

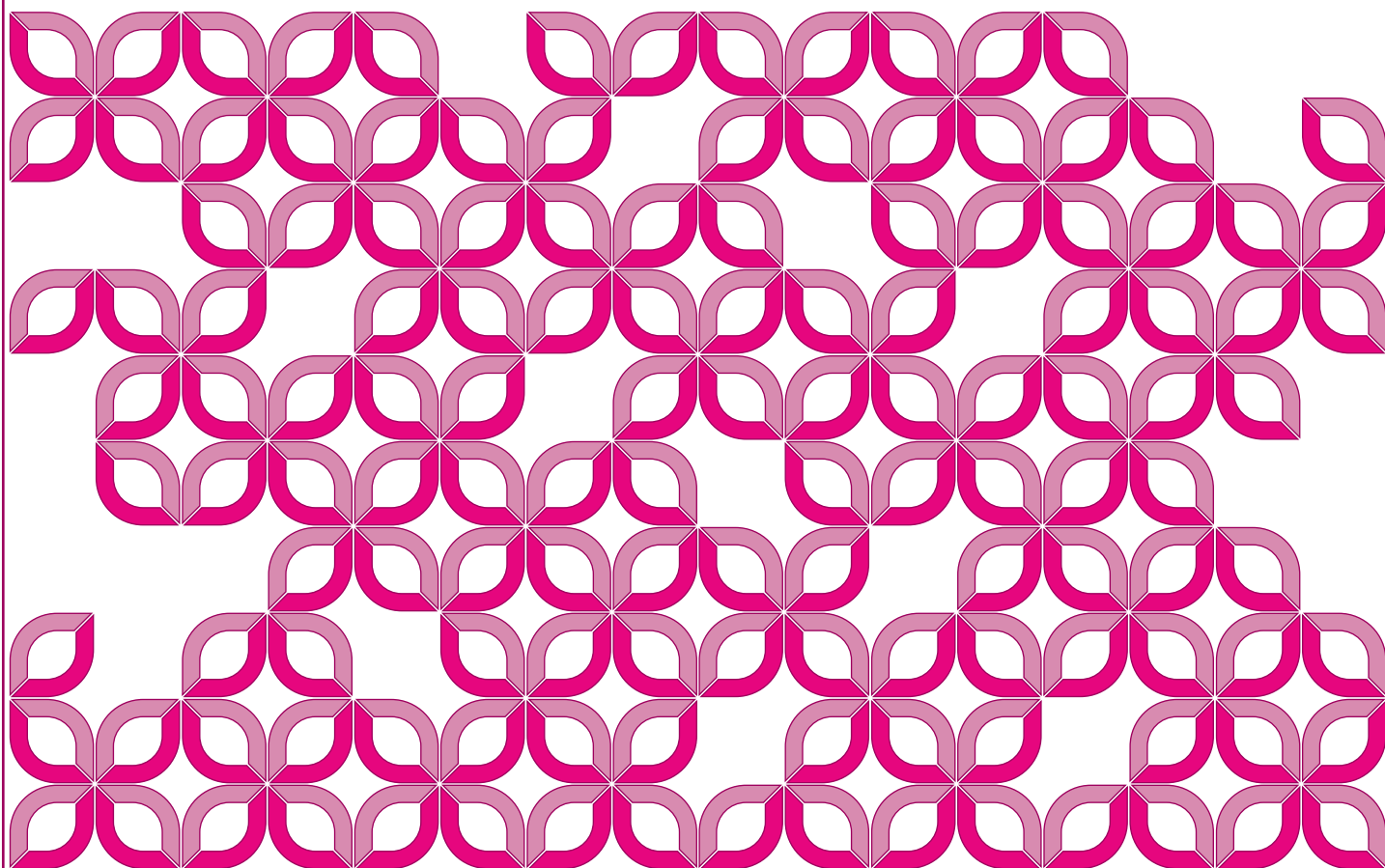
27

школа-конференция
МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ



БИОЛОГИЯ
наука XXI века

Сборник тезисов



Пушино, 22-25 апреля 2024 г.

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

С23 Сборник тезисов 27-й Пушкинской школы-конференции молодых ученых с международным участием «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА».
Пушино: ФИЦ ПНЦБИ РАН, 2024. – 428 с.

С 22 по 25 апреля 2024 года в г. Пушкино проходила 27-я Пушкинская школа-конференция молодых ученых с международным участием «Биология – наука XXI века». На конференции были рассмотрены новейшие достижения и результаты исследований молодых ученых, специализирующихся в различных областях биологической науки. Были проведены мастер-классы и пленарные лекции ведущих ученых. В сборнике представлены тезисы 382 докладов участников конференции по следующим направлениям:

- молекулярная биология и биоинформатика;
- клеточные технологии;
- микробиология и вирусология;
- физиология животных и биомедицина;
- физиология растений и фотобиология;
- экология и почвоведение;
- цифровизация здравоохранения и медицинская биоинформатика.

Публикуется в авторской редакции

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

© Коллектив авторов
© Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ И БИОИНФОРМАТИКА	4
КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ	101
МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ	167
ФИЗИОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ И БИОМЕДИЦИНА	245
ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ И ФОТОБИОЛОГИЯ	352
ЭКОЛОГИЯ И ПОЧВОВЕДЕНИЕ	372
ЦИФРОВИЗАЦИЯ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И МЕДИЦИНСКАЯ БИОИНФОРМАТИКА	407
АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ	415

Секция 1

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ И БИОИНФОРМАТИКА

ПОИСК РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В 5' И 3' UTR РНК НОВОГО KINDIA TICK VIRUS И ПОЛУЧЕНИЕ ИХ ПОЛНОРАЗМЕРНЫХ СИНТЕТИЧЕСКИХ ДНК КОПИЙ

Алхиреенко Д.А.^{1,2}, Цишевская А.А.^{1,2}, Гладышева А.В.¹

¹Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Россия

²Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Новосибирск, Россия

darya.a.00@yandex.ru

Вирусы используют системы клеток-хозяев для реализации собственной генетической информации и приобрели различные механизмы, позволяющие им конкурировать с клеточными мРНК. Важную роль в реализации генетической информации вирусов играют 5' и 3' нетранслируемые регионы (5' и 3' UTR), которые сворачиваясь в определенную вторичную структуру действуют как цис-элементы для транскрипции, трансляции и упаковки вирусного генома. Kindia tick virus (KITV) недавно обнаруженный флавиподобный вирус с необычным устройством генома, структура и роль 5' и 3' UTR вирусной РНК в реализации его генетической информации на сегодняшний день фактически полностью остаются неизученными.

В данной работе впервые были получены модели вторичных структур 5' и 3' UTR РНК двух изолятов Kindia tick virus и выявлены регуляторные элементы характерные для ортофлавириусов. В 1-3 сегментах были обнаружены ортофлавириусные регионы 5' DAR и 3' DAR, которые отвечают за циклизацию генома перед репликацией. В 5' UTR всех сегментов найден регион 5'-GCAC-3', с которым связывается белок La для стабилизации репликативного комплекса. В 3' UTR сегмента 1 обнаружен высококонсервативный ортофлавириусный пентануклеотид 5'-CACAG-3', который у флавириусов участвует в репликации генома. Полученные результаты показывают эволюционную связь между несегментированными и сегментированными вирусами семейства *Flaviviridae*, однако этой информации недостаточно для определения механизмов реализации генетической информации у вирусов с сегментированным геномом.

Для получения экспериментальных данных о структуре 5' и 3' UTR были собраны полноразмерные ДНК копии нетранслируемых регионов РНК всех четырех сегментов KITV с помощью ПЦР с перекрытием, их длина составила от 91 до 352 нуклеотидов. Поскольку кристаллизовать отдельно РНК затруднительно, в последовательности 5'-3' UTR РНК KITV была добавлена стеблевая петля размером 18 нуклеотидов, взаимодействующая с белком оболочки фага MS2. Белок MS2 является удобной моделью для структурных исследований комплексов белок-РНК. Связывание белка с РНК происходит за счет образования в ней специфичной вторичной структуры в виде шпильки. Дизайн последовательностей производили в UNA Mfold и Vienna RNA fold таким образом, чтобы не изменить исходную вторичную структуру 5'-3' UTR. Для сохранности собранных синтетических последовательностей и последующего получения их транскриптов, ДНК копии 5'-3' UTR KITV были клонированы в плазмидный вектор рJET. Также из перекрывающихся олигонуклеотидов был собран синтетический ген, кодирующий белок оболочки фага MS2. После чего была получена рекомбинантная плазмидная ДНК рEASY- MS2, обеспечивающая синтез белка оболочки фага MS2 в прокариотической системе клеток.

Далее планируется кристаллизация полученного комплекса MS2 белок – UTR РНК KITV и его рентгеноструктурный анализ. Это позволит экспериментально подтвердить их структуру и установить роль 5'-3' UTR вирусной РНК при реализации генетической информации новых флавиподобных вирусов с сегментированным геномом.

ПОЛУЧЕНИЕ МИНИМАЛЬНОГО ФРАГМЕНТА EIF4G *SOLANUM TUBEROSUM*,
СПОСОБНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВОВАТЬ С EIF4E

Андрейцев В.В.^{1,2}, Колесникова В.В.¹, Никонова Е.Ю.¹, Никонов О.С.¹

¹Институт белка РАН, Пушино, Россия

²Волгоградский государственный университет, Волгоград, Россия

yvlad.andr@gmail.com

eIF4G является одним из основ белков, участвующих в инициации трансляции у эукариот. Он является платформой для формирования комплекса 4F и содержит сайты связывания eIF4E, eIF4A, PABP и мРНК. Несмотря на то, что известно множество примеров использования факторов инициации трансляции, входящие в состав комплекса eIF4F растений, вирусами растений, они менее изучены, чем их гомологи у представителей царства Животные. Определение механизма взаимодействия вирусов с факторами инициации трансляции растений ляжет в основу создания вирусоустойчивых сортов. Мы планируем определить минимальный фрагмент eIF4G картофеля (*Solanum tuberosum* St), способного образовывать комплекс с eIF4E. Это послужит отправной точкой для дальнейших структурных исследований компонентов как растительного, так и вирусного инициаторных комплексов.

В данной работе представлены результаты по получению минимального фрагмента St eIF4G. Нами были получены две кодон-оптимизированные генетические конструкции, кодирующие целевой фрагмент без каких-либо тагов и фрагмент с 6 гистидина для облегчения очистки. На данный момент подобраны условия индукции синтеза белка с 6 гистидинами в штамме *E. coli* BL21 (DE3). Эти условия позволяют получить белок в растворимой форме. Нами была разработана схема очистки данного белка.

Для подбора условия кристаллизации был использован коммерческий набор MIDASplus, так как он считается универсальным и подходит для кристаллизации белков, белок-белковых комплексов и др., на данный момент получены первые кристаллы. Для качественной проверки полученных кристаллов мы использовали несколько тестов: окрашивание кристаллов (IzIt) и ПААГ в денатурирующих условиях для одного из кристаллов. В ближайшее время мы проверим качество полученных кристаллов с помощью PCA.

ДИНАМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МУТАНТНЫХ ФОРМ ЭНДОЛИЗИНА
БАКТЕРИОФАГА RB49 ПО ДАННЫМ ^{15}N РЕЛАКСАЦИИ

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

¹Филиал Института биоорганической химии РАН, Пушино, Россия

²Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушино, Россия

arkatsachndir@gmail.com

Осуществление акта катализа ферментом сопровождается структурными перестройками белковой глобулы и представляет собой динамический процесс. Динамическое описание структурных переходов является ключом к пониманию механизмов, лежащих в основе сворачивания и стабильности белков, распознавания лигандов, аллостерической регуляции и катализа.

ЯМР является уникальным аналитическим инструментом молекулярной биологии, способным предоставить информацию о структуре, динамике и электронном окружении практически любого ядра в молекуле, даже такой сложной, как белок. Более того, методы ЯМР позволяют изучать молекулы в их естественной среде – растворе, используемые сенсорные группы не вызывают каких-либо структурных возмущений, а приложенные магнитные поля настолько слабы по сравнению с тепловой энергией, что не влияют на молекулярную структуру или динамику.

Для исследований динамики белков общепринятым сенсором является группа NH. Группа NH в хорошем приближении представляет собой изолированную спиновую пару. Она удобно расположена и широко представлена в основной цепи белка (за исключением остатков пролинов). Эти обстоятельства в сочетании с хорошим разрешением сигналов ЯМР в корреляционных спектрах ^1H - ^{15}N позволяют охватить наблюдением локальную подвижность основной цепи в районе практически каждого аминокислотного остатка. При этом обогащение белка стабильным изотопом ^{15}N является относительно простым и доступным.

В настоящей работе было исследовано изменение локальной динамики полипептидной цепи пептидазы бактериофага RB49 в ответ на введенные мутации важного для катализа консервативного остатка триптофана-109: W109F и W109A. Ранее было показано, что замена на фенилаланин позволила мутантному ферменту сохранить 40% от активности природного белка, при этом активность аланинового мутанта упала в 20 раз.

Для детального анализа динамики измененных белковых глобул были получены ^{15}N обогащенные препараты обоих мутантов W109F и W109A. Для этого клетки экспрессионного штамма *E. coli* C41(DE3), трансформированные плазмидами с соответствующими генами, выращивали на минимальной среде M9, в которой в качестве источника азота использовали $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$. Далее белки очищали до гомогенности хроматографическими методами. Наборы данных (^1H - ^{15}N – NOESY, ^1H - ^{15}N T₁ и ^1H - ^{15}N -T₂) для исследования динамики получали на ЯМР спектрометре Avance III 600 (Bruker). Для уточнения отнесения были получены и использованы 3D ^{15}N – NOESY и 3D ^{15}N – TOCSY спектры.

Сравнительный анализ изменений динамики мутантов показал, что увеличение локальной подвижности аланинового мутанта W109A в районе замены более выражено, чем у фенилаланинового W109F, что отражает уровень локальной дестабилизации белковых глобул в области активного центра. Корреляция падения ригидности активного центра с падением активности мутантов свидетельствует о роли остатка триптофана-109 в формировании каталитически активной пространственной структуры с оптимальной динамикой, необходимой для осуществления акта гидролиза. Дальнейшее изучение зависимости локальных изменений динамики от факторов среды (pH, ионная сила) поможет пролить свет на детали процесса катализа.

Работа поддержана грантом РФФ № 23-24-00210.

ВЛИЯНИЕ НОКДАУНА MAML1 В ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ НА ОСТЕОГЕННУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ КЛЕТОК МЕЗЕНХИМНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Басович Л.С.^{1,2}, Малашичева А.Б.¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

²Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

L.Basovich@yandex.com

Внутриклеточный сигнальный путь Notch влияет на основные клеточные процессы, такие как пролиферация, дифференцировка и апоптоз. Рецепторы Notch (Notch1-4) активируются при связывании с лигандами Delta-like или Jagged (Dll1, 3 и 4, Jag1-2), что приводит к протеолитическому отщеплению внутриклеточного домена Notch рецептора (NICD), который транспортируется в ядро и взаимодействует с транскрипционными факторами семейства CSL и MAML.

Белок Mastermind-like 1 (MAML1) является транскрипционным ко-активатором сигнального пути Notch, а уровень его экспрессии способен влиять на передачу сигналов в зависимости типа клеток и стадии дифференцировки. Было показано, что MAML1 усиливает активность фактора транскрипции Runx2, имеющего важное значение для дифференцировки и пролиферации остеобластов.

Целью исследования являлся анализ влияния нокдауна транскрипционного ко-активатора MAML1 в эндотелиальных клетках на остеогенную дифференцировку клеток мезенхимного происхождения при совместном культивировании. Ингибирование экспрессии MAML1 осуществлялось методом РНК-интерференции путем лентивирусной трансдукции эндотелиальных клеток пуповинной вены человека (HUVeC) короткой шпилечной РНК. Аналогичным методом производился нокдаун MAML1 в клетках мезенхимного происхождения (первичных остеобластах человека, гингивальных фибробластах). Инициация остеогенной дифференцировки осуществлялась по стандартному протоколу добавлением 100 нМ дексаметазона, 50 мкМ аскорбиновой кислоты и 10 мМ β-глицерофосфата в питательную среду. Уровень экспрессии генов оценивали методом ПЦР в реальном времени, остеогенная дифференцировка была проанализирована с помощью окраски ализариновым красным.

Нокдаун MAML1 в эндотелиальной клеточной линии приводит к подавлению некоторых компонентов сигнального пути Notch: генов *hNOTCH1*, *DLLA*, *JAG1*, однако не вызывает ингибирование экспрессии таргетного гена – *HEY1*. В случае со-культивирования эндотелиальных клеток с нокдауном MAML1 с интактными клетками мезенхимного происхождения наблюдается подавление остеогенной дифференцировки. При нокдауне MAML1 в клетках мезенхимного происхождения не наблюдается остеогенная дифференцировка, что потенциально связано с действием Runx2.

Исследование выполняется при финансовой поддержке гранта РФФИ № 23-15-00320.

ВЛИЯНИЕ ПРЕДПОЛАГАЕМОЙ РНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ NSUN7 НА СПЕРМАТОГЕНЕЗ У МЫШЕЙ

Буев В.С.^{1,2}, Гусева Е.А.^{2,3}, Сергиев П.В.^{2,3}

¹Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

²НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского
МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³Сколковский институт науки и технологий, Сколково, Россия

vittaria.fern@gmail.com

В мире 7% мужчин сталкиваются с диагнозом бесплодие вследствие снижения количества и/или подвижности сперматозоидов. Мутации в генах сперматогенеза часто ассоциированы с бесплодием. Одним из таких генов является гипотетическая m5C РНК метилтрансфераза NSUN7, принадлежащая к семейству NOL1/Nop2/Sun метилтрансфераз. NSUN7 является последним представителем данного семейства, для которого неизвестна функция его метилирования. Однако было показано, что мутации в гене *Nsun7* приводят к нарушению подвижности сперматозоидов у людей и мышей, вследствие чего самцы становятся стерильными.

Для изучения молекулярного механизма функционирования NSUN7 мы получили линию мышей с нокаутом *Nsun7* (*Nsun7*^{-/-}) и линию, содержащую аминокислотную замену одного из каталитических цистеинов на аланин (*Nsun7*^{C→A}). Согласно предполагаемому механизму реакции, внесенная замена должна приводить к образованию РНК-белкового ковалентного конъюгата *in vivo*. При исследовании фенотипов мышей мы наблюдали значительное нарушение подвижности сперматозоидов *Nsun7*^{-/-}, в то время как самцы *Nsun7*^{C→A} демонстрировали нормальный фенотип. Для выяснения причин этих дефектов мы подробно исследовали ультраструктуру сперматозоидов *Nsun7*^{-/-} и обнаружили, что изменился паттерн прикрепления продольных колонн фиброзной оболочки к аксонеме.

Нормальный фенотип мышей *Nsun7*^{C→A} может быть объяснен изменением механизма реакции метилирования. Анализ последовательностей ортологов NSUN7 выявил 3 мотива (IV, VI, VIII) с высоко консервативными цистеинами. Согласно молекулярному моделированию структуры NSUN7, все эти мотивы расположены в активном центре белка. Таким образом, цистеин мотива VIII, который присутствует исключительно в NSUN7, может играть роль в катализе.

Помимо этого, мы выявили белкового партнера NSUN7 – C19ORF81, у которого, согласно автоматической аннотации, есть РНК-узнающий мотив. Самцы мышей нокаутных по гену *C19orf81* проявляют такой же фенотип, как и *Nsun7*^{-/-}, и электронная микроскопия жгутиков также подтвердила изменение паттерна прикрепления продольных колонн фиброзной оболочки к аксонеме.

Работа поддержана грантом РФФ №21-64-00006.

РАЗНООБРАЗИЕ И МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ ОЗЕРА БАЙКАЛ ПО ДАННЫМ МЕТАБАРКОДИНГОВЫХ И МЕТАГЕНОМНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Букин С.В., Ломакина А.В., Черницына С.М., Захаренко А.С.,
Павлова О.Н., Земская Т.И.**

Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, Россия

sergeibukin@lin.irk.ru

Микробиологические исследования донных отложений озера Байкал проводятся с начала прошлого столетия с использованием подходов и методов, характерных для определенных временных периодов. Ранние работы доказали, что развитие различных физиологических групп микроорганизмов в донных отложениях озера преимущественно определяется доступностью субстратов, окисленными или восстановленными условиями среды, а также поступлением газосодержащих минерализованных флюидов из глубин осадочной толщи. В последние годы, применение молекулярно-биологических и биоинформатических методов позволило с высоким разрешением оценить характер изменений в составе и функциональных характеристиках микробных сообществ, населяющих различные экотопы.

В данной работе проведён анализ данных высокопроизводительного секвенирования (Illumina) фрагментов гена 16S рРНК бактерий (регион V2-V3, 78 образцов) и архей (регион V5-V6, 75 образцов) из донных отложений грязевых вулканов, нефте-метановых сипов и зон спокойного осадконакопления, отобранных в период с 2018 по 2023 годы. Полученные данные подтвердили достоверные различия бета-разнообразия между сообществами восстановленных и окисленных слоёв донных отложений во всех экотопах (ANOSIM $R^2=0.792-0.805$, $p_{value} < 0.001$). Общей чертой сообществ окисленных осадков являлась высокая относительная численность представителей таксонов *Gammaproteobacteria*, *Desulfobacterota*, *Methylomirabilota*, *Verrucomicrobiota*, *Planctomycetota* и *Nitrososphaeria*. Микробные популяции восстановленных донных отложений характеризовались значительной долей *Atribacterota*, *Caldisericota* и *Bathyarchaeia*. Между экотопами сообщества в большей степени различались на уровне таксонов низкого ранга.

По результатам метагеномного анализа, на примере образцов из зоны спокойного осадконакопления и грязевого вулкана южной котловины оз. Байкал, показаны различия функциональных характеристик сообществ различных экотопов в значительной степени отражающие различия физико-химических параметров среды. Метаболический потенциал микробиомов был оценен по соотношению количества реконструированных генов основных метаболических путей к количеству генов ДНК-зависимой АТФазы (*recA/radA*). В метагеноме поверхностных газонасыщенных илов грязевого вулкана, обнаружена значительная доля генов путей Вуда-Льюнгаля (*fdhAB*, *cooSF*, *acsBCD*), 3-гидроксипропионатного пути (*ppc*, *pps*, *porABCDG*) и обратного цикла трикарбоновых кислот (*aclAB*, *icd*, *korABCD*), а также генов ассимиляционной (*cysH*, *aprAB*) и диссимиляционной сульфатредукции (*dsrAB*). Для метагенома окисленных илов фонового района, напротив, отмечена высокая доля генов ферментов, ответственных за различные этапы окисления углеводов (окислительное фосфорилирование, гликолиз), а также ферментов SOX-системы окисления тиосульфата, сульфит оксидазы (*fssAB*) и окисления метанола (*mxaAB*), тогда как относительная доля ключевых генов путей автотрофной фиксации CO₂ была невелика. Общей отличительной

особенностью метагеномов поверхностных слоёв донных отложений оз. Байкал, в сравнении с другими пресноводными озёрами, являлась относительно большая доля генов метаболизма азота, обеспечивающих процессы нитрификации (*amoAB*, *hao*), денитрификации (*narAB*, *narGHI*, *nirKS*, *norBC*, *nosZ*) и восстановления нитрита (*nirBD*, *nrfAH*).

Экспедиционные работы и метабаркодинговые исследования выполнены в рамках государственного задания ЛИН СО РАН, финансируемого Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (НИОКТР 121032300223-1 [0279-2021-0006]), метагеномный анализ проведён при поддержке проекта РФФ №22-14-00084.

МЕТИЛИРОВАНИЕ ПРОМОТОРА ГЕНА SIRT1 В ОБРАЗЦАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ПЕРВЫМ ПСИХОТИЧЕСКИМ ЭПИЗОДОМ ШИЗОФРЕНИИ

**Буртовская М.И.¹, Карпова Н.С.², Орлова Ю.В.¹, Нурбеков М.К.²,
Аршинова Е.С.², Архипов А.Ю.³**

¹Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова, Ярославль, Россия

²Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва, Россия

³Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

m.burtovskaya@gmail.com

Шизофрения – психическое расстройство, характеризующееся сочетанием продуктивной и негативной симптоматики, поведенческих и когнитивных нарушений. В Центральном федеральном округе шизофрения затрагивает ~0,37% населения на пике продуктивности и социального роста, лишая дееспособности.

Около 50% пациентов с шизофренией имеют коморбидную депрессию. Исследования полногеномных ассоциаций выявили ассоциацию полиморфизма rs3758391 гена SIRT1 с тяжестью депрессивных симптомов у пациентов с шизофренией. Сиртуин 1 (SIRT1) – никотинамид (NAD⁺)-зависимая деацетилаза, которая участвует в гомеостазе глюкозы, передаче дофаминергических сигналов, репарации ДНК, апоптозе, старении и регуляции иммунных реакций. Luo and Zhang (2016) выявили, что низкие уровни мРНК SIRT1 в плазме крови у пациентов с шизофренией связаны с депрессивными симптомами. Одной из причин снижения уровня мРНК SIRT1 может выступать метилирование его промотора. Поскольку прием антипсихотиков может влиять на уровень метилирования, мы сосредоточились на изучении уровня метилирования промотора гена SIRT1 у пациентов с первым психотическим эпизодом шизофрении до приема антипсихотиков.

Забор венозной крови осуществлялся у 33 пациентов с шизофренией и 20 лиц без психических отклонений, а также онкологических и аутоиммунных заболеваний любой локализации. Выделение ДНК проводили методом фенол-хлороформной экстракции с последующей бисульфитной конверсией. Уровень метилирования оценивался с помощью метил-специфичной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ), условия ПЦР-РВ были взяты из статьи Gigeck С.О. и коллег (2014). Последовательность праймеров были взяты из статьи Islam S. и коллег (2020). Каждый образец анализировался трижды. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (SD). Уровень метилирования рассчитывался в процентах (%) по формуле, представленной в статье Islam S. и коллег (2020). Поскольку данные имели распределение отличное от нормального, согласно критерию Колмогорова-Смирнова, группы сравнивались с помощью критерия Манн-Уитни. Корреляцию между возрастом и уровнем метилирования промотора SIRT1 анализировали с помощью коэффициента корреляции Спирмена.

В ходе исследования мы сравнили опытную и контрольную группы. В результате не было выявлено статистически значимых различий между уровнями метилирования промоторной области гена SIRT1 в экспериментальной и контрольной группах ($1,97 \pm 3,67\%$ против $1,16 \pm 1,16\%$ p -value=0,38). Также мы не обнаружили корреляции между уровнями метилирования промоторной области SIRT1 и возрастом при анализе всех образцов ($R_s=0,09$, p -value=0,49) и отдельно контрольной и экспериментальной групп ($R_s=0,09$, p -value=0,72 против $R_s=0,09$, p -value=0,62).

Можно заключить, что промотор гена SIRT1 практически неметилирован в проанализированных образцах (процент метилирования для всей выборки составил $1,62 \pm 3\%$). Более того, в общей выборке только 7% людей были старше 60 лет, следовательно, мы не могли наблюдать возраст-зависимое увеличение метилирование промотора гена SIRT1. Данные результаты объясняются важностью участия сиртуина 1 в регуляции ключевых клеточных процессов. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что метилирование промоторной области гена SIRT1 не связаны с первым психотическим эпизодом шизофрении.

АНАЛИЗ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ РЕКОМБИНАНТНЫХ
АРОМАТИЧЕСКИХ О-ДЕМЕТИЛАЗ P450

Валиахметов Э.Э., Кунгуров Г.А., Суханов А.Ю., Трахтман Н.В., Валидов Ш.З.

ФИЦ Казанский научный центр РАН, Казань, Россия

emlvaliakhmetov@yandex.ru

Лигнин является вторым по распространенности биополимером в мире, который ввиду недостаточной эффективности его использования и переработки, не используется в должной мере. Гидролиз лигнина приводит к образованию значительного количества гваякольного и синринголового типа мономеров, которые должны быть О-деметилованы для получения продуктов, пригодных для использования в химической промышленности. Реакция О-деметилирования, катализируемая О-деметилазами типа цитохромов P450, является реакцией «бутылочного горлышка» в пути деградации лигнина. Несмотря на это, количество охарактеризованных О-деметилованных все еще невелико. Изучение данных ферментов с различной субстратной специфичностью в отношении ароматических соединений, позволило бы, с помощью белковой инженерии, создать О-деметилованные, для эффективной утилизации лигнина.

К наиболее привлекательным ферментам данного семейства ввиду их широкой специфичности относят GcoA, AgcA и SyoA. Данные белки были экспрессированы и очищены в системе *E. coli* для дальнейшего изучения их свойств и структуры. Оптимизированные последовательности генов (*gcoA*, *agcA* и *syoA*) были синтезированы и клонированы в экспрессионный вектор pET-GB1a. Экспрессию проводили в штамме BL21(DE3) pLysS при 37°C и 200 об/мин в течение 4 часов. Целевой белок очищали методами афинной и эксклюзионной хроматографии. Выход белка на 1 л культуры при этом составил более 50 мг для каждого исследуемого белка. Чистота образцов составила не менее 95%. Для определения субстратной специфичности ферментов был проведен анализ спектрофотометрической характеристики каждого фермента до и после добавления субстратов (гваякол, крезол, синрингол, 2-метокси-4-пропилфенол, 4-гидрокси-3-метоксифенилацетон и 3,5-диметокси-4-гидроксиацетофенон). Как и в других P450, в исследуемых ферментах при связывании с субстратом происходит перегруппировка d-орбитальных электронов и образование пятивалентной формы железа, что сопровождается смещением пика поглощения белков из области 430 нм (пик Core) в область 390 нм. Из полученных данных следует, что GcoA связывает все тестируемые субстраты кроме 3,5-диметокси-4-гидроксиацетофенона; AgcA оказался способен связывать крезол и 2-метокси-4-пропилфенол; SyoA, в свою очередь, не показал значительных изменений спектра поглощения, за исключением связывания с 3,5-диметокси-4-гидроксиацетофеноном, при взаимодействии с которым наблюдалось смещение пика Core (около 40%). Таким образом, выделенные препараты белков могут быть использованы для получения данных о структурах и дальнейшего исследования их каталитических свойств.

Работа выполнена в рамках проекта «Разработка рекомбинантного штамма на основе *Pseudomonas putida* PCL1760 для биокаталитической трансформации ароматических производных лигнина», финансируемого Министерством Науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2022-254 от 17.06.2022 г.).

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АМИЛОИД FXR1 ВКЛЮЧАЕТСЯ В СОСТАВ НЕЙРОНАЛЬНЫХ СТРЕСС-ГРАНУЛ В ОТВЕТ НА ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС И ТЕПЛОВЫЙ ШОК

Валина А.А.^{1,2}, Юзман А.К.², Розенман В.А.², Белашова Т.А.^{1,3}, Галкин А.П.^{1,2}

¹Санкт-Петербургский филиал Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН,
Санкт-Петербург, Россия

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

³Санкт-Петербургский Государственный Университет, Лаборатория биологии амилоидов,
Санкт-Петербург, Россия

annavalina@mail.ru

Амилоиды представляют собой белковые фибриллярные агрегаты, имеющие кросс-бета структуру. Помимо патологических амилоидов, приводящих к развитию амилоидозов, с каждым годом пополняется список так называемых функциональных амилоидов. В нашей лаборатории был идентифицирован функциональный амилоид коры головного мозга позвоночных животных – белок FXR1. Однако вопрос о функциональной значимости формирования амилоидной конформации белком FXR1 в нейронах головного мозга остается открытым.

Известно, что в норме FXR1 связывается с 3'-нетранслируемой областью мРНК млекопитающих, что способствует деградации или стабилизации транскриптов. Одной из репрессируемых FXR1 мишеней является мРНК цитокина TNF α , который запускает каскад синтеза других цитокинов и ростовых факторов в ответ на воспалительную реакцию. При нейродегенеративных заболеваниях, таких как болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона, уровень продукции TNF α резко возрастает. На основании этого мы предполагаем, что при стрессе FXR1 может инактивироваться в составе стресс-гранул (СГ) – цитоплазматических включений, собирающихся вокруг основных компонентов аппарата трансляции при клеточном стрессе. Это, в свою очередь, запускает трансляцию связанной с FXR1 мРНК, обеспечивая тем самым быстрый ответ на неблагоприятные воздействия. В данной работе мы проанализировали влияние различных стрессовых условий на уровень агрегации белка FXR1 в культуре клеток нейробластомы человека SH-SY5Y, а также оценили колокализацию FXR1 с белками нейрональных стресс-гранул в дрожжевой модельной системе.

На клеточной линии нейробластомы человека SH-SY5Y с помощью иммуноцитохимического окрашивания было показано, что окислительный стресс, вызванный метаарсенитом натрия (NaAsO₂; 0,5 и 3 мМ, 1 ч), и тепловой шок (+43°C, 0,5 ч) способствуют сборке агрегатов FXR1 в крупные цитоплазматические гранулы, колокализирующиеся с коровыми белками СГ, FMRP и FXR2. Доля клеток со СГ составила 87,4%, 88,8% и 90,7% для условий 0,5 мМ, 3 мМ NaAsO₂ и +43°C, соответственно, и была статистически значимо выше по сравнению с контролем (12,9%; p-value <0,05). Обработка провоспалительным цитокином TNF α (300 и 1300 нг/мл, 1 ч) не приводила к статистически значимому увеличению числа СГ (12,9% и 16,3%, соответственно). На возможность физического взаимодействия FXR1 с белками FMRP и FXR2 также указывает высокая степень колокализации этих белков в дрожжевой модельной системе (94% и 73%, соответственно), полученная путем гетерологичной продукции белков интереса, слитых с репортерной последовательностью флуоресцирующего белка.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что при некоторых типах острого стресса в нейрональных клетках включаются механизмы образования стресс-гранул. Мы предполагаем, что включение в них амилоидных фибрилл белка FXR1, в свою очередь, активирует трансляцию мРНК цитокина TNF α , запускающего воспалительные реакции в головном мозге.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 22-24-00451.

ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫЕ МОДИФИКАЦИИ БЕТА-АМИЛОИДА ВЛИЯЮТ НА ЕГО ТРАНСПОРТ ЧЕРЕЗ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКИЙ БАРЬЕР

Варшавская К.Б., Петрушанко И.Ю., Митькевич В.А., Барыкин Е.П., Макаров А.А.

Институт молекулярной биологии им. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

kseniya.varshavskaya@ya.ru

Болезнь Альцгеймера (БА) является наиболее распространенным нейродегенеративным заболеванием. Данное заболевание характеризуется различными патологическими маркерами в головном мозге, одним из которых является накопление бета-амилоидного пептида (A β). A β способен претерпевать различные посттрансляционные модификации, которые изменяют его патогенные свойства. Известно, что A β экспрессируется не только в головном мозге, но и в периферических тканях. Так, A β может попадать в мозг из кровообращения путем связывания с RAGE и способствовать патологии БА. Однако транспорт модифицированных форм A β через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) ранее не изучался. Здесь мы охарактеризовали транспорт фосфорилированного (pS8-A β ₄₂) и изомеризованного (isoD7-A β ₄₂) A β через ГЭБ по сравнению с немодифицированным A β .

Для исследования транспорта A β и его изоформ использовали *in vitro* модель ГЭБ, представляющую собой эндотелиальные клетки головного мозга мыши bEnd.3, высеченные на мембрану трансвелл. Транспорт изоформ A β оценивали с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). Ингибиторы эндоцитоза и антагонисты RAGE использовали для характеристики механизмов транспорта A β и его изоформ. Эндотелиальную проницаемость оценивали с помощью флуоресцеина натрия. Также с помощью микротермофореза определяли параметры взаимодействия A β и его изоформ с RAGE.

Было показано, что isoD7-A β ₄₂ и pS8-A β ₄₂ лучше проникают через ГЭБ, чем немодифицированный A β ₄₂. Транспорт всех изоформ зависит от кавеолина, но транспорт isoD7-A β ₄₂ зависит как от кавеолин-, так и от клатрин-опосредованного эндоцитоза. Антагонист RAGE ингибирует транспорт A β ₄₂ и его изоформ, но влияние этого ингибитора на прохождение pS8-A β ₄₂ было менее выраженным, чем для других изоформ. Также, было определено, что RAGE связывается с isoD7-A β ₄₂ на порядок слабее, чем с A β ₄₂. В лизатах клеток bEnd.3 были обнаружены более высокие уровни A β ₄₂ по сравнению с isoD7-A β ₄₂.

Таким образом, посттрансляционные модификации A β увеличивают скорость его транспорта через ГЭБ и модифицируют механизмы транспорта, что может иметь значение для патологии и лечения БА.

ПРОБЛЕМЫ, ВОЗНИКАЮЩИЕ ПРИ КОНТРОЛЕ КАЧЕСТВА ГЕНОМНЫХ
БИБЛИОТЕК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА
НА ПРИБОРЕ НАНОФОР 05

Ващенко К.Д.^{1,2}, Адельшина Э.В.^{1,2}

¹Центр химической инженерии, Национальный исследовательский университет ИТМО,
Санкт-Петербург, Россия

²Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург, Россия

KrisstinaVash@yandex.ru

Геномная библиотека – это набор двуцепочечных ДНК-фрагментов, подготовленных для последующего секвенирования на приборах массового параллельного секвенирования. Из-за высокой стоимости секвенирования на таких приборах предъявляются повышенные требования к качеству геномных библиотек: к значениям концентраций длин фрагментов ДНК библиотеки. Контроль качества геномных библиотек будем проводить с помощью секвенатора первого поколения НАНОФОР 05 в режиме неденатурированного электрофореза. При проведении анализа к геномной библиотеке добавляются два фрагмента ДНК (размерный стандарт) известной длины и концентрации, длина одного меньше, а другого больше диапазона длин фрагментов библиотеки. Концентрация этих фрагментов должна быть подобрана таким образом, чтобы на итоговой электрофореграмме интенсивность пиков размерного стандарта превышала интенсивность шума. В результате получаем распределение концентраций длин фрагментов ДНК в геномной библиотеке.

Работа посвящена изучению проблем, возникающих при контроле качества геномных библиотек с использованием метода капиллярного электрофореза на приборе Нанофор 05.

В ходе работы были выявлены следующие проблемы:

1. При низкой концентрации пики размерного стандарта будут идентифицированы как шум и не будут обработаны математическим аппаратом.
2. При высокой концентрации интенсивность пиков будет зашкаливать и выходить за область допустимых значений прибора в результате будут ошибки в определении концентраций длин фрагментов геномной библиотеки.
3. При добавлении к геномной библиотеке фрагментов, длина которых входит в диапазон длин фрагментов библиотеки, наблюдается утрата информации о пиках библиотеки, чья длина близка к длине добавленных фрагментов.
4. На некоторых электрофореграммах наблюдаются дополнительные пики меньшей интенсивности вблизи пиков известной длины, подобное явление объясняется появлением артефактов на этапе полимеразной цепной реакции при приготовлении библиотеки. Подобные пики детектируются математическим аппаратом, однако на качество анализа геномных библиотек не влияют.

В ходе работы были определены оптимальные концентрации размерного стандарта, которые позволяют получать распределение концентраций длин фрагментов ДНК геномной библиотеки для оценки качества библиотеки.

ОБРАЗОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ ГЕМОЛИЗИНА II *BACILLUS CEREUS* С
УКОРОЧЕННЫМИ ФОРМАМИ HlyIICTD И HlyIIILCTD

**Ветрова О.С.^{1,3}, Руденко Н.В.¹, Каратовская А.П.¹, Замятина А.В.¹, Нагель А.С.²,
Андреева-Ковалевская Ж.И.², Сиунов А.В.², Бровко Ф.А.¹, Солонин А.С.²**

¹Филиал федерального государственного бюджетного учреждения науки Института
биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
Пушино, Россия

²Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических
исследований Российской академии наук», Институт биохимии и физиологии
микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина, РАН, Пушино, Россия

³Пушкинский филиал федерального государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего образования «Российский биотехнологический университет»
(РОСБИОТЕХ), Пушино, Россия

olesja.wetrowa1999@gmail.com

Гемолизин II (HlyII) – один из важнейших вирулентных факторов *Bacillus cereus*, относящийся к группе β-пороформирующих токсинов. С помощью моноклональных антител против С-терминального домена HlyII было показано, что экспрессия токсина сопровождается наличием его укороченных форм. Ранее нами были описаны укороченные формы HlyIICTD (HlyII Asp319-He412) и HlyIIILCTD (HlyII Met225-He412), функция которых пока не известна.

Иммуноферментным анализом (ИФА) и иммуноблоттингом показано, что в условиях, отличных от физиологических (рН 5.0), HlyIICTD способен взаимодействовать с полноразмерным токсином и образовывать комплексы с молекулярной массой около 62 кДа, устойчивые к кипячению, присутствию додецилсульфата натрия (SDS) и изменению рН до физиологических значений. В условиях, соответствующих физиологическим (фосфатно-солевой буфер, рН 7.4), образования комплексов не наблюдается.

ИФА с биотинилированной формой HlyIICTD показал, что механизм образования данных комплексов заключается в олигомеризации HlyIICTD, как с С-терминальным доменом в составе токсина, так и в виде отдельных молекул.

Образование комплексов «HlyII+HlyIIILCTD» выявлено только в физиологических условиях. Это взаимодействие отличается низкой аффинностью и не устойчиво при кипячении и в присутствии SDS.

Для понимания функции укороченных форм токсина в клетке было изучено их влияние на процесс гемолиза эритроцитов кролика, вызванный HlyII. В эксперименте использовался нативный функционально-активный HlyII и HlyII, подвергшийся закислению до рН 5.0 с последующей нейтрализацией, что приводило к снижению его гемолитической активности. Показано, что укороченные формы токсина не влияют на гемолиз эритроцитов кролика, вызванный нативным функционально-активным HlyII. Однако, инкубация HlyII с HlyIICTD (даже в следовых количествах) при рН 5.0 с последующей нейтрализацией реакционной смеси, приводила к полному ингибированию гемолиза.

Таким образом, исследование выявило, что HlyIICTD и HlyIIILCTD способны взаимодействовать с полноразмерным токсином в определенных условиях. Образование устойчивого комплекса HlyII с HlyIICTD при рН 5.0 приводит к ингибированию гемолиза эритроцитов. Эти результаты расширяют наше понимание роли укороченных форм токсина гемолизина II в регуляции его функции.

Работа поддержана грантом РФФ № 22-74-10026.

ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНЫХ МЕХАНИЗМОВ АКТИВАЦИИ РЕЦЕПТОРА
ИНСУЛИНОПОДОБНОГО ФАКТОРА РОСТА (IGF-IR) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
МУТАНТНЫХ ФОРМ РЕЦЕПТОРА

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

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

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

gavrilenkova.aa@phystech.edu

Рецептор инсулиноподобного фактора роста (IGF-IR) — это рецепторная тирозинкиназа, которая активируется инсулиноподобным фактором роста 1 и 2, а также инсулином. IGF-IR играет ключевую роль в росте, дифференцировке и старении клеток. На данный момент точные механизмы активации и передачи внутриклеточного сигнала семейства рецепторов инсулина не известны. Предполагается, что в неактивном состоянии ТМ-домены рецептора инсулиноподобного фактора роста находятся в конформации, препятствующей взаимодействию цитоплазматических частей молекулы. При связывании лиганда, конформация рецептора меняется, в результате внутриклеточные тирозинкиназные домены сближаются и фосфорилируют друг друга, вызывая клеточный ответ [1].

Для того, чтобы изучить роль трансмембранного домена в активации рецептора IGF-IR, нами были получены мутантные формы рецептора, содержащие двойные замены в трансмембранном домене. Клетки линии НЕК293 трансфицировали плазмидными конструкциями, кодирующими мутантные формы IGF-IR с заменами V941E-A942R; V948E-G949R; G949E-G950R. Затем клетки инкубировали в среде F-12, с добавлением инсулина, клеточные лизаты анализировали методом вестерн-блота. В результате эксперимента мы получили следующие данные. Мутантные формы IGF-IR V941E-A942R и V948E-G949R не экспрессировались в клеточной линии НЕК293. Двойная замена G949E-G950R приводила к фосфорилированию рецептора в отсутствие лиганда в отличие от рецептора дикого типа, который фосфорилируется только в присутствии IGF-I. Мы предполагаем, что двойная замена G949E-G950R приводит к стабилизации димера рецептора в активной конформации, за счет образования солевых мостиков в трансмембранном домене, и к автофосфорилированию рецептора в отсутствие лиганда.

Введение мутаций V941E-A942R и V948E-G949R в трансмембранном домене приводило к отсутствию детектируемой экспрессии рецептора. Поэтому мы решили сделать химерные конструкции, чтобы оценить влияние внесенных мутаций. Для этого мы заменили трансмембранный домен рецептора, подобного рецептору инсулина (IRR) на трансмембранный домен рецептора инсулиноподобного фактора роста (IGF-IR). Данные рецепторы принадлежат к одному семейству и имеют высокую гомологию трансмембранных участков. IRR активируется при повышении pH внеклеточной среды выше 8. В результате мутации V941E-A942R, V948E-G949R и G949E-G950R приводили к активации рецептора при значении pH 7,4, в отличие от рецептора дикого типа, который был активен только при pH 9,0.

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

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (РНФ), грант № 23-25-00298.

ВЛИЯНИЕ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО pH НА ФАЗОВУЮ СЕПАРАЦИЮ SUP35NM В *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ПРИ СТРЕССОВЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ

Гаврилов А.Е.¹, Горшенева Н.А.¹, Куличихин К.Ю.¹, Матвеев А.Г.², Рубель А.А.¹

¹Научная лаборатория биологии амилоидов СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

²Кафедра генетики и биотехнологии СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

havrilovalex02@gmail.com

Цитоплазматический pH ($pH_{\text{цит}}$) является важным параметром, оказывающим существенное влияние на жизнеспособность клеток и являющийся ключевым фактором для поддержания гомеостаза. Изменение $pH_{\text{цит}}$ может привести к изменению конформации белков, что приводит к изменению активности ферментов, мембранного транспорта. С другой стороны, снижение $pH_{\text{цит}}$ в результате стрессовых воздействий может выступать сигналом, запускающим фазовую сепарацию (конденсацию) белков.

В частности, при стрессовых воздействиях конденсируется дрожжевой белок Sup35 (фактор терминации трансляции eRF3). Т. Францманн с коллегами предположили, что основную роль в этом процессе играют NM-домены белка, а снижение $pH_{\text{цит}}$ является триггером для фазовой сепарации [1]. Однако, результаты исследования Б. Граймса и его коллег не поддерживают эту гипотезу [2].

Целью данного исследования является изучение влияния $pH_{\text{цит}}$ на фазовую сепарацию NM-доменов Sup35. Sup35NM был слит с красным флуоресцентным белком уTag-RFP-T и сверхпродуцирован в клетках *S. cerevisiae*. Клетки инкубировали в буферах с pH 5,0-7,0 или проводили гиперосмотический шок, затем визуализировали конденсаты Sup35NM с помощью флуоресцентной микроскопии. Вместе с тем измеряли $pH_{\text{цит}}$ *in vivo* с помощью радиометрического pH-чувствительного белка *sfpHluoGin*. Полученные нами данные показывают, что образование конденсатов Sup35NM при помещении клеток в буферы с pH 5,0-7,0 и при гиперосмотическом шоке не зависит от изменений $pH_{\text{цит}}$.

Исследование было выполнено при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (грант №20-14-00148-П), а также Санкт-Петербургского государственного университета (проект № 95444727).

1. Franzmann et al. (2018) *Science*, 359(6371):eaao5654

2. Grimes et al. (2023) *Biomolecules*; 13(9):eaao1370

ЧЕМ ОПАСЕН РАК ДЛЯ РАКА: ВЛИЯНИЕ КОРНЕГОЛОВОГО РАКООБРАЗНОГО
PELTOGASTER RETICULATA НА НЕРВНУЮ СИСТЕМУ ХОЗЯИНА *PAGURUS MINUTUS*
(СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ)

Голофеева Д.М.¹, Лянгузова А.Д.^{2,3}, Гафарова Е.Р.²,
Миролюбов А.А.^{2,3}, Нестеренко М.А.⁴

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

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

³Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург, Россия

⁴HiLIFE – Institute of Biotechnology, University of Helsinki, Хельсинки, Финляндия

golofeevad@gmail.com

Корнеголовые ракообразные (Cirripedia: Rhizocephala) высокоспециализированные паразиты, заражающие других ракообразных. Корнеголовые ракообразные демонстрируют уникальный пример манипулирования хозяином. Паразит оказывает влияние на морфологию, физиологию и поведение хозяина, меняя личиночный цикл и гормональный статус. Происходит паразитарная кастрация зараженной особи, в некоторых случаях наблюдается полное разрушение гонад. Кроме того, заражение хозяина-самца корнеголовым ракообразным приводит к феминизации: хозяин не только меняется внешне, но и демонстрирует поведенческие паттерны, свойственные вынашивающей потомство самке.

Эффективное манипулирование организмом хозяина связано с наличием специализированных сайтов контакта паразита с нервной системой зараженной особи. Интерна (часть тела корнеголового ракообразного, располагающаяся в гемоцеле хозяина) представляет собой систему трубковидных столонов. Некоторые из этих столонов прорастают в нервную ткань хозяина. Используя транскриптомный подход нами были изучены молекулярные процессы, лежащие в основе взаимодействия между корнеголовыми ракообразными *Peltogaster reticulata* и нервной системой раков-отшельников *Pagurus minutus*. Мы произвели сборку *de novo* транскриптома абдоминальных ганглиев зараженных и здоровых раков-отшельников обоих полов с использованием трех различных программ (Trinity, RNA-Bloom, и rnaSPAdes). Полученный референсный транскриптом содержит в себе последовательности, имеющие высокие показатели качества и полноты сборки.

Анализ дифференциальной экспрессии белок-кодирующих генов показал уменьшение количества активных биологических процессов как для зараженных самцов, так и для самок. У зараженных особей подавлены процессы, связанные с регуляцией иммунного ответа, размножения и жизненного цикла в целом. Таким образом наблюдаемые изменения фенотипа инфицированных животных подтверждаются молекулярно. При этом подавление процессов, связанных с размножением, происходит не через непосредственное воздействие на репродуктивные органы, а за счет влияния на нервную систему.

Разница в транскриптомах зараженных самок и зараженных самцов определена небольшим числом процессов в отличие от здоровых особей. Таким образом, заражение *P. reticulata*, по-видимому, стирает половые различия, характеризующие здоровых раков-отшельников, на молекулярном уровне.

Работа поддержана грантом РФФИ № 24-24-00133.

ИЗМЕНЕНИЕ ВИДОВОГО СОСТАВА МИКОРИЗНЫХ ГРИБОВ РИЗОСФЕРЫ В
ПРОЦЕССЕ РАЗВИТИЯ ЭФФЕКТИВНОГО АМ-СИМБИОЗА *MEDICAGO LUPULINA* С
RHIZOPHAGUS IRREGULARIS В ВЕГЕТАЦИОННЫХ УСЛОВИЯХ

Горенкова А.И.^{1,2}, Крюков А.А.¹, Юрков А.П.¹

¹Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии,
Санкт-Петербург, Россия

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

nastya.gorenkova.2016@mail.ru

Арбускулярная микориза (АМ) представляет собой наиболее широко распространенный тип микоризных симбиозов. Грибы АМ способствуют существенному усилению фосфатного питания растений, адаптации растений к стресс-факторам среды абиотической и биотической природы, что выражается в росте урожайности и качества продукции в сложных почвенно-климатических условиях. Для изучения грибов АМ требуется их генетическая идентификация. С появлением методов NGS, в частности Illumina MiSeq, идентификация микроорганизмов (в том числе грибов АМ) из проб почвы стала более доступна. В современном сельском хозяйстве использование препаратов на основе бактерий и грибов АМ является важным аспектом сохранения почвенного плодородия. В исследовании проведено моделирование влияния биопрепарата АМ на рост аборигенных грибов АМ и впервые выявлено влияние эффективного штамма-интродуцента RCAM00320 *Rhizophagus irregularis* на сообщество грибов АМ в условиях развития симбиоза с высокоэффективной отзывчивой на микоризацию линией MIS-1 *Medicago lupulina*. Для исследования была выбрана почва одного из биотопов Северного Кавказа, а именно речной долины реки Теберда. Для исследованных территорий было показано самое высокое биоразнообразие АМ грибов из различных биотопов Северного Кавказа, одной из горячих точек (hot spots) мирового биоразнообразия. На отобранной нестерильной почве был поставлен вегетационный эксперимент с люцерной хмелевидной и высокоэффективным грибом АМ *R. irregularis*. Проведена оценка на 7 сроках учета от ранних до поздних ключевых фаз развития растения-хозяина. Оценены 9 параметров продуктивности и эффективности, а также 7 параметров микоризации растений люцерны. Из ризосферы корней люцерны выделена грибная ДНК и выполнено секвенирование IlluminaMiSeq по регионам ITS1 и ITS2. По всем образцам в сумме получено 3 339 461 ридов (2 660 436 ридов после фильтрации).

Результаты показали, что штамм-интродуцент оказывает поддерживающее влияние на биоразнообразие аборигенных грибов АМ в ризосфере *M. lupulina* при смене основных фаз развития, исключая фазы стеблевания и зрелого плода. Впервые до фазы начала бокового ветвления показано существенное ($P < 0.05$) положительное влияние штамма-интродуцента на рост растений *M. lupulina* в условиях роста с активной аборигенной микобиотой со значительным числом видов грибов АМ. Доля АМ-грибов относительно других микроорганизмов была минимальной на первый срок учета в фазу развития первого листа и составляла менее 1%, но затем резко возрастала в фазу развития второго листа и далее существенно увеличивалась вплоть до фазы третьего листа, сохраняя высокий уровень доли числа ридов на протяжении всего эксперимента.

Изучение биоразнообразия грибов АМ и поиск новых штаммов будет способствовать развитию сельского хозяйства Российской Федерации.

Работа выполнена при поддержке РФФ 22-16-00064.

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ СУБЪЕДИНИЦ НАДФН-ОКСИДАЗНОГО КОМПЛЕКСА В КУЛЬТУРЕ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК МЫШИ В УСЛОВИЯХ ГИПЕРГЛИКЕМИИ

Грачева А.И.^{1,2}, Митрошина И.Ю.², Дюкина А.Р.²

¹Рязанский государственный университет имени С.А. Есенина, Рязань, Россия

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

anastasia.grasceva@mail.ru

Усиленная выработка активных форм кислорода (АФК) при высоком содержании глюкозы (гипергликемии), приводит к эндотелиальной дисфункции, являющейся причиной осложнений сахарного диабета. Генерация супероксид-аниона, предшественника других АФК, в эндотелиоцитах происходит с участием трансмембранного белка NOX2 (gp91phox), каталитической субъединицей мембраносвязанного мультибелкового комплекса НАДФН оксидазы. Для его сборки и оптимального функционирования необходимы фосфорилирование локализованных в цитоплазме активирующей (p67phox) и организующей (p47phox) субъединиц и их транслокация к мембране. Показано повышение экспрессии gp91phox, p47phox, p67phox субъединиц и изменение уровня их фосфорилированных изоформ при сахарном диабете 2 типа, тогда как влияние гипергликемии на уровень экспрессии генов данных субъединиц исследовано мало.

Целью работы было определение уровня экспрессии генов, кодирующих gp91phox, p47phox, p67phox субъединицы НАДФН оксидазы в эндотелиоцитах, культивируемых в условиях гипергликемии.

Эндотелиоциты микрососудов кожи мыши изолировали из фрагментов дермы хвоста методом седиментации на градиенте плотности перколла. Клетки инкубировали при концентрации глюкозы в среде 22 мМ (гипергликемия) или 5,5 мМ (контроль) в течение 24 ч при 37°C в CO₂-инкубаторе.

Анализ экспрессии генов проводили с помощью количественной ПЦР с обратной транскрипцией. Для получения кДНК использовали MMLV RT kit (Евроген, Россия). ПЦР в реальном времени проводили с использованием реакционной смеси qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия). Амплификация и детекция результатов была проведена на амплификаторе DT light 4 («НПО ДНК-Технология», Россия). Статистическую обработку результатов проводили с помощью Mann–Whitney U-test ($p \leq 0.05$).

В результате анализа данных с помощью относительной количественной оценки ($\Delta\Delta C_t$ method) обнаружено, что экспрессия гена SYBV (gp91phox), выявляемая в культуре эндотелиоцитов мыши, культивируемых в условиях нормогликемии (1.1 ± 0.75), достоверно отличалась от уровня экспрессии этого гена, выявляемой в культуре, культивируемой в условиях гипергликемии (9.1 ± 3.7). Уровень экспрессии NCF1 (p47phox) в эндотелиоцитах в условиях гипергликемии составлял 25.9 ± 13.8 , что значимо отличалось от такого при нормогликемии (1.1 ± 0.77). Анализ экспрессии гена NCF2 (p67phox) показал, что уровень экспрессии, выявляемой в культуре эндотелиоцитов мыши, культивируемых в условиях нормогликемии (1 ± 0.3), достоверно отличался от уровня экспрессии этого гена, выявляемого в культуре эндотелиоцитов мыши, культивируемых в условиях гипергликемии (35.1 ± 5.1).

Проведенные нами исследования показали, что в гипергликемических условиях повышается уровень экспрессии генов gp91phox, p47phox, p67phox субъединиц НАДФН оксидазы в эндотелиоцитах микрососудов кожи мыши, что может приводить к повышению уровня экспрессии соответствующих субъединиц НАДФН оксидазы. Предполагается, что выявленная нами связь гипергликемии с повышенной экспрессией исследуемых генов является одной из причин эндотелиальной дисфункции при сахарном диабете.

Работа поддержана грантом РФ №22-15-00215.

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ РНК-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА *Dm NXF1* НА ЛОКОМОТОРНУЮ АКТИВНОСТЬ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Грудкова Д.М., Голубкова Е.В.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

dashka.gru@mail.ru

Dm nxf1 – ген, отвечающий за ядерно-цитоплазматический транспорт мРНК. Белок NXF1, взаимодействуя с цитоскелетом, участвует в процессах нейрогенеза, обеспечивая рост аксонов нейронов, формирование нейропиля и структурирование отделов головного мозга. Так как белок жизненно необходим, мы предполагаем, что мутации в гене *Dm nxf1* (*sbr* – синонимичное название) оказывают существенное влияние на локомоторную активность.

Для изучения этого влияния был поставлен тест на отрицательный геотаксис. Мух каждого генотипа помещали в количестве 20–25 особей в пробирку с отметкой 10 см. После встряхивания, по истечении 10 секунд подсчитывалось количество достигших, не достигших отметки и остающихся на дне мух. Сравнивали с контролем дикого типа.

Тестирование на отрицательный геотаксис проводилось с мухами следующих генотипов:

- 1) ♀/♂ **FM6** – линия, содержащая балансерную хромосому с многочисленными инверсиями.
- 2) ♀*sbr*¹²/**FM6** и ♂*sbr*¹²/**YDp+** – рецессивная леталь *sbr*¹² – имеет аллеле-специфичный эффект на способность к спариванию и фертильность самцов. Жизнеспособные самки – гетерозиготные, самцы – с транслоцированным на Y-хромосому аллелем дикого типа.
- 3) ♀*sbr*⁵/**FM6** – рецессивная леталь *sbr*⁵. Жизнеспособные самки – только гетерозиготы.
- 4) ♀*sbr*^{del}/**FM6**, ♀*sbr*^{del}/**C-S** и ♂*sbr*^{del}/**YDp+** – линии, содержащие делецию *sbr*⁺.
- 5) ♀**FM6/C-S** и ♂**C-S/YDp+** – линии, взятые для сравнения с диким типом.
- 6) ♀/♂ *sbr*¹ – мутантная аллель *sbr*¹ не является леталью.
- 7) ♀/♂ **Oregon-R**
- 8) ♀/♂ **Conton-S** – линии дикого типа, взятые в качестве контроля.

По результатам тестирования мы пришли к следующим выводам:

1. Наиболее сильный доминантно-негативный эффект мутации наблюдается у самцов *sbr*¹²/**YDp+** и самцов, содержащих делецию. Однако показатель активности снижен и у самок **FM6**, что, вероятно, объясняется эффектом балансерной хромосомы.
2. На показатель подвижности мух существенное влияние оказывает эффект старения, проявляющийся в среднем на 15 сут., за исключением дикого типа.
3. Менее всего заметны изменения в локомоторной активности самок *sbr*¹²/**FM6**, что, по-видимому, объясняется эффектом гетерозиса. Линия *sbr*¹ также не отличается результатами тестирования от контрольных линий.
4. Низкий показатель активности мух также сопряжен с более сильным эффектом старения, низкой продолжительностью жизни.
5. Для линий *sbr*¹, **FM6** и генотипов с аллелем *sbr*¹² наблюдается зависимость показателя локомоторной активности от пола.

Работа выполнена при поддержке гранта СПбГУ (ID Pure 115624290).

ГЕНЫ ДЕНИТРИФИКАЦИИ В ГЕНОМЕ ШТАММА *STUTZERIMONAS STUTZERI* DIA-8

Гусманова Ю.Р.¹, Бабынин Э.В.^{1,2}, Дегтярева И.А.²

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

²Лаборатория молекулярно-генетических и микробиологических методов ФИЦ Казанский научный центр РАН, Казань, Россия

ju.gusmanova@yandex.ru

Эффективное удаление азота из сточных вод является важнейшей задачей, обусловленной серьезными проблемами, связанными с охраной окружающей среды и защитой здоровья населения. Бактериальная нитрификация/денитрификация представляет собой традиционный процесс удаления азота, в котором NH_4^+ последовательно окисляется до NO_3^- бактериями, окисляющими аммиак на начальном этапе, и затем нитраты удаляются посредством денитрификации на завершающем этапе. Хотя целевым конечным продуктом при очистке сточных вод является N_2 , накопление промежуточных продуктов в результате отсутствия у микроорганизмов полных метаболических путей денитрификации является постоянной проблемой на некоторых очистных сооружениях.

Мы установили, что штамм *Stutzerimonas stutzeri* DIA-8, который был выделен из нефтезагрязненной почвы на территории Республики Татарстан, способен расти на среде, где источником азота являются нитраты или нитриты. Геном *S. stutzeri* DIA-8 был секвенирован на платформе Miseq (Illumina, США) в НИЛ «Мультиомиксные технологии живых систем» Казанского федерального университета. Черновой геном штамма был собран в 28 контигов (>500 п.н.) с размером генома 4,496,503 п.н., а расчетная полнота и загрязненность составили 100 и 0,2% соответственно, что свидетельствует о высоком качестве данного генома. На основании аннотации Prokka в геноме штамма DIA-8 обнаружено 4265 белок-кодирующих последовательностей (CDS), 54 генов тРНК и 3 гена рРНК.

Геномный анализ показал, что в геноме штамма DIA-8 присутствуют гены мембраносвязанной нитратредуктазы (*narG*) и периплазматической нитратредуктазы (*narX*). Диссимиляционное восстановление нитрита до оксида азота может катализироваться двумя неродственными ферментами: либо цитохром-нитритредуктазой (*nirS*), либо медьсодержащей нитритредуктазой (*nirK*). Ген *nirS*, но не *nirK*, был идентифицирован в геноме штамма DIA-8. Кроме того, были идентифицированы гены *norB*, кодирующие редуктазу оксида азота (NorB, ключевой фермент восстановления оксида азота в закись азота), и гены *nosZ*, кодирующие редуктазу закиси азота (NosZ, ключевой фермент восстановления закиси азота в газообразный азот). Таким образом, мы делаем предположение, что штамм *S. stutzeri* DIA-8 может осуществлять полный путь денитрификации.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОМОВ ЛЬНА *LINUM USITATISSIMUM* L.

Дворянинова Е.М.¹, Пушкова Е.Н.¹, Большева Н.Л.¹, Рожмина Т.А.², Борхерт Е.В.¹,
Жернова Д.А.¹, Сигова Е.А.¹, Мельникова Н.В.¹, Дмитриев А.А.¹

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

²Федеральный научный центр лубяных культур, Торжок, Россия

dvorianinova.em@phystech.edu

Лен культурный (*Linum usitatissimum* L.) возделывается по двум основным направлениям – для производства масла и волокна. *L. usitatissimum* представлен разнообразными генотипами, которые различаются по ключевым сельскохозяйственным характеристикам. Создание новых сортов и линий льна с требуемыми свойствами будет наиболее эффективным при использовании методов современной селекции, которые основаны на тщательном изучении генотипов льна на геномном и транскриптомном уровнях. В данной работе проведен сравнительный анализ геномов 20 генетически удаленных образцов льна.

На основе литературных данных и генетического анализа создана выборка из 20 генотипов льна. ДНК выбранных образцов экстрагирована согласно разработанной ранее методике, основанной на выделении ядер, а затем секвенирована на платформах Oxford Nanopore Technologies (ONT) и Illumina. Выполнены геномные сборки согласно разработанной ранее схеме: сборка и полировка данными ONT с использованием комбинации приложений Canu-Racon(x2)-Medaka и полировка данными Illumina приложением POLCA. В результате получены геномные сборки со средним размером 370 млн. п.н., N50 = 6 млн. п.н. и средней полнотой по BUSCO равной 95%. Геномные сборки аннотированы с использованием приложения Augustus, полученные последовательности белков проанализированы с использованием OrthoFinder и PanGP.

В 20 анализируемых сборках льна выявлено порядка 65 тыс. белковых кластеров, из которых 36 тыс. присутствовали в каждом из 20 геномов. Количество уникальных кластеров было около 500. Согласно приложению PanGP, с добавлением каждой геномной сборки льна в анализ количество новых белковых кластеров снижалось. После включения в анализ восемнадцатого генома новые белковые кластеры практически не появлялись.

Полученные данные представляют основу для детального анализа различий между генотипами льна на уровне генома и транскриптома, а также позволят создавать новые сорта с заданными ценными сельскохозяйственными характеристиками.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, грант № 075-15-2021-1064.

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ БЕЛКА TREACLE В СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ЯДРЫШКА КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА

Дериглазов Д.А.¹, Величко А.К.^{1,2,3}, Лужин А.В.^{1,2}, Петрова Н.В.¹, Разин С.В.⁵

¹Отдел клеточной геномики, Лаборатория стабильности генома, Институт биологии гена
РАН, Москва, Россия

²Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины,
Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

³Институт трансляционной медицины и биотехнологии Первого МГМУ им. Сеченова,
Москва, Россия

⁴Биологический факультет Московского государственного университета
имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

drglz.dm@gmail.com

Фазовые переходы повсеместно распространены в неживой материи, и недавние открытия показали, что они также играют ключевую роль в живых клетках. Концепция «разделения фаз на границе жидкость-жидкость» (от англ. liquid-liquid phase separation – LLPS) уже произвела революцию в понимании некоторых процессах, происходящих в клетке. Считается, что внутриклеточное разделение фаз на границе жидкость-жидкость может приводить к образованию конденсированных жидкоподобных капель белка и РНК, которые служат функциональными центрами во многих клеточных процессах, например, транскрипция, зарождение микротрубочек, адаптивная реакция на стресс, репарация ДНК и др. Ядрышко также представляет собой многокомпонентный фазовый конденсат, образующийся на платформе рибосомной РНК (рРНК). Основной функцией ядрышка является синтез рРНК и сборка рибосом. В ядрышке РНК и сотни различных белков разделены на три несмешивающиеся жидкие фазы: фибриллярный центр (FC), плотный фибриллярный компонент (DFC) и гранулярный компонент (GC). Каждый из этих компартментов обеспечивает особую среду, образующуюся в результате разделения фаз определенного белка. Конститутивными компонентами DFC и GC являются нуклеолин и нуклеофосмин (B23) соответственно. Какой белок играет аналогичную роль в FC до сих пор оставалось не ясным.

В настоящей работе мы представляем доказательства того, что ядрышковый белок Treacle служит молекулярным каркасом для FC в ядрышках клеток человека. Мы продемонстрировали, что Treacle способен формировать биомолекулярные конденсаты, и детально охарактеризовали структурные детерминанты, регулирующие его LLPS свойства. Благодаря способности к LLPS, белок Treacle обеспечивает рекрутинг и концентрирование факторов транскрипции у рДНК, а также сепарацию компонентов FC от DFC. В совокупности это обеспечивает пространственное разделение синтеза рРНК и её последующего процессинга. Перемешивание компонентов FC и DFC вследствие нарушения способности Treacle к LLPS, приводит к снижению эффективности обоих процессов, и эквивалентно по последствиям полной деплеции эндогенного белка Treacle. Мы также продемонстрировали, что способность к фазовой сепарации Treacle критически необходима для его взаимодействия с репарационным белком TOPBP1 и активации ответа на повреждение в рДНК при генотоксическом стрессе. В совокупности, результаты, полученные в нашей работе, раскрывают роль белка Treacle не просто, как структурного каркаса для формирования FC, а как ядрышкового хаба, интегрирующего функции транскрипции рибосомальных генов, процессинга рРНК и сохранения целостности рДНК.

Работа поддержана грантом РФФИ № 21-74-10018.

АНАЛИЗ КЛАСТЕРОВ ГЕНОВ ВТОРИЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА БАЙКАЛЬСКОГО
ОКСИФИЛЬНОГО ШТАММА *JANTHINOBACTERIUM*

Дмитриева М.Е.¹, Шелковникова В.Н.¹, Потапова Н.А.², Мартынова Е.И.¹,
Ромашова А.К.¹, Аксёнов-Грибанов Д.В.¹

¹Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

²Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН, Москва

marrie.dmitrieva@gmail.com

Оксифильные микроорганизмы обитают в условиях повышенного содержания кислорода в среде и обладают выраженными механизмами защиты от оксидативного стресса. Например, данные организмы обладают метаболическими перестройками и изменением генной экспрессии. Оксифильные микроорганизмы обладают своими сформировавшимися особенностями и наличием генетических кластеров, кодирующих синтез вторичных метаболитов. Экспрессия данных кластеров в условиях высокого содержания кислорода обеспечивает синтез биологически активных молекул. Данные об адаптивных механизмах защиты могут иметь дальнейшие перспективы для управления метаболической активностью, разработке технологий для лечения различных заболеваний и индукции синтеза целевых метаболитов. Особый интерес представляют оксифильные микроорганизмы озера Байкал, поскольку обитают в условиях повышенного оксидативного фона.

Целью данного исследования являлся анализ кластеров генов вторичного метаболизма байкальского оксифильного штамма *Janthinobacterium* sp. 2021M8.

Оксифильный штамм *Janthinobacterium* sp. 2021M8 был выделен из воды озера Байкал, отобранной в зоне гипероксии в пос. Большое Голоустное. Концентрация кислорода в месте пробоотбора составила не менее 13 мг/л в 2021 г. и 17 мг/л в 2022 г. Штамм был культивирован в холодильной камере и условиях повышенного содержания кислорода в среде для дальнейшего выделения ДНК.

Геном секвенирован на платформе Illumina MiSeq. Полнота сборки была проверена с помощью BUSCO (v. 5.4.7). Геном аннотирован с применением сервиса Prodigal (v. 2.6.3), функциональная аннотация выполнена с помощью eggNOG-mapper (v. 2.1.9). Потенциал штамма к синтезу вторичных метаболитов проанализирован с применением инструмента antiSMASH v.7.

Алгоритм antiSMASH выявил 7 кластеров генов, ответственных за синтез вторичных метаболитов. Однако, для всех 7 регионов не было обнаружено похожих известных кластеров. Данный факт может говорить о том, что выделенный нами штамм *Janthinobacterium* sp. 2021M8 имеет генетические кластеры, кодирующие синтез новых, ранее не идентифицированных биологически активных соединений.

Таким образом, секвенирование геномов оксифильных микроорганизмов, представляет собой многообещающее направление для обнаружения кластеров, ответственных за синтез новых биологически активных молекул, с возможностью создания рекомбинантных штаммов – продуцентов.

Работа выполнена при финансовой поддержке проекта Минобрнауки России FZZE-2024-0003.

ВЛИЯНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ МЕЖДУ СТАРТОМ ТРАНСКРИПЦИИ И СТАРТОМ ТРАНСЛЯЦИИ НА КОЛИЧЕСТВО БЕЛКА-РЕПОРТЕРА

Есюнина Д.М., Кульбачинский А.В.

Национальный исследовательский центр Курчатовский институт, Москва, Россия

es_dar@inbox.ru

РНК-полимераза (РНКП) – фермент, осуществляющий транскрипцию у всех живых организмов. Транскрипция состоит из 3 стадий: инициации, элонгации и терминации. У бактерий узнавание промоторов происходит при участии фактора инициации – сигма-субъединицы, которая присоединяется к кор-ферменту РНКП. При переходе к элонгации сигма-субъединица обычно диссоциирует, но в некоторых случаях может оставаться связанной с элонгационным комплексом и вызывать паузы транскрипции. Фактор-независимая терминация транскрипции происходит при формировании в РНК шпильки, после которой следует уридин-богатая последовательность. Это вызывает остановку РНК-полимеразы, изменение ее конформации и высвобождение РНК-транскрипта. Трансляция РНК происходит ко-транскрипционно, и сайт старта трансляции зачастую находится вблизи старта транскрипции. Для того, чтобы выяснить влияние расстояния и последовательности ДНК между началом синтеза РНК и стартом трансляции на количество белка, нами создана серия репортерных конструкций на основе оперона люциферазы *P. luminescence*, в которых область Шайн-Дальгарно находится на разном расстоянии от начала синтеза РНК, а 5'-нетранслируемый участок содержит дополнительные сигналы пауз или терминации транскрипции. С помощью анализа люминесценции было показано, что удаление старта трансляции от старта транскрипции на 125 п.н. приводит к незначительному увеличению экспрессии люциферазы относительно конструкции без линкерной области. В то же время, дальнейшее увеличение расстояния между стартами транскрипции и трансляции до 1 т.п.н. приводит к значительному снижению сигнала люминесценции. Вероятно, в этом случае более протяженная область нетранслируемой РНК способствует терминации транскрипции либо дегградации РНК. Введение дополнительного сигнала терминации перед стартом трансляции сильно снижает уровень люминесценции репортера при малой длине 5'-нетранслируемой области, но практически не влияет на экспрессию люциферазы в случае конструкций с нетранслируемой областью длиной 1 т.п.н. Наличие в последовательности данной области сигналов транскрипционных пауз также вызывает изменения в уровне экспрессии люциферазы. Таким образом, полученная модельная система позволяет напрямую измерять активность репортерного гена в зависимости от последовательности 5'-нетранслируемой области и может быть использована для анализа влияния сигналов пауз и терминации транскрипции на сопряжение транскрипции и трансляции. Работа проведена в рамках выполнения государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

ДЕТЕКЦИЯ ИЗМЕНЕНИЙ КИШЕЧНОЙ МИКОБИОТЫ У МЫШЕЙ ПРИ РАННЕМ ПАТОГЕНЕЗЕ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Жданова Е.С.¹, Ермаков А.М.¹, Фролова М.С.²

¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН – обособленное
подразделение ФИЦ Пуштинский научный центр биологических исследований РАН,
Пушино, Россия

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

dla_lisa@mail.ru

В организме человека находится множество микроорганизмов, включая бактерии, грибы, археи и вирусы. В подавляющем большинстве случаев фокус исследований направлен на бактерии как самое представленное царство в кишечной экосистеме. Однако, учитывая многообразие микроорганизмов в одних и тех же биотопах, такие ограниченные исследования могут привести к непониманию общей картины происходящего в пищеварительном тракте. И в этом контексте интерес вызывают исследования микобиома (микомы, микобиоты). Это термин используется для описания грибкового сообщества в структуре микробиома в целом, его влияния на здоровье и патологию человека.

Микобиота, как и микробиота, играет значительную роль при патогенезе многих заболеваний, влияет на иммунный ответ организма хозяина и является фактором риска иммунологических нарушений у пациентов с врожденной предрасположенностью. Патогенез грибов наиболее опасен в начале и в конце жизни, когда организм наиболее уязвим. Также повышение активности грибов возможно при различных заболеваниях, в том числе нейродегенеративных.

Для детекции изменений микобиоты при нейродегенеративных заболеваниях использовались фекальные и кишечные образцы мышей линии BALB/c, предоставленные лабораторией системной организации нейронов. Первая и вторая экспериментальная группа мышей подвергались введению A β 1-42, второй дополнительно вводили GSK, как терапию селективным ингибитором НАДФН оксидазы. Третья группа выступала в качестве контроля.

Из полученных образцов выделялась тотальная ДНК после чего подвергалась двум раундам амплификации для получения полных ампликонов 18S РНК. Ранее нами были подобраны универсальные праймеры в базе данных Silva на 18S РНК с покрытием более 74% грибковых таксонов.

Подготовка библиотек для секвенирования происходила по протоколу SQK-LSK109, разработанному Oxford Nanopore Technologies, с использованием оригинальных реагентов. Запуск секвенирования производился на ячейке MinION.

Видовое разнообразие менялось в зависимости от типа образцов, наибольшее количество видов грибов получилось обнаружить в тонком кишечнике. Таксономическое разнообразие снижалось в толстом кишечнике и достигало минимального значения в фекальных образцах.

При сравнении контрольной группы и группы патологии с лечением в образцах из толстого кишечника были обнаружены достоверные различия в представленности грибов вида *Taphrina letifera* и *Entomophaga destruens*. В сравнении групп с патологией и патологией с лечением достоверно различались бактерии вида *Fereydownia khargens* в тонком отделе кишечника. Изменения представленности данных видов может быть связано с изменением активности иммунной системы.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНСТАНТЫ ДИССОЦИАЦИИ КОМПЛЕКСА D-ЭНАНТИОМЕРНОГО
ПЕПТИДА, РАЗРАБОТАННОГО ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА, С
МЕМБРАННЫМ ДОМЕНОМ БЕЛКА ПРЕДШЕСТВЕННИКА ПЕПТИДА В-АМИЛОИДА

**Загрядская Ю.А.¹, Крючкова А.К.¹, Бтейх Т.¹, Каплун Д.С.¹,
Бочаров Э.В.^{1,2}, Охрименко И.С.¹**

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

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

zagriadskaia.ua@mipt.ru

Болезнь Альцгеймера — самое распространённое нейродегенеративное заболевание, приводящее к тяжёлой деменции. Детальная информация о структуре, динамике и различных межмолекулярных взаимодействиях биомолекул, непосредственно участвующих в развитии болезни Альцгеймера, необходима для рациональной разработки новых биологически активных соединений и скрининга существующих с целью разработки новых эффективных перспективных лекарственных средств. Данные секвенирования генов различных групп людей и изучение выявленных семейных мутаций, приводящих к раннему развитию нейродегенерации или к её тяжёлым формам, убедительно свидетельствуют о том, что аберрантное образование и/или клиренс нейротоксичного пептида β -амилоида (A β), являющегося продуктом последовательного гидролиза белка предшественника пептида β -амилоида (APP), является одной из основных причин заболевания на молекулярном уровне. Ранее с помощью зеркального фагового дисплея был получен ряд D-пептидов, приводящих к уменьшению концентрации цитотоксических агрегатов A β . В настоящее время лекарственное средство на основе одного из D-пептидов прошло фазу II клинических испытаний, однако молекулярные механизмы его фармакологического действия не исследованы полностью. В частности, не было охарактеризовано его взаимодействие с трансмембранным фрагментом APP672-726 (A β 1-55 – в нумерации пептида β -амилоида), являющимся субстратом γ -секретазы, – то есть с непосредственным предшественником A β . С помощью микромасштабного термофореза (MST) мы получили экспериментальные данные, показывающие, что D-пептид, являющийся по своей сути неупорядоченным пептидом (IDP), может специфически связываться с внеклеточной околочелювной (JM) областью мембраносвязанного предшественника A β . Было проверено влияние нескольких патогенных семейных мутаций, расположенных в различных структурных и функциональных частях APP, на связывание с D-пептидом. Полученные данные согласуются с данными молекулярной динамики, которые показывают, что D-пептид динамически, IDP/IDP-подобным образом, связывается вблизи сайта узнавания α -секретазы, расположенного между внеклеточным катионсвязывающим доменом и JM-спиралью APP.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, номер проекта 23-74-00024.

ХАРАКТЕРИСТИКА ВЛИЯНИЯ КОВАЛЕНТНОГО И НЕКОВАЛЕНТНОГО
СВЯЗЫВАНИЯ ГЛУТАТИОНА С ГЕМОГЛОБИНОМ НА СТРУКТУРУ БЕЛКА
МЕТОДАМИ СПЕКТРОСКОПИИ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ И
ИНФРАКРАСНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

Зарипов П.И.¹, Кулешова Ю.Д.¹, Паршина Е.Ю.², Слатинская О.В.², Максимов Г.В.²,
Макаров А.А.¹, Петрушанко И.Ю.¹

¹Институт молекулярной биологии РАН, Москва, Россия

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

p.zaripov@confidesk.com

Гемоглобин – это основной белок эритроцитов, обеспечивающий доставку кислорода к тканям организма. Гемоглобин (Hb) – активный участник регуляции редокс-статуса эритроцита, в поддержании которого важную роль играет трипептид глутатион (GSH). При окислительном и метаболическом стрессе эритроцитов, гемоглобин подвергается редокс-зависимой модификации – S-глутатионилрованию по остаткам цистеина (Hb-SSG). Гемоглобин также способен образовывать нековалентный комплекс с восстановленным глутатионом (GSH), высвобождая часть GSH в условиях гипоксии. Таким образом, взаимодействие гемоглобина с глутатионом важно для адаптации эритроцитов к различным типам стресса.

Мы оценили влияние глутатионирования и нековалентного связывания GSH на структуру гемоглобина методами спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) и инфракрасной спектроскопии (ИК). Эффективность глутатионирования гемоглобина окисленным глутатионом (GSSG) и отсутствие глутатионирования при инкубации с GSH определяли с помощью иммуноблоттинга.

С использованием лазера 633 нм мы получили усредненные КР-спектры высушенных образцов оксигемоглобина (Hb), Hb-SSG и нековалентного комплекса (Hb:GSH). Существенные изменения были обнаружены в соотношении полос спектра 665/745 см⁻¹, соответствующих симметричным деформационным колебаниям пиррольных колец (665 см⁻¹), и симметричным колебаниям растяжения (745 см⁻¹) пиррольных колец гемопорфирина. В спектре Hb:GSH это соотношение значительно ниже, чем в спектрах Hb и Hb-SSG, что свидетельствует о снижении плотности упаковки молекул белка, поскольку резонансное усиление полосы 665 характерно для плотной упаковки молекул в кристаллическом образце. Кроме того, в спектре нековалентного комплекса Hb:GSH мы выявили снижение соотношения полос 975/998 см⁻¹, соответствующих асимметричным колебаниям растяжения бокового радикала C₅C₁ порфиринового макроцикла (975 см⁻¹), и асимметричным деформационным колебаниям пиррольных колец (998 см⁻¹). Снижение этого соотношения указывает на структурные изменения в области боковых радикалов. Методом ИК-спектроскопии мы обнаружили изменение усредненного спектра в области 1650-1541 см⁻¹ после глутатионирования гемоглобина. Относительные амплитуды пиков I₁₆₅₀ и I₁₅₄₁ характеризуют соотношение различных элементов вторичной структуры белка. Снижение отношения амплитуд I₁₆₅₀/I₁₅₄₁ в спектре Hb-SSG свидетельствует о снижении доли α-спиралей в молекуле белка. В области 1312-1200 см⁻¹ наблюдается смещение максимума от 1243 см⁻¹ в случае Hb к 1294 см⁻¹ в образцах Hb:GSH и Hb-SSG, наиболее выраженное в спектре Hb-SSG. Это указывает на рост доли неупорядоченной структуры при глутатионировании гемоглобина.

Таким образом, глутатионирование Hb меняет вторичную структуру белка – снижает долю α-спиралей за счет роста доли неупорядоченной структуры. При образовании нековалентного комплекса вторичная структура гемоглобина остается практически неизменной, но наблюдаются изменения в области гема.

Работа поддержана грантом РФФ №19-14-00374.

ФОРМИРОВАНИЕ ФУНКЦИЙ ГЕНА *AZGP1* В ЖИРОВОЙ И ОПУХОЛЕВЫХ ТКАНЯХ

Кадилова Ф.Р.¹, Матюнина Е.А.², Козлов А.П.²

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

²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия

kadirova.f.r@gmail.com

Обнаруженные многочисленные сходства между жировой тканью и опухолями позволяют предположить возможное эволюционное происхождение жировой ткани млекопитающих от некоторых наследственных доброкачественных мезенхимальных опухолей. Были описаны гены, которые появились у рыб и экспрессировались в них, а их человеческие ортологи (*AZGP1* и другие) приобрели функции, связанные с жировым органом.

Ген *AZGP1* является одним из ключевых регуляторов в жировой ткани и параллельно с этим участвует в развитии опухолей у людей. Молекулярные свойства данного гена опосредуют такие биологические процессы как иммунный ответ, негативная регуляция пролиферации популяции клеток, активация липолиза в адипоцитах и другие. Продукт гена *AZGP1*, цинк- α 2-гликопротеин, по структуре схож с молекулой главного комплекса гистосовместимости I и содержит 3 домена: домены α 1 и α 2 образуют бороздку, в присутствии цинка способную связывать гидрофобные лиганды, а домен α 3 по структуре напоминает постоянные домены иммуноглобулина.

Для объяснения становления функций, которые выполняет продукт гена *AZGP1* в опухолях и жировом органе, был проведен его филогенетический и экспрессионный анализ.

При анализе с помощью алгоритма tBLASTn было выяснено, что ген *AZGP1* имеет ортологи во всех анализируемых таксонах. С использованием программы MAFFT нуклеотидная и кодирующая последовательности гена и аминокислотная последовательность кодируемого им белка были выровнены с ортологичными последовательностями в избранных таксонах. В результате с использованием программы MrBayes были получены филогенетические деревья, отражающие эволюционные связи между вышечисленными последовательностями гена *AZGP1* человека и его ортологами в избранных таксонах: иммуноглобулино-подобный домен, соответствующий домену α 3 у человека, появляется еще у рыб. Структуры, связанные с регулированием липолиза в жировых тканях, появляются значительно позже.

Для анализа связи уровней экспрессии данного гена с патогенезом опухолей и ожирения была проанализирована экспрессия гена *AZGP1* в опухолях (с использованием базы данных The Cancer Genome Atlas) и в жировой ткани. С помощью алгоритма Morpheus были визуализированы уровни экспрессии *AZGP1* у пациентов с различными опухолями (локализациями и типами) и в жировой ткани у пациентов с ожирением и без ожирения. Было показано, что уровень экспрессии гена *AZGP1* в некоторых типах опухолей (рак молочной железы, рак простаты, рак поджелудочной железы и другие) существенно повышен среди пациентов, что коррелирует с благоприятным прогнозом для пациента. Экспрессия в жировой ткани (PRJNA237271), в свою очередь, значительно снижается при ожирении, что говорит о влиянии нарушения функции *AZGP1* на развитие данной патологии.

Можно заключить, что ген *AZGP1* возникает у рыб и экспрессируется в опухолевых тканях. Первоначальная функция связана с иммунным ответом. Дальнейшая его эволюция связана с приобретением функции в жировом органе при его формировании из наследуемых опухолей.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ АМИНОКИСЛОТНЫХ ЗАМЕН НА СВОЙСТВА L-
АСПАРАГИНАЗЫ ИЗ ГИПЕРТЕРМОФИЛЬНОЙ АРХЕИ *THERMOCOCCUS SIBIRICUS*

Калинин С.Г.¹, Думина М.В.¹, Жданов Д.Д.², Покровская М.В.²,
Александрова С.С.², Эльдаров М.А.¹

¹Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,
Москва, Россия

²Институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Москва, Россия

stanislav-kalinin-1990@mail.ru

Один из важнейших для биотехнологии ферментов L-аспарагиназа (L-АСП, L-аспарагин-амидогидролаза) катализирует гидролиз L-аспарагина с образованием L-аспарагиновой кислоты и аммиака. Широкое применение фермента в биомедицине обусловлено ауксотрофностью по аспарагину некоторых видов опухолей, не способных самостоятельно синтезировать и восполнять внутриклеточный уровень данной аминокислоты в отличие от нормальных клеток. Относительно новой сферой применения L-аспарагиназы стала пищевая промышленность. Выявлено, что L-АСП в высокотемпературных пищевых технологиях эффективно снижает уровень токсичных продуктов, образуемых в процессе взаимодействия аспарагина с редуцирующими сахарами в реакции Майяра. Биотехнологическая значимость и широкое распространение L-АСП в природе стимулировали работы по поиску и инженерии новых улучшенных форм этих ферментов, среди которых особый интерес представляют термофильные L-АСП (термо-L-АСП).

Целью данной работы стала инженерия L-АСП из гипертермофильной археи *Thermococcus sibiricus* (TsA).

По результатам множественного выравнивания аминокислотных последовательностей L-АСП мезофильного и гипертермофильного происхождения были намечены мутации в различных зонах белка, затрагивающие как вариабельные, так и «особые аминокислотные остатки (а.о.)» – а.о. консервативные для термо-L-АСП, но не их мезофильных гомологов, вблизи высококонсервативных участков. Суммарно было получено 10 мутантных форм TsA, которые экспрессировали в клетках *Escherichia coli*.

Для предварительной оценки влияния мутаций на активность, температурный оптимум был проведен полуколичественный экспресс-скрининг вариантов TsA. Мутантные формы были проанализированы по активности в супернатанте методом прямой несслеризации при температурах 24, 37, 60, 90°C.

Предварительный скрининг активности выявил три группы мутантов:

– низко-/неактивные мутанты, содержащие делецию в С-концевой области $\Delta(K277-V280)$. Нарушение контактов данного участка с крышкой и консервативными а.о. привело к снижению активности более чем на 80 % относительно фермента дикого типа TsAwt во всем диапазоне температур – 24–90°C;

– высокоактивные при 90°C мутанты Q20H/F142I/C153Y, D54G/T56Q, S112N/K293M, перспективные для применения в высокотемпературных пищевых технологиях. Активность D54G/T56Q, S112N/K293M была выше относительно TsAwt;

– мутанты, превосходящие по активности TsAwt в области умеренных температур 37-60°C, – S112N, K293M, S112N/K293M. Данные варианты представляют интерес для терапевтического применения.

Для 5 перспективных мутантных форм TsAwt проведена очистка, проводится уточнение характеристик, а также изучение термостабильности, субстратной специфичности, кинетических свойств.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-74-10100, <https://rscf.ru/project/22-74-10100/>) в Федеральном исследовательском центре «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук.

СВЯЗЬ ПОЛИМОРФНЫХ МАРКЕРОВ ГЕНОВ *XRCC1*, *ERCC2*, *TP53*, *MDM2* И *CDKN1A* С РИСКОМ РАЗВИТИЯ РАКА ЯИЧНИКА

Капралова М.А.¹, Ломскова П.К.¹, Хабас Г.Н.², Асатурова А.В.², Каюмова Л.Н.³,
Хохлова С.В.², Заварыкина Т.М.^{1,2}

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля, Москва, Россия

²Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и
перинатологии им. В.И. Кулакова, Москва, Россия

³Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова,
Москва, Россия

kapamariya97@gmail.com

Рак яичника (РЯ) является второй причиной смертности среди онкогинекологических заболеваний в мире. Современная теория канцерогенеза основывается на том, что помимо внешних факторов, для возникновения опухоли важно наличие генетической предрасположенности. Известно, что патогенез РЯ в ряде случаев, чаще всего при наследственном варианте заболевания, тесно связан с мутациями генов-онкосупрессоров *BRCA1* и *BRCA2*. Однако мутации в этих генах отвечают за 10-15% случаев РЯ.

Цель работы: изучение связи полиморфных маркеров генов репарации ДНК (*XRCC1*, *ERCC2*) и контроля клеточного цикла (*TP53*, *MDM2*, *CDKN1A*) с риском развития рака яичника (РЯ).

В работе было изучено распределение частот аллелей полиморфных участков генов системы репарации *XRCC1* (rs25487) и *ERCC2* (rs13181), апоптоза и контроля клеточного цикла *TP53* (rs1042522), *MDM2* (rs2279744) и *CDKN1A* (rs1801270) и проанализирована их связь с риском развития РЯ у женщин Московского региона. Работа проведена на 129 образцах крови здоровых доноров и крови и ткани 107 больных РЯ. Забор опухолевого материала производился при первичной циторедуктивной операции, до начала химиотерапии. Выделение ДНК выполнено с использованием набора реагентов Diatom DNA Prep 400 (Лаборатория Изоген, Россия). Определение статуса полиморфных маркеров генов проводилось методом ПЦР в реальном времени с флуоресцентными аллель-специфичными зондами на приборе «CFX96 Touch Real-Time System» (Bio-Rad, США).

В ходе работы получены отношения шансов (ОШ) риска развития РЯ. Для аллеля *Arg* маркера гена *XRCC1* ОШ = 2.24, 95% ДИ = 1.57-3.20, $p < 0.0001$. Для генотипов маркера гена *XRCC1* статистически значимое увеличение риска развития РЯ обнаружено при использовании всех моделей наследования. Наиболее выражен риск развития РЯ при рецессивной модели для генотипа *Arg/Arg* ОШ = 3.52, 95% ДИ = 1.66-7.45, $p = 0.0001$. Для маркера гена rs13181 *ERCC2* различия были выявлены для генотипов в образцах ткани: ОШ = 0.48, 95% ДИ = 0.29-1.75, $p = 0.0042$ для *Lys/Gln* (кододоминантная модель), и ОШ = 2.43, 95% ДИ = 0.67-2.85, $p = 0.016$ для *Gln/Gln* (рецессивная модель). Для аллеля *Pro* маркера rs1042522 гена *TP53* ОШ = 0.94, 95% ДИ = 0.57-1.65, $p = 1.0$; для аллеля *G* маркера rs2279744 гена *MDM2* ОШ = 0.96, 95% ДИ = 0.49-1.89, $p = 0.90$; для аллеля *Arg* маркера rs1801270 гена *CDKN1A* ОШ = 1.53, 95% ДИ = 0.76-3.09, $p = 0.29$. Для генотипов маркеров генов клеточного цикла статистически значимого риска развития РЯ не выявлено.

Таким образом, выявлено, что rs25487 *XRCC1* и rs13181 *ERCC2* связаны с повышенным риском развития РЯ и могут быть вовлечены в патогенез этого заболевания. Для маркеров генов *TP53*, *MDM2* и *CDKN1A* получены результаты, указывающие на отсутствие ассоциации с РЯ.

РОЛЬ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА EIF4E В РАЗВИТИИ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Колесникова В.В.¹, Андрейцев В.В.^{1,2}, Никонова Е.Ю.¹, Никонов О.С.¹

¹Институт белка РАН, Пушино, Россия

²Волгоградский государственный университет, Волгоград, Россия

kolesnikovavicto@yandex.ru

Вирус Y картофеля снижает урожайность картофеля, который является важной продовольственной культурой. Создание устойчивых сортов – наиболее перспективный метод борьбы с вирусом. Так как вирусы сильно зависимы от компонентов клеточной системы трансляции, если один из необходимых компонентов станет недоступен для вируса, растение будет устойчивым. Известно, что одной из ключевых точек взаимодействия является образование комплекса между вирусным белком VPg и eIF4E растения. Однако молекулярный механизм взаимодействия картофеля с вирусом Y картофеля описан только с помощью модели, в основе которой лежат структурные данные гомологов. Инициация трансляции – важный этап в процессе биосинтеза белка. Ключевым этапом у эукариот является связывание кэп структуры на 5'-конце мРНК белком eIF4E, который входит в состав гетеротримерного комплекса eIF4F. eIF4E представлен несколькими изоформами, которые объединяют в семейство. Растения, в том числе картофель, в составе семейства белков eIF4E имеют eIF4E1 и eIF4E2, а также характерный только для цветковых растений eIF(iso)4E. Некоторые растения содержат большое количество изоформ eIF4E, например, у табака восемь изоформ. Интересно, что у представителей других царств функции eIF4E изоформ считаются взаимозаменяемыми, но для некоторых из изоформ eIF4E установлена определенная роль в конкретных этапах жизненного цикла клетки. В растениях нокаут некоторых генов eIF4E не вызывает значимых изменений, а некоторых – летален для организма. Разнообразие изоформ может быть следствием полиплоидности растений или связано с избирательной ролью каждой из изоформ в биосинтезе.

В рамках нашей работы показано, что eIF4E1 и eIF4E2 картофеля способен взаимодействовать с VPg вируса Y картофеля, а eIF(iso)4E не образует с ним комплекс. С помощью предложенной модели были спрогнозированы аминокислотные замены, влияющие на образование комплекса eIF4E-VPg, а также определен ряд мутаций предположительно влияющих на образование комплекса eIF4E-eIF4G. Кроме того, проведена большая работа по определению и получению белков семейства eIF4E картофеля и наиболее распространенных вариантов VPg, которые представили бы природное разнообразие наиболее полно, для проведения *in vitro* исследований функциональной активности и экспериментов по кристаллизации для получения структурных данных методом РСА.

TOE-SEQ – НОВЫЙ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫЙ ПОДХОД ДЛЯ МОНИТОРИНГА
IN VITRO ТРАНСЛЯЦИИ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ СИКВЕНС-СПЕЦИФИЧНОСТИ
АНТИБИОТИКОВ

Комарова Е.С.¹, Кабилов М.Р.², Зотова П.А.³, Сергиев П.В.^{1,3,4,5}, Донцова О.А.^{3,4,5,6}

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова – институт
функциональной геномики, Москва, Россия

²Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН,
Новосибирск, Россия

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

⁴Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова – Научно-
исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Москва, Россия

⁵Сколковский институт науки и технологий, Сколково, Россия

⁶Институт биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН –
отдел функционирования живых систем, Москва, Россия

ekaandreyanova@yandex.ru

В настоящее время активно используется комбинирование различных подходов с целью исследования новых деталей биологических процессов. Яркими примерами таких комбинаций являются RNA-seq, DNA-seq, ChIP-seq, Flow-seq, которые нашли широкое применение в различных научных областях. Они позволили перевести анализ нуклеиновых кислот, их взаимодействий с белками, а также эффективности работы изучаемых клеточных процессов на высокопроизводительный уровень, тем самым открыв новые возможности и направления не только в молекулярной биологии, но и в медицине. Число таких успешных примеров можно дополнить новым разработанным в нашей лаборатории методом Toe-seq, сочетающим флуоресцентный тоупринтинг и высокопроизводительное секвенирование (NGS).

В основе метода Toe-seq лежит система *in vitro* трансляции, в которой используется библиотека мРНК с рандомизированным участком в кодирующей области и различные антибиотики, и последующей обратной транскрипции с использованием флуоресцентно меченого праймера, в результате которой образуются тоупринты различной длины в зависимости от места останковки рибосомы. Далее полученные тоупринты подготавливают для амплификации и NGS. В итоге мы получаем набор последовательностей разной длины, позволяющий определить с точностью до нуклеотида места останковки рибосомы на мРНК в присутствии или отсутствии антибиотиков. Благодаря применению метода Toe-seq можно определить возможную специфичность антибиотиков по отношению к последовательности мРНК (сиквенс-специфичность), активно исследуемую разными научными группами в мире.

Данный подход можно использовать как в бактериальной системе трансляции, так и в эукариотической, что даёт возможность проводить анализ антибиотической активности с разных сторон. Его применение может внести вклад в детальное изучение молекулярных основ механизма действия антибиотиков и в открытие новых направлений в решении проблемы активного развития резистентности к ним.

Работа поддержана грантом РФФ №21-64-00006.

ПОДГОТОВКА ВЕКТОРА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ ПИЛИНА И ФЛАГЕЛЛИНА БАКТЕРИИ *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* SP7

**Константинова Е.А.^{1,2}, Пятибратов М.Г.³, Широков А.А.^{1,2}, Щёголев С.Ю.^{1,2},
Бурыгин Г.Л.^{1,2}, Матора Л.Ю.^{1,2}**

¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленное
подразделение ФИЦ «Саратовский научный центр РАН», Саратов, Россия

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

³Институт белка РАН, Пушино, Россия

kate-uliana@mail.ru

Бактерии рода *Azospirillum* являются модельными организмами в исследовании молекулярных основ ассоциативного растительно-микробного взаимодействия, вступая во взаимовыгодные симбиотические отношения со многими растениями, в том числе важными сельскохозяйственными культурами. Одними из определяющих успешность колонизации растений выступают жгутики и пили, находящиеся на поверхности клеток азоспирилл. Для типовых штаммов *Azospirillum brasilense* Sp7 и *Azospirillum baldaniorum* Sp245 было установлено гликозилирование флагеллина полярных жгутиков и пилина, что существенным образом сказывается на их физико-химических и биологических свойствах. В связи с этим, актуальной задачей является получение рекомбинантных белков пили и полярного жгутика для оценки роли белковой и углеводной части этих молекул в формировании ответных реакций растений и симбиотических отношений. Цель данной работы – получение рекомбинантных штаммов-продуцентов негликозилированных пилинов и флагеллинов *Azospirillum brasilense* Sp7.

В геноме штамма *Azospirillum brasilense* Sp7 (номер в GenBank: GCA_008274945.1) с помощью BLAST-анализа нами были выявлены гены, кодирующие пилин *flp* (Flp family type IVb – QEL94494.1) и флагеллин полярного жгутика *flaA* (QEL90760.1), расположенные на хромосоме 4 (CP033316.1) и хромосоме 1 (CP033312.1) соответственно. К участкам геномов, включающих целевые гены и области в 200 нуклеотидов до начала и после окончания генов, с помощью онлайн-сервиса Prime-BLAST и программ SnapGene и Ugene были подобраны 6 пар праймеров (по 3 на каждый из целевых генов). Праймеры подбирались с условием, чтобы ПЦР-продукты содержали полные гены пилина или флагеллина и сайты расщепления эндонуклеаз рестрикции BamHI и NdaI. Праймеры были синтезированы компанией Lumiprobe (Москва). С помощью данных праймеров планируется получение векторов, содержащих гены пилина или флагеллина штамма *Azospirillum brasilense* Sp7, для трансформации штамма *Escherichia coli* XL1-Blue как сверхпродуцента целевых белков.

Биоинформатический анализ гена *flp* (QEL94494.1) показал, что препилин *Azospirillum brasilense* Sp7 содержит 70 аминокислотных остатков (а.о.). Методом множественного выравнивания аминокислотных последовательностей было предположено, что 13 N-концевых а.о. представляют собой сигнальный пептид, а белок пилина состоит из 47 а.о. Кроме того, с помощью программы MusiteDeep (<https://www.musite.net>) было выявлено 2 высоковероятных сайта гликозилирования пилина: по остаткам аспарагина Asn27 и треонина Thr42. Короткая аминокислотная последовательность пилина и гликозилирование его молекул делают затруднительным выделение и изучение нативных молекул из культуры штамма *Azospirillum brasilense* Sp7. В связи с этим, получение рекомбинантного негликозилированного белка может существенно помочь в исследованиях роли пили азоспирилл в формировании растительно-микробного симбиоза.

БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ ПОИСК ПЕРСПЕКТИВНЫХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ БАКТЕРИОФАГОВ, ЗАРАЖАЮЩИХ БАКТЕРИИ ГРУППЫ *BACILLUS*

Копосова О.Н., Казанцева О.А., Шадрин А.М.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН – обособленное подразделение
ФИЦ Пущинский научный центр биологических исследований РАН, Пущино, Россия

olga.n.koposova@mail.ru

Бактерии группы *Bacillus* – грамположительные спорообразующие микроорганизмы, широко распространенные в окружающей среде, преимущественно в почве. Некоторые из них способны вызывать болезни у человека и животных, например, сибирскую язву (*Bacillus anthracis*).

Рост числа резистентных к антибиотикам штаммов бактерий – возбудителей заболеваний является одной из важных проблем для медицины. И Всемирная Организация Здравоохранения в 2016 г., и Министерство здравоохранения Российской Федерации в 2017 г. разработали стратегии по борьбе с устойчивостью к противомикробным препаратам. Один из предлагаемых ими пунктов этой стратегии – разработка новых антимикробных препаратов на основе бактериофагов и их ферментов.

Среди ферментов бактериофагов с антимикробными свойствами особенно интересны эндолизины. Они используются фагами на последней стадии литического цикла для разрушения пептидогликана клеточной стенки бактерий изнутри, что приводит к гибели клетки. Уже показано, что применение эндолизинов извне тоже эффективно и возможно их применение в качестве антимикробных препаратов.

Цель работы – создать и проанализировать базу данных генов, кодирующих эндолизины бактериофагов, заражающих бактерии группы *Bacillus*, для подбора перспективных молекул для дальнейших исследований.

В ходе работы из базы данных NCBI Nucleotide database были получены 441 нуклеотидные последовательности геномов *Bacillus*-бактериофагов. Все они были автоматически ре-аннотированы с использованием RASTk. В полученных ре-аннотированных геномах были вручную отобраны последовательности, для которых в разделе «function» находились наименования: «phage lysin», «phage N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase», «endolysin», «endopeptidase», «L-alanoyl-D-glutamate peptidase», «glycosyl hydrolase», «family 25», «phage structural protein, holin, or lysin» и др. Всего выбрали 477 нуклеотидных последовательностей. Эти последовательности были проверены при помощи BLASTp по стандартной базе данных «non-redundant protein sequences (nr)» для организмов «Viruses (taxid:10239)» по алгоритму «PSI-BLAST (Position-Specific Iterated BLAST)» и HHpred, для поиска доменов в котором использовали базы данных доменов Pfam-A_v36, COG_KOG_v1.0, SCOPe70_2.08, NCBI_conserved_Domain(CD)_v3.19 и параметры по умолчанию. Далее вручную проводилось назначение функций белков по результатам «Conserved domains» с учетом параметров «Query cover» и «E-value» в случае BLASTp и по «Hhpred results» с параметрами «Probability» и «E-value» в случае HHpred, исключались последовательности генов с неопределенными функциями и не относящиеся к эндолизинам. Всего было обнаружено 463 потенциальных эндолизина бациллярных фагов.

Из 463 отобранных нуклеотидных последовательностей было построено филогенетическое древо с помощью MEGA X. Его анализ показал, что эндолизины сгруппировались по типам ферментативной активности, и это дало возможность для выбора ферментов из отдельных групп для дальнейшего изучения.

Работа поддержана грантом РФФ №22-15-00385.

КЛЕТОЧНАЯ ЛИНИЯ ТКО-НЕК 293 С ТРЕМЯ ИНАКТИВИРОВАННЫМИ
ГЕНАМИ IP3 РЕЦЕПТОРОВ

Копылова Е.Е., Кочкина Е.Н., Рогачевская О.А.

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

Ikopylov76@gmail.com

Многие первичные медиаторы инициируют мобилизацию внутриклеточного Ca²⁺ в самых разнообразных клетках эукариот. В большинстве случаев процесс генерации внутриклеточных Ca²⁺ сигналов включает стимул-зависимую продукцию инозитолтрифосфата (IP₃), стимуляцию IP₃ рецепторов (IP₃R) и выброс Ca²⁺, депонированного в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР). Функционально IP₃R представляют собой внутриклеточные IP₃-активируемые Ca²⁺ каналы. У позвоночных три гена *IP3R1*, *IP3R2* и *IP3R3* кодируют субъединицы IP₃R, которые функционируют как гомо- или гетеротетрамеры. В разных клетках позвоночных обычно функциональны 2–3 изоформы IP₃R, и несмотря на значительный уровень гомологии аминокислотных последовательностей этих рецепторов, активность каждой из трех изоформ IP₃R находится под контролем различных механизмов. Для исследования вклада индивидуальных IP₃R в формирование клеточных ответов на различные агонисты рецепторов плазматической мембраны нами ранее были созданы клеточные линии, экспрессирующие только одну из трех изоформ. При этом оставалось невыясненным, существуют ли альтернативные пути трансдукции сигнала при стимуляции рецепторов, в том числе, нейротрансмиттерами, без участия IP₃-опосредованного пути. Для решения этой задачи была получена клеточная линия, в которой были инактивированы все три гена IP₃R с помощью CRISPR/Cas9 технологии. Для создания такой линии была использована ранее полученная линия клеток НЕК293/ Δ IP₃R2/ Δ IP₃R1, в которых функциональным оставался только рецептор IP₃R3. Направленное генетическое редактирование в области первого экзона инициировало появление биаллельной мутации, исключающей трансляцию функционального IP₃R3 белка. Полученные клетки, в которых были инактивированы все три гена *IP3R* (triple knockout, ТКО) ТКО-НЕК293, потеряли способность отвечать на ацетилхолин, АТФ, норадреналин и аденозин, которые индуцировали мобилизацию Ca²⁺ в клетках НЕК293 дикого типа. Это указывало на то, что Ca²⁺ ответы на эти агонисты были опосредованы преимущественно IP₃R, в отсутствии которых в клетках ТКО-НЕК293 агонист-индуцированный выброс депонированного Ca²⁺ полностью блокирован. Полученная клеточная линия может быть использована для гетерологичной экспрессии мутантных производных IP₃R любого из трех типов и представляет интерес в качестве универсальной модели для изучения связи функций IP₃R и вариабельности их генов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда № 22-14-00031.

ВНУТРИКЛЕТОЧНОЕ ЗАКИСЛЕНИЕ АКТИВИРУЕТ МИТОФАГИЮ И МОДУЛИРУЕТ МИТОХОНДРИАЛЬНУЮ ДИНАМИКУ В МОДЕЛЯХ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

Крицкая К.А., Федотова Е.И., Бережнов А.В.

Институт биофизики клетки ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушино, Россия

kritskayak96@yandex.ru

Нарушение процессов контроля качества митохондрий, включая митофагию, участвует в патогенезе болезни Паркинсона (БП). В наших предыдущих работах было показано, что лактат и пируват натрия повышают уровень митофагии и обладают нейропротекторными свойствами в клеточных моделях БП, хотя механизмы этого действия оставались неясными. В данном исследовании мы стремились разграничить роль модуляции внутриклеточного рН и метаболических эффектов в реализации этих защитных влияний. Мы использовали фибробласты пациентов с БП с мутациями в генах PINK1 и LRRK2, а также модель нейробластомы SH-SY5Y, обработанную MPP+. Путем прямого закисления внеклеточной среды для снижения цитозольного рН или добавления лактата/пирувата мы оценивали результирующие эффекты на морфологию митохондрий, индукцию митофагии, профили экспрессии генов и митохондриальную динамику. Наши результаты демонстрируют, что мягкое, кратковременное закисление значительно увеличивало колокализацию митохондрий и лизосом во всех линиях клеток. Обработка лактатом/пируватом сопоставимо индуцировала митофагию до уровней около 40%. Анализ экспрессии генов выявил разные профили транскрипции генов митофагии/аутофагии – как PINK1/Parkin-зависимые, так и рецептор-опосредованные пути активировались закислением и лактатом/пируватом, особенно в токсических моделях. Кроме того, в MPP+-модели наблюдалась измененная экспрессия генов митохондриальной динамики, таких как Opa1, Mfn1 и Drp1. В заключение, наши данные свидетельствуют, что внутриклеточное закисление может быть ключевым механизмом, посредством которого добавление лактата/пирувата способствует процессам контроля качества митохондрий, нарушенным при БП. Это подчеркивает потенциал терапевтических подходов, модулирующих рН, для восстановления митофагии и целостности митохондрий в качестве новой нейропротекторной стратегии при БП и других митохондриальных расстройствах.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ПНЦБИ РАН № 075-00609-24-01 (№ 1022080100047-5-1.6.4 «Нейропротекторные препараты нового поколения»).

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ С
БЕЛКОМ ПРЕДШЕСТВЕННИКОМ ПЕПТИДА БЕТА-АМИЛОИДА КАК
ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ МИШЕНЬЮ

**Крючкова А.К.¹, Бтейх Т.¹, Каплун Д.С.¹, Загрядская Ю.А.¹,
Бочаров Э.В.^{1,2}, Охрименко И.С.¹**

¹Лаборатория старения и возрастных нейродегенеративных заболеваний Московского
физико-технического института, Москва, Россия

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

Kryuchkova.ak@phystech.edu

Болезнь Альцгеймера – самый распространённый тип деменции, вызванный изменениями в процессинге белка предшественника бета-амилоида (amyloid precursor protein, APP), приводящими к изменению количества и баланса в продукции форм пептида бета-амилоида (A β). Согласно амилоидной гипотезе, увеличение количества амилоидов, образованных A β , оказывает токсическое действие на нейроны и глию. Таким образом, терапевтическое влияние на продукцию A β и образование ими агрегатов может предотвратить развитие деменции. Известные современные многочисленные перспективные лекарственные средства, в том числе находящиеся в настоящий момент на стадии клинических испытаний, имеют терапевтической мишенью сами олигомеры или амилоиды образованные A β . Целью нашей работы является получение структурных данных о взаимодействии APP, а именно его трансмембранного фрагмента APP672-726 (A β 1-55), являющимся субстратом γ -секретазы, с перспективными лекарственными средствами. В качестве терапевтической мишени рассматривается форма APP после протеолитической деградации β -секретазой. Ввиду невозможности выделения данного белка из клеток человека, мы используем бесклеточную систему экспрессии для быстрого и надёжного получения данного мембранного белка в количествах необходимых для структурных исследований, в том числе для наработки изотопномеченных белков, необходимых для структурно-динамических исследований методами ЯМР.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, номер проекта 23-74-00024.

РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ ДЛЯ ПРЕОДОЛЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ СОСУЩИХ ВРЕДИТЕЛЕЙ К РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ

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

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

yulia_kyd@mail.ru

Одним из перспективных и безопасных для окружающей среды и человека методов защиты растений является применение препаратов, блокирующих экспрессию жизненно важных генов вредителей за счет РНК-интерференции. В этой работе мы осуществили поиск генов, предположительно блокировка которых приведет к повышенной смертности у зеленой персиковой тли (*Myzus persicae*) и подходящих для применения подобных методик. Использовались целевые гены тли: MPATP, MPNuc1, MPNuc2, эффект блокировки которых на насекомых был описан ранее, а также различные комбинации их фрагментов. В качестве контроля использовали ген колорадского жука LDNuc2. Все последовательности встраивали в модифицированную плазмиду pRSET с дополнительным промотором, позволяющую осуществить экспрессию целевых генов и их фрагментов в виде молекул двухцепочечной РНК (дцРНК), способных запускать реакцию РНК-интерференции в организме насекомых. дцРНК синтезировали в бактериях и выделяли с помощью фенол-хлороформной экстракции. Также нами была разработана методика культивирования зеленой персиковой тли на искусственной питательной среде, которая позволяет поддерживать культуру вредителя без использования растений. На данный момент проводятся опыты по кормлению насекомых искусственной питательной средой, содержащей дцРНК, с фиксацией продолжительности жизни и репродукции особей.

IN SILICO ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДНЫХ
ВАЛЬПРОЕВОЙ КИСЛОТЫ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫХ
ПРОТИВОСУДОРОЖНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Кузнецова Н.В., Золотоверхая Е.А., Беспалов А.Я., Кубарская Л.Г.

Научно-клинический центр токсикологии им. академика С. Н. Голикова Федерального
медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

taran009@yandex.ru

Судорожный синдром – это неотложное состояние в неврологической практике, которое относится к состояниям, потенциально угрожающим жизни.

С целью создания препаратов, обладающих противосудорожной активностью, в центре токсикологии им. Голикова ФМБА России проводятся разработки производных вальпроевой кислоты. В рамках исследования было выбрано 8 новых оригинальных производных вальпроевой кислоты (их структура и формулы закодированы под номерами, поскольку имеют патентной защиты) и соединение аминоэфира вальпроевой кислоты с третичной аминогруппой [Патент 2714135]. Прогноз наличия противосудорожной и нейромодуляторной активности был произведен с помощью программы PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) web-сервиса Way2Drug. Оценка вероятности взаимодействия соединений с белками-мишенями человека выполнена с использованием сервиса Pass Targets. Расчет аффинности к предполагаемым мишеням-рецепторам проведен методом молекулярного докинга с помощью программы AutoDock Vina.

Получены следующие результаты:

Анализ биологической активности веществ № 5, 7, 10 и 21 показал, что они могут обладать противосудорожными свойствами. Образец № 12 оказался наиболее предпочтительным для терапии дискинезий и когнитивных расстройств. В терапии фобических расстройств возможно применение веществ № 5, 7, 10, кроме того, эти вещества и вещество № 3 обладают анксиолитическим эффектом. Для препарата № 21 был выявлен вероятный противоэпилептический эффект. Для веществ № 3 и 14 показана способность облегчать тремор при болезни Паркинсона. Ряд веществ, вероятно, стимулируют высвобождение серотонина, тогда как вещество № 14 наоборот, может стимулировать обратный захват серотонина. Таким образом, все синтезированные производные вальпроевой кислоты, кроме вещества № 4, по результатам анализа с применением программного обеспечения, могут обладать центральным действием.

Прогнозирование прямых взаимодействий исследуемых соединений с белками-мишенями человека с использованием сервиса Pass Targets показало, что из ряда синтезированных производных вальпроевой кислоты сродством к мускариновым рецепторам обладают вещества № 3, 4, 12 и 14. Никотиновый ацетилхолиновый рецептор является мишенью для вещества № 14. При исследовании биологических эффектов можно предположить, что препарат № 14 является агонистом никотиновых ацетилхолиновых $\alpha 4\beta 4$ рецепторов.

Для молекулярного докинга в качестве наиболее вероятных мишеней синтезированных веществ выбраны мускариновые рецепторы M1, M4 и M5, а также альфа 7 субъединица н-ацетилхолинового рецептора. Выявлено что соединение № 21 обладает высоким сродством к M5 мускариновому рецептору и альфа 7 субъединице н-ацетил-холинового рецептора. А также у веществ № 12,14 и 21 был обнаружен высокий аффинитет к рецептору ГАМК-А.

Наиболее перспективными веществами, синтезированными в центре токсикологии им. Голикова ФМБА России для дальнейшего исследования потенциальной противосудорожной и нейромодуляторной активности предлагаются производные вальпроевой кислоты под номерами 12, 14 и 21.

СОЗДАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ХИМЕРНОГО БЕЛКА PLY57_ENV D, ОБЪЕДИНЯЮЩЕГО ФУНКЦИИ ЭНДОЛИЗИНА И ПОЛИ-ГАММА-D-ГЛУТАМАТ ДЕПОЛИМЕРАЗЫ

Кулябин В.А., Скорынина А.В., Шадрин А.М.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН – обособленное
подразделение Федерального исследовательского центра «Пушкинский научный центр
биологических исследований РАН», Пушкино, Россия

unicorn.vlad@gmail.com

Увеличение устойчивости бактерий к антибиотикам стимулирует исследования альтернативных методов для борьбы с бактериальными инфекциями. Это привело к возрождению интереса к изучению бактериофагов и их антибактериальных белков по всему миру. Эндолизины, которые вырабатываются фагами, разрушают пептидогликан клеточной стенки бактерий и играют важную роль в лизисе хозяйских клеток. Эндолизин Ply57 фага Izhevsk имеет широкий спектр активности против бактерий *B. cereus sensu lato*, а также высокую термостабильность, что делает его перспективной основой для разработки антибактериальных средств и средств для борьбы с патогенными микроорганизмами с целью предотвращения бактериальной контаминации, вызванной бактериями группы *B. cereus*, включая известного и наиболее опасного представителя — *B. anthracis*, возбудителя сибирской язвы.

Некоторые бактерии способны вырабатывать поли-гамма-D-глутаминовую кислоту (PDGA) для образования капсулы, поверхностной структуры, которая защищает их от внешних воздействий. У патогенных бактерий капсула определяет вирулентность, обеспечивая защиту от иммунной системы и помогая избежать фагоцитирования. Кроме того, капсула мешает белкам взаимодействовать с клеточной стенкой, мембраной и блокирует действие антител и эндолизинов. Деполимераза EnvD, обнаруженная в бактерии *P. noertemantii*, разрушает капсулу бактерий, гидролизуя PDGA. Эта деполимераза разрушает капсулу *B. anthracis*, обладает хорошей термостабильностью, повышает эффективность антибиотиков и может улучшить методы лечения бактериальных инфекций.

Целью исследования является получение гибридного белка Ply57_EnvD, объединяющего свойства эндолизина и поли-гамма-D-глутамат деполимеразы.

В данной работе на основе метода TEDA (T5 Exonuclease-Dependent Assembly) была получена плазмидная конструкция *pET33_ply57_envD*, содержащая слитые гены *ply57* и *envD*. Далее был получен рекомбинантный штамм *E. coli* BL21 (DE) Star *pET33_ply57_envD* для последующего синтеза химерного белка. Гибридный белок Ply57_EnvD выделен из телец включения с использованием мочевины с последующей ренатурацией в большом объеме буфера и итоговой очисткой при помощи металл-хелатной хроматографии. Была проведена проверка активности Ply57_EnvD на способность разрушать PDGA *B. subtilis* VKM B-501^T и клеточную стенку *B. tropicus* ATCC 4342. Результаты показали, что при сохранении деполимеразной активности, удельная активность химерного белка в гидролизе пептидогликана уменьшается.

Ply57_EnvD обладает двойным действием, направленным на разрушение бактериальных клеток. Исследования в области применения антимикробных белков продолжаются, и предполагается, что эндолизины, деполимеразы или их гибридные формы могут стать ключевым компонентом новых стратегий для лечения инфекций, особенно в условиях роста числа штаммов бактерий, обладающих множественной устойчивостью к антибиотикам.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ «22-15-00385».

НЕСТРУКТУРНЫЙ БЕЛОК 1 ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА ВЫХОДИТ ИЗ КЛЕТОК В СОСТАВЕ РАЗНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ

Латанова А.А., Стародубова Е.С.

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

aalatanova@gmail.com

Инфекции, вызываемые флавивирусами, представляют угрозу в современном мире, поскольку для борьбы со многими из них нет профилактических вакцин и специфического лечения. В связи с этим изучение механизма патогенеза флавивирусов имеет большую важность. Среди факторов патогенеза особое внимание привлекает неструктурный белок 1 (NS1), который секретируется из инфицированных клеток отдельно от вирусных частиц и способен воздействовать на различные клетки организма. Недавно для флавивирусов денге и Лангат было выявлено, что белок NS1 выходит из инфицированных клеток также в составе экзосом – внеклеточных везикул малого размера, формирующихся внутри мультивезикулярных телец клетки. Целью данной работы было проанализировать наличие белка NS1 одного из представителей флавивирусов, вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) в разных популяциях внеклеточных везикул, выделяемых клетками, поскольку ранее этот аспект не был исследован.

Для изучения выхода белка NS1 в составе внеклеточных везикул клетки HEK293 или SH-SY5Y трансфицировали плазмидой, кодирующей NS1, и затем из среды культивирования проводили выделение различных популяций внеклеточных везикул и характеризовали их. Для контроля проводили выделение из клеток, трансфицированных базовым вектором. При последовательных стадиях центрифугирования и фильтрации из среды культивирования отделяли апоптотические тельца и микровезикулы. Затем с использованием коммерческого набора (Total exosome isolation reagent) проводили отделение экзосом. В полученных фракциях внеклеточных везикул определяли: размер частиц по динамическому световому рассеиванию (ZetaSizer) и NTA анализу (NanoSight300), тотальное содержание белка и наличие NS1 и специфических для каждой популяции маркерных белков с помощью вестерн-блота. Для определения наличия NS1 внутри внеклеточных везикул проводили их обработку протеиназой К с последующим анализом вестерн-блотом.

В результате выделения и характеристики внеклеточных везикул из сред культивирования клеток HEK293 и SH-SY5Y, экспрессирующих NS1 ВКЭ, обнаружено, что NS1 содержится во всех полученных популяциях: апоптотических тельцах, микровезикулах и экзосомах. При обработке везикул протеиназой К белок NS1 и внутривезикулярные маркеры сохраняются, что свидетельствует о нахождении NS1 внутри везикул.

Таким образом, было обнаружено, что белок NS1 ВКЭ выходит из клеток не только в свободной форме, но и внутри различных популяций внеклеточных везикул. Полученные данные указывают на необходимость дальнейшего изучения воздействия, переносимого во внеклеточных везикулах NS1 на другие клетки для понимания механизмов патогенеза как флавивирусов, так и ВКЭ, в частности.

Работа поддержана грантом РФФИ №23-24-00627.

МЕТИОНИН–ГАММА-ЛИАЗА КАК КОМПОНЕНТ ПРОТИВОМИКРОБНОЙ ДВУХКОМПОНЕНТНОЙ СИСТЕМЫ: РАЦИОНАЛЬНЫЙ РЕДИЗАЙН ФЕРМЕНТА

Левшина К.П., Куликова В.В., Коваль В.С., Ревтович С.В., Сольев П.Н.

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

levshina.ksusha2002@yandex.ru

Пиридоксаль-5'-фосфат-зависимая метионин– γ -лиаза (МГЛ) катализирует реакцию γ -элиминирования L-метионина и его аналогов. Фермент был обнаружен в некоторых бактериях, простейших и растениях.

Ранее было установлено, что МГЛ катализирует расщепление сульфоксидов S-алк(ен)ил-L-цистеина с образованием тиосульфидов, обладающих противомикробными свойствами. В последовательности МГЛ из *Clostridium novyi* имеются три остатка цистеина, которые могут модифицироваться продуктами реакции – тиосульфидами, что приводит к подавлению активности фермента. Во избежание инактивации фермента в результате блокирования SH-групп продуктами реакции нами была получена мутантная форма МГЛ с заменами остатков цистеина 118, 184 и 273 на гистидин и аланин методом сайт-направленного мутагенеза. Исследованы физико-химические и каталитические свойства полученного фермента. Мутантная форма МГЛ не катализировала расщепление природного субстрата L-метионина, но более эффективно превращала сульфоксиды S-алк(ен)ил-замещенного L-цистеина в антимикробные тиосульфиды. В отличие от фермента дикого типа, мутантная форма не подвергалась инактивации продуктами реакции в процессе реакции β -элиминирования сульфоксидов S-алк(ен)ил-L-цистеина. Антибактериальный эффект тиосульфидов, полученных в смеси мутантной МГЛ с сульфоксидами, был показан *in vitro* для нескольких штаммов грамположительных (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*) и грамотрицательных бактерий (*E. coli*, *Citrobacter freundii*, *Salmonella typhimurium*). Полученные данные дают возможность создать более эффективную, по сравнению с ферментом дикого типа, двухкомпонентную систему фермент/сульфоксид для получения противомикробных тиосульфидов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ проект №24-24-00304.

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ ПРОФИЛЯ МЕТИЛИРОВАНИЯ *IN VITRO*

Магера Е.М.¹, Бублик А.А.², Стрелкова А.Н.²

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

²АО «Биокад», Санкт-Петербург, Россия

magera.em@yandex.ru

Разработка препаратов генной терапии является одним из самых передовых и активно развивающихся направлений. Эффективность генотерапевтических препаратов, созданных на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (AAV) в качестве вектора, напрямую зависит от долгосрочной и устойчивой экспрессии доставляемого терапевтического трансгена. Зачастую, с целью обеспечения наилучшей эффективности экспрессии трансгена, используют сильные конститутивные вирусные промоторы, например, ранний промотор цитомегаловируса или модифицированные варианты промоторных последовательностей других организмов. Однако промоторные области вирусов обладают высокой плотностью CpG-сайтов, что отличает их от промоторов человека. Таким образом, CpG-богатые области рекомбинантной ДНК могут вызывать нежелательный иммунный ответ и являются мишенями для ДНК-метилтрансфераз (DNMT). Соответственно, при создании генотерапевтических препаратов важно учитывать и выявлять уязвимость экспрессионной кассеты к метилированию на ранних этапах разработки.

Поэтому целью работы была постановка и отработка методики, позволяющей определить профиль метилирования ДНК *in vitro* в двух временных точках после трансфекции.

Для этого в ходе работы провели трансфекцию линии гепатокарциномы человека HUH-7 и собрали клеточные осадки на 3 и 6 сутки после трансфекции. Образцы тотальной ДНК из клеточных осадков подвергали бисульфитной конверсии и проводили метил-независимую бисульфитную ПЦР. В качестве отрицательного контроля использовали ПЦР-продукт, не содержащий 5-метилцитозин. Для оценки вариабельности профиля метилирования ДНК получали библиотеку клонов, содержащих вектор pGEM-T, несущий вставку с исследуемой последовательностью промотора. Целевой участок секвенировали по Сэнгеру. Тотальную мРНК, полученную после трансфекции, использовали для оценки уровня экспрессии целевого белка методом ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией.

На данный момент полученные в ходе работы данные находятся на стадии обработки. На конференции будет представлено описание разработанной тест-системы и результаты её использования в виде количественной оценки степени метилирования целевого участка в двух временных точках после трансфекции и оценки уровня экспрессии целевого белка в двух выбранных точках.

ВВЕДЕНИЕ ФОСФОМИМИЧЕСКИХ ЗАМЕН В БЕЛКИ СЕМЕЙСТВА EIF4E *SOLANUM TUBEROSUM*

Малеев М.Г., Колесникова В.В., Никонов О.С., Никонова Е.Ю.

Институт белка РАН, Пушино, Россия

maks_gennadevich@inbox.ru

Белки семейства eIF4E представляют собой группу эукариотических односубъединичных факторов инициации трансляции 4E массой около 25 kDa, которые связываются с 5'-кэп-структурой и участвуют в формировании eIF4F комплекса, обеспечивающего трансляцию мРНК. На данный момент установлено, что одним из способов тонкой регуляции трансляции мРНК является прямое фосфорилирование факторов 4E, однако до настоящего времени нет однозначного понимания, каким образом фосфорилирование влияет на структуру и функции факторов. Особый интерес представляет изучение влияния фосфорилирования на структуру и функцию факторов 4E картофеля в контексте борьбы с вирусными заболеваниями сельскохозяйственных растений. К сожалению, на сегодняшний день отсутствуют данные о регуляции трансляции посредством фосфорилирования фактора 4E картофеля (*Solanum tuberosum*).

Целью данной работы является получение мутантных форм белков семейства 4E, несущих аминокислотные фосфомимические замены в положениях предсказанных сайтов фосфорилирования.

Нами был проведен анализ модели SteIF4E и осуществлен поиск возможных сайтов фосфорилирования, влияющих на структуру фактора. В результате идентифицирован сайт, фосфорилирование которого влияет на конформационно-динамические свойства SteIF4E. Предполагаемый сайт фосфорилирования находится в аминокислотной последовательности, узнаваемой родственной Snf1 протеинкиназы 1 (SnRK1). При использовании этого фермента для фосфорилирования фактора *in vitro* даст гетерогенный препарат белка. Поэтому нами были внесены точечные нуклеотидные замены в плазмиды, кодирующие изоформы SteIF4E, для получения мутантных форм с фосфомимическими заменами в сайте фосфорилирования SnRK1. Для этих мутантных форм была разработана схема выделения и белки получены в препаративных количествах.

Результаты: 1) в SteIF4E обнаружен потенциальный сайт фосфорилирования, способный повлиять на функции белка; 2) получены мутантные формы белков семейства SteIF4E, несущие аминокислотные фосфомимические замены в положениях предсказанных сайтов фосфорилирования.

ИЗУЧЕНИЕ ПРОНИЦАЕМОСТИ МОДЕЛЬНЫХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН ДЛЯ ЭХИНОКАНДИНОВ МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ

Малыхина А.И., Ефимова С.С., Остроумова О.С.

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

amalykhina@incras.ru

В настоящее время грибковые инфекции становятся значимой угрозой общественному здоровью в связи с высокой распространенностью и развитием устойчивости к проводимой терапии. Эхинокандины (ЭК) являются антимикотиками, рекомендованными в качестве препаратов первой линии. ЭК нарушают работу 1,3-b-d-глюкансинтазы, приводя к нарушению целостности клеточной стенки гриба. ЭК-устойчивые мутации находятся в мембранной части фермента. Однако, как именно ЭК действуют на глюкансинтазу – непосредственно связываясь с ней или путем влияния на липидное окружение – остается неизвестным. Показано, что модулирование липидного состава мембраны также вызывает ферментативную устойчивость к ЭК. Детальное понимание взаимодействия ЭК с мембраной может помочь в повышении эффективности и борьбе с устойчивостью к ЭК. Целью работы является изучение проницаемости липидных мембран разного состава для ЭК (анидулафунгина (АФ), каспофунгина (КФ), микафунгина (МФ)) методом компьютерной симуляции.

Мембраны из смеси 1-пальмитил-2-олеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ПОФХ), ПОФХ:холестерин(Хол) 2:1, ПОФХ:эргостерин(Эрг) 2:1 были расположены в *x-y* плоскости гидратированного прямоугольника размером 4.2x4.2x9.7 нм в растворе 0.15 М NaCl. Молекула ЭК помещена в раствор на расстоянии 3 нм от центра мембраны. Параметризация молекул ЭК и сборка моделей проводилась на платформе CHARMM-GUI с использованием общеатомного силового поля CHARMM36m. Симуляция проводилась на GROMACS v.2023.2. Направленная симуляция проводилась с применением постоянной силы в 500 кДж/моль/нм² между центром массы ЭК и мембраной по *z* оси в течение 50 нс при температуре 25°C. Для расчета профиля свободной энергии использовался метод «umbrella sampling». Реакционная координата располагалась между 3 нм (водная фаза) и 0 нм (центр мембраны) с шагом 0.2 нм. Расчет произведен в соответствии с «WHAM» алгоритмом.

Изменение средней потенциальной энергии между водной фазой и центром мембраны при прохождении ЭК через бислой для мембран ПОФХ, ПОФХ:Хол, ПОФХ:Эрг составило: для АФ – 24.9, 42.5, 39.4 ккал/моль; для КФ – 28.3, 50.0, 41.2 ккал/моль; для МФ – 36.1, 52.3, 55.7 ккал/моль, соответственно. Разница энергий между модельной мембраной клеток человека (ПОФХ:Хол) и грибов (ПОФХ:Эрг) была равна: для АФ – 3.1, для КФ – 8.8, для МФ – 3.4 ккал/моль. Наличие стерина в мембране повышало энергию проницаемости на 14.5 для АФ, 12.9 для КФ и на 16.2 ккал/моль для МФ. Профиль энергии был схож у АФ и МФ, и демонстрировал низкую энергию нахождения молекулы в головах липидов, что, вероятно, связано с наличием полярного атома в хвосте этих ЭК. У КФ энергия в районе голов липидов была довольно высокой, что может быть связано с гидрофобным хвостом молекулы. Среднее количество водородных связей между ЭК и водой при нахождении в водной фазе составило 7.5 для АФ, 8.0 для КФ и 9.8 для МФ, что соответствует литературным данным о гидрофильности (logP -1.5, -4.8, -6.3 для АФ, КФ и МФ).

Энергии проницаемости ЭК соединений соотносятся с их гидрофильностью и увеличиваются в ряду АФ, КФ, МФ. Установлено, что добавление стерина, приводящее к увеличению толщины мембраны и снижению площади на липидную молекулу, значимо

повышает энергию проницаемости. Неожиданный эффект большой разницы в энергиях между Эрг и Хол бислоями для КФ может быть отчасти объяснен увеличенным количеством водородных связей между КФ и водой в Хол мембране, которое наблюдалось в направленной симуляции. На основании профиля энергий можно предположить лучшее встраивание АФ и МФ в бислой, по сравнению с КФ, что коррелирует с эффективностью этих препаратов.

Работа поддержана грантом РНФ № 22-74-10023.

БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ ПОИСК ХИТИНАЗЫ *PARALITHODES CAMTSCHATICUS*

Минина Ю.А.¹, Позднякова-Филатова И.Ю.²

¹Тульский государственный университет, Тула, Россия

²ФИЦ Пуштинский научный центр биологических исследований РАН, Пушино, Россия

mininajulia2002@gmail.ru

Хитиназы – это гидролитические ферменты, катализирующие деградацию хитина путем разрыва в нем гликозидных связей. В биотехнологии хитиназы в комплексе с β -1,3-глюканазами применяют для разрушения клеточной стенки грибов, в том числе дрожжей. Доступные на рынке препараты имеют высокую стоимость и длительный срок поставки, поэтому мы решили разработать препарат хитиназы пригодный для лизиса дрожжей.

Источником гена мы выбрали *Paralithodes camtschaticus* (red king crab, камчатский краб), поскольку основной пищей для него служат организмы, содержащие хитин. Транскриптом был ранее собран de novo Олегом Гусевым с использованием данных базы NCBI (SRA NCBI: SRX5509375; SRX5509376; SRX5509377; SRX5509378). Для того, чтобы идентифицировать зрелую мРНК в имеющихся транскриптомных данных, необходимо было найти подходящую референсную последовательность. *Paralithodes camtschaticus* имеет следующую таксономическую принадлежность: Domain Eukaryota, Kingdom Animalia, Phylum

Arthropoda, Class Malacostraca, Order Decapoda, Suborder Pleocyemata, Infraorder Anomura, Family Lithodidae, Genus Paralithodes. Ближайшие родственные организмы, для которых в базе данных UniProtKB/TrEMBL были обнаружены хитиназы, относились к Suborder Pleocyemata. Из 223 представленных в базе UniProtKB/TrEMBL аминокислотных последовательностей мы случайным образом выбрали 12, которые принадлежали *Eriocheir sinensis* (A0A024BU17), *Crangon crangon* (A0A2Z4BXY9), *Portunus trituberculatus* (A0A218KB11, A0A5B7ILC1, A0A218KBH7, A0A5B7CFS3), *Macrobrachium nipponense* (W8PQ98), *Homarus americanus* (A0A8J5JYK0, A5YVJ9), *Procambarus clarkia* (A0A075BYD9), *Palaemon varians* (D7F2T9), *Scylla paramamosain* (A0A2U9QGC2). С помощью инструмента Genome Workbench мы идентифицировали контиг, содержащий открытую рамку считывания, продукт которой был похож на хитиназы в базе данных UniProtKB/Swiss-Prot.

Длина обнаруженной зрелой мРНК составляет 1272 нуклеотида. Открытая рамка считывания насчитывает 1269 нуклеотидов (стоп-кодон в контиге отсутствует), продукт имеет длину 423 аминокислоты. Аминокислотная последовательность предполагаемой хитиназы *Paralithodes camtschaticus* схожа с хитиназами позвоночных животных (например, *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Sus scrofa*, *Bos taurus*), беспозвоночных животных (например, *Brugia malayi*, *Manduca sexta*, *Drosophila melanogaster*), растений (*Lotus japonicus*, *Medicago truncatula*, *Arabidopsis thaliana*), грибов (например, *Aphanocladium album*, *Trichoderma harzianum*, *Candida albicans*), бактерий (например, *Serratia marcescens*, *Streptomyces lividans*, *Bacillus subtilis*) и вирусов (*Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus*, *Orgyia pseudotsugata multiple nucleopolyhedrovirus*): идентичность находится в диапазоне от 21 до 42% при покрытии от 35 до 99%, что может указывать на различия ферментативных свойств хитиназы *Paralithodes camtschaticus* и уже изученных хитиназ эукариот, бактерий и вирусов.

КОМПЛЕКС mTOR И МАРКЕРЫ АУТОФАГИИ В ПЛАЦЕНТЕ И МОЗГЕ ПЛОДА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ

Михель А.В.^{1,2}, Щербицкая А.Д.^{1,2}, Горбова А.В.¹

¹Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия

²Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

anastasia.michel39@gmail.com

Показано, что материнская гипергомоцистеинемия (ГГЦ) характеризуется повышением уровня гомоцистеина (ГЦ) как в организме матери, так и плода. ГЦ способен влиять на систему «мать-плацента-плод»: проходит через плацентарный барьер, способствует изменению морфофункционального состояния плаценты и влияет на формирование архитектоники коры головного мозга плода. Активация комплекса mTOR (mTORC) способствует клеточному выживанию и пролиферации клеток, ингибирование же может приводить к развитию аутофагии. Потенциально ГГЦ способна влиять на сигнальные пути, способствующие развитию аутофагии, являющейся ответом на недостаток питательных веществ и клеточный стресс. Однако в настоящее время вопрос и влиянии пренатальной ГГЦ на развитие этого процесса и на систему mTOR в плаценте и мозге плода изучен недостаточно. В связи с этим, целью работы является оценка влияния ГГЦ на активацию компонентов системы mTORC и содержания маркеров аутофагии в плаценте и мозге плода на 14-й и 20-й день беременности (E14 и E20). Самкам крыс линии Wistar с 4-го дня беременности и до родоразрешения дополнительно перорально вводили: контрольной группе – воду; подопытной – раствор L-метионина (0,6 г/кг). На E14 и E20 происходил забор материала. Плаценту делили на материнскую (МЧП) и плодную части (ПЧП). Исследование содержания mTOR, p-mTOR, 4EBP1, p-4EBP1, p-рpS6 и рpS6, а также маркеров аутофагии (Atg13, Beclin-1, Ambra-1, LC3B, р62, LAMP-2) было выполнено методом вестерн блот. В группе с материнской ГГЦ на E14 отмечено одновременное снижение уровня рpS6 в МЧП и ПЧП, сопровождающееся уменьшением содержания 4EBP1 и mTOR только в МЧП. Однако статистически значимых изменений в уровнях компонентов mTORC и нижележащих маркеров в мозге плода этого срока развития выявлено не было. В свою очередь, на E20 отмечено повышение уровня mTOR и p-4EBP1 в МЧП и ПЧП, соответственно. В мозге же, наоборот, наблюдается снижение только содержания 4EBP1. Интересно, что при исследовании маркеров развития аутофагии на E14 обнаруживается снижение уровня Atg13 и LC3B в ПЧП, в то время как в МЧП отмечено только повышение содержания LC3B. При этом метиониновая нагрузка приводит к повышению уровня LAMP-2 и снижению уровня Beclin-1 в мозге плода на E14. В плаценте к концу беременности наблюдаются более ярко выраженные изменения в содержании маркеров аутофагии: повышение Ambra-1 и LC3B в ПЧП и МЧП, а также Beclin-1 и LAMP-2 в ПЧП. В мозге же статистически достоверных различий в уровне исследуемых маркеров выявлено не было. Таким образом, материнская ГГЦ приводит к изменению передачи сигналов mTORC преимущественно в МЧП на E14. Кроме того, полученные данные свидетельствуют о возможном снижении активации аутофагии в ПЧП на E14 и, напротив, стимуляции сборки аутофаголизосом на E20 в этой структуре. При этом мозг плода характеризуется меньшей изменчивостью исследуемых маркеров, что может быть результатом компенсаторного вклада плаценты в условиях высокого уровня ГЦ матери.

Работа поддержана грантом РФФИ №22-15-00393.

CRISPR/CAS9 ОПОСРЕДОВАННАЯ ИНАКТИВАЦИЯ ГЕНА SH3GL2 ПРИВОДИТ К НАРУШЕНИЮ КОРТИКОГЕНЕЗА

Моторина А.О.¹, Гавриш М.С.¹, Тутукова С.А.¹, Тарабыкин В.С.²

¹Научно-исследовательский институт нейронаук, Национальный исследовательский
Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород,
Россия;

²Институт клеточной биологии и нейробиологии, Медицинский университет Шарите,
Берлин, Германия

a_motorina99@mail.ru

Структурное и функциональное развитие центральной нервной системы (ЦНС) зависит от процессов нейрогенеза, миграции нейронов и формирования связей между ними. Миграция нейронов является важным явлением для нормального развития и представляет собой четко организованную последовательность молекулярно-генетических событий. Поэтому нарушение любого из этапов может приводить к широкому спектру пороков, с различной морфологией коры, генетической или внешней этиологией, родственными синдромами и клиническими проявлениями.

В процессах регуляции миграции нейронов особое место занимают транскрипционные факторы семейства Neurod – Neurod1, Neurod2 и Neurod6. Они играют ключевую роль в регуляции дифференцировки, миграции, выживания и спецификации нейронов. Показано, что у мышей с двойным нокаутом Neurod2/6 распределение нейронов описано с увеличением верхних и уменьшением более глубоких слоев. У мышей с тройным нокаутом Neurod1/2/6 рано рожденные нейроны преимущественно подвергаются апоптозу, в результате чего исчезают популяции нейронов нижних слоев.

Чтобы идентифицировать молекулы, находящиеся под прямым контролем факторов Neurod, нашими коллегами из института клеточной биологии и нейробиологии при клинике Шарите был выполнен транскрипционный анализ, благодаря которому были выявлены гены, чья экспрессия в коре мутантных животных была значительно изменена. В связи с этим, наш интерес был обращен к гену Sh3gl2, экспрессия которого в мутантных мышах снижается ~ на 76%. Кроме того, по данным глубокого мРНК-секвенирования в комбинации с ChIP-Seq (иммунопреципитация хроматина), выявлено, что Sh3gl2 может быть одной из прямых мишеней Neurod2.

Sh3gl2 участвует в быстром клатрин-независимом эндофилин-опосредованном эндоцитозе, который является основным путем рециклинга синаптических везикул, участвуя в синаптической пластичности и регуляции проведения нервного импульса.

Для выявления роли гена Sh3gl2 в миграции нейронов и процессах нейрогенеза был проведен нокаут гена с использованием технологии CRISPR/Cas9. Генетический конструкт был введен в нейрональные клетки-предшественники эмбрионов мышей линии C57Bl/6 на e13.5 с помощью *in utero* электропорации. На сроке e18.5 было продемонстрировано, что нокаут гена Sh3gl2 приводит к задержке миграции нейронов в нижних слоях коры. Вероятно, Sh3gl2 принимает участие не только в процессах миграции нейронов, а также в определении клеточной судьбы на ранних этапах нейрогенеза.

В заключение стоит отметить, что идентификация генов-мишеней транскрипционных факторов Neurod и регулируемых ими каскадов, позволит понять процессы, лежащие в основе нейрогенеза и миграции нейронов, что послужит фундаментом для создания новых методов пренатальной диагностики и терапии.

Исследование выполнено при поддержке министерства науки и высшего образования РФ (грант № FSWR-2023-0029).

ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ И ПОИСК ПАРТНЕРОВ ХРОМАТИН РЕМОДЕЛИРУЮЩЕГО КОМПЛЕКСА BRAHMA (SWI/SNF)

Напрягло Е.А.

Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

my.study.folder@yandex.ru

Введение. Поиск механизма воздействия на молекулярный аппарат клетки, контролирующей активность генов, – одна из центральных задач молекулярной биологии. Работа генетического аппарата основана на динамическом равновесии между упаковкой генома и доступа к нему, что обеспечивается хроматин ремоделирующими комплексами, обеспечивающими изменение физической структуры хроматина в процессе экспрессии генов у эукариот за счет перемещения, дестабилизации, реструктурирования нуклеосом, а также отделения гистонов от молекулы ДНК. [1]

Актуальность. Данные, полученные в результате исследования, в перспективе послужат основой для разработки методов направленной регуляции экспрессии генов у эукариот, что позволит влиять на работу клетки. Например, в 20% случаев заболевания раком источником болезни является мутация в генах, кодирующих субъединицы ремоделера SWI/SNF.

Цели и задачи. Цели исследования: 1) уточнение структурно-функциональной организации комплекса Brahma; 2) изучение механизмов взаимодействия комплекса с ядерными белками-партнерами. Текущая основная задача – детальное изучение белка SAYP (ген *e(y)3*), структурной единицы комплекса SWI/SNF. SAYP обеспечивает связь энхансера с промотором при активации гена, а его частичная инактивация приводит к подавлению экспрессии гена [2].

Краткое описание. Объектом для исследования выбран белковый ремоделер семейства Brahma (SWI/SNF) организма *Drosophila melanogaster*, состоящий из 8 основных субъединиц, локализованный в большей части сайтов активной транскрипции РНК-полимеразы II и имеющий гомолог РНФ10 у человека.

Для изучения механизмов активации энхансеров в норме и на фоне нокдаунов по субъединицам SWI/SNF, будет использована модельная система энхансер-зависимой транскрипции экзисон-зависимых генов на клеточной линии S2. Взаимное влияние субъединиц комплекса на процессы привлечения на промоторы и энхансеры будет устанавливаться с помощью метода хроматин-иммунопреципитации.

Результаты. Сконструирована плаزمида рQE30 с частью кодирующей последовательности *e(y)3*. После подбора условий экспрессии, с помощью компетентных клеток-продуцентов *E.coli* XL-1 получены пробы белка в препаративных количествах, инъекционно введенных в тела кроликов. Из сыворотки крови получены антитела к исследуемому белку. Их специфичность по отношению к SAYP подтверждена методом вестерн-блот анализа.

Выводы. В дальнейшем планируется использовать полученные антитела для биохимических и молекулярно-биологических экспериментов с экзисон-зависимыми генами поиска партнеров ремоделера SWI/SNF.

Работа поддержана грантом РФФИ №20-14-00201.

Список литературы

1. Clapier C. R., Cairns B. R. The biology of chromatin remodeling complexes //Annual review of biochemistry. – 2009. – Т. 78. – С. 273-304.
2. Shidlovskii, Y.V. et al. Subunits of the PBAP Chromatin Remodeler Are Capable of Mediating Enhancer-Driven Transcription in *Drosophila*. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 2856.

СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ИНГИБИРОВАНИЯ MIF ФЕНИЛИЗОТИОЦИАНАТОМ

Немчинова А.Р.¹, Иванова А.Г.¹, Костевич В.А.², Соколов А.В.², Самыгина В.Р.¹

¹Институт кристаллографии, Курчатовский Комплекс Кристаллография и Фотоника
НИЦ «Курчатовский Институт», Москва, Россия

²Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

lera@crys.ras.ru

Фактор ингибирования миграции макрофагов (MIF) является мультифункциональным белком, принадлежащем к семейству цитокинов. MIF обладает провоспалительной активностью, что делает его мишенью для поиска эффективных ингибиторов. Кристаллическая структура MIF человека была получена впервые в 1996 году [1]. MIF представляет собой тример, состоящий из субъединиц с молекулярной массой 12,5 кДа. Ингибиторы MIF делятся на ковалентные и нековалентные. Большой спектр ингибиторов (в частности, изотиоцианаты) связываются с каталитически важным N-концевым пролином ковалентно. Однако детали этого процесса не ясны.

В работе были получены и проанализированы две кристаллические структуры комплекса MIF с фенилизотиоцианатом (PITC). Одна структура (комплекс MIF-PITC-1) была получена настаиванием кристаллов апоформы MIF, выращенных методом диффузии в парах. При получении второго комплекса (MIF-PITC-2) перед кристаллизацией MIF был предварительно модифицирован в течение суток путем добавления раствора PITC. Кристаллы MIF-PITC-2 получены методом встречной диффузии. Набор дифракционных данных собран на рентгеновском дифрактометре SynergyLab (Rigaku, Япония). Структура MIF-PITC-1 решена с разрешением 1.9Å. Набор дифракционных данных с комплекса MIF-PITC-2 собран на станции синхротронного излучения BL41XU синхротрона Spring-8 (Хего, Япония). Структура MIF-PITC-2 решена с разрешением 1.17Å.

В структуре комплекса MIF-PITC-2 N-концевой пролин, играющий важную роль в таутомеразной активности MIF, ковалентно модифицирован PITC во всех трех субъединицах. Положение PITC сходно с положением фенилизотиоцианата (код pdb 4F2K).

В структуре комплекса, полученного кратковременным настаиванием с PITC (MIF-PITC-1), обнаружена молекула PITC, нековалентно связанная двумя из трех субъединиц. Такая мода связывания отличается от моды связывания PITC в комплексе MIF-PITC-2 и обнаружена впервые. Таким образом, установлено, что ингибирование не является одноступенчатым процессом и существует «сайт удерживания», в котором связывается ингибитор непосредственно перед ковалентной модификацией N-концевого пролина.

Работа выполнена частично в рамках темплана Курчатовского комплекса Кристаллография и Фотоника НИЦ «Курчатовский Институт». Кристаллизация MIF-PITC-2 и получение набора рентгеновских данных от кристалла этого комплекса проведен в рамках Федеральной космической программы 2016–2025 гг. (ОКР «МКС (Наука)»).

[1] Sun et al. (1996) Proc Natl. Acad. Sci. USA **93**: 5191-5196

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ТАЛИНА

Несговорова Н.А., Перцева А.С.

Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

nesgovorova.na@gmail.com

Белок талин является компонентом системы клеточного цитоскелета – он опосредует связь между актиновыми филаментами и интегриновыми рецепторами внеклеточного матрикса. Талин выполняет роль механосенсора, трансформируя механические стимулы в биохимические сигналы посредством активации сайтов связывания с различными молекулами (рецепторами, элементами цитоскелета, адаптерными белками). С-концевой палочковидный домен молекулы талина представлен пучками альфа-спиралей (R1-R13), особая укладка которых определяет их способность к растяжению. Именно эта особенность структурной организации позволяет талину выполнять роль «естественного амортизатора»: под действием физических стимулов белок разворачивается, рассеивая приложенную кинетическую энергию, после чего возвращает исходную форму. Уникальные механические свойства обуславливают потенциальное применение талина в качестве основы для создания материалов с улучшенными защитными свойствами. Особенно остро вопрос разработки таких материалов стоит в области аэрокосмической и военной промышленности.

Целью настоящей работы является разработка технологии получения рекомбинантного талина в клетках *Escherichia coli*. В ходе исследования был разработан экспрессионный плазмидный вектор, несущий целевую последовательность, которая кодирует модифицированные субдомены R1-R3 талина *Mus musculus*. Компетентные клетки BL21(DE3) были трансформированы данным плазмидным вектором путем электропорации для создания штамма-продуцента рекомбинантного талина. Полученный штамм-продуцент характеризовался быстрым ростом при культивировании и обеспечивал высокий выход целевого продукта в растворимой форме. Также была апробирована методика очистки полученного рекомбинантного талина с помощью металл-аффинной хроматографии.

Таким образом, в ходе проведенных экспериментов была разработана технология получения рекомбинантного талина в бактериальной системе экспрессии. Дальнейшая работа по подбору условий полимеризации мономерной формы талина и оценке физико-химических свойств полученного полимера станет предпосылкой для создания инновационного защитного материала. Полимерный материал, разработанный на основе рекомбинантного талина, может найти свое применение в качестве защитного покрытия для бронежилетов и аэрокосмического оборудования.

ИЗУЧЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ СТРУКТУРЫ БЕЛКОВ, СПРОВОЦИРОВАННЫХ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕМ

Никольский К.С., Куликова Л.И., Петровский Д.В., Руднев В.Р., Кайшева А.Л.

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
Москва, Россия

kirill.s.nikolsky@yandex.ru

Посттрансляционная модификация белка (ПТМ) – это изменение белковой молекулы путем ковалентного присоединения химической группы после этапа синтеза. В природе ПТМ белков распространены. На сегодня известны более 400 вариантов модификаций. Несмотря на активное изучение структурных особенностей модифицированных форм белков по сравнению с интактными, среди ученых нет единого мнения о выраженности структурных изменений белка после модификации. Фосфорилирование белка, или присоединение к белку фосфатной группы, является одним из самых распространенных видов посттрансляционной модификации. При этом научный консенсус о степени влияния фосфорилирования на структуру и функцию белка до сих пор не достигнут.

Мы провели анализ, который посвящен изучению влияния фосфорилирования отдельного аминокислотного остатка (серин, треонин, тирозин) на локальные изменения структуры белка в окрестности 15 аминокислотных остатков от участка фосфорилирования, а также белка в целом (глобальные изменения). Для этого анализа в банке данных белковых структур (PDB) были отобраны белковые пары – интактный белок и соответствующая фосфорилированная форма белка.

В анализе не глобальные изменения, охватывающие структуру целого белка. Однако наблюдалась гетерогенность изменений геометрических параметров белков в районе сайта модификации. В зависимости от степени этих изменений были выделены две группы: первая группа, характеризующаяся значительными изменениями в окрестности участка фосфорилирования ($\text{RMSD} > 2\text{\AA}$), и вторая группа, в которой изменения в окрестности сайта фосфорилирования были незначительны ($\text{RMSD} 2\text{\AA}$). Сайты модификации белков первой группы чаще всего локализованы в центре неструктурированных областей, при этом изменения во второй группе – в α -спиралях или на границе неструктурированного участка.

Белки обеих групп участвуют во многих биологических процессах. В белках первой группы, сайт фосфорилирования, как правило, расположен вблизи или в сайте связывания с белками-партнерами. В белках же второй группы этот сайт обычно удалён от сайтов связывания. Структурные изменения, которые претерпевают модифицированные белки, варьируют степени выраженности. Наблюдаемые структурные изменения в целом согласуются с литературными данными о модулировании функции белка после фосфорилирования. Изучение влияния посттрансляционных модификаций на структуру и функцию белка – важная задача структурной биологии и биомедицины.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных исследований Российской Федерации на долгосрочный период 2021–2030 гг. (No122092200056-9).

ПОИСК ПАРТНЕРОВ ХРОМАТИН-РЕМОДЕЛИРУЮЩЕГО КОМПЛЕКСА СЕМЕЙСТВА
ВРАНМА (SWI/SNF) И ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ
ОРГАНИЗАЦИИ БЕЛКОВОГО ФАКТОРА OSA У *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Нуралиева С.З.¹, Шидловский Ю.В.^{2,3}

¹Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

²Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

³Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова,
Москва, Россия

Введение. Регуляция экспрессии генов осуществляется в основном на стадии инициации транскрипции. Среди факторов транскрипции выделяют большую группу – коактиваторы транскрипции.

Одним из механизмов, влияющих на активность генов, является ремоделирование хроматина, изменяющее его физическую структуру. Модификация нуклеосомной матрицы осуществляется с помощью одной из групп коактиваторов транскрипции – хроматин-ремоделирующих комплексов. Ремоделирование приводит к изменению доступности определенных участков геномной ДНК к регуляторным факторам транскрипции. Однако, координация работы различных групп коактиваторов, динамика их привлечения на хроматин изучена еще недостаточно.

Мы занимаемся изучением семейства ремоделеров SWI/SNF [1].

Актуальность. На данный момент изучение механизмов регуляции активности генов – одна из наиболее актуальных фундаментальных задач молекулярной биологии. Координация привлечения факторов транскрипции на матрицу ДНК – процесс, обеспечивающий динамику экспрессии генов. Его изучение открывает возможность направленной регуляции экспрессии. Кроме того, нарушение работы ортологов у человека (ген ARID) приводит к раковым заболеваниям, нарушениям развития.

Цель и задачи. Osa – мультидоменный белок, выполняющий функцию привлечения комплекса SWI/SNF на энхансеры и промоторы [2]. Основная цель – структурно-функциональный анализ белкового фактора. Задачи: 1) описать взаимодействие фактора osa с ядерными белками-партнерами; 2) предсказание доменной структуры белка osa и уточнение его функции в процессе привлечения комплекса SWI/SNF на хроматин.

Краткое описание работы. На модельной системе – комплексе экдизон-зависимых генов в культуре клеток S2 – проведем активацию генов экдизоном и проверим привлечение экдизонового рецептора, изучаемых субъединиц и РНК-полимеразы на промоторы и энхансеры этих генов. Будет проведена серия нокдаунов по субъединицам комплекса SWI/SNF, после чего изучен механизм активации энхансеров. С помощью метода хроматин-иммунопреципитации будет изучено взаимное влияние субъединиц комплекса SWI/SNF.

Результаты. Сконструирована плазмида, включающая в себя эпитоп фактора osa, трансформированная в культуру клеток *E.coli*, благодаря чему получен рекомбинантный белок, на основе которого созданы препараты для инъекций в кроликов. Из сывороток крови получены антитела, специфичность которых к белку osa доказана методом вестерн-блот анализа.

Выводы. С помощью полученных антител предстоит провести эксперименты с целью поиска партнеров для хроматин-ремоделирующего комплекса SWI/SNF.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского Научного Фонда 20-14-00201.

Список литературы

1. Shidlovskii Y. V. et al. Subunits of the PBAP chromatin remodeler are capable of mediating enhancer-driven transcription in *Drosophila* //International journal of molecular sciences. – 2021. – Т. 22. – №. 6. – С. 2856.
2. Collins R. T. et al. Osa associates with the Brahma chromatin remodeling complex and promotes the activation of some target genes //The EMBO journal. – 1999. – Т. 18. – №. 24. – С. 7029-7040.

ПОЛУЧЕНИЕ *DE NOVO* РЕКОМБИНАНТНЫХ СТРУКТУРНЫХ БЕЛКОВ НОВОГО ВИРУСА ХАСЕКИ

Осинкина И.А., Гладышева А.В.

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

osinkina_ia@vector.nsc.ru

Изучение новых вирусов является важным этапом превентивного противодействия вирусным угрозам. Структурные вирусные белки являются основным продуктом, синтезируемым в клетках при заражении – из них в дальнейшем будут собираться новые вирусные частицы. Изучение их строения, структуры и свойств помогает предугадывать свойства и особенности протекания вирусной инфекции, разрабатывать методы диагностики и защиты. Одним из недавно впервые обнаруженных вирусов является вирус Хасеки (Haseki tick virus, HSTV) – новый вирус из группы неклассифицированных вирусов семейства *Flaviviridae*, впервые выявленный на территории РФ в образцах клещей и сывороток крови людей после укуса клеща. Инфекция, вызванная вирусом Хасеки, проявляется в виде лихорадки, затруднения дыхания и боли в горле. Геном вируса Хасеки представлен одноцепочечной (+)РНК размером около 16 000 нуклеотидов, содержит одну открытую рамку считывания, фланкируемую 5' и 3' нетранслируемыми регионами. Однако механизмы реализации генетической информации вируса Хасеки, структура его генома и вирусных белков остается полностью неизученным.

В данной работе было предсказано расположение надмембранных частей двух предполагаемых структурных белков вируса Хасеки SP1 и SP2. Для оценки пространственной организации белков SP1 и SP2 были построены модели третичной структуры в нейросети AlphaFold2. Дальнейший дизайн искусственных генов производили таким образом, чтобы уменьшить количество не структурированных областей в получаемых рекомбинантных белках для улучшения эффективности их дальнейшей кристаллизации.

Из попарно перекрывающихся олигонуклеотидов были собраны искусственные гены, кодирующие рекомбинантные белки SP1 и SP2, содержащие нуклеотидную кодон-оптимизированную последовательность белков SP1 (474 н.п.) и SP2 (450 н.п.). Для дальнейшего получения чистых рекомбинантных белков и отщепления аффинных меток при проведении хроматографической очистки в состав генетических конструкций, содержащих встройки искусственных генов, была добавлена аффинная метка из шести гистидинов и сайт протеолиза пикорнаином 3С риновируса A28 «Leu-Gln-Ala-Ile-Phe-Gln↓Gly-Pro». На основе плазмидных векторов были созданы устойчивые генетические конструкции pJET1.2/HSTV-SP1 и pJET1.2/HSTV-SP2 предназначенные для хранения и наработки рекомбинантных генов и конструкции pET200/HSTV-SP1 и pEASY/HSTV-SP1, содержащие систему экспрессии на основе Lac-операона. Для рекомбинантного белка SP1 были созданы прокариотические штаммы-продуценты BL-21/pET200/HSTV-SP1, с оптимальными условиями экспрессии: культивирование 16-20 часов при 20°C, 180 об/мин с добавлением 1мМ ИПТГ, и KRX/pET200/HSTV-SP1 – культивирование 20 часов при 16°C, 210 об/мин с индукцией 1мМ ИПТГ и 0,1% рамнозы.

Полученные в результате работы генетические конструкции, кодирующие рекомбинантные структурные белки SP1 и SP2 вируса Хасеки и штаммы-продуценты BL-21/pET200/HSTV-SP1 и KRX/pET200/HSTV-SP1 будут применены в дальнейших работах по получению, очистке, кристаллизации и расшифровке третичной структуры белков SP1 и SP2 вируса Хасеки с целью изучения их структуры, механизмов реализации генетической информации вируса Хасеки и своевременной организации противоэпидемических мер.

ВЛИЯНИЕ ТКАНЕСПЕЦИФИЧНОЙ СВЕРХЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ СЕМЕЙСТВА *DICER* НА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Пакшина Н.Р.¹, Коваль Л.А.¹, Щеголева Е.В.¹, Земская Н.В.¹, Яковлева Д.В.¹,
Шапошников М.В.¹, Прошкина Е.Н.¹, Москалев А.А.^{1,2}

¹Институт биологии Федерального исследовательского центра Коми научного центра
Уральского отделения Российской академии наук, Сыктывкар, Россия

²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

pakshina.n.r@ib.komisc.ru

МикроРНК и короткие интерферирующие РНК относятся к некодирующим РНК и играют важную роль в регуляции генной экспрессии на посттранскрипционном уровне и в поддержании стабильности генома. Они участвуют в различных биологических процессах, включая детерминацию продолжительности жизни и ответ организма на неблагоприятные воздействия. Белки семейства Dicer обеспечивают биогенез этих некодирующих РНК. При этом у *Drosophila melanogaster* присутствует два белка этого семейства: Dicer-1 осуществляет процессинг пре-микроРНК в микроРНК, тогда как Dicer-2 принимает участие в биогенезе коротких интерферирующих РНК. Нарушение регуляции генов, кодирующих белки Dicer, может вызывать изменения в профилях экспрессии микроРНК и негативно сказываться на длительности жизни и скорости старения организма, а также вызывать возраст-зависимые заболевания.

В данной работе мы изучили влияние тканеспецифичной сверхэкспрессии генов *Dicer-1* и *Dicer-2* на продолжительность жизни *Drosophila melanogaster*. Экспериментальных особей получали в результате скрещивания самок UAS-линий, несущих дополнительные копии *Dicer-1* и *Dicer-2*, с самцами драйверных линий с кондиционными GAL4, специфичными для нервной системы, жирового тела, кишечника и мышц. Для индукции кондиционной сверхэкспрессии в среду добавляли мифепристон в концентрации 3.2 мг/мл, контрольные особи содержались на среде с добавлением этанола.

В большинстве случаев тканеспецифичная активация генов семейства *Dicer* вызывала снижение ПЖ на 3-88 %, либо не приводила к статистически значимым эффектам. В то же время сверхэкспрессия *Dicer-1* в нервной системе воспроизводимо увеличивала медианную продолжительность жизни и возраст 90% смертности у самок на 9% и 10% ($p < 0.001$), соответственно.

Далее мы оценили влияние нейрональной сверхэкспрессии *Dicer-1* на возрастную динамику двигательной активности, а также устойчивость к четырем неблагоприятным факторам: гамма-облучению (700 Гр), прооксиданту параквату (20 ммоль/л), гипертермии (35°C) и голоданию. Сверхэкспрессия *Dicer-1* не вызывала статистически значимых изменений возрастной динамики двигательной активности. Но она повысила выживаемость дрозофил при воздействии гамма-облучения и параквата на 26-41% ($p < 0.01$). Напротив, у мух со сверхэкспрессией *Dicer-1* снижалась медианная выживаемость при голодании на 15% ($p < 0.05$) и отсутствовал статистически значимый эффект на устойчивость к гипертермии. Дополнительно, методом ОТ-ПЦР было обнаружено, что при сверхэкспрессии *Dicer-1* активировались гены (*Sirt1*, *bsk*, *foxo*, *tgo*, *Gadd45*, *Xpc*, *Hsf*, *Azot*, *Tsc1*), которые ранее были определены как гены долгожительства у дрозофилы, в 1.5-3.8 раза ($p < 0.05$).

Исследования выполнены в рамках государственного задания по теме «Генетические и функциональные исследования эффектов геропротекторных интервенций на модели *Drosophila melanogaster*» N 122040600022-1.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ РНК-СВЯЗЫВАЮЩИХ УЧАСТКОВ БЕЛКА CspA
Mycobacterium tuberculosis МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ
ДИНАМИКИ И ДОКИНГА

Панкратова П.Ю., Леконцева Н.В., Никонов О.С., Никулин А.Д.

Институт белка РАН, Пушино, Россия

pankratova.p.y@gmail.com

Транс-кодируемые малые регуляторные РНК (мРНК) бактерий являются регуляторами экспрессии генов и позволяют бактериям быстро адаптироваться к изменениям окружающей среды и воздействиям различных стрессов. Кроме того, мРНК бактерий задействованы в развитии вирулентности и регуляции чувства кворума. У возбудителя туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis* выявлено большое число малых нетранслируемых РНК, однако их возможное участие в регуляции экспрессии генов исследовано слабо. Во многих бактериях в функционировании мРНК важную роль играют белковые РНК-шапероны, способствующие взаимодействию мРНК со своими РНК-мишенями. В *M. tuberculosis* не были обнаружены классические РНК-шапероны Hfq и ProQ. Мы обратили свое внимание на белки с доменом холодового шока (Cold shock domain), которые выполняют широкий спектр биологических функций, включая регуляцию транскрипции, сплайсинга РНК, трансляции и др. Белки этого семейства имеются также и в *M. tuberculosis* и потенциально могут регулировать взаимодействие мРНК с мРНК.

Целью нашей работы стала идентификация РНК-связывающих участков на поверхности белка с доменом холодового шока CspA из *M. tuberculosis*, моделирование комплексов белка со шпилечными участками мРНК и полноразмерными мРНК, а также определение их стабильности с помощью методов молекулярной динамики. Для поиска консервативных участков и предсказания структуры белка использовали аминокислотную последовательность из базы UNIPROT. Поиск гомологов домену холодового шока проводился при помощи множественного выравнивания методом BLAST. Пространственная структура белка CspA из *M. tuberculosis* промоделирована с помощью программы AlphaFold2. Полученная модель стабилизирована методами молекулярной динамики в программе GROMACS с использованием силового поля CHARMM, в явном растворителе. Расчеты проводились в течение 300 нс в 0.1 М растворе NaCl при комнатной температуре (300 К). Общее время симуляции составило 300 нс. Вторичная структура исследуемых мРНК была рассчитана программами RNAfold, MXfold2 и Vfold2D. Для формирования моделей комплексов РНК-белок были взяты как фрагмент одноцепочечной РНК, так и несколько шпилечных структур. Структура шпилечных РНК была моделирована в программе VfoldLA. Структуры РНК-белковых комплексов были получены макромолекулярным докингом в программе HDOCK.

В результате для белка CspA из *M. tuberculosis* нами обнаружены две области связывания малых регуляторных РНК. Первый сайт представляет собой область аминокислотных остатков Trp8, Phe28, Arg57-Gly58-Pro59 и соответствует общему мотиву для семейства белков холодового шока, ранее описанному для белков группы CSP из *Vacillus subtilis* и *Escherichia coli*. Второй участок в области петель белка β 2- β 3 и β 4- β 5 ранее не был описан и идентифицирован нами впервые. Паттерны взаимодействия, обнаруженные в результате поведенного нами анализа, позволяют нам предложить общую модель распознавания участков на протяженных молекулах мРНК для их дальнейших структурно-функциональных исследований.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФ в рамках научного проекта №24-24-00071.

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОЙ ТЕРМОЛАБИЛЬНОЙ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ

Перцева А.С., Несговорова Н.А.

Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

aspertseva@itmo.ru

Щелочные фосфатазы (КФ 3.1.3.1) – это неспецифические моноэстеразы, катализирующие гидролиз эфирных связей в различных фосфомоноэфирах. Ферменты этой группы способны к отщеплению остатка фосфорной кислоты от широкого спектра субстратов. Щелочные фосфатазы (ЩФ) широко применяются в области молекулярной биологии и генетической инженерии благодаря способности удалять 5'-концевые фосфатные группы молекул ДНК и РНК. Например, дефосфорилирование снижает вероятность самолигирования линейаризованных ДНК при клонировании. Обработка ЩФ продуктов ПЦР-реакции обеспечивает инактивацию остаточных дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов и подготовку амплифицированного генетического материала к дальнейшему секвенированию. При проведении иммуноферментного анализа ЩФ используются в качестве ферментных меток. Однако получение нативных ЩФ из клеточных экстрактов их природных продуцентов сопряжено с рядом трудностей и не всегда является экономически выгодным в связи с низким выходом фермента в стабильной и функциональной форме. Кроме того, ведется активный поиск ЩФ, обладающих уникальными свойствами: термостабильностью или термолабильностью, солеустойчивостью, толерантностью к экстремальным значениям рН.

В связи с этим, целью настоящего исследования является получение рекомбинантной термолабильной щелочной фосфатазы антарктической бактерии ТАВ5 путем гетерологичной экспрессии в клетках штамма-продуцента *Escherichia coli*.

В ходе исследования нами был проведен сравнительный анализ физико-химических свойств щелочных фосфатаз различного происхождения. В качестве источника гена для создания рекомбинантного продуцента термолабильной щелочной фосфатазы была выбрана антарктическая психрофильная бактерия ТАВ5, содержащая ген *rhoA*. С помощью методов кодонной оптимизации и компьютерной визуализации была разработана экспрессионная конструкция рЕТ-28а-Nhis-TAP, позволяющая осуществлять биосинтез рекомбинантной щелочной фосфатазы TAP, слитой с N-концевой гексагистиридиновой (6xHis) меткой для обеспечения возможности очистки целевого белка методом металл-хелатной аффинной хроматографии. Путем электропорации компетентных клеток *E. coli* штамма SHuffle T7 Express (New England Biolabs) экспрессионным вектором рЕТ-28а-Nhis-TAP был получен штамм-продуцент рекомбинантной термолабильной щелочной фосфатазы. Полученный штамм-продуцент продемонстрировал стабильный рост в суспензионной культуре и высокий уровень экспрессии целевого рекомбинантного белка в растворимой форме. Была апробирована методика очистки рекомбинантной щелочной фосфатазы методом металл-хелатной аффинной хроматографии на никель-сефарозе. Активность полученного фермента определяли спектрофотометрическим методом с использованием в качестве субстрата паранитрофенилфосфата. Анализ термостабильности продемонстрировал полную инактивацию полученного рекомбинантного фермента в течение 5 минут при 65°C.

Таким образом, в результате настоящего исследования был создан штамм-продуцент и разработана технология получения рекомбинантной термолабильной щелочной фосфатазы TAP. Полученный рекомбинантный фермент может быть использован в качестве основы коммерческих ферментных препаратов для применения в области молекулярно-биологических исследований.

ВЫСОКОАКТИВНЫЕ МУТАНТНЫЕ ТРАНСАМИНАЗЫ *RUEGERIA* SP. TM1040 ДЛЯ СИНТЕЗА ХИРАЛЬНЫХ АМИНОВ

Петров М.Н., Родионова М.А., Новикова А.Е., Птицын Л.Р.

Научно-исследовательский институт «Аджиномото-Генетика», Москва, Россия

Maxim_Petrov@agri.ru

Производные тропана являются важными фармацевтическими компонентами (анестетики, мидриатики и т.д.). Так как получение энантиомерно чистых продуктов остается важной и, в ряде случаев, непростой задачей, повышенный интерес вызывает энзиматический метод синтеза хиральных аминов. В цикле работ д-ра Борншоера и сотр. [1] показано, что мутация 59L в трансаминазе (ТА, код PDB: 3FCR), выделенной из *Ruegeria* sp. TM1040, является ключевой для стереоспецифического синтеза хирального амина экзо-3-амино-8-бензоил-8-азабицикло[3.2.1]октана. В предыдущей работе [2] нами сообщалось о мутантном варианте ТА 3FCR (мутант 3), демонстрирующем активность в синтезе двух хиральных аминов: экзо-3-амино-8-бензил-8-азабицикло[3.2.1]октана (соединение Ia) и трет-бутил-экзо-3-амино-8-азабицикло[3.2.1]октан-8-карбоксилата (соединение IIa) из коммерчески доступных кето-предшественников. Этот мутант содержал 6 мутаций (3FCR_Y59L/S86A/Y87F/Y152F/T231A/I234M) и показывал высокую активность в отношении синтеза соединений Ia и IIa: 31,2 IU mg⁻¹ и 3,72 IU mg⁻¹, соответственно. В настоящей работе протестированы некоторые другие аминокислотные замены в позиции 59, а также в позициях 56, 58 и 419 и их влияние на синтез хиральных аминов. Мутант 3 был модифицирован путем внесения ранее не описанных мутаций: A56G, Y58I, Y59I/Y59M и A419G. В полученной серии ферментов лучшим оказался мутант 7 (3FCR_Y58I/Y59I/S86A/Y87F/Y152F/T231A/I234M) с активностью в отношении синтеза соединений Ia и IIa 67,4 IU mg⁻¹ и 8,02 IU mg⁻¹, соответственно. Таким образом, подтверждена значимость замены Y59I, а также мутаций (56G, 58I и 419G), существенных для эффективного синтеза энантиомерно чистых соединений Ia и IIa.

Литература

[1] Weiß MS et al., (2016), *Org. Biomol. Chem.* 14, 10249–10254.

[2] Родионова и др (2023), сборник тезисов 4-го Микробиологического конгресса, Томск, Россия, с. 133-134.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПРОСТРАНСТВЕННЫХ СТРУКТУР И
АМИНОКИСЛОТНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ЭНДОГЛЮКАНАЗ С РАЗНЫМ
ТЕМПЕРАТУРНЫМ ОПТИМУМОМ

Петухова О.С., Приставка А.А., Саловарова В.П.

Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

petukhova4olga@gmail.com

Целлюлолитические ферменты находят применение во многих областях промышленности. В последние годы наблюдается повышенный интерес к ферментам, температурный оптимум которых сдвинут к экстремально высоким и низким значениям. Термостабильные целлюлазы перспективны благодаря короткому периоду гидролиза за счет высокой удельной активности и меньшим затратам энергии на процесс охлаждения после предварительной обработки. Целлюлазы из психрофильных организмов востребованы в разных отраслях из-за высокой стабильности при низких температурах. В настоящее время молекулярные основы термостабильности и холодоактивности целлюлаз недостаточно изучены. Исследование разных групп ферментов методами биоинформатики может способствовать более глубокому пониманию взаимосвязей между термостабильностью ферментов и их структурными особенностями.

Цель работы – сравнительная оценка пространственных структур и аминокислотных последовательностей эндогликоканаз из микроорганизмов, различающихся таксономической принадлежностью и отношением к температуре среды обитания.

На первом этапе из баз данных GenBank и UniProt была извлечена выборка, включающая 105 эндогликоканаз из психро-, мезо- и термофильных микроорганизмов, относящихся к бактериям, грибам и археям. Для этих последовательностей было проведено множественное выравнивание в программе MEGA версии 11.0.9. по алгоритму ClustalW. Результаты анализа свидетельствуют о том, что уровень идентичности последовательностей в основном зависит от степени таксономического родства продуцентов и, в некоторой степени, от типа эндогликоканаз. Также были отмечены отдельные случаи схожести первичных структур ферментов из далеких таксонов, но с близким температурным оптимумом.

На втором этапе из исследуемой выборки, были выделены эндогликоканазы с описанной пространственной структурой – таких оказалось всего 14 ферментов (13.3% от всей выборки). Для них было проведено попарное выравнивание аминокислотных последовательностей (BLAST) и пространственных структур (Pairwise Structure Alignment, RCSB PDB). Практически во всех выравниваниях наблюдалась очень низкая идентичность последовательностей ($22.8 \pm 8\%$). Но при этом степень пространственного сходства в некоторых случаях оказалась неожиданно высокой ($31 \pm 25\%$) – как между ферментами из относительно близкородственных таксонов, но с разным термооптимумом, так и между эндогликоканазами из микроорганизмов, очень далеких в систематическом отношении, но обитающих в сходных температурных условиях. Например, бактериальные эндогликоканазы EG-A из мезофильного *Ruminiclostridium cellulolyticum* и термофильного *Acidothermus cellulolyticus* имеют структурное подобие в 65% и идентичность последовательностей в 17%. А термофильные ферменты из археи *Pyrococcus horikoshii* и гриба *Thermoascus aurantiacus* похожи по структуре на 62% и по последовательности на 20%.

Таким образом, функциональные свойства эндогликоказ определяются не столько их первичной структурой, сколько особенностями пространственной организации молекулы. Вероятно, естественный отбор в этом случае работает на закрепление вариантов фолда, наиболее оптимального для работы ферментов при данных условиях (в том числе температурных). Разумеется, на этот процесс могут влиять другие факторы, например, горизонтальный перенос генов, поэтому для получения более однозначных выводов необходимы дополнительные исследования с привлечением расширенных выборок и дополнительных алгоритмов.

АПТАМЕРЫ К БАКТЕРИАЛЬНЫМ РНК-ПОЛИМЕРАЗАМ КАК ПРОТОТИП ИНГИБИТОРОВ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ НОВЫХ АНТИБИОТИКОВ

Петушков И.В.^{1,2}, Пупов Д.В.¹, Кульбачинский А.В.^{1,2}

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

²Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

telomer1@rambler.ru

Растущая резистентность патогенных бактерий к антибиотикам является одной из важнейших проблем для современной медицины. Разработка новых антимикробных препаратов требует длительного времени и больших финансовых вложений, а штаммы патогенных микроорганизмов с множественной устойчивостью появляются регулярно. Одним из возможных подходов к получению новых антимикробных соединений является использование аптамеров к РНК-полимеразе (РНКП) – консервативному белку, который есть у всех бактерий. Аптамеры являются короткими молекулами нуклеиновых кислот, которые связываются с выбранной мишенью с высокой аффинностью. Получение аптамеров является несложным и быстрым процессом и может быть выполнено в стандартной молекулярно-биологической лаборатории.

В ходе исследования были получен набор аптамеров к кор-ферменту РНКП *Escherichia coli* и холоферменту РНКП *Mycobacterium tuberculosis* и протестированы их укороченные варианты. Было установлено, что некоторые аптамеры после минимизации сохраняют высокую аффинность к своей РНКП и способны эффективно подавлять транскрипцию в системе *in vitro* при наномолярных концентрациях. Аптамеры к РНКП *M. tuberculosis* способны подавлять транскрипцию *in vitro* даже в случае РНК-полимераз филогенетически удалённых видов. Аптамеры к РНКП *E. coli* более видоспецифичны. Таким образом, аптамеры к РНКП из разных бактерий способны быть ингибиторами транскрипции, как широкого спектра действия, так и узкого. В то же время, протестированные укороченные аптамеры не способны самостоятельно подавлять рост бактериальных клеток. В настоящий момент идёт исследование возможности использования модифицированных аптамеров, способных проникать в клетки.

Также в ходе исследования были впервые получены двухцепочечные ДНК-аптамеры к холоферменту РНК-полимеразы *M. tuberculosis*, последовательности которых напоминают консенсусные -35 и -10-элементы промотора. Фрагменты ДНК на основе таких аптамеров оказались сильными ингибиторами транскрипции и способны сами выступать в качестве матрицы для транскрипции. Различные классы аптамеров могут быть использованы в дальнейшем в качестве прототипа для разработки новых антибиотиков.

Работа проведена в рамках выполнения государственного задания НИЦ «Курчатовский институт» и частично поддержана грантом РФ №22-74-00142.

ПОЛНОГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ В
РАСТЕНИЯХ *ARABIDOPSIS THALIANA*, ПРОИЗРАСТАВШИХ В УСЛОВИЯХ
ХРОНИЧЕСКОГО РАДИОАКТИВНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ НА ТЕРРИТОРИИ
ЧЕРНОБЫЛЬСКОЙ ЗОНЫ ОТЧУЖДЕНИЯ

Подлущий М.С.¹, Воронежская В.С.¹, Казакова Е.А.¹, Блинова Я.А.¹,
Шестерикова Е.М.¹, Подлущкая А.В.¹, Волкова П.Ю.²

¹Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Обнинск, Россия

²Независимый исследователь, Гел, Бельгия

mikhail@podlutskii.ru

В эксперименте использовали второе поколение семян *A. thaliana*, полученное из материала, отобранного на территориях бывших населенных пунктов (Бабчин и Масаны), подвергшихся радиоактивному загрязнению в результате аварии на Чернобыльской АЭС.

Отобранные семена *A. thaliana* стратифицировали в течение 1-го дня, высаживали в чашки Петри на питательную среду Мурасиге-Скуга и проращивали в фитотроне в течение 13-ти дней в режиме длинного светового дня. Из полученных проростков *A. thaliana* выделяли геномную ДНК с использованием набора реагентов «СОРБ-ГМО-Б» на основе бромида цетримониума. Полученные образцы были переданы в компанию ЗАО «Евроген» для дальнейшей подготовки библиотек и выполнения секвенирования нового поколения в 6-ти повторностях на платформе Illumina NovaSeq 6000 в режиме парных прочтений.

Качество полученных данных секвенирования оценивали с использованием FastQC v 0.12.1. Триммирование данных выполняли с помощью Fastp v 0.23.4 и Trimmomatic v 0.39. Для выравнивания и сопоставления прочтений с референсным геномом *A. thaliana* (TAIR10, база данных EnsemblPlants, release 58) применяли алгоритмы bwa-mem2 v 0.7.17-r1188. Маркировку возможных дубликатов и сортировку полученных SAM файлов (*MarkDuplicatesSpark*) после картирования выполняли с использованием GATK4 v 4.3.0.0.

Двухэтапный полногеномный анализ однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в растениях *A. thaliana* также выполняли с использованием алгоритмов, встроенных в GATK4. На первом этапе осуществляли базовую перекалибровку показателей качества для полученных промаркированных данных картирования (*HaplotypeCaller*, *SelectVariants*, *VariantFiltration*, *BaseRecalibrator*, *ApplyBQSR*) для последующего выполнения анализа. На втором этапе повторно проводили процедуру коллинга (*HaplotypeCaller*), идентификации (*SelectVariants*) и фильтрации (*VariantFiltration*) полученных вариантов SNP. Аннотацию выполняли с помощью программы SnpEff v 2.11, дополнительно используя информацию, представленную в каталоге генетической изменчивости растений «1001Genomes».

У потомков растений *A. thaliana*, произраставших на участке *Bab*, было обнаружено 76.035 однонуклеотидных полиморфизмов, включая 23.477 SNP, не аннотированных в «1001Genomes». Наивысшая частота возникновения SNP была зафиксирована на 4-й (24.2%), 5-й (21.8%) и 3-й (18.6%) хромосомах.

У потомков растений *A. thaliana*, произраставших на участке *Masa*, было выявлено 139.421 SNP, в том числе 33.471 SNP, не аннотированных в каталоге генетической изменчивости растений. Это может указывать на более высокую частоту возникновения

мутаций в районе, загрязненном радионуклидами. Наивысшая частота полиморфизмов зафиксирована на 3-й (24.1%), 1-й (21.3%) и 4-й (18.6%) хромосомах.

Также был выполнен анализ всех неаннотированных однонуклеотидных полиморфизмов для выявления новых вариантов, потенциально связанных с ответом на хроническое ионизирующее излучение. Из двух наборов SNP были исключены общие 9.081 SNP, поскольку они представляют собой пример географического полиморфизма. Таким образом, 14.396 SNP с участка *Vab* и 24.390 SNP с участка *Masa* представляют особый интерес для дальнейшего изучения радиационно-индуцированного полиморфизма.

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ p53-ЗАВИСИМОГО ЭНХАНСЕРА 75C6 И ГЕНА *Xrp1* У ДРОЗОФИЛЫ В ОТВЕТ НА СТИМУЛЯЦИЮ γ -ОБЛУЧЕНИЕМ

Попова М.К.^{1,2}, Конопатов А.В.¹, Конова К.Ю.¹, Лебедева Л.А.¹, Шидловский Ю.В.¹

¹Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),
Долгопрудный, Россия

popova.mk@phystech.edu

В ответ на ионизирующее излучение происходит активация транскрипционного фактора белка p53. Известно, что в геноме происходит связывание белка p53 с энхансером p53RE, расположенным в локусе 75C6. В результате индуцируется экспрессия близлежащих к энхансеру генов, таких как *Reaper*, *Head Involution Defective*, *Sickle*. Кроме того, наблюдается экспрессия гена *Xrp1*, который находится от энхансера более чем в 20 Мб на другом плече хромосомы, что является уникальным примером супер-дальнего взаимодействия p53RE с *Xrp1*. Поскольку молекулярный механизм такого контакта неизвестен, предполагается, что возможную роль в этом играют архитектурные белки хроматина, среди которых GAF, CTCF. В нашем исследовании проводится анализ области 75C6 энхансера для выявления областей, ответственных за взаимодействие в данном случае.

Мутагенез области 75C6 был проведён с помощью сайт-специфической рекомбинации и метода CRISPR/Cas9, в результате чего были удалены CTCF, GAF, p53-связывающие участки. В исследуемых линиях до и после γ -облучения в дозе 40 Гр проводилось измерение расстояния p53RE – *Xrp1* в пространстве ядер с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ*, а также с помощью ПЦР в реальном времени определялся уровень экспрессии репортерного гена *GFP* под действием излучения.

Проведение биоинформатического анализа показало наличие сайтов связывания GAF, CTCF, CLAMP в локусе гена *Xrp1*. В соответствии с этим, ген *Xrp1* был разделен на шесть частей с целью найти область, ответственную за формирование контакта с p53RE. Каждый из этих фрагментов помещали в репортерную конструкцию с геном *GFP*, а затем интегрировали в различные локусы на правом плече третьей хромосомы.

Полученные данные говорят о том, что после облучения происходит сближение p53RE – *Xrp1* в пространстве ядер в диком типе и в 35 линии (энхансер rescue). Однако у мутантов (с делецией областей либо CTCF, либо GAF сайта/делецией CTCF и GAF сайтов/делецией полного p53RE) сближение нарушается. Это указывает на важность этих областей в функционировании изучаемого энхансера. После облучения в эмбрионах дрозофилы происходит активация экспрессии проапоптотического гена *Reaper*, гена *Xrp1*, а также репортерного гена *GFP*. По результатам исследования созданные конструкции с разными частями *Xrp1*, присоединенные к эндогенному *GFP*-репортеру, могут указывать на участки гена-мишени, необходимые для дальнего взаимодействия с p53-зависимым энхансером.

Работа поддержана грантом РФФИ № 20-14-00201.

ОСОБЕННОСТИ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ОЗИМОГО ЯЧМЕНЯ ПОСЛЕ ОСТРОГО ОБЛУЧЕНИЯ ПРОТОНАМИ И ЭЛЕКТРОНАМИ

**Празян А.А.¹, Подлущий А.А.¹, Волкова П.Ю.², Битаршвили С.В.¹,
Казакова Е.А.¹, Шестерикова Е.М.¹**

¹Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Обнинск, Россия

²Независимый исследователь, Гел, Бельгия

prazyana@yahoo.com

Разработка стратегий адаптации сельскохозяйственных культур к постоянно меняющимся климатическим условиям является критически важным вопросом продовольственной безопасности. Исследования реакции ячменя на ионизирующее излучение показали, что этот эволюционно древний стрессовый фактор может быть успешно использован для выявления молекулярных путей, участвующих в адаптации к ряду абиотических стрессоров.

В качестве объекта исследования использовался ячмень сорта Фокс-1.

Линейный ускоритель электронов NOVAC11 применяли для облучения ячменя электронами с энергией 8 МэВ в дозе 15 Гр. Протонное облучение выполнено на комплексе протонной терапии «Прометей», в аналогичной дозе.

Тотальную РНК выделяли из побега на 7-й день после облучения с использованием набора для очистки РНК GeneJET. Качество и чистоту выделенной РНК оценивали с помощью NanoDrop OneC и горизонтального гель-электрофореза. Синтез кДНК, подготовка библиотеки и секвенирование предоставлены компанией «Евроген» (Москва, Россия). С использованием набора реагентов TruSeq mRNA Stranded (Illumina).

Анализ функционального обогащения проводился с использованием базы данных Gene Ontology (GO) с ShinyGo v 0,75c для MorexV3. Принятый уровень значимости составлял 0,05 (с применением критерия Фишера в качестве статистического метода тестирования).

После попарного сравнения результатов исследования облучения протонами и электронами обнаружены следующие результаты: 244 имели повышенные уровни дифференциальной экспрессии, а 12 генов были подавлены.

При рассмотрении генов повышенной экспрессии и проведении анализа генных антологий (GO) отмечено, что на уровне молекулярных функций (MF) наибольшее количество генов вовлечены в процессы связывания двухцепочечного железа, связывание глутатиона, а также вовлечены в работу ксилан-1,4-бета-ксилозидазы, ДНК-топоизомеразы типа II, пируватдегидрогеназы, трипептидного трансмембранного переносчика, аминокислотной лигазы. В контексте клеточных компонентов (CC) был отмечен комплекс глицерин-3-фосфатдегидрогеназы. В контексте биологических процессов (BP) отмечена регуляция активности оксидоредуктазы, формы клеток, процесс биосинтеза треонина, окисление НАДН, развития семядолей и трансмембранного транспорта дипептидов.

Пониженная регуляция дифференциально экспрессируемых генов выражена в нескольких терминах GO, включая УДФ-галактозилтрансферазу, глицерофосфодиэфирфосфодиэстеразу, активность протеинтирозинкиназы (MF), процесс биосинтеза салициловой кислоты, анионный гомеостаз, клеточный ответ на холод и метаболизм альдитола (BP).

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-1068 от 28 сентября 2021 г.).

ЭФФЕКТЫ СВЕРХЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *SOD3* И *GPX3* НА УСТОЙЧИВОСТЬ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА К ОКИСЛИТЕЛЬНОМУ СТРЕССУ

Расова Е.Е.¹, Тавлеева М.М.¹, Рыбак А.В.¹, Белых Е.С.¹, Сенча Л.М.², Балалаева И.В.²,
Велегжанинов И.О.¹

¹Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии
наук, Сыктывкар, Россия

²Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,
Нижний Новгород, Россия

elrasova@mail.ru

Активные формы кислорода (АФК) участвуют в большинстве нормальных клеточных процессов, являются важным звеном в сигнальных клеточных каскадах, биосинтезе гормонов, иммунном ответе и других важных процессах. Однако окислительный стресс, вызванный дисбалансом в соотношении выработки АФК и работы антиоксидантных систем, приводит к серьезным последствиям как на клеточном уровне, так и для организма в целом, провоцируя и сопровождая развитие ряда серьезных заболеваний. В связи с этим исследование регуляции устойчивости клеток к окислительному стрессу является актуальной задачей биомедицины. Транскрипционная регуляция экспрессии генов антиоксидантных систем посредством технологии CRISPRa представляется нам наиболее перспективным и многообещающим способом повышения устойчивости клеток к окислительному стрессу. Гены *SOD3* и *GPX3* представляют первоочередной интерес в качестве мишеней для одновременной сверхэкспрессии по совокупности трёх причин. Во-первых, известно, что их раздельная сверхактивация оказывала положительный эффект на клеточную устойчивость к окислительному стрессу в разных экспериментальных системах. Во-вторых, существующий к настоящему моменту массив данных о влиянии сверхэкспрессии указанных генов на канцерогенез свидетельствует о том, что они преимущественно выступают в роли онкосупрессоров. В-третьих, данных об эффектах одновременной сверхактивации *SOD3* и *GPX3*, которая предположительно более эффективна и безопасна с позиции предотвращения дисбаланса H_2O_2 в клетке, на сегодняшний день в литературе нет.

Целью данной работы было изучение эффектов сверхактивации генов *SOD3* и *GPX3* на устойчивость клеток HEK293T и HeLa к окислительному стрессу, индуцируемому паракватом или воздействием гамма-излучения. Транзиентная сверхактивация генов в клетках проводилась с помощью котрансфекции плазмид, кодирующих активатор транскрипции dCas9-VPH и гидовые РНК к генам интереса. По данным флуориметрического анализа цитотоксичности в микрокультурах клетки HEK293T с одновременной сверхэкспрессией *SOD3* и *GPX3* (уровень экспрессии был выше контрольного в 55 и 25 раз соответственно) оказались более резистентными к γ -облучению и воздействию параквата. Тот же эффект был частично подтвержден на клеточной линии HeLa. В то же время уровень пролиферации клеток на фоне сверхэкспрессии достоверно снижался в культуре HEK293T и не имел достоверных отличий от контрольных значений в случае с HeLa. Кроме того, одновременное повышение экспрессии *SOD3* и *GPX3* в HEK293T не стимулировало, а в случае с HeLa приводило к снижению скорости миграции клеток. Это может свидетельствовать в пользу выбора данных генов как относительно безопасных мишеней транскрипционной регуляции клеточной стрессоустойчивости в контексте канцерогенеза. Таким образом, результаты, полученные нами на данном этапе, говорят об эффективности сверхэкспрессии генов антиоксидантной защиты в функционально обоснованных комбинациях и подтверждают перспективность данного направления исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Государственное задание № 122040600024-5 «Действие ионизирующего излучения и факторов нерадиационной природы на биологические объекты и биогенная миграция тяжелых естественных радионуклидов»).

ИЗУЧЕНИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ СИСТЕМЫ РЕСТРИКЦИИ- МОДИФИКАЦИИ *kpnI*

Резвых Л.Ф.

Научно-технологический университет «Сириус», Сочи, Россия

rezvyhlilija@gmail.com

Бактериальные системы рестрикции-модификации (СРМ) являются одним из самых распространенных компонентов бактериального иммунитета. В процессе эволюции СРМ развили потрясающее разнообразие механизмов регуляции, благодаря которым они сохраняют устойчивость при стабилизации в новом хозяине и при атаке бактериофагов. Механизмы регуляции СРМ исследуются уже более семидесяти лет, однако, по-прежнему они недостаточно изучены. Комплексный подход, с применением классических методов молекулярной биологии и биоинформатического анализа позволит взглянуть на механизмы регуляции этих систем по-новому.

Целью данной работы является изучение регуляторных элементов системы рестрикции-модификации *kpnI* с применением классических и биоинформатических подходов. Система РМ *kpnI* состоит из пары дивергентно расположенных, не перекрывающихся генов эндонуклеазы рестрикции (ЭР) и метилтрансферазы (МТ), разделенных межгенной областью 167 п.н. Регуляторные элементы данной системы ранее не были определены, однако предположительно, они располагаются в межгенной области. В данной работе СРМ *kpnI* была собрана *de novo* из олигонуклеотидов методом PCR и клонирована в вектор pET28.

Для поиска промоторо-подобных последовательностей применялись биоинформатические методы предсказания промоторов на основе сходства с консенсусной последовательностью сигма 70 факторов *E. coli* (BPRом); на основе машинного обучения для распознавания промоторов широкого круга бактерий (Promotech). В результате анализа были предсказаны промоторо-подобные последовательности ниже по течению от стартовой точки транскрипции обоих генов, но не были предсказаны промоторы в межгенной области. Промоторная активность предсказанных последовательностей СРМ *kpnI* проверялась методом транскрипционного слияния данных последовательностей выше по течению от репортерного гена *gal_K*. Конструкции *kpnI_galK* трансформировались в компетентные клетки *E. coli* HB101 с последующим анализом на индикаторных чашках МакКонки с добавлением галактозы. Транскрипционная активность исследуемых фрагментов подтверждалась красным цветом колоний, свидетельствующим о том, что ген *galK* экспрессируется и клетки способны усваивать галактозу. Предсказанные промоторо-подобные области СРМ *kpnI* ниже стартовых точек транскрипции генов ЭР и МТ не продемонстрировали транскрипционную активность на индикаторных чашках. Также была исследована межгенная область на наличие промоторной активности. В результате были обнаружены перекрывающиеся дивергентно расходящиеся промоторные регионы между генами ЭР (-121; +200) и МТ (-128; +2). В процессе получения регуляторных последовательностей СРМ *kpnI* был обнаружен регион (+9 ЭР; -85 ЭР) с ограниченной доступностью последовательности ДНК для посадки праймеров. Анализ предсказания вторичных структур данного региона показал наличие шпильчатой структуры (ttgccacatttccattaaattttaaagggaattctgca). Стабильная вторичная структура ДНК, либо другие элементы, пространственно препятствующие посадке праймеров или транскрипционных факторов могут быть задействованы в механизме регуляции данной системы. В настоящее время исследование продолжается. Регионы СРМ *kpnI* исследуются на уровне трансляции путем слияния с репортерным геном *lacZ*, проводится количественный анализ регуляторных элементов методом RT-PCR.

ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НАНОЧАСТИЦ СЕЛЕНА НА МОДЕЛИ ЖИВОТНЫХ С ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ КАРЦИНОМОЙ

Рогачев В.В., Варламова Е.Г.

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

vladimirrogachev6@gmail.com

Рак печени по распространенности и смертности занимает второе место в мире после рака легких, поэтому весьма актуальны исследования, направленные на разработку эффективных препаратов для лечения данного заболевания. В последние десятилетия достигнут значительный прогресс в лечении гепатоцеллюлярной карциномы, ограничения эффективной терапии так и не решены. Ключевыми проблемами остаются неспецифическое действие препаратов и повреждение здоровых тканей, необходимость использования высоких доз препаратов, а также отсутствие эффективного способа селективной доставки активного компонента к клеткам опухоли. В последнее время все чаще используются в медицине наночастицы на основе селена (НС), в первую очередь из-за минимальной токсичности по сравнению с самим селеном и другими селен-содержащими соединениями, селективности действия и др.

Работа посвящена исследованию терапевтических свойств НС на модели животных с гепатоцеллюлярной карциномой, вызванной инъекциями тиоацетамидом (ТАА). Использовались самцы мышей линии DBA/2J, которым внутривентриально вводили ТАА (150 мкг/г веса мыши) 3 раза в неделю, в течение 6 месяцев. После чего мыши были разделены на три группы: контрольная (инъекции физраствором), группа, находящаяся на самовосстановлении (без инъекций) и опытная группа, которой делали внутривентриальные инъекции НС (5 мкг/г веса мыши) 3 раза в неделю, 2 месяца. НС были получены методом лазерной абляции и имели сферическую форму и средний размер 100 нм.

Методом ПЦР в реальном времени были исследованы паттерны экспрессии про- и антиапоптотических генов, маркеров стресса эндоплазматического ретикула (ЭР-стресса), про- и противовоспалительных цитокинов, селенопротеинов и проведено сравнение этих паттернов с контролем. Было установлено, что инъекции НС способствовали снижению уровней мРНК провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-33, ключевых маркеров трех сигнальных путей UPR (факторы транскрипции ATF-4, ATF-6 и XBP1s), а также проапоптотических генов GADD34, PUMA, BIM, CHOP, CAS-3. Это может указывать на то, что в печени НС способны снижать воспаление, уровень ЭР-стресса и гибель гепатоцитов путем апоптоза, что, безусловно, оказывает терапевтический эффект. Данных эффектов не наблюдалось в группе самовосстановления. Кроме того, впервые мы проверили как меняются паттерны экспрессии мРНК 25 селенопротеинов млекопитающих непосредственно в опухоли. Нами установлено, что НС способствовали усилению экспрессии мРНК тиоредоксинредуктазы 2 (TXNRD2) более, чем в 5 раз, двух дейодиназ DIO2 и DIO3, более чем в 5 и 2 раза, соответственно, двух глутатионпероксидаз GPX2 и GPX3, более чем в 6 и 2 раза, соответственно. Наблюдался рост экспрессии мРНК селенопротеинов SELENOM (в 3 раза), SELENOT (в 2 раза), SELENON (в 3,7 раз) и SELENOV (в 4 раза). При этом наблюдалось снижение экспрессии TXNRD1, TXNRD3, DIO1, GPX4 SELENOF, SELENOS, SELENOV и SELENOI почти в 10 раз. Поскольку многие из этих селенопротеинов являются антиоксидантами, участвуют в контроле посттрансляционной модификации ряда белков, регулируют кальциевый гомеостаз в клетках, рост их экспрессии может оказывать существенный терапевтический эффект при лечении ГЦК. Вклад селенопротеинов и их роль в регуляции процессов, протекающих при ГЦК, еще предстоит исследовать.

Работа поддержана грантом РФФИ № 23-25-00030.

ВЛИЯНИЕ БЕЛКА SULA НА ПРОЦЕСС ДЕЛЕНИЯ *ESCHERICHIA COLI* В СОСТОЯНИИ SOS-ОТВЕТА

Румянцева Н.А., Голофеева Д.М., Ведяйкин А.Д.

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

rumyanatasha@yandex.ru

Во время SOS-ответа у многих видов бактерий экспрессируется белок SulA, в том числе у таких хорошо изученных видов, как *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*. Данный белок взаимодействует с ключевым белком деления – FtsZ – и тем самым ингибирует процесс деления у бактерий во время SOS-ответа. Существуют 2 основные модели, объясняющие механизм ингибирования: секвестрация и кэпирование. В настоящее время есть данные различных исследований, подтверждающие как одну, так и другую модель. При этом эксперименты *in vitro* в основном согласуются с моделью секвестрации. При этом кристаллическая структура SulA из *P. aeruginosa* показывает, что белок находится в виде димера, а модель секвестрации не учитывает это наблюдение.

Данная работа посвящена исследованию механизма действия белка SulA в *E. coli*. Полученные результаты позволяют сделать важные выводы относительно свойств SulA. Благодаря экспансионной микроскопии нами было показано, что FtsZ продолжает формировать кластеры и фокусы во время SOS-ответа. Далее была оценена концентрация SulA у бактерий *E. coli* во время SOS-ответа. Полученные результаты показывают, что на 1 молекулу SulA приходится около 10 молекул FtsZ, что не согласуется с моделью секвестрации. Кроме того, чтобы понять, каким образом SulA нарушает деление при такой низкой концентрации, была исследована его способность к димеризации при помощи бактериальной двугибридной системы, а также его способность нарушать межбелковые взаимодействия с участием FtsZ. Интересно отметить, что способность SulA *E. coli* к димеризации зависит от расположения репортерного белка – на N- или C-конце SulA.

Полученные результаты проясняют молекулярные механизмы ингибирования деления под действием SulA и указывают на то, что SulA ингибирует деление посредством кэпирования полимеров FtsZ, вероятно, при этом связывая 2 полимера одновременно.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ в рамках научного проекта № 22-24-00085.

НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА ПРЕДПОЛАГАЕМОГО БЕЛКА F21D5.3, МУЛЬТИМЕДНОЙ ОКСИДАЗЫ НЕМАТОДЫ *CAENORHABDITIS ELEGANS*

Самусева П.Д.^{1,2,3}

¹Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

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

³Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

samusevap@yandex.ru

У млекопитающих медь (Cu) вовлечена в активные центры жизненно важных ферментов, аллостерическое регулирование ферментов, транскрипционных факторов и участников ряда сигнальных путей. Однако свободные ионы Cu способны катализировать образование АФК, которые вызывают окислительный стресс. Безопасный перенос Cu осуществляет медь-транспортная система мембранных и растворимых белков (МТС). Система консервативна от дрожжей до человека. Мутации в её белках приводят к развитию нейродегенеративных, онкологических, сердечно-сосудистых и метаболических заболеваний. Для изучения молекулярно-генетических основ этих заболеваний и выработки путей их коррекции необходима более простая модель, чем модели млекопитающих, используемые в настоящее время. У человека ось транспортеров меди CTR1-ATOX1-ATP7A/B-CP обеспечивает импорт, доставку к местам формирования купроэнзимов и выведение Cu. У *C. elegans* ген *chca-1* соответствует гену *CTR1* (импортер Cu, >30% идентичности по белку), ген *cuc-1* гомологичен гену *ATOX1* (переносчик меди от CTR1 к ATP7A/B, >39% идентичности по белку), ген *cua-1* соответствует генам *ATP7A/B* (переносчик меди в люмен аппарат Гольджи, >45% идентичности *ATP7A/B* по белку). Предполагаемым ортологом гена *CP* человека, кодирующим внеклеточную мультимедную ферроксидазу, является ген *f21d5.3*, который по данным *in silico* кодирует мультимедную оксидазу. Ген *f21d5.3* гомологичен гену церулоплазмину (*CP*), а их белковые продукты идентичны на >30%. Для предсказания 3D-структуры F21D5.3 нематод использовали алгоритм ID-TASSER. Результаты показали сходство полученной пространственной структуры F21D5.3 со структурой CP человека. В анализируемом белке сайты, отвечающие за связывание с атомами Cu, высоко идентичны с подобными доменами в пластоцианине. Предполагаемый белок F21D5.3 содержит отщепляемую сигнальную последовательность на N-конце, и короткую альфа-спираль на C-конце, которой предположительно есть сайт для добавления гликозилфосфатидилинозитолового якоря (ГФИ-якорь). В экспериментальной части работы использовали *C. elegans* дикого (N2) и мутантного (H828Q) штаммов. Замена H828Q введена в белок CUA-1 с помощью технологии CRISPR/Cas9, она является гомологичной мутации H1069Q в ATP7B человека, которая приводит к развитию болезни Вильсона более чем у 50% пациентов кавказской популяции. Методом RNA-seq у нематод обоих штаммов выявлена мРНК, кодирующая белок F21D5.3, и у особей мутантного штамма ее уровень был повышен. Методом ПЦР в реальном времени показано, что ген *f21d5.3* экспрессируется на всех стадиях жизненного цикла, и с ним ко-экспрессируется ген *cua-1*. Из гомогената нематод методом дифференциального центрифугирования были изолированы фракция, обогащенная большими фрагментами плазматической мембраны и растворимая фракция. Полученные фракции были анализированы методом иммуноблоттинга с антителами к CP человека, мыши и крысы. Все использованные антитела связались с зонами, соответствующими молекулярным массам 60 и 25 кДа, что в сумме соответствует полноразмерной массе F21D5.3. Оксидазную активность F21D5.3 оценивали прямым окрашиванием о-дианизидином выявлены зоны, соответствующие иммунореактивным зонам F21D5.3. Обсуждается биологическая роль белка F21D5.3.

Работа поддержана грантом РФФ 20-74-10087.

ИССЛЕДОВАНИЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО РЕЦЕПТОРА GPR17 КЛАССА GPCR,
АССОЦИИРОВАННОГО С ПАТОГЕНЕЗОМ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА И ОЖИРЕНИЯ,
МЕТОДОМ КРИОЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

**Сафронова Н.А., Садова А.В., Дмитриева Д.С., Куркин Т.С., Шевцов М.Б.,
Борщевский В.И., Мишин А.В.**

Центр исследований молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний,
Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),
Долгопрудный, Россия

safronova.na@list.ru

Рецепторы, сопряженные с G белком (англ. G protein-coupled receptors, сокр. GPCR) – семейство рецепторов, включающее в себя примерно 800 белков с 7 трансмембранными спиралями. Рецепторы класса GPCR составляют ~4% от кодирующего белки генома человека и вовлечены в самые разные процессы: зрение, вкус, обоняние, эмбриональное развитие, регуляция аппетита, поведения и др. Эти рецепторы связываются с широким спектром химических соединений – от малых молекул до пептидов и белков, и, учитывая значительную вовлеченность в физиологические процессы, они являются важными мишенями для лекарственных препаратов. [1]

В данной работе исследуется человеческий рецептор класса GPCR: GPR17, который играет важную роль в развитии нервной системы, в частности, регулирует формирование миелиновой оболочки у нейронов. Рецептор экспрессируется в клетках-предшественниках олигодендроцитов строго на определенной стадии их развития; экспрессия рецептора прекращается одновременно с началом формирования миелина. Искусственно созданная устойчивая экспрессия рассматриваемого рецептора у мышей приводит к нарушению формирования миелина и к симптомам, схожим с симптомами рассеянного склероза. При этом полная потеря мышами гена этого рецептора не приводит к серьезным последствиям для здоровья [2,3]. Это делает GPR17 привлекательной мишенью для разработки лекарственных препаратов против рассеянного склероза – селективных ингибиторов данного рецептора.

Рассматриваемый рецептор также играет определенную роль при различных повреждениях ЦНС, в частности, при травмах и ишемических повреждениях [4]. Есть свидетельства, что ингибирование GPR17, вероятно, помогает восстановить поврежденные участки ЦНС после травмы [5]. Кроме того, недавние исследования показали, что GPR17, экспрессирующийся в ЖКТ, принимает прямое участие в процессах регулирования аппетита и контроля уровня глюкозы в крови [6].

Структура рецептора высокого разрешения поможет решить задачу разработки новых лекарственных средств – ингибиторов GPR17, обладающих высокой специфичностью и минимальными побочными эффектами. Для получения структуры рецептора необходимо наладить гетерологичную экспрессию, чтобы наработать рецептор в достаточных количествах, а также добиться того, чтобы очищенный белок был достаточно стабильным и мономерным.

В данной работе мы создали генно-инженерную конструкцию рецептора для экспрессии в клетках насекомых *Sf9* и дальнейшей очистки. Генно-инженерная конструкция и протокол выделения и очистки рецептора были оптимизированы для получения наибольшего выхода белка и его наилучшей стабильности. Был получен образец рецептора в комплексе с моноклональным антителом к партнерному белку и с нанотелом, аффинным к этому антителу.

Проведены первые исследования методом просвечивающей криоэлектронной микроскопии, которые подтвердили формирование данного комплекса.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (договор 075-03-2024-117, проект FSMG-2024-0012).

Литература

1. Luginina A, Gusach A, Lyapina E, Khorn P, Safronova N, Shevtsov M, Dmitrieva D, Dashevskii D, Kotova T, Smirnova E, Borshchevskiy V, Cherezov V, Mishin A. Structural diversity of leukotriene G-protein coupled receptors. *J Biol Chem.* 2023 Sep 11:105247. doi: 10.1016/j.jbc.2023.105247. Epub ahead of print. PMID: 37703990.
2. Chen Y, Wu H, Wang S, et al. The oligodendrocyte-specific G protein-coupled receptor GPR17 is a cell-intrinsic timer of myelination. *Nat Neurosci.* 2009;12(11):1398-1406. doi:10.1038/nn.2410
3. Hennen S, Wang H, Peters L, Merten N, Simon K, Spinrath A, Blättermann S, Akkari R, Schrage R, Schröder R, Schulz D, Vermeiren C, Zimmermann K, Kehraus S, Drewke C, Pfeifer A, König GM, Mohr K, Gillard M, Müller CE, Lu QR, Gomeza J, Kostenis E. Decoding signaling and function of the orphan G protein-coupled receptor GPR17 with a small-molecule agonist. *Sci Signal.* 2013 Oct 22;6(298):ra93. doi: 10.1126/scisignal.2004350. PMID: 24150254; PMCID: PMC4114018.
4. Ciana P, Fumagalli M, Trincavelli ML, Verderio C, Rosa P, Lecca D, Ferrario S, Parravicini C, Capra V, Gelosa P, Guerrini U, Belcredito S, Cimino M, Sironi L, Tremoli E, Rovati GE, Martini C, Abbracchio MP. The orphan receptor GPR17 identified as a new dual uracil nucleotides/cysteinyll-leukotrienes receptor. *EMBO J.* 2006 Oct 4;25(19):4615-27. doi: 10.1038/sj.emboj.7601341. Epub 2006 Sep 21. PMID: 16990797; PMCID: PMC1589991.
5. Wang J, He X, Meng H, Li Y, Dmitriev P, Tian F, Page JC, Lu QR, He Z. Robust Myelination of Regenerated Axons Induced by Combined Manipulations of GPR17 and Microglia. *Neuron.* 2020 Dec 9;108(5):876-886.e4. doi: 10.1016/j.neuron.2020.09.016. Epub 2020 Oct 26. PMID: 33108748; PMCID: PMC7736523.
6. Yan S, Conley JM, Reilly AM, Stull ND, Abhyankar SD, Ericsson AC, Kono T, Molosh AI, Kubal CA, Evans-Molina C, Ren H. Intestinal Gpr17 deficiency improves glucose metabolism by promoting GLP-1 secretion. *Cell Rep.* 2022 Jan 4;38(1):110179. doi: 10.1016/j.celrep.2021.110179. PMID: 34986353; PMCID: PMC8972502.

ОЦЕНКА КОРРЕЛЯЦИИ МИКРОБИОМА СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ НОСА С ИММУНОЛОГИЧЕСКИМИ ОСОБЕННОСТЯМИ ЧЕЛОВЕКА

Сергеева Л.А.¹, Пичугова П.А.¹, Обморнов О.Д.¹, Тутукина М.Н.²

¹Школа им. Маршала В.А. Чуйкова, Москва, Россия

²Сколковский институт науки и технологий, Сколково, Россия

lyuba_sergeeva2006@list.ru

Микробиом может оказывать значительное влияние на здоровье человека. Кроме того, сейчас активно ведутся исследования по оценке, наоборот, особенностей здоровья на состав микробиома. Метагеномный подход позволяет количественно оценить состав микробных сообществ без культивирования, что важно, так как не все бактерии можно вырастить в лабораторных условиях

Мы поставили перед собой цель оценить возможность корреляции состава микробиома слизистой оболочки носа людей с перенесенным Covid-19 и предрасположенности к развитию болезни Альцгеймера.

Было взято 20 образцов назальных микробиомов у взрослых и подростков. Из всех образцов с помощью набора Purelink microbiome kit (Promega, США) была успешно выделена ДНК, с которой были амплифицированы вариабельные участки V4 16S рНК. Фрагменты были очищены с помощью магнитных шариков Ampure XP (Beckman Coulter, США). Их концентрация была измерена на флуориметре Qubit 4, для того чтобы проверить, успешно ли прошел ПЦР. Концентрация образцов получилась в районе 1.66 нг/мкл – 98 нг/мкл. Для образцов, в которых количество материала было недостаточным, была повторена ПЦР и очистка. Образцы были переданы в ЦКП Геномики Сколтеха для секвенирования на платформе Illumina MiSeq (250+250PE). Данные были проанализированы с помощью скриптов, написанных на языке Python, с последующей визуализацией в Qiime II.

Затем, используя сыворотку испытуемых, два набора экспресс-тестов (RapidBio и Sorbus, Россия), а также набор для количественной оценки уровня антител к ключевым белкам SARS-CoV-2 (VirIntel, США), мы измерили уровень их иммунного ответа. Оба экспресс-теста сделаны на основе RBD-домена S-белка, и оказалось, что у 19 из 20 испытуемых есть антитела к S-белку на достаточном для визуализации уровне. При этом, тест RapidBio во всех случаях показал более четкий результат. Для количественной оценки уровня антител у испытуемых мы использовали VirIntel SARS-CoV-2 dual antigen ELISA test на RBD-домен S-белка и N-белок. Для проведения ИФА мы использовали стандартный протокол и окраску субстратом для пероксидазы хрена Sigma Fast с последующим измерением интенсивности окраски на планшетном спектрофотометре при длине волны 490 нм и нормализацией. По результатам ИФА оказалось, что у всех испытуемых есть антитела, как минимум, к одному из белков – количество антител варьируется от 0,065 до 1,833 на N-белке и от 0,08 до 1,16 на S-белке. Это коррелирует с тяжестью симптомов и создает хорошую основу для оценки корреляции антител с особенностями назальных микробиомов. В дальнейшем мы планируем оценить корреляцию микробиомов с полиморфизмами в локусе ApoE, который является одним из важнейших белков крови и участвует в развитии болезни Альцгеймера и сердечно-сосудистых заболеваний.

СОЗДАНИЕ ГЕНОМНОЙ СБОРКИ ФИТОПАТОГЕНА *COLLETOTRICHUM LINI* ХРОМОСОМНОГО УРОВНЯ

Сигова Е.А.^{1,2}, Дворянинова Е.М.¹, Рожмина Т.А.³, Кудрявцева Л.П.³, Жернова Д.А.¹,
Павлова В.А.^{1,4}, Бодров Я.В.^{1,4}, Каплун А.М.^{1,2}, Мельникова Н.В.¹, Дмитриев А.А.¹

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

²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),
Москва, Россия

³Федеральный научный центр лубяных культур, Торжок, Россия

⁴Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова РТУ МИРЭА,
Москва, Россия

sigova.ea@phystech.edu

Colletotrichum lini – фитопатоген, вызывающий антракноз льна. Это заболевание наносит значительный экономический ущерб льноводству. Антракноз провоцирует увядание взрослых растений и поражает семена, что приводит к ухудшению их всхожести. Наличие полной и протяженной сборки генома *C. lini* позволит вывести на новый уровень молекулярно-генетические исследования представителей этого вида и сделает более эффективными разработку средств защиты растений от антракноза и создание устойчивых сортов льна. Целью работы является получение сборки генома *C. lini* хромосомного уровня.

Для достижения заявленной цели на платформах Oxford Nanopore Technologies (ONT) и Illumina секвенированы геномы штаммов *C. lini* с различной степенью вирулентности. Геномные сборки получены с использованием приложения Canu и далее отполированы двумя итерациями приложения Raco, одной итерацией Medaka и одной итерацией Polca. Сборки обладали полнотой по BUSCO более 96% и состояли из 26-61 контига с N50 более 5 млн. п.н. Во всех сборках выделены полные митохондриальные геномы, остальные контиги были отсортированы нами по уменьшению длины. Для дальнейшего получения высококачественной сборки изучили повторы, встречающиеся в геноме *C. lini* с помощью приложения RepeatMasker. В том числе обнаружили теломерные повторы с использованием приложения Tidk. По результатам поиска теломерных повторов большинство сборок имело около 5 полностью собранных хромосом (от теломер до теломер) и около 10 контигов, которые имели теломерные повторы на одном из концов. Количество собранных теломерных повторов на концах варьировало от 9 до 19. С помощью приложения LAST провели множественные выравнивания геномов штаммов *C. lini* друг на друга. В результате большинство контигов с длиной более 1 млн. п.н. выравнивались полностью на соответствующие контиги из сборок других штаммов в прямом либо обратном направлении. Многие контиги с теломерными повторами только на одном конце выравнивались на полные хромосомы другого штамма за исключением только лишь наличия теломерных повторов на обоих концах, что говорит о высокой протяженности полученных сборок.

Мы продолжаем выполнение обширного сравнительного анализа сборок геномов штаммов *C. lini*, а также проводим тестирование различных приложений для скаффолдинга, которые позволяют объединять контиги в хромосомы на основе длинных чтений ONT. Сборка генома *C. lini* до уровня хромосом необходима для адекватного сравнительного анализа сборок штаммов этого вида и изучения дополнительных (accessory) хромосом, которые характерны для грибных фитопатогенов рода *Colletotrichum* и потенциально несут информацию о степени вирулентности штамма.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант 22-16-00169.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОТОННОГО КАНАЛА ОТОР1

Сладков К.Д., Кабанов А.В., Колесников С.С.

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

klimitrich@ya.ru

Белок отопетрин 1 (ОТОР1) участвует в формировании отолитов в вестибулярном аппарате (благодаря чему получил своё название), а также является сенсором кислого в мембране вкусовых клеток типа III. ОТОР1 функционирует как протонный канал, активность которого модулируется изменением pH экстраклеточного или внутриклеточного раствора. В данной работе исследовались возможные транспортные пути протона и механизмы регуляции тока через канал ОТОР1.

Структурно ОТОР1 представляет собой квазитетрамер, состоящий из двух субъединиц по два домена в каждой. Перенос протона, как предполагалось, должен происходить по механизму Гротхуса, при участии трансмембранных цепочек молекул воды, выявленных ранее методом молекулярной динамики. Хотя такие цепочки выявлены в каждом из двух доменов и между ними, мутационный анализ не позволил пока выявить, какие из них обеспечивают перенос протона. Для поиска транспортного пути был выполнен молекулярный докинг ОТОР1 и его лиганда – красителя Cibacron Blue 3G-A, который был ранее выявлен как ингибитор ОТОР1. Докинг проводился ко всей поверхности белка доступной для растворителя в ходе молекулярной динамики. Наиболее вероятные места связывания расположены в начале предполагаемых транспортных путей в междоменном пространстве и внутри С-домена. Наличие двух путей переноса протона согласуется с литературными данными, в которых ключевые аминокислоты белка расположены вдоль выявленных потенциальных транспортных путей. Таким образом, мы предполагаем наличие двух транспортных путей в каждой субъединице белка ОТОР1, регулируемых pH-чувствительными аминокислотными остатками в экстраклеточной и внутриклеточной части белка.

Из литературы известна только одна модель ОТОР1, предсказывающая величину тока в ответ на кислый стимул и потенцирование токов цинком. Эта модель не может описать ответы на щелочные стимулы, а также разную кинетику убывания тока в ответ на кислые стимулы разной интенсивности. Нами была разработана кинетическая модель протонного канала, лишённая этих недостатков. Модель опирается на формализм Ходжкина-Хаксли, в рамках которого концентрации экстраклеточного и внутриклеточного протона определяют как величину движущей силы, так и вероятность открытого состояния канала. Предположение о двух независимых транспортных путях позволяет адекватно описать токи в ответ на кислый и щелочной стимулы. Предлагаемая модель протонного канала ОТОР1 может быть использована для моделирования процесса трансдукции кислых стимулов во вкусовой клетке типа III.

Работа поддержана грантом РФФ № 22-14-00031.

ВЛИЯНИЕ ОСТАТКА ПРОЛИНА В ПОЛОЖЕНИИ 325 НА РАСПОЗНАВАНИЕ ЭПИТОПА
MX35 НАТРИЙ-ЗАВИСИМОГО ФОСФАТНОГО ТРАНСПОРТЕРА NaPi2b
МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ

Слидзюк И.А., Киямова Р.Г., Булатова Л.Ф.

Институт фундаментальной медицины и биологии, Казань, Россия

slidzukirina@gmail.com

Актуальность. Натрий-зависимый фосфатный транспортер NaPi2b является перспективной мишенью для разработки противоопухолевых препаратов, поскольку его высокое содержание обнаружено в клетках ряда злокачественных новообразований. В области большого внеклеточного домена (ВКД) NaPi2b присутствует эпитоп MX35, доступность для моноклональных антител которого зависит от конформации ВКД, которая формируется за счет образования дисульфидных связей между четырьмя остатками цистеина в положениях 303, 322, 328 и 350. Предположительно, в механизме образования дисульфидной связи между цистеинами в положениях 322 и 328 принимает участие остаток пролина в положении 325 благодаря уникальным свойствам, способствующим образованию изгиба в структуре ВКД, таким образом приближая два остатка цистеина для образования дисульфидной связи и стабилизации ВКД NaPi2b. Мы предполагаем, что при замене остатка пролина в этом положении конформация ВКД нарушится и эпитоп MX35 станет недоступен для моноклональных антител.

Цель работы. Изучить влияние остатка пролина в положении 325 на распознавание эпитопа MX35 натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b моноклональными антителами в лизатах опухолевых клеток линии OVCAR-8.

Материалы и методы. В ходе исследования были созданы генетические конструкторы, кодирующие мутантную форму транспортера NaPi2b с заменой остатка пролина на остаток аланина в положении 325 в районе большого внеклеточного домена NaPi2b, с помощью сайт-направленного мутагенеза. Проведена транзientная трансфекция плазмиды со вставкой гена NaPi2b, кодирующей дикий тип или мутантную форму NaPi2b с заменой пролина в положении 325, в клетки линии карциномы яичника OVCAR-8. Сравнение распознавания эпитопа MX35 моноклональными антителами мутантной формы и дикого типа NaPi2b проведено с помощью Вестерн-блот анализа лизатов трансфицированных опухолевых клеток линии рака яичника OVCAR-8.

Результаты. В результате проведенного исследования нами не обнаружена разница в распознавании эпитопа MX35 моноклональными антителами между диким типом и мутантной формой NaPi2b с заменой остатка пролина в положении 325 в Вестерн-блот анализе лизатов трансфицированных опухолевых клеток линии рака яичника OVCAR-8.

Заключение. Мы показали, что замена остатка пролина в положении 325 не изменила распознавание эпитопа MX35 NaPi2b моноклональными антителами лизатов трансфицированных опухолевых клеток линии рака яичника OVCAR-8.

В дальнейшем мы планируем изучить, как распознается эпитоп MX35 антителами на живых интактных клетках линии OVCAR-8 с помощью лазерной конфокальной микроскопии.

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета.

ИССЛЕДОВАНИЕ РНК-СВЯЗЫВАЮЩИХ СВОЙСТВ БЕЛКОВ ХОЛОДОВОГО ШОКА ИЗ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Смольянова Н.А.^{1,2}, Леконцева Н.В.², Никулин А.Д.²

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

²Институт белка РАН, Пушино, Россия

Туберкулёз — широко распространённое в мире инфекционное заболевание человека и животных, вызываемое различными штаммами микобактерий из группы *Mycobacterium tuberculosis*, или иначе палочкой Коха, уносящей около двух миллионов человеческих жизней на планете ежегодно. Попадая в организм хозяина, микобактерии взаимодействуют с макрофагами и способны подавлять аутофагию и передачу межклеточного сигнала, противостоять воздействию токсичных веществ, что приводит к сохранению жизнеспособности микобактерий внутри макрофагов. Длительное сосуществование *M. tuberculosis* и его хозяина позволило патогену выработать набор стратегий, позволяющих эффективно бороться с системами иммунной защиты. Среди них – малые регуляторные РНК, которые в совокупности со своими мРНК-мишенями составляют сложные регуляторные сети, позволяющие патогену адаптировать свой метаболизм на различных стадиях развития инфекции.

В бактериях в процесс регуляции трансляции с участием малых регуляторных РНК активно вовлечены РНК-шапероны – белки, способствующие расплетанию вторичной структуры РНК и взаимодействию двух разных молекул РНК – мРНК и мРНК. Поскольку наиболее известных и изученных РНК-шаперонов Hfq и ProQ обнаружено не было, предполагается, что в микобактериях роль РНК-шаперонов могут выполнять другие РНК-связывающие белки, например, представители таких семейств белков как CspA/CspB. Данные белки относятся к высококонсервативному семейству белков холодового шока и представляют собой β-бочонок, состоящий из пяти антипараллельных β-тяжей. Белки данного семейства сверхэкспрессируются в ответ на холодовой стресс и действуют как РНК-шапероны, предотвращая формирование вторичных структур РНК при низких температурах. На сегодняшний день Mtb CspA и Mtb CspB не исследовались подробно и сходство их функций с гомологами остаются под вопросом.

Нами получены генетические конструкции, кодирующие гены белков CspA и CspB из *M. tuberculosis*, а также конструкции трех малых регуляторных РНК, предположительно взаимодействующих с исследуемыми белками. Мы разработали протокол получения исследуемых белков и получили первые кристаллы препаратов MtbCspA. мРНК были наработаны транскрипцией *in vitro*. Сродство исследуемых белков с мРНК было исследовано с помощью методов электрофоретического анализа связывания (EMSA) и аналитической эксклюзионной хроматографии.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ №24-24-00071.

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ АГРЕГАЦИИ ПЕПТИДА АМИЛОИДА БЕТА С РАЗЛИЧНЫМИ МУТАЦИЯМИ: НОВЫЕ ДАННЫЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Стюфляева Ю.К.^{1,2}, Зелинский А.А.², Маликова О.А.², Рубель А.А.²

¹Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург, Россия

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

styuflyeva@scamt-itmo.ru

Болезнь Альцгеймера (БА) – наиболее распространенное нейродегенеративное заболевание, являющееся причиной более 80% всех случаев возрастной деменции. Общемировая заболеваемость БА оценивается примерно в 50 миллионов человек. В настоящее время отсутствуют неинвазивные методы ранней биохимической диагностики БА, поэтому их разработка крайне актуальна. Данное исследование направлено на изучение динамики агрегации вариантов пептида амилоида (A β 42) для последующей разработки подхода к диагностике заболевания на доклинической стадии, путем обнаружения малых количеств мультимеров пептида A β 42 в крови и лимфе.

Появление агрегированных форм пептида A β 42 и белка Тау является ключевым биохимическим маркером, указывающим на возможное начало патологического каскада при БА. Для диагностики БА применяются такие методы нейровизуализации, как магнитно-резонансная томография (МРТ) и позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) головного мозга, однако они обнаруживают относительно поздние стадии заболевания и требуют дорогостоящее оборудование. Существуют перспективные подходы, связанные с обнаружением агрегированной формы A β в биологических жидкостях организма. Так, методика РМСА (Protein Misfolding Cyclic Amplification) показала успехи при диагностике прионных агрегатов белка PrP в крови.

Одной из основных проблем при амплификации пептида A β с помощью метода РМСА является высокая скорость спонтанной агрегацией мономеров пептида A β *in vitro*, что приводит к появлению ложноположительных результатов. Для решения этой проблемы, мы получили пять генетических конструкций, кодирующих один из вариантов A β 42 человека, с мутациями снижающими его способность к агрегации, либо A β 42 дикого типа, слитые с последовательностью, кодирующей SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier). Конструкции также содержали последовательность, кодирующую гистидиновый тег (6 His), для очистки белков методами металл-аффинной хроматографии. Полученными вариантами трансформировали штамм *Escherichia coli* Rosetta, после чего подбирали условия для наработки и очистки рекомбинантных белков. В настоящее время проводится анализ кинетики агрегации мутантных вариантов A β 42 в присутствии амилоид специфичного красителя – тιοфлавина Т, с помощью метода флуориметрии. Варианты A β 42, имеющие относительно медленную скорость агрегации по сравнению с контролем будут использованы в последующей реакции РМСА.

Полученные нами результаты будут способствовать разработке эффективной тест-системы для обнаружения мультимерных форм пептида A β в крови в исчезающе малых количествах. В перспективе такой подход позволит диагностировать БА до появления клинических симптомов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Санкт-Петербургского государственного университета (проект № 95444727). В работе использовали приборную базу РЦ «Хромас» Научного парка СПбГУ.

ВЛИЯНИЕ УРОВНЯ СВЕРХЭКСПРЕССИИ ГЕНА SOD2 НА КЛЕТочНУЮ РАДИОУСТОЙЧИВОСТЬ

Тавлеева М.М.^{1,2}, Рыбак А.В.¹, Расова Е.Е.¹, Белых Е.С.¹, Велегжанинов И.О.¹

¹Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН, Сыктывкар, Россия

²Сыктывкарский государственный университет имени Питирима Сорокина,
Сыктывкар, Россия

tavleeva.marina@yandex.ru

Окислительный стресс, проявляющийся в нарушении редокс-статуса клетки, участвует в этиологии и/или патогенезе некоторых заболеваний, включая рак. Марганцевая супероксиддисмутаза (*SOD2*) – один из ключевых белков антиоксидантной защиты, локализованный в матриксе митохондрий. В опубликованном нами ранее систематическом обзоре была показана противоречивая роль *SOD2* в развитии рака. Мы поставили перед собой цель оценить влияние уровня сверхэкспрессии *SOD2* на устойчивость клеток *HEK293T* к окислительному стрессу, вызванному воздействием гамма-излучения в различных дозах.

Для сверхэкспрессии с использованием технологии *CRISPRa* были сконструированы гидовые РНК (гРНК), нацеленные на общий промотор транскрипционных вариантов (ТВ) 1–6, так как экспрессия ТВ 1–5 *SOD2* более чем в 1000 раз выше относительно вариантов 6, 8 и 9 в трёх клеточных линиях человека. ТВ 7 не обнаруживался. Была подтверждена зависимость уровня сверхэкспрессии гена от количества вносимых гРНК. При оценке жизнеспособности клеток методом флуорометрического анализа цитотоксичности в микрокультурах (*FMCA*) после облучения было показано, что высокие уровни сверхэкспрессии ТВ 1–6 (с использованием трёх гРНК) биологически адекватны при высоких же уровнях окислительного стресса (наибольшая жизнеспособность – после 5 Гр). Вероятно, это связано с тем, что высокая активность *SOD2* ведёт к перепроизводству перекиси водорода, что имеет большую токсичность по сравнению со стрессом, вызванным облучением в дозах 2 и 3 Гр, после которых наибольшую жизнеспособность показали трансфектанты с одной и двумя гРНК соответственно.

В дополнительном эксперименте с помощью метода формирования колоний оценивали два параметра, из которых складываются показатели жизнеспособности – выживаемость и скорость клеточной пролиферации. Варианты со слабой и сильной сверхэкспрессией ТВ 1–6 *SOD2* дублировали с одновременной сверхэкспрессией каталазы (*CAT*), которая разрушает перекись. Как и ожидалось, выживаемость клеток, сверхэкспрессирующих ТВ 1–6 *SOD2* совместно с *CAT*, была выше относительно соответствующих вариантов без *CAT*. Статистически значимое повышение выживаемости в ответ на облучение во всех дозах наблюдалось в варианте с одновременной сильной сверхэкспрессией *SOD2* и *CAT*, а после 5 Гр – и в варианте наибольшей сверхэкспрессии ТВ1–6 *SOD2*.

Все варианты воздействия демонстрировали тенденцию к снижению скорости пролиферации клеток при сверхэкспрессии ТВ 1–6 *SOD2* (отдельно или совместно с каталазой), поэтому описанные выше результаты оценки жизнеспособности по большей части обусловлены изменением выживаемости.

В сочетании с литературными данными о подавлении проканцерогенных эффектов эктопической экспрессии *SOD2* с помощью сверхэкспрессии каталазы, представленные здесь данные указывают на потенциальную эффективность одновременной сверхэкспрессии *SOD2* и *CAT* для снижения оксидативного стресса, возникающего в различных патологических процессах. Более того, эти результаты иллюстрируют важность выбора степени сверхэкспрессии *SOD2* для достижения защитного эффекта.

ГЕНОМНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ СЕМЕЙСТВ ГЕНОВ, ВОВЛЕЧЕННЫХ В БИОСИНТЕЗ ЖИРНЫХ КИСЛОТ ОБЛЕПИХИ

Турба А.А.¹, Новаковский Р.О.¹, Предущенко П.А.¹, Зубарев Ю.А.²,
Мельникова Н.В.¹, Дмитриев А.А.¹

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук,
Москва, Россия

²Федеральный Алтайский научный центр агробιοтехнологий, Барнаул, Россия

anastas.turba@gmail.com

Облепиха (*Hippophae rhamnoides* L.) обладает ценными питательными и лечебными свойствами. Биологически активные масла облепихи содержатся в семенах и мякоти плодов. Высокое содержание пальмитиновой кислоты в мякоти плодов (около 36%) ограничивает развитие производства облепихи, однако эту характеристику можно улучшить. Известно, что тканеспецифичная экспрессия ключевых генов, вовлеченных в биосинтез жиров, обуславливает значительную разницу в содержании масла и его жирнокислотном составе в семенах и мякоти плодов облепихи. Высокий уровень экспрессии генов *GPD1* и *DGAT1*, *DGAT2* в формирующейся мякоти способствует эффективному накоплению триацилглицеринов. Низкий уровень экспрессии данных генов обуславливает низкое содержание масла в семенах. Высокий уровень экспрессии *KASII*, коррелирующий с высоким уровнем экспрессии *SAD*, *FAD2*, *FAD3*, *FAD7*, *FAD8* и низким уровнем экспрессии *FATB*, *Δ9D*, способствует накоплению олеиновой, линолевой и линоленовой кислот в семенах облепихи. Однако низкий уровень экспрессии *KASII*, коррелирующий с высоким уровнем экспрессии *FATB* и *Δ9D*, способствует накоплению пальмитиновой и пальмитолеиновой кислот в мякоти.

В этой работе с использованием последовательности генома облепихи (<https://db.cngb.org/search/project/CNP0001846/>) проведено комплексное исследование генов семейств *SAD*, *FAD*, *FAT*, *KAS*, *GPD* и *DGAT*, включая структуры генов, филогенетические отношения и состав мотивов.

Последовательности белков *Arabidopsis thaliana* и его ортологов были загружены из базы данных Ensembl Plants (<https://plants.ensembl.org/>). Эти последовательности использовались в качестве запросов с помощью BLASTP с фильтром по критерию E-value ≤ 1e-5 для идентификации членов искомым семейств. Файлы скрытой марковской модели для анализируемых семейств генов загружены из базы данных Pfam (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>). HMMER 3.0 (<http://hmmer.janelia.org/>) использовался для отбора генов-кандидатов. Два онлайн-ресурса: Pfam (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/pfam>) и NCBI-CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>) применялись для определения того, содержат ли все кандидаты соответствующие домены. ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>) использовался для расчета длины аминокислотной последовательности, молекулярной массы (MW), изоэлектрической точки (pI) и индекса нестабильности всех генов-кандидатов. Приложение MEGA 11.0 с инструментом ClustalW применялось для множественного выравнивания последовательностей и построения филогенетических эволюционных деревьев. Мотивы белков получены из MEME (<http://meme-suite.org/>, v5.1.1).

В ходе работы из 2366 генов-кандидатов отобрано и проанализировано 9 генов *SAD*, 20 генов *FAD*, 8 генов *FAT*, 26 генов *GPD* и 7 генов *DGAT*. Полученные данные лягут в основу последующих полногеномного, транскриптомного и метиломного анализов, которые необходимы для понимания механизмов синтеза жирных кислот, а также развития маркер-ориентированной селекции облепихи с целью создания сортов с улучшенным жирнокислотным составом плодов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 23-46-00026.

ПОЛУЧЕНИЕ ОБСКУРИНА СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ ЗИМНЕСПЯЩЕГО СУСЛИКА
UROCITELLUS UNDULATUS

Уланова А.Д.¹, Барсук Д.А.^{2,3}, Михайлова Г.З.¹, Попова С.С.¹, Вихлянцев И.М.^{1,4}

¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушино, Россия

²Пушчинский филиал ФГБОУ высшего образования «Российский биотехнологический университет», Пушино, Россия

³Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ Пушчинский научный центр биологических исследований РАН, Пушино, Россия

⁴Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета, Казань, Россия

a-okuneva@yandex.ru

Одним из важных направлений являются исследования молекулярных механизмов пластичности поперечно-полосатых мышц зимнеспящих животных в период гибернации. Обнаружено, что в период гибернации происходит преимущественный синтез таких гигантских белков саркомерного цитоскелета как тайтин, небулин и обскурин. Белок обскурин (“obscure” – неизвестный, неясный) играет важную роль в миофибриллогенезе и сборке толстых филаментов, определяя поперечный размер саркомеров и мышечных волокон в целом. Обскурин, также, как и тайтин, относится к семейству полипептидов, экспрессируемых одним геном. Взаимодействие обскурина с тайтином в саркомере свидетельствует о тесной структурной и функциональной взаимосвязи этих двух гигантских белков. В частности, в периоды “зимней” активности зимнеспящего суслика *Urocyon undulatus* происходит повышение содержания мРНК обскурина и тайтина в скелетной мышце *m. longissimus dorsi* [Gritsyna et al., J. Evol. Biochem. Physiol., 2022]. Высказано предположение, что в период зимней активности происходит синтез новых изоформ обскурина, участвующих совместно с более длинными изоформами тайтина в реконструкции трехмерного упруго-эластичного каркаса мышечных клеток. Однако исследования изоформного состава обскурина длиннохвостого суслика *Urocyon undulatus* затруднены в связи с тем, что в базе данных PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) отсутствуют нуклеотидные последовательности гена обскурина этого животного. Нами было проведено выравнивание известных нуклеотидных последовательностей мРНК обскурина альпийского сурка *Marmota marmota*, мышцы *Mus caroli* и тринадцатиполосного суслика *Ictidomys tridecemlineatus* с целью поиска гомологичных участков в мРНК известных последовательностей изучаемых генов этих близкородственных грызунов. В качестве основного был использован ген обскурина тринадцатиполосного суслика *Ictidomys tridecemlineatus*, последовательность которого предсказана биоинформационными методами (mRNA obscurin (LOC101962737), NCBI Reference Sequence: XM_040273316.1, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/XM_040273316.1). Последовательность ДНК, кодирующую фрагмент обскурина, синтезировали методом ПЦР с использованием кДНК из скелетной мышцы *m. longissimus dorsi* в качестве матрицы. ПЦР-фрагменты субклонировали в вектор, затем конструкцию трансформировали в компетентные клетки. В результате был получен пептид (aa.61–306, 28 кДа), нуклеотидная последовательность которого имеет восемь замен, по сравнению с аналогичной последовательностью для обскурина тринадцатиполосного суслика, при этом аминокислотная последовательность полученного пептида не изменена. В дальнейшем предполагается получить мышинные поликлональные антитела к этому пептиду с целью последующего обнаружения высокомолекулярных изоформ обскурина в скелетных мышцах длиннохвостого суслика. Запланированные нами исследования обскурина расширят представления о роли гигантских мышечных белков в поддержании структуры и функции поперечно-полосатых мышц в норме и при патологии. Работа выполнена в рамках Государственного задания № 075-00224-24-01.

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ АГРЕГАТОВ ТИТИНА СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ КРОЛИКА

Урюпина Т.А.¹, Бобылёва Л.Г.¹, Пеньков Н.В.², Тимченко М.А.¹, Уланова А.Д.¹,
Габдулхаков А.Г.³, Вихлянецв И.М.^{1,4}, Бобылёв А.Г.¹

¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушино, Россия

²Институт биофизики клетки РАН, Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», Пушино, Россия

³Институт белка РАН, Пушино, Россия

⁴Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

tatyanauta98@gmail.com

Амилоидозы представляют собой широкий спектр заболеваний, вызывающих дисфункцию органов, а иногда и смерть. Они ассоциированы с образованием и накоплением в организме амилоидных агрегатов. На сегодняшний день не существует эффективных методов лечения амилоидозов. Это связано в первую очередь с отсутствием полного понимания процесса амилоидной агрегации, в том числе на уровне структуры. Также продолжается открытие новых амилоидных белков – функциональных амилоидов, амилоидные агрегаты которых сопряжены с жизненно важными функциями в организме.

В данной работе изучена структура агрегатов титина скелетных мышц кролика, полученных в двух разных растворах – 0.15 М глицин-КОН pH 7.0 и 200 мМ KCl, 10 мМ имидазол pH 7.0. Ранее нами было показано, что в указанных растворах титин формирует разные по морфологии агрегаты.

Вторичную структуру двух типов агрегатов скелетномышечного титина изучали с помощью ИК-Фурье-спектроскопии. Агрегаты титина в двух растворах имеют пик, соответствующий характеристикам амилоидных агрегатов. Полученные данные указывают на то, что в образцах титина имеется большой процент неупорядоченной структуры и в процессе агрегации количество неупорядоченности растет. У агрегатов титина, сформированных в растворе, содержащем 200 мМ KCl, отсутствуют α -спиральные участки и увеличивается процент β -складок по сравнению с неагрегированной формой белка.

Рентгеновская дифракция показала наличие ярко выраженного амилоидного рефлекса 4.6 Å у агрегатов титина, сформированных в растворе, содержащем 0.15 М глицин-КОН. В растворе, содержащем 200 мМ KCl, амилоидных рефлексов не обнаружено. Мы также показали, что агрегаты титина, сформированные в растворе, содержащем 0.15 М глицин-КОН связывались с красителем тиофлавином Т, увеличивая его флуоресценцию.

Таким образом, совокупность полученных нами разными методами данных может указывать на то, что агрегаты титина, сформированные в растворе, содержащем 0.15 М глицин-КОН, относятся к амилоидоподобным. Полученные данные выявляют особенности структурных изменений при формировании межмолекулярных связей между молекулами гигантского белка титина в процессе его агрегации и расширяют представления о процессе амилоидной агрегации белков.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (№ 22-24-00805).

РАЗРАБОТКА И ОПТИМИЗАЦИЯ СТРАТЕГИЙ БОРЬБЫ С КОЛОРАДСКИМ ЖУКОМ
LEPTINOTARSA DECEMLINEATA С ПОМОЩЬЮ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ

Фадеев Р.Р.^{1,2}, Биницкая Н.В.¹, Долгих В.В.¹

¹Всероссийский институт защиты растений, Санкт-Петербург, Россия;

²Ленинградский государственный университет имени А.С. Пушкина,
Санкт-Петербург, Россия

fadeeff.rusln@gmail.com

Представители семейства пасленовых играют важную роль в мировом сельском хозяйстве, а картофель является третьей по потреблению продовольственной культурой в мире после риса и пшеницы. Наиболее опасным и экономически значимым вредителем пасленовых является колорадский жук *Leptinotarsa decemlineata*, описанный в 1824 году. Причиняемый этим фитофагом ущерб усугубляется его быстрой адаптацией к действию химических пестицидов. К 2008 году вредитель приобрел устойчивость к более чем 50 химическим соединениям и с каждым годом это число растет.

Одним из перспективных и относительно безопасных для окружающей среды и человека методов борьбы с фитофагами-вредителями (и другими фитопатогенами) является подход, основанный подавлении транскрипционной активности жизненно-важных генов вредителя с помощью РНК-интерференции. Это процесс запускается попаданием в организм насекомого молекул двухцепочных РНК (дцРНК), комплиментарных участкам генов-мишеней.

В качестве мишеней для РНК-интерференции были выбраны фрагменты генов колорадского жука, кодирующих (1) b'-субъединицу коацерватного комплекса СОР1, (2) актин, (3) субъединицу А вакуолярной АТФазы, (4) субъединицу 7 (Mov34) 26S протеасомы, (5) белок S4 рибосомальной субъединицы 40S, (6) компонент комплекса сортировки эндосом Snf7, а также две эндонуклеазы, потенциально способные гидролизовать дцРНК. В докладе будут представлены результаты (I) создания генетических конструкций для биосинтеза молекул дцРНК в *E. coli* HT115 (DE3) с использованием оригинального вектора; (II) оптимизации метода их выделения и очистки после наработки в бактериях; (III) кормления личинок колорадского жука различными комбинациями фрагментов для поиска вариантов, максимально эффективно подавляющих развитие вредителя; (IV) попытки использования системы гидропоники для доставки дцРНК в растение.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВИРУСНОГО ШАПЕРОНИНА AR9 ПРИ ПОМОЩИ МЕТОДА КРИОГЕННОЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

Федоров Н.В.¹, Пичкур Е.Б.¹, Самыгина В.Р.¹, Курочкина Л.П.²

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

²НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

eugene.pichkur@gmail.com

Шаперонины – это класс молекулярных шаперонов, ответственных за правильное формирование и восстановление третичной или четвертичной структуры белков за счет энергии гидролиза АТФ. Шаперонины принято делить на две группы. Шаперонины первой группы находятся в прокариотах, хлоропластах и митохондриях и представляют собой мультисубъединичные комплексы из двух состыкованных «спина к спине» семисубъединичных колец. Шаперонины первой группы функционируют в паре с кошаперонинами, которые как крышка прикрывают внутреннюю полость шаперонина. Шаперонины второй группы находятся в эукариотах и функционируют без кошаперонинов, крышка для инкапсулирования белка-субстрата формируется альфа-спиралями их апикальных доменов. Недавние исследования показали, что некоторые вирусы бактерий (бактериофаги) кодируют собственные шаперонины, имеющие свои особенности. Они функционируют без кошаперонинов и не имеют встроенной крышки. Для понимания механизма функционирования вирусных шаперонинов необходимо изучить их структуру на разных стадиях АТФазного цикла.

В работе мы исследовали шаперонин бактериофага AR9 *B. subtilis*, кодируемый геном 228. Рекомбинантный белок представляет собой кольцо из семи субъединиц, шесть из которых объединяются в пары (в каждой паре субъединицы находятся в двух определенных конформационных состояниях); оставшаяся же субъединица обладает повышенной лабильностью. Поскольку функционирование шаперонина AR9 является АТФ-зависимым, целью работы было получение криоЭМ структуры его комплекса с АТФ.

Перед витрификацией в раствор шаперонина был добавлен раствор АТФ. Образец был витрифицирован в жидком этане в работе Vitrobot Mark IV. Набор изображений с образца был собран с использованием криогенного электронного микроскопа Titan Krios (РЦ Нанозонд, НИЦ «Курчатовский институт»). Полученные изображения были обработаны в программном пакете CryoSPARC. После предварительной обработки была получена карта электронной плотности комплекса шаперонина с АТФ с разрешением 3.2 Å. С использованием утилит CryoSPARC разрешение было улучшено до 2.5 Å, что значительно выше, чем для ранее опубликованной структуры его апоформы [1]. На карте электронной плотности четко визуализируются как пары объединённых субъединиц, так и непарная субъединица, которая за счет своей подвижности разрешена хуже остальных субъединиц. Экваториальные домены имеют жёсткую структуру и разрешены лучше апикальных. Ведется работа по дальнейшему улучшению карты плотности и изучению отличий строения апоформы субъединиц и шаперонина в целом от его комплекса с АТФ.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 23-74-00021. Улучшение разрешения модели выполнено в рамках тематического плана НИЦ «Курчатовский Институт».

[1] Sokolova OS et al (2022) *Biomedicines*, 10, 2347 doi: 10.3390/biomedicines10102347

ВЫЯВЛЕНИЕ РЕАССОРТАНТНОГО ВИРУСА ГРИППА H13N8 В РАЙОНЕ ОЗЕРА БАЙКАЛ

Феоктистова С.Г., Сайганова М.А., Девяткин А.А.

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

feoktistova.sg@mipt.ru

Вирусы гриппа А (ВГА) представляют собой серьезную угрозу для здоровья людей во всем мире. С одной стороны, эти вирусы вызывают сезонные вспышки гриппа у людей. С другой стороны, это зоонозная инфекция, способная вызвать пандемию. Наиболее важным природным резервуаром ВГА являются дикие водоплавающие птицы.

В данной работе мы изучали распространенность ВГА среди птиц в Республике Бурятия. В 2020 году было собрано 3018 фекальных проб от диких перелетных птиц в районе озера Байкал. Из этих проб 11 оказались положительными на подтип H13N8, и для них было проведено полногеномное секвенирование. Все образцы содержали один и тот же вирус A/Unknown/Buryatia/Arangatui-1/2020.

Анализ реассортации проводили с помощью построения графика соответствия парных расстояний (PDCP) и матрицы отклонений парных расстояний (PDDM). Для тестирования и сравнения результатов общего метода использовали RDP5.

PDDM был проведен на основе 122 последовательностей полных геномов других известных H13N8 вирусов и показал, что A/Unknown/Buryatia/Arangatui-1/2020 возник в результате реассортации. Так же было показано, что реассортация между большинством дивергентных вирусов происходит между сегментами PB2, HA и NS.

Кроме того, несколько десятилетий назад, реассортация произошла между предками вирусов, недавно собранных в Китае, Нидерландах, США и Чили. Выявление нового реассортантного вируса в районе озера Байкал подчеркивает острую необходимость постоянного наблюдения и исследований для лучшего понимания эволюционной динамики вирусов гриппа, особенно таких малоизученных подтипов, как H13N8. Ограниченная доступность полных геномов в публичных базах данных так же подчеркивает необходимость дальнейших исследований и секвенирования для углубления понимания генетического разнообразия и эволюции H13N8 и других малоизученных подтипов гриппа.

Работа поддержана грантом РФФИ № 22-74-10032.

ТРАНСГЛЮТАМИНАЗЫ БАЗАЛЬНОГО МНОГОКЛЕТОЧНОГО: СТРУКТУРА ГЕННОГО
КЛАСТЕРА И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ БЕЛКОВ
У ГУБКИ *HALISARCA DUJARDINII*

Фиошин А.Д., Кравчук О.И., Адамейко К.И., Люпина Ю.В.

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

alexcolton@yandex.ru

Трансглутаминазы (TGM) – ферменты, осуществляющие посттрансляционные модификации белков, участвуют в регуляции клеточного цикла, пролиферации и дифференцировки клеток. Проведенное транскриптомное и геномное исследование губок показало, что у эволюционно древнего многоклеточного животного имеется сложно устроенный кластер генов TGM. У холодноводной морской губки *H. dujardinii* обнаружено шесть изоформ TGM, одна из которых, предположительно, не обладает ферментативной активностью. Несмотря на низкую гомологию, другие пять изоформ TGM сохраняют консервативные домены и, вероятно, каталитические функции, сходные с ферментами млекопитающих. Транскриптомные исследования выявили дифференциальную экспрессию изоформ TGM в годовом жизненном цикле и в процессах диссоциации и реагрегации клеток губки *H. dujardinii*. В фармакологических экспериментах с помощью ингибитора цистамина в дозах 0.5 – 25 мкМ показано, что снижение активности TGM в процессе реагрегации клеток губки усиливает адгезивные свойства клеток губки и дозозависимо повышает концентрацию активных форм кислорода в клеточных агрегатах. Исследование TGM базальных многоклеточных вносит вклад в эволюцию биохимических путей, участвующих в посттрансляционной модификации белков.

Работа поддержана грантом РФФ № 22-74-00111.

ВЛИЯНИЕ НОКАУТА ГЕНОВ МЕТИЛТРАНСФЕРАЗ METTL4 И THUMP2 НА ФЕНОТИП МЫШЕЙ И ЧЕЛОВЕКА

Хохлова М.А.^{1,2}, Марьясина С.С.^{2,3}, Сергиев П.В.^{1,2,3}

¹Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ имени М.В. Ломоносова,
Москва, Россия

²Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского имени М.В. Ломоносова,
Москва, Россия

khokhlovama@my.msu.ru

Сплайсинг – это один из важнейших этапов процессинга пре-мРНК, суть которого заключается в вырезании интронов из последовательности гена и сшивании экзонов между собой в готовую белоккодирующую нуклеотидную последовательность. Узнавание участков разрезания и сшивания осуществляет сплайсосома, в состав которой входят рибонуклеопротеидные комплексы белков и малых ядерных РНК (мяРНК) U1, U2, U4, U5 и U6. Каждая мяРНК играет важную роль в эффективности и точности протекания сплайсинга.

В рамках данной работы мы обратили внимание на метилтрансферазы *METTL4* и *THUMP2*, которые осуществляют посттранскрипционную модификацию мяРНК U2 (30 m6A) и мяРНК U6 (72 m6G соответственно). Данные модификации функционально значимы: было показано, что нокаут генов данных метилтрансфераз провоцирует альтернативные события сплайсинга мРНК.

RNA-seq анализ транскриптомов из печени мышей с нокаутом вышеупомянутых метилтрансфераз показал увеличение экспрессии генов, ассоциированных с иммунным ответом. Иммуногистохимия печени подтвердила повышенную концентрацию клеток Купфера в печени мышей обеих экспериментальных групп. Проанализировав плазму крови нокаутных мышей было обнаружено повышенное содержание глюкозы (до 9,5 ммоль/л) и снижение содержания некоторых жирных кислот примерно на 10-15% от нормы. Полученные результаты свидетельствуют о том, что нокаут генов метилтрансфераз *METTL4* и *THUMP2*, вероятно, вызывает MODY-диабет.

Работа выполнена при поддержке РФФ №21-64-00006.

СИСТЕМА ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ СЕНСОРОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРЕССОВОГО ОТВЕТА БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Цой Е.А., Фисунов Г.Ю., Говорун В.М.

ФБУН НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва, Россия

eatsoy2012@gmail.com

В каждой живой клетке, эукариот и прокариот, одновременно протекает множество процессов (биосинтез и катаболизм низкомолекулярных соединений, транспорт, транскрипция, трансляция и репликация). Но при этом они не мешают друг другу. Это связано с тем, что внутреннее содержимое живых клеток, даже самых просто организованных – Молликут, структурировано. В эукариотических клетках это достигнуто за счет системы внутренних мембран и цитоскелета, с прокариотами дела обстоят иначе. На данный момент ученые продолжают исследовать, как решена эта проблема в бактериальных клетках. Одним из развивающихся методов изучения организации внутреннего содержимого клеток является флуоресцентная микроскопия, в том числе сверхвысокого разрешения. Для этого создаются различные флуоресцентные генетически-кодируемые биосенсоры, которые позволяют детектировать различные характеристики среды. Например, уже созданы сенсоры, детектирующие: pH, окислительно-восстановительный потенциал, электростатический потенциал, концентрации метаболитов. Эти флуоресцентные сенсоры не имеют проблем с проникновением внутрь клетки и оказывают минимальный эффект на её жизнеспособность.

В данной работе мы обратили свое внимание на два генетически-кодируемых флуоресцентных биосенсора. Для детекции изменений pH в бактериальных клетках, мы выбрали сенсор Sypher3s, разработанный на основе YFP. А для визуализации пространственно-временного распределения АТФ в клетке, был взят флуоресцентный сенсор MalionG, содержащий в своем составе GFP.

В качестве объектов нашего исследования, были выбраны бактерии, относящиеся к разным классам (*E. coli* и *M. gallisepticum*). В отличие от классического модельного объекта, *M. gallisepticum* обладает рядом уникальных особенностей, которые присущи бактериям класса Mollicutes. К примеру, у них редуцирована клеточная стенка, упрощен метаболизм, а размер генома находится в диапазоне 0,7-1,5 миллиона пар оснований. В геноме микоплазм снижено содержание ГЦ-оснований (около 30%). Как следствие этого, частота встречаемости кодов отличается от классических модельных объектов. Так, в нем практически не встречается триптофановый кодон UGG, его функцию выполняет кодон UGA, являющийся у большинства организмов стоп-кодоном. Поэтому важно было создать вектора с адаптированным кодонным составом генов, способные экспрессироваться в исследуемых нами бактериях.

При помощи программы VAC-browser в нашей лаборатории была разработана и собрана универсальная генетическая конструкция для обоих модельных объектов. Используя этот же софт, мы адаптировали генетический код флуоресцентных белков для экспрессии в бактериях *E. coli* и *M. gallisepticum*. В ходе работы были собраны вектора, содержащие в своем составе Sypher3s или MalionG. Полученными плазмидами были трансформированы *E. coli* и *M. gallisepticum*. Мы показали, что полученные нами штаммы бактерий экспрессируют флуоресцентные биосенсоры Sypher3s или MalionG. Полученные в ходе данной работы генетические конструкции будут использованы для исследования организации основных принципов организации бактериальных клеток.

Работа финансировалась по заданию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в рамках темы «Создание искусственных клеточных систем» рег. № 1022040800170-3-1.6.23.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБИНАНТНОГО ФЕРМЕНТА RihC ИЗ БАКТЕРИЙ *L. REUTERI* LR1 И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ

Шапошников Л.А.^{1,2}, Агеевец В.А.³, Тишков В.И.^{1,2}, Пометун А.А.^{1,2,4}

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

²Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального
медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

⁴Медицинский институт РУДН имени Патриса Лумумбы, Москва, Россия

shaposhnikovleo@gmail.com

Внутрибольничные инфекции в настоящее время являются актуальной и серьезной проблемой. Одними из возбудителей этих инфекций традиционно считаются бактерии рода *Klebsiella*. Эти патогены вызывают пневмонию, сепсис, воспаление мочеиспускательной системы, проблемы с печенью и почками, а их резистентность к антибиотикам с каждым годом возрастает. Известно, что при обработке антибактериальными агентами эти бактерии переходят в состояние биоплёнки, в котором их устойчивость значительно повышается.

Ранее при проведении совместного культивирования бактерий рода *Lactobacillus* и бактерий рода *Klebsiella* оказалось, что существует два штамма лактобактерий – *Limosilactobacillus reuteri* LR1 и *Lacticaseibacillus rhamnosus* F, которые проявляют антагонистическое действие к бактериям *Klebsiella*. Эти штаммы особо интересны потому, что они входят в состав собственной микробиоты кишечника человека. Был проведён протеомный анализ как свободных *L. reuteri* и *L. rhamnosus*, так и при их совместном культивировании с бактериями рода *Klebsiella*, и оказалось, что в ответ на действие патогена лактобактерии синтезируют ряд белков, способствующих подавлению роста клебсиелл. Анализ с помощью тандемной MALDI/TOF/TOF спектрометрии показал, что среди этих белков есть гидролазы, способствующие разрушению пептидных сшивок в пептидогликане клебсиелл или углеводного остова этого пептидогликана, белки, гидролизующие нуклеиновые кислоты, а также белки метаболизма, которые синтезируются только в ответ на присутствие клебсиелл. Одним из таких ферментов является рибонуклеозидгидролаза С (RihC) из *L. reuteri*.

RihC катализирует реакцию расщепления рибонуклеозидов до азотистых оснований и рибозы. Этот фермент является неспецифичным и катализирует реакции как с пиримидиновыми нуклеозидами, так и с пуриновыми. Не до конца ясна физиологическая роль данного фермента в лактобактериях и то, почему он синтезируется именно в ответ на присутствие патогенов.

В данной работе был получен рекомбинантный фермент RihC из *L. reuteri* LR1 (штамм был любезно предоставлен Всероссийским научно-исследовательским институтом молочной промышленности (ФГАНУ «ВНИМИ»)), а также проведены исследования антибактериальной активности данного фермента на патогенах группы ESKAPE и *E. coli* с множественной устойчивостью к антибиотикам. Показано, что данный фермент не обладает собственной антибактериальной активностью, однако обладает синергизмом с меропенемом при действии на *K. pneumoniae* и *E. coli*, замедляя рост этих организмов. Помимо этого, RihC из *L. reuteri* снижает эффективность образования биоплёнок у некоторых штаммов *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa* и *E. cloacae*.

Работа поддержана грантом РФФ № 23-64-10029.

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБИНАНТНОЙ L-
ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ *LIMOSILACTOBACILLUS REUTERI*

Широкова А.А.¹, Лукьянова Т.Е.¹, Шехтман С.П.¹, Тишков В.И.^{1,2}, Пометун А.А.^{1,2}

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

²Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН (ИНБИ РАН), Москва, Россия

annaevashirokova@gmail.com

В последнее время существует серьезная проблема в современной медицине, связанная с ростом антибиотикорезистентности патогенных микроорганизмов. В 2018 году Всемирная организация здравоохранения причислила *Klebsiella pneumoniae* к списку самых опасных патогенов из-за ее способности приобретать устойчивость к антибактериальным средствам. Однако самый большой интерес клебсиеллы вызывают, как возбудители нозокомиальных инфекций. В большей степени внутрибольничным инфекциям подвержены люди из групп риска: лица с сахарным диабетом и ХОБЛ. Передается внутрибольничные инфекции, при несоблюдении гигиены медицинским персоналом. Одним из способов борьбы с полирезистентными инфекциями, в том числе с *K. pneumoniae* является подавление их роста.

Недавние исследования показали, что некоторые штаммы молочнокислых бактерий могут успешно ингибировать рост *K. pneumoniae*. Один из таких эффективных штаммов — *Limosilactobacillus reuteri*, который выделяет несколько видов ферментов в окружающую среду. Эти ферменты можно разделить на три категории: протеазы, воздействующие на клеточные стенки *K. pneumoniae*, гидролазы нуклеиновых кислот и ферменты метаболизма молочнокислых бактерий. Особый интерес вызывают продукты метаболизма, такие как L- и D-лактатдегидрогеназы и цистеинсинтаза, поскольку они вырабатываются в значительных количествах при контакте с биопленками патогенов [1].

В качестве объекта исследования нами была выбрана – L-лактатдегидрогеназа (LreLLDH*). Это фермент, катализирующий реакцию превращения пирувата в L-лактат с сопряженным окислением NADH в NAD⁺. Нами были клонирован и получен фермент для исследования его физико-химических свойств. Также была проведена оптимизация условий экспрессии, позволяющая увеличить выход активности целевого белка более, чем в 2 раза.

Для полной характеристики фермента было проведено исследование pH-зависимости активности, что позволило определить его pH-оптимум, который находится в диапазоне pH 5,5-7. Также была определена температурная зависимость активности LreLLDH в диапазоне температур 16-40°C. В ходе исследования была изучена температурная инактивация фермента. Оказалось, что LreLLDH обладает высокой стабильностью при повышенных температурах.

*Белок выделен из лактобактерий *Limosilactobacillus reuteri*. Штамм бактерий был предоставлен Всероссийским научно-исследовательским институтом молочной промышленности.

Данное исследование проводится с финансовой поддержкой РФФИ по гранту № 23-64-10029.

Литература

1. Savinova O.S., Glazunova O.A., Moiseenko K.V., Begunova A.V., Rozhkova I.V., Fedorova T.V. Exoproteome Analysis of Antagonistic Interactions between the Probiotic Bacteria *Limosilactobacillus reuteri* LR1 and *Lactocaseibacillus rhamnosus* F and Multidrug Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae* // International Journal of Molecular Sciences. 2021. Vol. 22, 10999. P. 1-18.

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ТРАНСПОРТНОЙ СИСТЕМЫ МЕДИ НЕМАТОДЫ *C. ELEGANS* В ТЕЧЕНИЕ ЖИЗНЕННОГО ЦИКЛА

Щукина А.Д.^{1,3}, Самусева П.Д.^{1,2,3}, Мехова А.А.¹

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

²Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

³Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

tshukina.ad@edu.spbstu.ru

Медь (Cu) – один из важнейших микроэлементов для живых организмов. В качестве каталитического и аллостерического фактора она участвует в клеточном дыхании, детоксикации АФК, синтезе нейромедиаторов, нейропептидов, формировании соединительной ткани, транспорте железа и регуляции активности ряда транскрипционных факторов и участников сигнальных путей. В то же время в избытке свободные ионы меди способствуют образованию АФК и вызывают окислительный стресс. Безопасный внутриклеточный транспорт Cu осуществляется консервативной транспортной системой меди (ТСМ), в которой ось *CTR1* – *АТОХ1* – *АТР7А/В* – Сротвечает за поступление и выведение Cu. Нарушения в работе ТСМ ведут к различным заболеваниям, одно из которых болезнь Вильсона (БВ) – аутосомно-рецессивное нарушение метаболизма меди, вызываемое мутациями в гене *АТР7В*, кодирующим медь-транспортную АТФазу. Изучение БВ и поиск мишеней для ее терапии в настоящее время осуществляют преимущественно на моделях млекопитающих. Однако исследования на генетически более простой нематоде *C. elegans* могут способствовать лучшему пониманию первичных механизмов развития БВ и более эффективному поиску целевых лекарств. В организме *C. elegans* консервативная ось ТСМ представлена соответствующими ортологами: *CHCA-1* – *CUC-1* – *CUA-1* – *F21D5.3*. В работе использовали штамм *C. elegans* дикого типа N2 и штамм, несущий замену H828Q в *CUA-1*, аналогичную замену H1069Q в *АТР7В* – наиболее распространенной мутации, приводящей к развитию БВ в европейской популяции. Полученные нами ранее результаты свидетельствуют о том, что нематоды штамма H828Q в присутствии избытка меди, демонстрируют фенотип БВ и могут служить моделью для ее изучения.

Цель данной работы – исследовать изменение уровней экспрессии генов ТСМ *C. elegans* обоих штаммов в онтогенезе. Синхронизированные популяции нематод культивировали в жидкой среде, собирали на различных стадиях развития (L1, L2, L3, L4, young adult), затем выделяли тотальную РНК фенол-хлороформным методом, синтезировали кДНК и измеряли уровни экспрессии генов интереса относительно референсных генов *rnp-3* и *cdc-42* методом ПЦР в реальном времени. Сравнительный анализ показал, отсутствие статистически значимых различий в изменении экспрессии генов ТСМ *C. elegans* в онтогенезе между штаммами. В то же время уровни экспрессии генов *chca-1*, *cua-1* и *F21D5.3* достоверно различаются в зависимости от стадии развития. Так, *chca-1* интенсивнее всего экспрессируется на стадии развития L2, экспрессии *cua-1* и *F21D5.3* растут по мере развития нематоды, однако пиковые активности генов достигаются на стадиях L4 и L3, соответственно. Уровень экспрессии *cuc-1* не меняется в течение всего цикла развития нематоды.

Высокий уровень экспрессии гена *chca-1*, кодирующего ортолог белка-транспортера меди *CTR1*, на стадии L2 может свидетельствовать об усиленном поступлении Cu в клетки *C. elegans* и наибольшей уязвимости нематоды мутантного штамма H828Q к токсичному воздействию свободных ионов Cu на данном этапе развития. Таким образом стадия развития L2 представляет особый интерес при исследовании потенциальных хелатирующих препаратов для терапии БВ.

Работа поддержана грантом РФФИ №20-74-10087.

АНАЛИЗ КОЛОКАЛИЗАЦИИ FXR1 С БЕЛКАМИ НЕЙРОНАЛЬНЫХ СТРЕСС-ГРАНУЛ В ДРОЖЖЕВОЙ СИСТЕМЕ

Юзман А.К.¹, Белашова Т.А.^{1,3}, Валина А.А.^{1,2}, Галкин А.П.^{1,2}

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

²Санкт-Петербургский филиал ИОГен РАН им. Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия

³Лаборатория биологии амилоидов, Санкт-Петербург, Россия

nastya.yuzman.00@gmail.ru

Стресс-гранулы (СГ) представляют собой рибонуклеопротеиновые (РНП) комплексы, состоящие из различных молекул РНК и РНК-связывающих белков. Одним из компонентов СГ является белок FXR1, который, как было показано нашей лабораторией ранее, функционирует в нейронах мозга млекопитающих в амилоидной форме. Стоит отметить, что FXR1 является негативным регулятором трансляции TNF α , который запускает каскад синтеза провоспалительных цитокинов, приводящих к гибели нейронов и, как следствие, запуску нейродегенеративного каскада. Помимо FXR1 коровыми компонентами СГ являются белки TIA-1, FMRP и FXR2. При различных патологиях в состав СГ могут включаться и другие белки. Например, при наследственной ранней форме болезни Альцгеймера в составе нейрональных СГ обнаруживается белок SFPQ. В то время как состав СГ изучен достаточно подробно, в исследованиях их динамики остаётся много вопросов. Было показано, что важную роль в сборке СГ играют не только молекулы РНК, с которыми РНК-связывающие белки взаимодействуют, но и водородные связи между аминокислотными остатками неупорядоченных доменов самих белков. Ранее мы показали, что FXR1 демонстрирует частичную колокализацию с FMRP в кортикальных нейронах мозга крысы *R. norvegicus* и в культуре клеток нейробластомы человека IMR-32 в условиях стресса. Однако проанализировать попарное взаимодействие белков стресс-гранул в культурах клеток млекопитающих невозможно. Поэтому, целью представленной работы стала оценка колокализации FXR1 с белками нейрональных стресс-гранул в дрожжевой модельной системе.

Для оценки колокализации дрожжевые клетки *Saccharomyces cerevisiae* были трансформированы плазмидами, содержащими гены белков интереса, «сшитыми» с репортерной последовательностью флуоресцирующего белка (CFP или YFP). Оценка колокализации химерных белков осуществлялась с использованием флуоресцентной микроскопии. В качестве негативного контроля оценивалась колокализация FXR1 с PrP – белком, не входящим в состав стресс-гранул, но способным к образованию амилоидных фибрилл.

В результате исследования, установлено, что частоты колокализации FXR1 с коровыми компонентами стресс-гранул TIA-1, FMRP и FXR2 составили 80%, 94% и 73% соответственно. Интересно отметить, что белки FXR1, FMRP и FXR2, но не TIA-1, демонстрируют высокую гомологию N-концевого домена. Ранее нами было показано, что именно эта последовательность отвечает за образование амилоидных фибрилл FXR1. Отсутствие статистически достоверной разницы между частотами колокализации коровых компонентов позволяет утверждать, что гомология доменов не влияет на взаимодействия белков в ходе их объединения в РНП-частицы. Частота колокализации FXR1 с факультативным компонентом стресс-гранул SFPQ составила 45%, что достоверно ниже частот взаимной локализации FXR1 с коровыми компонентами СГ. Частота колокализации FXR1 и PrP (негативный контроль) составила 20%. Полученные результаты свидетельствуют о том, что высокие частоты колокализации FXR1 с белками стресс-гранул не могут объясняться случайным связыванием агрегирующих белков.

Таким образом, мы предполагаем, что FXR1 может физически взаимодействовать с некоторыми коровыми компонентами нейрональных СГ.

Секция 2

КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

СОЗДАНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ГИБРИДНЫХ НАНОСИСТЕМ,
СОСТОЯЩИХ ИЗ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДОВ ЖЕЛЕЗА И ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО
СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА

Абдуллина М.И.¹, Горобец М.Г.¹, Майорова О.А.², Бычкова А.В.¹

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук,
Москва, Россия

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

triyozhika@gmail.com

Магнитные наночастицы (МНЧ) имеют потенциал для применения в биологии и медицине ввиду их особых физико-химических свойств. Например, обладая пероксидазоподобной активностью, МНЧ способны участвовать в генерации активных форм кислорода (АФК) в реакции, подобной реакции Фентона. Белковые покрытия на поверхности МНЧ позволяют увеличить биосовместимость и избежать опсонизации МНЧ, а также облегчить дальнейшую модификацию функциональными компонентами для их применения в тераностике. Гибридные наносистемы, состоящие из наночастиц оксидов железа и человеческого сывороточного альбумина (ЧСА), в дальнейшем могут быть применены, например, для адресной доставки лекарств.

Устойчивость покрытий из ЧСА на поверхности МНЧ зависит от различных факторов. Так, было доказано, что большей стабильностью обладают покрытия, полученные при рН 6,0 по сравнению с рН 6,6 и 7,5; повышение ионной силы при добавлении 0,15 и 0,30 М хлорида натрия также снижало стабильность покрытий из альбумина. Для оценки устойчивости и целостности покрытий применялся иммуноглобулин G (IgG), который связывается с поверхностью МНЧ с образованием агрегатов микронных размеров, причем человеческий сывороточный альбумин может препятствовать образованию таких агрегатов в случае формирования им устойчивого и целостного покрытия на поверхности МНЧ. Также было изучено влияние предварительного воздействия УФ на МНЧ и/или добавления пероксида водорода на параметры устойчивости покрытий из ЧСА.

Орто-фенилендиамин (о-ФДА) использовался для оценки пероксидазоподобной активности МНЧ в присутствии пероксида водорода: было изучено влияние воздействия УФ на свойства МНЧ; концентрации добавленного ЧСА и времени инкубации систем (МНЧ + ЧСА).

Проводилась количественная оценка адсорбции ЧСА, конъюгированного с цианиновым красителем Cy5, на поверхность МНЧ. После магнитной сепарации систем (МНЧ + ЧСА-Cyanine5) надосадочные жидкости оценивались методами Бредфорда, спектрофотометрии, спектрофлуориметрии и сравнивались с контрольными растворами. Таким образом была получена зависимость концентрации связавшегося с МНЧ ЧСА-Cyanine5 от концентрации добавленного. Также было выявлено, что предварительно созданные альбуминовые покрытия снижали адсорбцию ЧСА-Cyanine5 на МНЧ.

Работы по созданию гибридных наносистем проводятся при финансовой поддержке Российского научного фонда № 22-75-10150, <https://rscf.ru/project/22-75-10150/>.

ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ АДАПТАЦИЯ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПРИ ИНГИБИРОВАНИИ КИНАЗЫ mTOR

Александрова К.В., Суворова И.И.

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

aleksandrova_k_v@mail.ru

В настоящее время ингибиторы киназы mTOR (mammalian target of rapamycin) первого поколения – рапамицин и его производные, подавляющие активность комплекса mTORC1, – одобрены для лечения ряда онкологических заболеваний; в то же время их применение вызывает реактивацию сигнального пути mTOR по механизму обратной связи. По этой причине всё больше внимания уделяется двойным ингибиторам комплексов mTORC1/2, в частности, вистузертину, находящемуся на второй стадии клинических испытаний. Однако, как показали последние научные данные, полная инактивация киназы mTOR вводит опухолевые клетки различного генеза в дормантное состояние – состояние обратимой остановки пролиферации, в условиях которой раковые клетки претерпевают фенотипические изменения. При этом используемые дозы ингибитора mTOR, превышающие значение IC₅₀ более чем в 10000 раз, не приводят к полной элиминации опухолевых клеток. В данной работе мы характеризуем латентное состояние раковых клеток, вызванное ингибированием киназы mTOR.

Обработка раковых клеток линии A549 (аденокарцинома лёгкого) дуальным ингибитором mTOR AZD8055 в концентрациях от 0,5 мкМ до 10 мкМ в течение 7 и 21 дней индуцировала в клетках состояние пролиферативного блока, отличающееся от канонического ареста клеточного цикла отсутствием активации пути Rb и накоплением p21. Сохранившие жизнеспособность опухолевые клетки уменьшались в размерах и характеризовались аккумуляцией лизосом и усилением аутофагии (выявление маркеров LAMP2 и LC3I/II соответственно). Электронная микроскопия выявила в клетках A549, обработанных AZD8055, многочисленные вакуолизированные структуры с внутренним содержимым, что указывает на сдвиг метаболизма в сторону катаболических реакций. На фоне детектированной активности лизосом, поддерживаемой в клетках на высоком уровне в течение 21 дня обработки агентом, ингибитор AZD8055 приводил к образованию субпопуляции раковых клеток A549, характеризующейся увеличенной митохондриальной массой. Аналогичные результаты были получены на клеточной линии T98G (глиобластома) при действии AZD8055. По всей видимости, тотальное ингибирование mTOR в раковых клетках приводит к глобальным внутриклеточным перестройкам и приобретению клеткой принципиально нового фенотипа.

Работа поддержана грантом РФФИ № 23-25-10017 и грантом Санкт-Петербургского научного фонда № 23-25-10017.

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ЭФАПТИЧЕСКОЙ СВЯЗИ КАРДИОМИОЦИТОВ В ФОРМИРОВАНИИ ОДНОНАПРАВЛЕННОГО БЛОКА ПРОВЕДЕНИЯ

**Бакуменко С.С.¹, Романова С.А.^{1,2}, Аитова А.А.¹, Наумов В.Д.¹, Семидетнов И.С.¹,
Бережной А.К.^{1,2}, Слотвицкий М.М.^{1,2}, Цвеляя В.А.^{1,2}, Агладзе К.И.^{1,2}**

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

²Московский областной научно-исследовательский клинический институт
им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия

bakumenko.ss@phystech.edu

Сердечная ткань существенно неоднородна по своей структуре, что существенно влияет на устойчивость проведения волны возбуждения. Важнейшим следствием гетерогенности сердечной ткани является возможное развитие функциональных блоков с последующим формированием спиральных волн-реентри. В большинстве случаев гомогенная модель сердечной ткани достаточна для исследования динамики и взаимодействия спиральных волн [1], поскольку характерный размер ядра реентри значительно превышает характерный размер межклеточных неоднородностей в сердечной ткани, которые могут быть представлены в виде межклеточных связей с различной проводимостью (щелевые контакты, GJ, и регионы с эфаптической связью, ЕрС). Однако механизм формирования первичных спиральных волн в сердечной ткани до сих пор не изучен [2] и может не иметь полного объяснения в гомогенной модели. Влияние межклеточных неоднородностей на формирование первичных реентри может быть значительно более значимым, чем влияние на динамику спиральных волн: критический радиус кривизны волнового фронта имеет размеры, сопоставимые с размерами межклеточных неоднородностей [3] и, следовательно, такие неоднородности могут влиять на формирование однонаправленного блока, необходимого для возникновения реентри.

Целью данной работы является создание гетерогенной модели сердечной ткани для исследования влияния межклеточных неоднородностей на условия формирования первичных волн-реентри. В компьютерной модели распределение участков с различной проводимостью (GJ, ЕрС, непроводящие участки) было достигнуто при помощи клеточной модели Поттса, распределяющей неоднородности соответственно минимуму Гамильтониана системы [4]. При помощи *in silico* экспериментов в данной модели был предложен механизм повышенной аритмогенности, связанный с подавлением эфаптической межклеточной связи (ЕрС). Реализация такой гипотезы через изменение свойств мембраны кардиомиоцитов может объяснить повышение аритмогенности без влияния на работу ионных каналов [5]. Для проверки данного механизма была разработана экспериментальная система, включающая в себя протокол выделения человеческих сердечных клеток из биоптата предсердий (ушко предсердия), их дальнейшую культивацию и исследование свойств мембраны при совмещении флуоресцентной и атомно-силовой микроскопии (методом *force-modulation*) после добавления исследуемых веществ. Было подтверждено изменение свойств мембраны для двух препаратов (противораковой препарат циклофосфамид и фотосенсибилизатор Азо-Таб), коррелирующее с повышенной вероятностью возникновения волн-реентри, обнаруженной в экспериментах по оптическому картированию волны возбуждения. Исследование данного механизма позволит повысить эффективность доклинического тестирования лекарственных средств на кардиотоксичность, а также найти способы минимизации побочных эффектов, связанных с подавлением эфаптической межклеточной связи.

Литература

1. *Ten Tusscher K. H. W. J., Panfilov A. V.* Alternans and spiral breakup in a human ventricular tissue model //American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. – 2006. – Т. 291. – №. 3. – С. H1088-H1100.
2. *Majumder R., Pandit R., Panfilov A. V.* Turbulent electrical activity at sharp-edged inexcitable obstacles in a model for human cardiac tissue //American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. – 2014. – Т. 307. – №. 7. – С. H1024-H1035.
3. *Kadota S. et al.* Curvature-dependent excitation propagation in cultured cardiac tissue //JETP letters. – 2012. – Т. 94. – С. 824-830.
4. *Kalinin A. et al.* Modeling the functional heterogeneity and conditions for the occurrence of microreentry in procedurally created atrial fibrous tissue //Journal of Applied Physics. – 2023. – Т. 134. – №. 5.
5. *Podgurskaya A. D. et al.* Cyclophosphamide arrhythmogenicity testing using human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes //Scientific Reports. – 2021. – Т. 11. – №. 1. – С. 2336.

РАЗРАБОТКА ЦВЕТНОЙ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГРИППА ТИПА А, В

Беднягина О.О.^{1,2}, Моисеева А.А.¹, Семейкина А.А.¹

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

²Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы, Москва, Россия

o.o.bednyagina@gmail.com

Грипп – это острая вирусная респираторная инфекция, которая поражает людей всех возрастных групп. Ежегодно гриппом заболевает почти 10% населения мира и умирает около полумиллиона человек. Вирус гриппа включает в себя четыре типа: А, В, С и D. Вирусы гриппа типов А и В могут вызывать серьезные эпидемии и пандемии, в то время как вирус типа С более стабилен генетически и вызывает легкие формы заболевания. Вирус типа D относится только к животным и не поражает людей. Поскольку вирусы гриппа обладают высокой контагиозностью, необходимо иметь быстрый и легкий способ их обнаружения.

Целью исследования является создание иммунохроматографического теста для определения вирусов гриппа типа А и гриппа типа В, которые имеют схожие симптомы. Определяемым антигеном является нуклеопротеин вируса. В качестве биореагентов использованы моноклональные антитела к каждому вирусу гриппа фирмы «HyTest» (Россия).

В качестве детектируемого маркера использовались цветные латексные частицы с карбоксильными группами. Активация функциональных групп карбодиимидно-сукцинимидным методом обеспечивает устойчивую связь между латексными частицами и антителами путем образования ковалентных связей, что обеспечивает стабильность конъюгата. Для ресуспендирования подобран Трис-буфер с добавками (бычий сывороточный альбумин, азид натрия).

Процесс разработки и оптимизации иммунохроматографической тест-системы включает в себя подбор состава мультимембранного композита, в том числе определение состава применяемых реагентов.

В ходе проведения сравнительной характеристики рабочих мембран, была выбрана мембрана фирмы «Sartorius» (Германия) CN180, поскольку она характеризуется хорошей совместимостью с биореагентами и обеспечивает низкий предел обнаружения за счет более мелких пор. Также подобрана концентрация антител в тестовой зоне для достижения высокой чувствительности.

В процессе разработки иммунохроматографической тест-системы были проверены мембраны под образец и конъюгат фирм «Ahlstrom» (Финляндия), «MDI» (Индия) и KinBio (Китай). Мембрана фирмы KinBio RB45 подходит и для образца, и для нанесения конъюгата антитело-маркер, так как обеспечивает наилучшее сепарирование матрикса и дальнейшее вымывание нанесенных биореагентов.

В качестве основы рабочего буфера выбран 50 мМ Трис с рН 8.0, который содержит 0,5 % Tween-20 и 100 мМ NaCl, что дает наилучший результат для обнаружения вирусов. Выбраны специфические реагенты в буфере для рабочей зоны и конъюгата, которые обеспечивают стабильность системы, что было подтверждено методом ускоренного старения. Готовая тест-система может храниться в течение двух лет при температуре в диапазоне от 2 до 30°C.

Предел обнаружения разработанной тест-системы составляет 12 нг/мл для вирусов гриппа типа А и В. Благодаря быстрому времени анализа (10 минут), одновременному определению разных штаммов вируса и разноцветной интерпретации результатов анализа, данная система является эффективным инструментом для диагностики.

АССОЦИИРОВАННЫЕ С АТЕРОСКЛЕРОЗОМ МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ МУТАЦИИ ВЫЗЫВАЮТ ДЕФЕКТНОСТЬ МИТОФАГИИ В МОНОЦИТОПОДОБНЫХ КЛЕТКАХ-ЦИБРИДАХ

Борисов Е.Е., Хотина В.А., Косырева А.М.

«Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика
А.П. Авцына» Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

borisovevgenij5@gmail.com

Митофагия – частный случай аутофагии, направленный на удаление поврежденных митохондрий. Нарушение этого процесса может привести к развитию окислительного стресса и стать причиной развития ряда патологий, в том числе атеросклероза. Мы предполагаем, что определенные митохондриальные мутации могут вызвать нарушения процессов митофагии. Вклад митохондриального генома в клеточные процессы часто изучается на цибридах – клеточных линиях с одинаковым ядерным геномом и с различиями в геноме митохондрий. Здесь мы изучаем активность митофагии в ответ на ее модуляцию митохондриальным разобщителем FCCP в 2 линиях цибрид ТС-520 и ТС-522, выявив так называемый дефект митофагии в клетках линии ТС-520.

Уровень митофагии оценивали 2 независимыми методами: прямым наблюдением с помощью конфокального микроскопа и методом ПЦР-РВ. Митохондрии и лизосомы живых клеток окрашивали специфическими молекулярными зондами MitoTracker и LysoTracker для наблюдения их колокализации на конфокальном микроскопе. Мы зафиксировали повышение митофагии в линии ТС-522 и отсутствие ее роста в линии ТС-520. Одновременно мы выявили рост экспрессии генов-маркеров, ассоциированных с митофагией (PINK1, parkin, BNIP, NIX, BECN1, CTSD, LAMP-1, LAMP-2, MAP1LC3B), в линии ТС-522 при инкубации с FCCP и небольшое снижение их экспрессии в линии ТС-520. Также мы изучили накопление холестерина рассматриваемыми клетками после их инкубации с липопротеинами низкой плотности, заранее проверенных на способность накапливаться в клетках, в течение 24 часов, применив энзиматический калориметрический тест. Одновременно мы сравнили клетки по их мембранному потенциалу митохондрий, содержанию активных форм кислорода в цитозоле и окисленных форм кардиолипина в мембране митохондрий, используя проточный цитометр CytoFLEX и красители LumiTracker, H2DCFDA и MitoCLOx.

Полученные нами результаты говорят о присутствии дефекта митохондрий в линии ТС-520 в виде отсутствия реакции на стимуляцию митофагии повреждением митохондрий разобщителем дыхания FCCP. Также нами было обнаружено, что клетки с дефектом митофагии не накапливают в себе холестерин из липопротеинов низкой плотности, при этом они отличаются от клеток с нормальной митофагией повышенным уровнем базовой митофагии, уменьшенным мембранным потенциалом митохондрий и повышенным содержанием активных форм кислорода в цитозоле. Разницы в накоплении холестерина между линиями зафиксировано не было.

Мы предполагаем, что дефект митофагии может играть особую роль в патогенезе атеросклероза, препятствуя нормальному очищению клеток и тканей от мутантных митохондрий, потенциально являющихся очагом воспаления.

Работа поддержана грантом РФФИ № 23-25-00237

Источники литературы

1. Volobueva A, Grechko A, et al. Changes in Mitochondrial Genome Associated with Predisposition to Atherosclerosis and Related Disease. *Biomolecules*. 2019 Aug 18;9(8):377.
2. Sazonova MA, Sinyov VV, Ryzhkova AI, et al. Creation of Cybrid Cultures Containing mtDNA Mutations m.12315G>A and m.1555G>A, Associated with Atherosclerosis. *Biomolecules*. 2019 Sep 18;9(9):499.

ТРАНСКРИПЦИОННОЕ ПЕРЕПРОГРАММИРОВАНИЕ ЕСТЕСТВЕННЫХ КИЛЛЕРОВ В МОДЕЛИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ

Вершинина С.О.¹, Штиль А.А.²

¹ФГАОУ «Национальный исследовательский университет ИТМО», Санкт-Петербург, Россия

²ФГБУ НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, Москва, Россия

sovershinina@itmo.ru

Ключевые слова: естественные клетки-киллеры, циклинзависимые киназы

Введение: Гиперактивация иммунной системы приводит к серьезным осложнениям многих заболеваний. Поиск подходов к регуляции активности иммунокомпетентных клеток – важная задача биомедицины. Естественные клетки-киллеры (НК) – компонент системы врожденного иммунитета. Эти клетки вызывают гибель опухолевых и инфицированных клеток-мишеней посредством продукции многочисленных цитокинов. Рецепторы NKp30 и NKp44 являются активирующими и играют взаимодополняющие роли во врожденном иммунитете как основные детерминанты цитотоксичности НК-клеток, в то время как рецептор KIR2DL4 – ингибирующий (играет важную роль в воспалительном микроокружении рака молочной железы). Мы предложили роль циклинзависимых киназ CDK8/19, опосредующих перепрограммирование транскрипции генов в ответ на внешние воздействия, в регуляции генов, кодирующих рецепторы НК-клеток.

Цель — изучить роль транскрипционного перепрограммирования в экспрессии генов цитокинов и рецепторов НК-клеток.

Материалы и методы: культивирование клеток линии NK-92 в присутствии IL-2, необходимого для пролиферации и дифференцировки клеток, а также анализ мРНК генов рецепторов CD56, NKp30, NKp44, KIR2DL4 и цитокинов TGF- β , TNF- α , IFN- γ , IL-10 с использованием ПЦР в реальном времени. Для анализа данных использовали пакет статистических программ GraphPad.

Результаты. Цитокины IL-10, IL-15, IL-18, TGF β , TNF α индуцируют экспрессию поверхностных рецепторов НК-клеток. Фармакологический ингибитор CDK8/19 оказывает разнонаправленное воздействие на экспрессию отдельных генов. Ингибирование CDK8/19 в модели воспалительного микроокружения чаще приводит к снижению экспрессии генов про-(IL-10, TGF β) и противовоспалительных цитокинов (IL-15, IL-18, TNF α , IFN γ) в НК-клетках. Эффективность ингибитора CDK8/19 варьирует при действии различных цитокинов, что позволяет предположить различия в уровне экспрессии и/или роли CDK8/19 в реализации иммунного ответа. Предположительно, такой подход к регуляции воспаления будет избирательно влиять на экспрессию про- и противовоспалительных цитокинов в НК-клетках в зависимости от их дифференцировки.

Заключение: Транскрипционные киназы CDK8/19 регулируют экспрессию генов цитокинов и рецепторов в НК-клетках, главным образом, ограничивая воспалительные ответы. Требуется углубленное изучение ингибиторов CDK8/19 для модулирования цитотоксичности НК-клеток в опухолевом микроокружении.

ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ И РАДИОСЕНСИБИЛИЗИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА НОВОГО ТИПА ФТОР-СОДЕРЖАЩИХ НАНОЧАСТИЦ *IN VITRO*

Винник Д.А.^{1,2}, Попов А.Л.¹, Иванов В.К.³

¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушино, Россия

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

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

dashavin.nik@yandex.ru

В настоящее время одним из основных способов лечения различных видов рака является радиотерапия. Лечение в виде ионизирующего излучения совместно с другими формами лечения, так и без них получают до 40% больных. Для повышения эффективности лучевой терапии могут быть использованы радиосенсибилизаторы, в том числе на основе золота, гадолиния, церия и оксидов тяжелых металлов. Радиосенсибилизаторы повышают эффективность действия и снижают лучевую нагрузку на здоровые клетки. Одним из подходов в создании перспективных сенсибилизаторов является использование веществ, обладающих радиолуминесценцией. Облучение фторсодержащих соединений рентгеновскими лучами может индуцировать радиолуминесценцию, что приводит к генерации электронов, которые запускают процессы повреждения клеточных структур, такие как двунитевые разрывы, апоптоз. Хорошим кандидатом на такое соединение могут быть наночастицы фторида лютеция (LuF_3), которые обладают выраженной радиолуминесценцией (1–3)

Мы разработали схему синтеза нового класса наночастиц LuF_3 , которые могут быть использованы в качестве радиосенсибилизатора. Значение ζ -потенциала наночастиц LuF_3 составляет -16 ± 1 мВ в воде MQ, а гидродинамический диаметр равен 193 нм.

Влияние наночастиц (в концентрациях 10 μM до 300 μM) при соинкубации с несколькими клеточными культурами: меланомы мыши (B16/F10), аденокарциномы человека (MCF-7) и карциномы 4T1, оценивалось для выявления избирательной цитотоксичности. Комплексный анализ состоял из МТТ-теста, теста жизнеспособности (Live/Dead), а также окраски потенциал-чувствительным красителем тетраметилпродамином (TMRE-тест) через 24 и 72 ч после совместного сокультивирования клеток с композитом. Результаты теста жив/мертв не выявили концентрационно-зависимого соотношения между долей мертвых клеток от их общего числа и концентрацией наночастиц фторида лютеция, а наибольшая смертность среди всех исследуемых групп не превысила 25%. Однако по результатам МТТ-теста и оценки митохондриального мембранного потенциала (окраска TMRE) выявили, что наличие композита во всех исследуемых концентрациях за все время сокультивирования с повышением концентрации композита снижается активность НАДФ-зависимых оксидоредуктаз и падает интенсивность свечения клеток, что свидетельствует о снижении значений мембранного митохондриального потенциала (ММП).

Анализ радиосенсибилизирующих свойств наночастиц анализировали при облучении рентгеновскими лучами. Анализ клоногенной активности клеток выявил концентрационную и дозовую зависимости ингибирования: при концентрации наночастиц LuF_3 250 μM и дозе 2 Гр и 4 Гр число колоний уменьшилось на 50% и 80% соответственно, по отношению к контролю. Таким образом клетки меланомы линии B16F10, предобработанные наночастицами LuF_3 , после воздействия рентгеновских лучей, формируют меньше колоний по сравнению с клетками без наночастиц, что свидетельствует о выраженном радиосенсибилизирующем действии синтезированного нанокompозита.

Наше исследование продемонстрировало, что наночастицы LuF_3 являются перспективным материалом для повышения эффективности радиотерапии. В дальнейшем нами планируется проводить облучение клеточных сфероидов, а при успешном проведении опытов переходить к экспериментам на мышах.

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

Список источников

1. Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs – PubMed [Интернет]. [цитируется по 18 март 2024 г.]. Доступно на: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21430696/>
2. Kong B, Seog JH, Graham LM, Lee SB. Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles. *Nanomed.* июль 2011 г.;6(5):929–41.
3. Nikzamid M, Akbarzadeh A, Panahi Y. An overview on nanoparticles used in biomedicine and their cytotoxicity. *J Drug Deliv Sci Technol.* 1 февраль 2021г.;61:102316.

ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТНЫХ СИСТЕМ ПРИ ОТВЕТЕ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА НА ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС

Витковская Е.В.¹, Иванова Ю.С.², Пуговкина Н.А.², Люблинская О.Г.².

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

²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

rinettaj@gmail.com

Поддержание окислительно-восстановительного баланса необходимо для обеспечения нормальной жизнедеятельности клетки. Антиоксидантные системы играют важную роль как при ответе клеток на окислительный стресс, так и в регуляции редокс-зависимых сигнальных процессов. Среди этих систем ключевыми являются тиоредоксин (TRX)- и глутатион (GSH)-зависимая ферментативные системы. Согласно литературным данным, опухолевые клетки обладают усиленной антиоксидантной защитой в сравнении с нормальными клетками. Данное предположение обусловлено обнаружением увеличенного уровня экспрессии генов ключевых членов этих систем, а также высокой активностью антиоксидантных ферментов, определенной на основе анализа клеточных лизатов. Однако, описанные выше методы не дают возможности оценить активность и проследить функциональную роль различных антиоксидантных систем в живых клетках. Недостаток фундаментальных знаний о работе данных систем затрудняет исследования по изучению их в качестве потенциальной мишени для противоопухолевой терапии.

Перекись водорода, как наиболее стабильную и долгоживущую молекулу, можно выделить среди наиболее значимых внутриклеточных окислителей. Недавно разработанная в нашей лаборатории проточно-цитометрическая методика, дает возможность использовать биосенсор перекиси водорода *HyPer* для анализа функционирования антиоксидантных систем в клетке прижизненно. В данной работе, с помощью измерения динамики окисления белка *HyPer* была проведена количественная оценка активности антиоксидантной защиты клеток опухолевого фенотипа при ответе на H_2O_2 -индуцированный окислительный стресс различной интенсивности. В качестве клеточной модели была использована линия клеток хронической миелогенной лейкемии K-562, а в качестве меры антиоксидантной активности клеток – вычисляемая константа окисления биосенсора.

В первую очередь, мы показали, что при увеличении окислительной нагрузки пероксидазная активность в клетках линии K-562 снижается. Далее, используя ингибиторы ауранофин и бутионинсульфоксимин, мы изучили вклад TRX- и GSH-зависимой антиоксидантных систем, соответственно, в обеспечение элиминации внутриклеточной перекиси водорода. Было обнаружено, что TRX-система выполняет свою детоксифицирующую функцию только при низких окислительных нагрузках, сопоставимых с физиологическими концентрациями, измеряемыми в плазме крови. В то же время, активность GSH-системы сильно не зависит от интенсивности окислительного стресса, что может свидетельствовать в пользу обеспечения ею буферной антиоксидантной функции. Таким образом, данное исследование позволило провести комплексный анализ пероксидазной активности систем антиоксидантной защиты опухолевых клеток человека.

Работа поддержана грантом РФФИ №21-74-20178.

ВЛИЯНИЕ ПРОТИВОГРИБКОВЫХ АНТИБИОТИКОВ ЭХИНОКАНДИНОВОГО РЯДА НА ПРОНИЦАЕМОСТЬ МОДЕЛЬНЫХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН

Водопьянова Е.В., Малыхина А.И., Ефимова С.С., Остроумова О.С.

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

@ket08_02@mail.ru

Инвазивные грибковые инфекции являются серьезной проблемой в сфере здравоохранения. По данным ВОЗ, ежегодная смертность от этой группы заболеваний составляет около 1,5 миллионов человек, а заболеваемость близка к миллиарду случаев. На данный момент, выделяют пять основных групп антимикотических средств: полиены, триазолы, эхинокандины, аллиламины и флуцитозин. Эхинокандины (ЭК) подавляют рост грибковых клеток, нарушая работу β -(1,3)-D-глюкан-синтазы – фермента, ответственного за синтез основного компонента клеточной стенки грибов – β -глюкана. Тем не менее, механизмы развития резистентности к ЭК не всегда предполагают вовлеченность соответствующего фермента, а в последнее время также появляются сведения, позволяющие предположить способность ЭК взаимодействовать напрямую с клеточными мембранами.

Целью работы является исследование способности эхинокандин проявлять мембранную активность в отношении больших одноламеллярных липосом (LUV) разного липидного состава, имитирующих мембраны клеток животных и грибов.

Для достижения поставленной цели применяли метод кальцеинового релиза. LUV диаметром 100 нм, заполненные флуоресцирующим красителем кальцеином, формировали из различных липидных систем – 1-пальмитоил-2-олеил-sn-глицеро-3-фосфохолина (ПОФХ), ПОФХ с эргостерином (Эрг) или холестерин (Хол) в соотношении 2:1. Липосомы формировали последовательным применением методов замораживания-оттаивания и экструзии. Полученную после экструзии суспензию липосом подвергали гель-фильтрации, в качестве элюирующего буфера использовали 0.15 М раствор NaCl. Концентрация липосом в итоговой суспензии составила 0.3 мМ. Аликвоту суспензии липосом совместно с буфером (0.15 М NaCl) помещали в кювету спектрофлуориметра. Сначала проводили измерение интенсивности флуоресценции (ИФ) контрольного образца, а затем добавляли исследуемые ЭК – анидулафунгин (АФ), каспофунгин (КФ) или микафунгин (МФ), до концентрации в растворе, равной 50 мкМ, и измеряли изменение ИФ. Все измерения производили при длине волны возбуждения 490 нм и эмиссии 520 нм. Увеличение ИФ свидетельствовало о выходе из липосом кальцеина, то есть об увеличении проницаемости мембран под действием ЭК.

Было обнаружено, что АФ увеличивает проницаемость мембран. При этом наиболее активным АФ оказался в отношении нестериновых ПОФХ липосом – ИФ составляла около 90%, в отношении ПОФХ-Эрг мембран АФ проявлял чуть меньшую активность – ИФ около 80%, и был наименее активен в отношении ПОФХ-Хол бислоев – ИФ равна 50%. КФ, в свою очередь, оказался неактивен в отношении ПОФХ-Хол мембран, но в ПОФХ и ПОФХ-Эрг липосомах ИФ составляла 70 и 75 %, соответственно. МФ не проявлял мембранной активности ни в одном из случаев.

Полученные данные свидетельствуют о способности ЭК увеличивать проницаемость мембран. Этот эффект зависит как от липидного состава мембраны, так и от вида ЭК.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 22-74-10023.

АДАПТАЦИЯ ДОКСИЦИКЛИН-ИНДУЦИРОВАННОЙ *IN-VITRO* МОДЕЛИ ПЛЕВРОДЕЗА ДЛЯ ПАЦИЕНТОВ С ПЕРВИЧНЫМ СПОНТАННЫМ ПНЕВМОТОРАКСОМ

Гайфуллина Л.М.¹, Бакаленко Н.В.¹, Смирнова Д.С.¹, Атюков М.А.², Малашичева А.Б.¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

²Городская многопрофильная больница №2, Санкт-Петербург, Россия

gaifullina.ya@yandex.ru

В настоящее время одной из важных задач торакальной медицины является лечение и профилактика пациентов с первичным спонтанным пневмотораксом (ПСП). Это патологическое состояние, проявлением которого является нарушение целостности висцеральной плевры и, как следствие, поступление воздуха из легкого в плевральную полость. Для лечения и профилактики рецидивов данного заболевания используют плевродез – процедуру, направленную на создание сращений (спаек) между висцеральной и париетальной плеврой. Основные участники плевродеза – мезотелиальные клетки плевры и плевральные и легочные фибробласты. Мезотелий воспринимает внешний (химический или физический) сигнал и секретирует коктейль провоспалительных и профибротических факторов, под воздействием которых фибробласты активируются, подвергаются миофибробластной дифференцировке и образуют спайки. В некоторых случаях постоянные спайки не образуются, и становится возможен рецидив заболевания. В настоящий момент данные о причинах, приводящих к рецидиву ПСП, практически отсутствуют в литературе.

Для исследования факторов, препятствующих нормальному образованию спаек, т.е. нормальному фиброгенезу в процессе плевродеза необходима клеточная модель плевродеза. Данная работа посвящена адаптации модели, предложенной в работе Mierzejewski et al., 2022.

В данном исследовании мезотелиальные клетки выделяли из биоптата висцеральной плевры доноров с первичным спонтанным пневмотораксом, полученного в результате плевроэктомии. Первичная культура клеток была охарактеризована методами ПЦР и ИЦХ. Было показано, что они экспрессируют маркеры мезотелиальных клеток (мезотелин, цитокератины, *E-cad*) и мезенхимных клеток (виментин). Для индукции плевродеза к полученным первичным мезотелиальным клеткам добавляли склерозирующий агент доксициклин (2 мкг/мл). Далее инкубировали мезотелиальные клетки 4 ч и 24 ч в нормальных условиях, после чего меняли среду и инкубировали еще сутки. После чего среду с провоспалительными факторами от мезотелиальных клеток добавляли к легочным фибробластам, который далее инкубировали 24 ч. Анализ экспрессирующихся молекулярных маркеров проводили методом ПЦР. В мезотелиальных клетках мы наблюдали увеличение экспрессии *PAI-1*, *IL-8* и *TGFβ1* после 4 ч воздействия доксициклином, что соответствует начальному этапу плевродеза. Также зафиксировали скачок экспрессии маркеров матриксных металлопротеиназ (*MMP2*) и их ингибиторов (*TIMP2*), что свидетельствует о перестройке внеклеточного матрикса и начале фиброза. На легочных фибробластах наблюдали рост экспрессии гладкомышечного актина 2 (*ACTA2*) и коллагена, а также увеличение со временем маркеров эпителиально-мезенхимного перехода *SLUG* и *SNAIL*, что достоверно говорит о фибротическом процессе.

Таким образом, адаптированная *in vitro* модель плевродеза может быть использована далее для изучения первичного спонтанного пневмоторакса, в особенности его рецидивов. В частности, согласно полученным данным более целесообразно воздействовать на мезотелиальные клетки 24 ч.

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

СИНТЕЗ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ АЛЬБУМИНОВЫХ НАНОЧАСТИЦ

Галаева З.Р.^{1,2}, Храмцов П.В.^{1,2}

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

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

galaevazarina@psu.ru

По данным ГОСТ ISO/TS 27687—2014 «наночастица – нанообъект, линейные размеры которого по всем трем измерениям находятся в нанодиапазоне». Наночастицы могут служить в качестве контейнеров для различного рода молекул, например, для флуоресцентных красителей. Использование таких носителей в ряде случаев усиливает интенсивность флуоресценции, что позволяет снизить предел обнаружения в гомогенных флуоресцентных иммуноанализах по сравнению с отдельными красителями. Гомогенные иммуноанализы интересны тем, что они не требуют дополнительных стадий отмывок, как в иммуноферментном анализе (ИФА), при этом упрощение процедуры анализа не отменяет их высокую чувствительность. Мы синтезировали флуоресцентные наночастицы в разных условиях, оценили их размеры, полидисперсность и интенсивность флуоресценции.

Для синтеза наночастиц мы использовали метод десольватации, который заключался в добавлении к водному раствору белка спиртового раствора. В прозрачную стеклянную вialу добавляли водный раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА) и ставили на магнитную мешалку с постоянным перемешиванием. Контроль температуры обеспечивался за счет термопары. Затем, этиловый спирт, содержащий хлорид европия и лиганды, усиливающие его флуоресценцию, при помощи перистальтического насоса с постоянной скоростью по каплям добавляли к раствору белка. В это время катионы европия и лиганды образуют комплексы, благодаря чему интенсивность флуоресценции ионов европия увеличивается в десятки раз. Кроме того, при достижении определенной объемной доли спирта БСА выпадает в осадок, образуя наночастицы, состоящие из агрегированных молекул БСА и флуоресцентных комплексов. После помутнения раствора синтез останавливали. Далее непрореагировавшие компоненты реакционной смеси удаляли при помощи центрифугирования. Флуоресцентные комплексы европия были выбраны нами, поскольку они способны излучать свет в течение нескольких миллисекунд, что существенно дольше аутофлуоресценции биологических образцов. В связи с этим использование комплексов европия в качестве метки в иммунофлуоресцентных анализах позволяет устранить фоновый сигнал образца.

Основной задачей нашего исследования была оптимизация условий синтеза наночастиц. Мы последовательно меняли такие параметры, как: pH раствора БСА, концентрация хлорида европия и лигандов и скорость их добавления к раствору белка. В результате оптимальными параметрами синтеза стали: pH раствора БСА – 9, 10; концентрация Eu^{3+} – 2 мМ; скорость добавления спиртового раствора – 0,5 мл/мин. Эти условия помогли достичь наибольшей интенсивности флуоресценции.

Размеры наночастиц в различных условиях синтеза варьировались в диапазоне 120–350 нм, а их индекс полидисперсности 0,08–0,380. Было продемонстрировано, что наночастицы могут сохранять свои характеристики при хранении в воде при +4 °С без консервантов в течение 2х месяцев.

Полученные наноматериалы планируется применять в гомогенном флуоресцентном иммуноанализе.

Работа поддержана грантом РФФИ № 24-25-00266.

ОСТЕОКОНДУКТИВНЫЕ КОМПОЗИТНЫЕ СКАФФОЛДЫ НА ОСНОВЕ МАТРИЦЫ ИЗ ТЕРМОПЛАСТИЧНЫХ ПОЛИМЕРОВ, НАПОЛНЕННОЙ АМОРФНЫМ ФОСФАТОМ КАЛЬЦИЯ ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ

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

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

²Институт регенеративной медицины, Первый Московский государственный медицинский
университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

³Химический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Москва, Россия

golubchikovdo@my.msu.ru

В настоящее время одной из актуальных проблем современной регенеративной медицины остается создание материалов для костной пластики, которые после введения в костный дефект будут индуцировать рост тканей и с течением времени замещаться на нативную кость. В дополнение к биологическим свойствам, материал должен обладать механосовместимостью с окружающими тканями, чем обусловлен возрастающий интерес к композитным материалам. Перспективной полимерной матрицей для создания таких композитов являются термопластичные биополимеры, такие как поликапролактон, полилактид, и полигидроксibuтират, тем не менее, серьезным вызовом остается способ формирования трехмерных структур на их основе. В то время как традиционной методикой является термоэкструзия, она сильно ограничена XY-разрешением печати и приводит к получению более шероховатой поверхности. Решением данной проблемы может стать использование альтернативных способов формирования, таких как литье в растворимую форму под давлением или фотополимерная 3D печать, которые были использованы в данной работе. Кроме того, важным критерием выбора полимера является рН при растворении, поскольку широко исследуемый полилактид закисляет среду, что приводит к ацидозу.

В связи с этим, в рамках данной работы был использован поликапролактон, который не приводит к сильному падению рН (до 7.3-7.4). В качестве фосфатного наполнителя был использован аморфный фосфат кальция (АФК), который является естественным прекурсором гидроксиапатита в организме человека [1]. Для формирования пористой архитектуры скаффолдов, которая обеспечивает остеокондуктивность материала, были использованы описанные ранее методы трехмерной печати [2]. В дополнение к исследованиям свойств итоговых композитов, в рамках текущей работы была оптимизирована методика синтеза аморфного фосфата кальция, а также произведено исследование зависимости эффективности ингибирования кристаллизации АФК в гидроксиапатит от константы устойчивости комплекса CaX, где X – анионный ингибитор. Было определено, что полученные композиты имеют более гидрофильную поверхность в сравнении с ненаполненной полимерной матрицей. В дополнение к этому, гидрофильность поверхности композитов может быть улучшена при обработке в растворителях, таких как гидроксид натрия и лимонная кислота, а также при обработке в кислородной плазме. Для исследования биосовместимости полученных композитных материалов также было проведен тест на цитотоксичность.

Работа поддержана грантом РФФ №22-19-00219.

[1] Zuev, D.M., Golubchikov, D.O., Evdokimov, P.V. et al. Synthesis of Amorphous Calcium Phosphate Powders for Production of Bioceramics and Composites by 3D Printing. Russ. J. Inorg. Chem., 2022, 67, 940–951

[2] Golubchikov, D.; Evdokimov, P.; Zuev, D.; Filippov, Y.; Shatalova, T.; Putlayev, V. Three-Dimensional-Printed Molds from Water-Soluble Sulfate Ceramics for Biocomposite Formation through Low-Pressure Injection Molding. Materials 2023, 16, 3077.

КОМПЛЕКСНОЕ РЕШЕНИЕ АНТИГИПОКСИЧЕСКОЙ ЗАЩИТЫ КЛЕТОК ПОЧЕК В УСЛОВИЯХ ТЕПЛОЙ ИШЕМИИ: ИССЛЕДОВАНИЯ *IN VITRO*

Давыдова Е.Ю.¹, Галызёнкова А.Д.¹, Шестакова А.В.¹,
Беляков Д.Ю.², Закржевская В.Д.²

¹Детский технопарк «Кванториум» – структурное подразделение БУ ОО ДО «Дворец пионеров и школьников им. Ю.А. Гагарина», Орёл, Россия

²Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, Орел, Россия

E.Y.DAVYDOVA@yandex.ru

Одной из стратегий лечения рака почки, темпы роста распространения которого превышают многие другие злокачественные новообразования, выступает операция частичной нефрэктомии. В целях обеспечения гемостаза и визуального контраста между опухолью и здоровой тканью хирургами применяется технология тепловой ишемии, которая заключается в уменьшении кровенаполнения органа вследствие пережатия почечной артерии. Возникающая при этом гипоксия существенно ограничивает возможную продолжительность процедуры, что делает актуальной проводимое нами исследование по разработке системы фармакологической защиты почки на основе фумарат-содержащего препарата «Конфумин», сочетающей физиологически активные вещества с различными механизмами действия.

Для моделирования условий гипоксии *in vitro* нами использована культура клеток эпителия почек MDCK, которые в течение необходимого времени инкубировали с внесением 5 мМ восстанавливающего кислород дитионита натрия. В случае экспериментов с гипоксией-реперфузией после обработки дитионитом клетки выдерживали в насыщенной кислородом среде. В этих условиях наблюдаются комплексные нарушения митохондриального метаболизма, включающие снижение митохондриального мембранного потенциала, увлечение скорости продукции активных форм кислорода (АФК), снижение уровня восстановленного глутатиона (GSH), а также значительное падение уровня митофагии, что приводит к накоплению в клетках дефектных митохондрий. Применение фумарата натрия обеспечивает частичное восстановление работы комплекса I электронтранспортной цепи митохондрий, а также активацию гликолиза, что, однако, оказывается недостаточно для компенсации возникающего дефицита АТФ в клетках, а также снижения вероятности повреждений от АФК. Для этой цели может быть использован комплекс физиологически активных веществ в виде экзогенных антиоксидантов (нами были рассмотрены витамин Е, коэнзим Q10 и его менее липофильный аналог идебенон, а также рибофлавин), а также активаторов транскрипционного фактора Nrf2 (в экспериментах мы использовали диметилфумарат (DMF), а также омавелоксолон (RTA 408)).

Как следует из полученных данных, в модели гипоксии все экзогенные антиоксиданты привели к увеличению содержания в клетках GSH. Причем наиболее эффективным оказался коэнзим Q10, за ним следовал витамин B2, далее – идебенон и, наконец, витамин Е. Однако в случае гипоксии-реоксигенации все четыре соединения показали отрицательный эффект – уровень GSH был даже ниже, чем в контроле. Таким образом, экзогенные антиоксиданты могут быть элементами «первой линии обороны» клеток от окислительного стресса, но должны работать совместно с активацией собственных защитных механизмов клетки. Нами показано, что в условиях гипоксии RTA 408 приводит к некоторому улучшению, в то время как под влиянием DMF содержание GSH увеличено значительно. Однако особенно выраженный эффект оба активатора показали в самом жёстком случае – при гипоксии и последующей реоксигенации: RTA408 и DMF позволили увеличить уровень GSH до близких к контрольным значений.

Совокупность полученных данных позволяет предположить, что сочетание активирующего гликолиз фумарата натрия с комплексной антиоксидантной защитой имеет значительную перспективу для нефропротекции при проведении процедуры тепловой ишемии во время операции резекции почки.

ЭКСПАНСИЯ КЕРАТИНОЦИТОВ ЛИНИИ НАСАТ С ПОМОЩЬЮ ЛИЗАТА ТРОМБОЦИТОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ РАНОЗАЖИВЛЯЮЩИХ МАТЕРИАЛОВ

Дёмина Е.С.^{1,3}, Игнатъева М.В.^{1,3}, Токтохоева Л.Н.^{1,3}, Долодоев А.С.^{1,2},
Цыбденова А.П.^{2,3}, Балханов Ю.С.^{2,3}, Нимаева А.А.³, Серых М.Ф.³,
Суворина М.Ю.^{4,5}, Сурин А.К.^{4,5}

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

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

³ООО «Шэнэскин», Улан-Удэ, Россия

⁴Институт белка РАН, Пушино, Россия

⁵Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
Пушино, Россия

yevgeniya.zamurayeva@mail.ru

В настоящем исследовании проведена оценка эффективности использования лизата тромбоцитов человека в качестве альтернативы рутинной ксеногенной сыворотки для экспансии кератиноцитов линии HaCaT. Цель работы заключалась в анализе морфофизиологических особенностей (жизнеспособность, миграция, криоконсервация) и пролиферативной активности клеток линии HaCaT в средах с добавлением 10% лизата тромбоцитов человека по сравнению со средой с 10% эмбриональной телячьей сыворотки.

Лизат тромбоцитов человека получали из лейкоредуцированного пулированного концентрата тромбоцитов с помощью криодеструкции при -20°C , поэтапной фильтрации и инкубации при 37°C и добавляли в бессывороточные среды с антибиотиками. Анализ масс-спектрометрических данных с использованием базы UniProt протеома тромбоцитов человека позволил идентифицировать 637 пептидов, которые относятся к 21 белковой группе, включая тромбоцитарные факторы роста (PDGF-AA, AB, BB), трансформирующий фактор роста (TGF α 1), сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), эпидермальный фактор роста (EGF).

Установлено, что при внесении 10% лизата тромбоцитов в среду культивирования морфофизиологические особенности клеток линии HaCaT (полигональные, без отростков, до 25 мкм, с центрально расположенным ядром, с высокой пролиферативной активностью, сильной адгезией, образованием монослоя) сохранялись. Мониторинг жизнеспособности, миграции и деления кератиноцитов линии HaCaT через 24, 96 и 168 часов в ходе теста нанесения «царапины» на монослой клеток и с использованием автоматического счётчика клеток выявил, что использование 10% лизата тромбоцитов в качестве добавки к культуральной среде не цитотоксично, способствует активации пролиферации, миграции кератиноцитов человека и аналогично со сроками достижения конfluence при культивировании с 10% эмбриональной телячьей сыворотки. После криохранения в лизате тромбоцитов с 10% диметилсульфоксида кератиноциты активно адгезируют, пролиферируют также как и при криоконсервации в эмбриональной телячьей сыворотке с добавлением идентичного криопротектора.

Показано, что применение кератиноцитов линии HaCaT для создания ранозаживляющих материалов, разработанных на основе комбинации коллагеновой матрицы и продуктов синтеза этих клеток, эффективно в отношении ожоговых, трофических, посттравматических ран. Нарращивание клеточной массы кератиноцитов за счёт активации аллогенными белками роста эпителия рассматривается перспективным и актуальным. Таким образом, лизат тромбоцитов рекомендуется как альтернатива ксеногенной (эмбриональной бычьей) сыворотки в протоколах экспансии клеток *in vitro*.

ЭРИТРОЦИТАРНАЯ ГЕМОЛИТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ОЦЕНКИ
АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ-
ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Дубенская Н.А.², Соколова Е.М.¹, Психа Б.Л.¹, Нешев Н.И.¹

¹ФИЦ проблем химической физики и медицинской химии РАН, Черноголовка, Россия

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

nina260bnina@yandex.ru

Поиск и исследование веществ, обладающих антиоксидантными свойствами, и последующая разработка на их основе фармакологических препаратов до настоящего времени продолжает оставаться одним из базовых направлений химической биологии и медицинской химии. Это обуславливает актуальность и практическую значимость разработки биологических моделей, на которых осуществляется тестирование новых соединений на антиоксидантную активность. Широкое распространение получило использование для этой цели модели индуцированного оксидативного гемолиза эритроцитов. В качестве индукторов гемолиза используют известные в химии полимеров азо- и пероксидные инициаторы радикальной полимеризации.

Была изучена кинетика оксидативного гемолиза 0,2%-ной суспензии эритроцитов мыши под действием 2,2'-азобис(2-амидинопропан) дигидрохлорида (AAPH), пероксида водорода (H₂O₂), *трет*-бутилгидропероксида (*t*-BuOOH), гидропероксида кумола (Cumyl-OOH). Гемолитическую активность инициаторов характеризовали длительностью периода индукции гемолиза.

В то же время кинетические закономерности гемолиза под действием исследуемых соединений существенно различались. В случае AAPH величина периода индукции гемолиза убывала обратно пропорционально квадратному корню от концентрации инициатора, что согласуется с классической теорией радикально-цепного окисления углеводов. В случае *t*-BuOOH период индукции гемолиза убывал медленнее, проявляя тенденцию к насыщению. Данная зависимость хорошо аппроксимировалась биэкспоненциальной функцией вида $y = A_1 e^{-k_1 C} + A_2 e^{-k_2 C} + y_0$, где k_1 и k_2 равны $2 \cdot 10^{-2}$ и $65 \cdot 10^{-2}$, соответственно. Это может указывать на возможное присутствие двух различных факторов, влияющих на исследуемую систему.

H₂O₂ и Cumyl-OOH вызывали гемолитические эффекты примерно в том же диапазоне концентраций, что и *t*-BuOOH, однако сквозную концентрационную зависимость в этом случае получить не удастся.

Полученные в данной работе результаты согласуются с представлением, что в случае с AAPH основной радикальной формой является образующийся при разложении AAPH в водной среде пероксидный радикал, который атакует мембрану клетки снаружи. В то же время под действием пероксидов оксидативные процессы вначале инициируются внутри клетки с участием гемоглобина, после чего первичные радикальные формы атакуют мембрану изнутри, что, в целом, делает систему более сложной. Делается вывод, что в эритроцитарной модели индуцированного оксидативного гемолиза эритроцитов в качестве инициатора ПОЛ предпочтительнее использовать азогенератор пероксидных радикалов – AAPH.

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного задания № АААА-А19-119071890015-6.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ КОЛЛАГЕНОВОГО ГИДРОГЕЛЯ НА РОСТ КЛЕТОК
АДЕНОКАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА И ЭКСПРЕССИЮ
ГЕНОВ-МАРКЕРОВ ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОГО ПЕРЕХОДА

Елагина Д.М., Сенча Л.М., Здобнова Т.А., Балалаева И.В.

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,
Нижний Новгород, Россия

d.ela01@mail.ru

Значительное влияние на поведение клеток нативной опухоли оказывает ее внеклеточное микроокружение. Взаимодействие опухолевых клеток с внеклеточным матриксом способно влиять на изменение их фенотипа в ходе эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), что впоследствии может приводить к терапевтической резистентности опухоли. В настоящее время актуальным методом исследования влияния микроокружения опухоли является культивирование клеток *in vitro* в трехмерных условиях. В качестве 3D-каркаса часто используется коллаген, так как это самый распространенный белок матрикса, способный обеспечивать приток кислорода и питательных веществ к клеткам.

Целью данной работы было исследование особенностей роста клеток рака молочной железы человека в коллагеновом гидрогеле в сравнении с другими опухолевыми клетками и монослоем, а также оценка экспрессии генов ряда белков, связанных с ЭМП. Работа выполнена на клетках трижды негативного рака молочной железы человека MDA-MB-231, в качестве сравнения использовали клетки эпидермоидной карциномы A431 и клетки карциномы яичника SKOV3. Для создания трехмерной модели роста опухолевых клеток был использован раствор коллагена I типа в 0,1% уксусной кислоте, полученный из сухожилий крыс. Клетки были заключены в коллагеновые гидрогели, обогащенные питательной средой, путем смешивания клеточной суспензии и ингредиентов геля. Готовые гидрогели с заключенными в них клетками инкубировали в течение 7 суток. Оценивали морфологию клеток в монослое и трехмерном гидрогеле, а также скорость роста культуры путем ферментативной деструкции гидрогеля и подсчета количества клеток. Для оценки эпителиально-мезенхимального статуса клеток был выполнен сравнительный анализ уровня экспрессии генов-маркеров ЭМП, а именно транскрипционных факторов SNAIL и SLUG, матричной металлопротеиназы MMP9, трансмембранного рецептора NOTCH1 и рецептора коллагена DDR1 с помощью метода ПЦР в реальном времени.

В ходе исследования показано, что при переходе от 2D к 3D культивированию клеток наблюдается изменение общей морфологии клеток и формирование вытянутых оформленных клеточных образований. Полученные ростовые параметры для линии MDA-MB-231 были сопоставлены с данными для клеток карциномы яичника SKOV3 и клеток эпидермоидной карциномы A431. Для всех линий показано, что при заключении клеток в гель из коллагена I типа происходит существенное замедление роста опухолевых клеток в сравнении с монослоем. Также в клетках, культивируемых в коллагеновом гидрогеле, было выявлено значительное увеличение уровня экспрессии генов SNAIL и DDR1 по сравнению с клетками в монослое, что можно рассматривать как признак активации ЭМП. Статистически значимых изменений экспрессии генов SLUG, MMP9, NOTCH1 обнаружено не было. Таким образом, контакт клеток с коллагеном I типа может приводить к изменению морфологии клеток и к замедлению их роста, а также вызывать изменение уровня экспрессии некоторых генов, ассоциированных с запуском эпителиально-мезенхимального перехода.

Работа выполнена в рамках проекта НЦМУ «Центр фотоники», при финансировании Министерством науки и высшего образования РФ (договор № 075-15-2022-293).

ЭКЗОСОМАЛЬНАЯ СЕКРЕЦИЯ АЛЬФА ИЗОФОРМЫ БЕЛКА ТЕПЛОВОГО ШОКА Hsp90

Жмурина М.А., Врублевская В.В., Петренко В.С., Скарга Ю.Ю., Моренков О.С.

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

mariya100694@gmail.com

В клетках функционируют две изоформы белка теплового шока Hsp90, Hsp90 α и Hsp90 β , участвующие в фолдинге многих внутриклеточных белков. Часть Hsp90 секретируется клетками во внеклеточное пространство, где Hsp90 α играет важную роль в обеспечении процессов миграции и инвазии опухолевых клеток. В этой связи, экстраклеточный Hsp90 α (eHsp90 α) является перспективной молекулярной мишенью для создания противоопухолевых препаратов антиметастатического действия. Считается, что Hsp90 α секретируется клетками с помощью экзосомального пути секреции. Экзосомы представляют собой небольшие (50-200 нм) внеклеточные микровезикулы, принимающие участие в межклеточной коммуникации путем транспортировки различных биомолекул, таких как белки, липиды и нуклеиновые кислоты. Экзосомы содержат Hsp90 α и стимулируют клеточную миграцию и инвазию. При этом стимулирующий эффект экзосом ингибируется антителами, что свидетельствует о локализации Hsp90 α снаружи экзосом, однако это противоречит представлениям о генезисе экзосом. Целью настоящей работы явилось изучение секреции Hsp90 α в клетках фибросаркомы человека HT1080 и оценка локализации Hsp90 α в экзосомах.

Для изучения секреции Hsp90 клетками мы разработали количественный иммуноферментный метод определения Hsp90 α на основе двух α -Hsp90 α специфичных моноклональных антител. Экзосомы выделяли методом ультрацентрифугирования из культуральной жидкости от клеток HT1080 и трех клонов HT1080 с нокаутом гена Hsp90 β , полученных в нашей лаборатории. Экзосомы имели размеры 168-200 нм, в них присутствовали маркеры экзосом – Hsp70 и HLA 1-го типа.

Установлено, что нокаут гена Hsp90 β приводил к повышению количества Hsp90 α в культуральной среде разных клонов в 10-100 раз относительно HT1080. При этом, доля Hsp90 α в экзосомальной фракции составляла не более 0,5-3% для всех исследованных культур. Содержание Hsp90 α в экзосомах, выделенных из культуральной среды Hsp90 β -негативных клонов было в 10-25 раз больше, в сравнении экзосомами, выделенными из культуральной среды исходной культуры. При обработке препаратов экзосом Тритоном X-100 Hsp90 α обнаруживался в растворе и не осаждался при ультрацентрифугировании, что свидетельствовало об ассоциации Hsp90 α с липид-содержащими везикулярными структурами. Около 80-90% Hsp90 α экзосомальной фракции были чувствительны к протеолизу с помощью трипсина и протеиназы К, что свидетельствовало об их локализации снаружи экзосом, в то время как 10-20% Hsp90 α были локализованы внутри везикулярной структуры и не подвергались протеолизу. Обработка экзосом Тритоном X-100 перед протеолизом приводило к полному разрушению Hsp90 α в экзосомах.

Полученные нами данные свидетельствуют, что посредством экзосом секретируется только незначительная часть от всего секретируемого Hsp90 α для культуры HT1080 и мутантных линий HT1080-Ко β , что не согласуется с общепринятыми представлениями о ключевой роли экзосом в секреции Hsp90 α клетками. В экзосомальной фракции Hsp90 α находится в основном снаружи везикул, в то время как согласно классическим представлениям о пути генезиса экзосом, Hsp90 α должен локализоваться внутри экзосом. Это дает основания предполагать наличие какого-то неизвестного везикулярного механизма секреции Hsp90 α . В клонах HT1080 с нокаутом гена Hsp90 β наблюдается увеличение количества Hsp90 α как в экзосомах, так и в неэкзосомальной фракции культуральной жидкости, что свидетельствует о важной роли Hsp90 β в секреции своего паралога, Hsp90 α .

ВЛИЯНИЕ ГИДРОГЕЛЯ ИЗ ВАРТОНОВА СТУДНЯ ПУПОВИНЫ ЧЕЛОВЕКА НА ИНДУКЦИЮ ХОНДРОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК

**Закопайко Б.А.^{1,2}, Товпеко Д.В.³, Александрова С.А.²,
Кондратенко А.А.³, Калюжная Л.И.³**

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

²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

³Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

bogdanzakopayko@gmail.com

Применение гидрогелевых форм внеклеточного матрикса является перспективным средством терапии травматических повреждений суставного хряща. Изготовление инъекционных форм таких препаратов из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека имеет особое преимущество благодаря составу и свойствам пуповины. Целью работы являлось исследование влияния гидрогеля из Вартонова студня на мезенхимные стромальные клетки (МСК) костного мозга и хондроциты человека.

В исследовании были использованы – клеточная линия МСК костного мозга человека (FetMSC) из «Коллекции культур клеток позвоночных» Центра коллективного пользования Института цитологии РАН, и культура хондроцитов взрослого человека, полученная авторами самостоятельно. Гидрогель из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека был изготовлен по запатентованной технологии (Патент РФ RU2745995C1).

Для определения влияния гидрогеля на степень компактизации клеточных сфероидов провели трехмерное культивирование МСК и хондроцитов человека в 96-луночных планшетах с неадгезивной поверхностью (Nunc clone sphere). Оценивали динамику степени округлости и площади сфероида следующим образом. Клеточные суспензии (100 тыс. клеток в 10 мкл) наносили в центр лунки и выдерживали в течение 2 ч для адгезии клеток, в результате чего формировались округлые сфероиды. После этого к сфероидам добавляли – полную ростовую среду (DMEM/F12 с ЭТС) или хондрогенную среду StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit (Gibco), а также образцы гидрогеля (8 и 9 мг/мл) в количестве 10% от общего объема. В качестве положительного контроля использовали хондрогенную среду, а в качестве отрицательного – полную ростовую среду. Культивирование сфероидов проводили в течение четырех недель в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °С. Фотофиксацию проводили раз в 7 дней с последующим анализом изображений в программе Image J 1.48.

Добавление образцов гидрогеля в хондрогенную среду не оказывало значительного влияния на динамику выбранных морфометрических показателей в сравнении с положительным контролем. Добавление образца гидрогеля в ростовую среду способствовало увеличению степени округлости сфероидов на 11 и 21 % у МСК и хондроцитов человека, соответственно, по сравнению с отрицательным контролем. Гидрогель так же способствовал формированию более плотных сфероидов на ранних этапах культивирования и снижал интенсивность потери сфероидными клеточных масс, что позволяет предположить косвенное влияние гидрогеля на индукцию клеток в хондрогенном направлении.

Гидрогель из пуповины человека создает благоприятные условия для формирования сфероидов и сохранения их жизнеспособности.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках государственного задания FMFU-2021-0008.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ СТРЕСС-АССОЦИИРОВАННЫХ БЕЛКОВ В КЛЕТОЧНЫХ КЛАСТЕРАХ РАНЕВОЙ ТКАНИ *ACOMYS CAHIRINUS*

Заливако А.С.¹, Козлова О.С.¹, Билялов А.И.^{1,2}

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

²Московский клинический научный центр им. А.С. Логинова, Москва, Россия

alisazalivako@gmail.com

Известно, что взрослые млекопитающие обладают крайне ограниченной способностью к регенерации, так, при заживлении ран утраченные клетки обычно заменяются фиброзной тканью. Но грызуны из рода *Acomys* проявляют необыкновенную способность к регенерации: потеряв ухо или кусок шкурки, *Acomys cahirinus* способен в течение месяцев восстановить травмированный орган в изначальном виде. Для подробного изучения процессов регенерации на первых этапах был выбран метод одиночеклеточного секвенирования.

В рамках данной работы проводится сравнение экспрессии стресс-ассоциированных белков в разных группах клеток между образцами поврежденной ткани ушной раковины *Acomys cahirinus* и мыши линии Balb/c – лабораторной мыши, которая, будучи наиболее близким к *A. cahirinus* модельным организмом, используется в качестве контроля. Сбор клеток осуществлялся в разные периоды после повреждения ушных раковин: сразу после, спустя шесть часов, два дня и неделю после нанесения травм.

В программе Cellranger count было произведено картирование прочтений на геном *A. cahirinus*. Фильтрация, удаление внешней РНК и клеток с аномальными профилями экспрессии осуществлялись с помощью пакетов SoupX версии 1.6.2 и DoubletFinder версии 2.0.4. Дальнейшая предобработка, включающая уменьшение размерности и кластеризацию, осуществлялись с помощью пакета Seurat версии 4.4.0.

Аннотация образцов осуществлялась вручную, по найденным в литературе маркерным генам, подобранным для каждой клеточной популяции.

Как показывают результаты анализа, наиболее интенсивная экспрессия генов стресс-ассоциированных белков происходит у *A. cahirinus* на шестом часу после нанесения травмы — это особенно выражено среди генов семейства металлотионеинов, экспрессия белков которых обычно сопряжена с препятствованием апоптозу и нейтрализацией активных форм кислорода. Повышенная экспрессия гена *Sod1*, сопутствующая перечисленным выше процессам, также была более интенсивной среди всех клеточных кластеров *A. cahirinus*.

Также некоторые гены белков теплового шока, такие как *HSPB1*, отличаются спецификой экспрессии в определенных клеточных кластерах у *A. cahirinus*, а именно — в клетках эндотелия и дифференцированных кератиноцитов. В идентичных клеточных кластерах мыши экспрессия этих генов сравнительно ниже в каждом из образцов, включая нативные.

Таким образом, сравнение экспрессии стресс-ассоциированных генов между образцами *A. cahirinus* и мыши линии Balb/c выявило уникальные паттерны экспрессии, сопутствующие ранним процессам регенерации у *A. cahirinus*. Повышенная экспрессия генов белков металлотионеинов и белков теплового шока может препятствовать апоптозу, способствовать уменьшению количества активных форм кислорода и, таким образом, повышать скорость и качество регенерации на первых этапах.

РОСТ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКА НЕЙРОПОДОБНЫХ КЛЕТОК НА
МАГНИТОАКТИВНЫХ ЭЛЕКТРОФОРМОВАННЫХ СКАФФОЛДАХ В
НИЗКОЧАСТОТНОМ МАГНИТНОМ ПОЛЕ

Зельцер А.И., Бонарцев А.П., Жаркова И.И.

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

angelinazeltser.y@student.msu.ru

Разработка электро- и магнитоактивных скаффолдов является перспективным направлением для инженерии нервной ткани и направленной регуляции роста и дифференцировки культивируемых на них нервных и нейроподобных клеток. Применение нановолокнистых электроформованных скаффолдов на основе композитов поли-3-оксибутирата (ПОБ) с магнитными наноматериалами – наночастицами магнетита Fe_3O_4 (ПОБ/МНЧ) и их комплекса с оксидом графена (ПОБ/МНЧ/ГО) позволяет использовать уникальное свойство таких скаффолдов, электромеханическое сопряжение, для стимуляции клеток, при сохранении высокой биосовместимости полимерного биоматериала.

Клетки нейробластомы человека SH-SY5Y культивировали в ростовой среде (РС) DMEM/F12 (1:1), 15% инактивированной телячьей сыворотки (инТС) и 1% стрептомицина/пенициллина при 37°C и 5% CO_2 во влажной атмосфере. Для индукции нейрональной дифференцировки в течение 12 суток РС заменяли средой для стимуляции нейрогенной дифференцировки (НС) с добавлением 10 мкМ ретиноевой кислоты (РК) и градуальным снижением концентрации инТС. Клетки засевали на скаффолды ПОБ, ПОБ/МНЧ и ПОБ/МНЧ/ГО и инкубировали в условиях низкочастотного переменного магнитного поля (МП) с индукцией 68 мТ и частотой 0,67 Гц и в стандартных условиях (без МП). Рост дифференцированных и нативных клеток оценивали на 2, 5, 8 и 12 сутки с помощью биохимического теста AlamarBlue ($E_x/E_m = 540/580$ нм) на микропланшетном ридере Hidex Plate Chameleon. Статистический анализ проводили в GraphPad Prism 9 с использованием ANOVA и поправки Бонферрони для множественных сравнений. Результаты выражены в виде среднего значения \pm SEM.

Согласно полученным данным, без МП наблюдался рост клеток SH-SY5Y при культивировании на скаффолдах ПОБ/МНЧ и ПОБ/МНЧ/ГО. Переменное магнитное поле подавляло рост SH-SY5Y на всех типах скаффолдов. В сравнении с ПОБ и ПОБ/МНЧ, на скаффолдах ПОБ/МНЧ/ГО был отмечен самый активный рост клеток SH-SY5Y в переменном магнитном поле.

При нейрональной дифференцировке без МП отмечено снижение роста дифференцированных клеток SH-SY5Y на скаффолдах ПОБ и ПОБ/МНЧ уже к 5 суткам культивирования с сохранением тенденции снижения до 12 суток. На скаффолдах ПОБ/МНЧ/ГО без МП в течение 12 суток не происходило изменений в активности роста – количество клеток со временем оставалось постоянным. МП подавляло рост нейроподобных клеток только на скаффолдах ПОБ/МНЧ/ГО, в то время как рост на скаффолдах ПОБ и ПОБ/МНЧ оставался стабильно на невысоком уровне.

Таким образом, скаффолды ПОБ/МНЧ/ГО поддерживают благоприятные условия для роста и дифференцировки нейроподобных клеток SH-SY5Y по сравнению с скаффолдами ПОБ и ПОБ/МНЧ. Это подчеркивает потенциальную ценность магнитоактивных пьезоэлектрических композитов с оксидом графена для инженерии нервной ткани.

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ VDAC КАНАЛА ВНЕШНЕЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ МЕМБРАНЫ В РАЗВИТИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК ПРИ ГИПЕРГЛИКЕМИИ

Ильзоркина А.И.¹, Белослудцева Н.В.^{1,2}, Белослудцев К.Н.^{1,2}

¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушино, Россия

²Марийский государственный университет, Йошкар-Ола, Россия

ilzorkinaanna1998@mail.ru

Сахарный диабет – распространенное хроническое эндокринное заболевание, связанное с нарушением усвоения глюкозы и развивающееся вследствие недостаточности гормона инсулина, что приводит к развитию гипергликемии и нарушениям липидного и белкового обмена. Длительная гипергликемия, связанная с диабетом, вызывает многочисленные клеточные нарушения, одним из которых является дисфункция митохондрий.

Митохондрии играют важную роль в поддержании нормального функционального состояния клеток, поэтому нарушение в работе митохондрий связано с развитием многих патологий. Митохондриальный метаболизм требует эффективного обмена молекулами между митохондриями и цитоплазмой через внешнюю митохондриальную мембрану. Один из ключевых белков этой мембраны участвующих в контроле её проницаемости является потенциал-зависимый анионный канал (VDAC). Недавние исследования, проведенные в нашей лаборатории, показали, что в экспериментальной модели сахарного диабета экспрессия гена VDAC1 увеличивается почти в два раза, что свидетельствует о его важной роли в патогенезе данного заболевания. Поэтому изучение роли VDAC и возможности регуляции его активности при сахарном диабете является потенциально важным направлением в исследовании широкого спектра патологий, связанных с дисфункцией митохондрий. В связи с этим целью нашей работы было изучить влияние фармакологического и генетического ингибирования VDAC на развитие митохондриальной дисфункции в условиях гипергликемии в первичных культурах клеток человека. В первой части работы мы оценили влияние ингибитора VDAC канала – VBIT4 на развитие митохондриальной дисфункции первичной культуры эндотелиоцитов легких мышей в условиях гипергликемии. Было установлено, что инкубация (36 часов) клеток в среде с высокой концентрацией глюкозы (30 мМ) вызывает статистически значимое увеличение образования активных форм кислорода (АФК), повышение активности спонтанного образования МРТ поры в митохондриях и снижение мембранного потенциала в клетках. Экспозиция клеток в этих условиях с 5 мкМ VBIT-4 приводила к снижению генерации АФК и подавлению открытия МРТ поры. В следующей части работы была получена культура фибробластов кожи человека со сниженной экспрессией гена VDAC1. Установлено, что в условиях гипергликемии наблюдается значительное увеличение образования АФК (в 1.97 раза) в отличие от контроля. Снижение экспрессии VDAC1 приводило к менее выраженному росту генерации АФК (в 1.67 раза). Продemonстрировано, что индуцированное гипергликемией повышение активности спонтанного образования МРТ поры в клетках с пониженной экспрессией VDAC1 было менее выраженным (в 1.18 раза), чем в контрольных клетках (в 1.35 раза). Полученные результаты позволяют предположить, что фармакологическое или генетическое подавление активности VDAC1 в первичных культурах клеток может являться фактором, предотвращающим развитие митохондриальной дисфункции в условиях гипергликемии.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (20-15-00120_П).

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ АКТИВАЦИИ TRKA-РЕЦЕПТОРА ДИПЕПТИДНОГО МИМЕТИКА NGF

Илюшина Е.А., Зайнуллина Л.Ф., Середенин С.Б.

Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных
биомедицинских и фармацевтических технологий, Москва, Россия

ilyushina@academpharm.ru

Известно, что нейротрофические факторы играют важную роль в сохранении структурной целостности нервной системы, что делает их потенциально эффективными средствами в лечении нейродегенеративных заболеваний. Однако системное применение нейротрофинов ограничено по их фармакокинетическим свойствам, несмотря на доказанный в экспериментах высокий терапевтический потенциал. В ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» был разработан и синтезирован низкомолекулярный миметик 4-ой петли фактора роста нервов (NGF) гексаметилендиамид бис-(N-моносукцинил-глутамил-L-лизина) (ГК-2), проявляющий нейропротекторный эффект, зависимый от активации рецептора TrkA и связанных с рецептором нисходящих протеинкиназных путей.

В связи с этим целью работы является изучение активации TrkA рецептора и его фосфорилированных форм, нисходящих сигнальных путей и антиапоптотического эффекта миметика ГК-2.

Исследования проводились на клеточной линии нейробластомы человека SH-SY5Y на модели сывороточной депривации, позволяющей исследовать собственное действие миметика NGF ГК-2.

Клетки SH-SY5Y, культивируемые в условиях отсутствия сыворотки (24-часовое голодание) инкубировали с ГК-2 (1-10-100 нг/мл) или NGF- β (50 нг/мл) в различные временные промежутки (10, 30, 180 минут). Вестерн-блот анализ с использованием моноклональных антител проводился для определения уровней белка фосфорилированных форм TrkA (Tyr675, Tyr490, Tyr785), pERK, pAKT, pBAD. Для анализа стадий апоптоза использовали окрашивание клеток аннексином V/SYTOX, меченого FITC с последующей проточной цитометрией. Статистическую обработку данных проводили однофакторным дисперсионным анализом ANOVA (n=3; различия с p-значением <0,05 считались статистически значимыми).

На основании полученных результатов было установлено, что ГК-2 обладает пролонгированным антиапоптотическим эффектом по сравнению с NGF в условиях сывороточной депривации. Так, ГК-2 продемонстрировал эффект, сходный с NGF, при 24-часовом сывороточном голодании за счёт снижения количества «ранних апоптотических» клеток на 16% (p<0,05). Цитопротекторные свойства ГК-2, в отличие от NGF, сохраняются с течением времени (48 часов голодания), препятствуя переходу клеток в стадию позднего апоптоза. При анализе влияния ГК-2 на динамику активации TrkA показано, что характер фосфорилирования Tyr675 имеет схожую динамику с природным нейротрофином. При концентрации 100 нг/мл отмечено положительное влияние ГК-2 на фосфорилирование Tyr785 с задержкой во времени. Анализ фосфорилирования TrkA на Tyr490 выявил линейную зависимость взаимодействия ГК-2 с рецептором, по сравнению с NGF, имеющего обратную зависимость. Анализ сигнальных путей для ГК-2 показал активацию протеинкиназы АКТ и ингибирование проапоптотического белка BAD на 10 минуте эксперимента. Активация пути MAPK для ГК-2 характеризуется кратковременным повышением уровня p-ERK1/2 с последующим снижением уровня данной киназы.

Исследование выполнено в рамках государственного задания № FGFG-2022-0001.

ПРИМЕНЕНИЕ РЕПОРТЕРНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ МЕЛАНОМЫ В16F10RED В
ТРАНСЛЯЦИОННЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ В ОНКОЛОГИИ

Исаева А.С.^{1,2}, Мороз В.Д.³, Егоров А.Д.³, Карабельский А.В.³, Бабаева Г.^{4,5}, Хан И.И.^{4,5},
Покровский В.С.^{4,5}, Малоголовкин А.С.^{1,3}

¹Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова
Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет),
Москва, Россия

²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),
Москва, Россия

³Научно-технологический университет «Сириус», Сочи, Россия

⁴Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина,
Москва, Россия

⁵Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

isaeva_a_s@staff.sechenov.ru

Онкологические заболевания являются одной из основных причин смертности в мире – согласно данным Всемирной организации здравоохранения в 2020 г. скончались вследствие рака около 10 млн человек. Терапия злокачественных новообразований использует широкий арсенал хирургических подходов, а также лучевую, химио-, фотодинамическую и терапию моноклональными антителами. В последние годы развивается область виротерапии, которая предлагает использование онколитических вирусов для воздействия на неоперабельные и не поддающиеся лечению опухоли. Возможность оптической визуализации раковых клеток позволяет оценить объем опухоли и действие экспериментальных препаратов в лабораторных условиях и доклинических испытаниях. Разработка новых моделей рака с возможностью флуоресцентной детекции не теряет своей актуальности.

Целью данного исследования являлось получение опухолевой модели на основе клеточной линии меланомы мыши В16F10, кодирующей слитный ген Н2В-мKate2 под контролем конститутивного промотора EF1α.

В ходе работы путём трансдукции лентивирусными частицами клеток В16F10 была получена стабильная клеточная линия В16F10Red. На данной клеточной модели мы провели оценку цитопатического действия различных онколитических вирусов: вируса везикулярного стоматита (VSV) и вируса миксоматоза кроликов (MYXV).

Также нами была показана возможность применения клеток В16F10Red в экспериментах *in vivo* для изучения метастазирования меланомы на модели эмбрионов рыб *Danio rerio* и мышинной модели BALB/c с последующей визуализацией флуоресценции опухоли. С помощью конфокального лазерного микроскопа (Olympus FLUOVIEW FV3000, Япония) детектировали флуоресценцию опухоль и метастазы в месте инъекции клеток В16F10Red (желточный мешочек) и хвосте эмбрионов *Danio rerio*. На пятый день после подкожной инъекции BALB/c мышам 2×10^6 клеток В16F10 Red опухоль превышала 5 мм в диаметре и за 9 дней наблюдения достигала объема порядка 400 мм³, что подтверждает образование и развитие опухоли. Данные сигналы детектировали с применением *in vivo* имиджера (FOBI, Южная Корея), который также использовался для визуализации опухоли.

Полученная стабильная репортерная клеточная линия может быть использована для оценки действия терапевтических противоопухолевых препаратов как в качестве *in vitro* модели, так и с применением системы *in vivo* имиджинга. Экспрессия репортерного флуоресцентного белка мKate2 позволяет определять локализацию раковых клеток в организме, объем опухоли, а также метастазирование.

Работа поддержана грантом РФФ № 24-15-20040 и программой академического лидерства «Приоритет 2030» ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова.

ВЛИЯНИЕ МЕТИОНИНА И МЕТИОНИН- γ -ЛИАЗЫ НА БИОХИМИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В КУЛЬТУРЕ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

**Каверина А.П., Земская А.С., Ревтович С.В., Морозова Е.С.,
Ануфриева Н.В., Сольев П.Н.**

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

kaverina.a@list.ru

Онкогенез сопровождается различными изменениями клеточного метаболизма, в том числе обусловленными отличной от здоровых клеток активностью ферментов биосинтеза серосодержащих аминокислот и производства ими метаболитов, что в итоге приводит к зависимости раковых клеток от уровня экзогенного метионина.

Метионин- γ -лиаза (MGL), один из объектов исследований нашей лаборатории, катализирует расщепление метионина в некоторых бактериях, простейших и растениях. Фермент возможно использовать в терапии рака как самостоятельный препарат, так и в качестве компонента фармацевтической пары. Однако данных по сравнительной активности MGL и её влияния на метаболические пути в отношении нераковых клеток недостаточно для внедрения этого метода.

Задачами работы было исследовать цитотоксичность MGL и её комбинации с метионином *in vitro*, а также оценить активацию генов биосинтеза и метаболизма глутатиона в клетках с использованием полимеразной цепной реакции в реальном времени (qPCR).

МТТ-тест, выполненный на линии гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2 и иммортализованных клетках почечного эпителия зеленой мартышки VeroE6 через 24 часа инкубации, показал, что как фермент, так и субстрат, и их комбинация нетоксичны для клеток в предельных концентрациях 1 мг/мл (11,8 ЕД/мл) MGL и 20 мкМ метионина.

Для исследования влияния внеклеточных MGL/метионина на биохимию глутатиона – важного регулятора внутриклеточного метаболизма и окислительно-восстановительного стресса – нами была оценена экспрессия следующих генов в клетках HepG2:

- *HO-1*, кодирующий фермент гемоксигеназу-1;
- *NQO1*, кодирующий цитозольный фермент НАДФ(Н)-хиноноксидоредуктазу;
- *GCLC*, кодирующий каталитическую субъединицу глутаматцистеинлигазы;
- *GCLM*, кодирующий регуляторную субъединицу глутаматцистеинлигазы;
- *GS*, кодирующий глутаминсинтетазу.

Добавление MGL (1 мг/мл – 11,8 ЕД/мл) и метионина (2,984 мг/мл – 20 мкМ) по отдельности или вместе приводит к незначительному снижению экспрессии генов, кодирующих ферменты *NQO1*, *GCLC* и *GCLM*. Сравнимое снижение экспрессии также наблюдалось для гена *HO-1*, с той разницей, что добавление MGL в высокой концентрации (1 мг/мл – 11,8 ЕД/мл) на уровень экспрессии гена не влияло. Уровень экспрессии этих генов не увеличился, что свидетельствует об отсутствии в клетке признаков окислительного стресса. Также было показано, что одновременное добавление MGL и метионина специфично повышает экспрессию гена глутаминсинтетазы *GS*, в то время как значения экспрессии при добавлении MGL или метионина не отличаются от контрольных.

Таким образом, MGL, её природный субстрат и их комбинация нетоксичны для клеток и не оказывают влияния на окислительно-восстановительную регуляцию глутатионом внутриклеточной среды, что показывает безопасность применения MGL в противораковой терапии.

Работа поддержана грантом РФФ №20-74-10121-П.

РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ ЛЮМЕНОГЕНЕЗА В АДГЕЗИВНОЙ КУЛЬТУРЕ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Калинкина В.А.¹, Абдыев В.К.², Воротеляк Е.А.²

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

²Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

kalinkina_vasilisa.m@student.msu.ru

Люменогенез при формировании амниотической полости является одним из ключевых событий перимплантационного развития млекопитающих. У мыши данный процесс происходит на 4,75 день эмбриогенеза. В ходе него плюрипотентные клетки эпибласта бластоцисты, взаимодействуя с окружающей их базальной мембраной, претерпевают эпителизацию, формируя розетку, в центре которой возникает проамниотическая полость. У человека механизм люменогенеза остаётся недостаточно изученным в силу ограниченности доступа к эмбриональному материалу для проведения исследований. В связи с этим, перспективным направлением является разработка модели формирования люмен-подобных структур в культуре клеток человека с применением растворённых компонентов матрикса базальной мембраны, что позволяет имитировать условия развития эпибласта *in vivo*. Возможность моделирования люменогенеза при помощи плюрипотентных стволовых клеток человека и мыши была показана в ряде исследований, однако используемые в них методики отличаются, и точный механизм, приводящий к формированию люменов в подобных системах, на настоящий момент не описан.

В ходе данного исследования мы разработали модель люменогенеза в адгезивной культуре индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека с использованием Матригеля, матрикса базальной мембраны, применяемого для культивирования плюрипотентных клеток. Мы показали, что в течение суток после добавления Матригеля в культуральную среду колонии ИПСК образуют люменоиды — сферические клеточные агрегаты с внутренней полостью. Данные трёхмерные структуры сохраняются при дальнейшем культивировании даже в отсутствии Матригеля в среде.

При разработке протокола мы установили плотность рассеивания клеток, а также время и условия культивирования ИПСК до добавления Матригеля, необходимые для получения колоний оптимального размера (диаметром 100-300 мкм), обеспечивающего равномерность люменогенеза. Кроме того, была определена пороговая концентрация Матригеля в культуральной среде, поддерживающая формирование люменоидов. Цейтраферная съёмка показала, что люменогенез в описанной системе происходит путём заворачивания наверх и последующего смыкания краёв колоний. При помощи флуоресцентного окрашивания на F-актин мы изучили изменения в морфологии цитоскелета при формировании люменоидов. Мы также продемонстрировали сохранение в ходе люменогенеза ядерной локализации маркера плюрипотентности OCT4 и наличие в зонах межклеточных контактов E-кадгерина, что характерно для эпителизованных слоёв клеток. Помимо этого, по распределению маркера апикального домена PAR6 в цитоплазме мы установили направление апико-базальной поляризации клеток люменоидов.

Таким образом, разработанная нами методика открывает возможности для изучения процессов взаимодействия плюрипотентных стволовых клеток эпибласта с компонентами базальной мембраны, эпителизации и клеточной подвижности, приводящих к формированию амниотической полости в раннем эмбриогенезе человека.

Работа выполнена в рамках Государственного задания ИБР РАН ГЗ 0088-2024-0013 и при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-1063 от 28.09.2021).

ИНДУКЦИЯ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ У *VIGNA RADIATA* L. ИЗ РАЗНЫХ ВИДОВ ЭКСПЛАНТОВ

Кирсанова А.С., Ерастенкова М.В.

Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия

kir.alesya@mail.ru

Маш (*Vigna Radiata* L) – высокобелковое, бобовое растение, семена которого в большинстве случаев используются для продовольственных целей. В частности, их применяют как кормовые культуры: в качестве высокобелковых добавок, сена, силоса и соломы. Культура каллуса *V. Radiata* дает возможность получения растений-регенератов, которые могут использоваться в селекции нового поколения (CRISPR-Cas). Каллус – это неорганизованная меристематическая ткань, состоящая из дедифференцированных клеток и образующаяся в результате добавления определённых концентраций фитогормонов к питательной среде.

Каллус может быть получен из различных частей растения. Поэтому для полной оценки интенсивности каллусогенеза и в дальнейшем эмбриогенеза исследуются каллусные культуры, образованные из разных частей растения.

Таким образом, целью работы является подбор и создание оптимальных условий для инициации каллусной культуры и оценки каллусообразования у различных эксплантов, выявление наилучшего типа экспланта.

Материалы и методы. Исследование проводилось в лаборатории «искусственного выращивания и оздоровления генофонда растений» на базе Научного института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова.

В качестве материала исследования были выбраны 4 сорта *V. Radiata*, из коллекции ВИР, среди них: Местный (к-1805); Местный (к-1856); Местный (к-2037); Победа 104 (к-2156).

Исследуемый материал был введён в культуру *in vitro* по 10 семян для каждого сорта. Для этого материал стерилизовали бытовым отбеливателем Белизна (50%) с экспозицией 20 минут и высаживали на питательную среду Мурасиге-Скуга (МС) с добавлением 1 мг/л фитогормона 6-бензиламинопурина (6-БАП). Далее посадочный материал помещали в световую комнату до появления первых настоящих листьев (постоянная температура +24–25°C; относительная влажность воздуха – 70–80%, фотопериод – 16 часов). После проращивания материала для оценки индукции каллусогенеза были взяты следующие части растения: гипокотиль, эпикотиль, лист и семядоли и высажены на среду МС, иммобилизованную фитогормоном 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д) в концентрации 2 мг/л. Далее экспланты снова помещали в световую комнату. Интенсивность образования каллуса оценивалась каждые 5 дней.

Результаты и обсуждение. Результаты исследований показали, что индукция каллусной культуры у вышеперечисленных сортов происходит с различной интенсивностью на разных типах эксплантов. Так, у всех изучаемых сортов наилучшие показатели каллусогенеза наблюдались на поверхности листовой пластины (диапазон показателей у всех сортов: от 83,3% и до 100,0%). На семядолях диапазон показателей варьировался от 42,9% и до 77,8%; на эпикотиле – от 28,6% и до 55,6%. Наименьшие показатели каллусообразования были у эксплантов, полученных из гипокотилия (диапазон показателей: от 14,3% и до 50,0%). Опираясь на данные, полученные в результате исследования, можно сделать вывод, что лучшим эксплантом на среде МС с добавлением 2,4-Д является листовая диск. Ведутся работы по изучению органогенеза из каллуса, полученного из различных типов эксплантов.

ВЛИЯНИЕ СПОСОБА ИММОБИЛИЗАЦИИ БЕЛКА НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ
ХАРАКТЕРИСТИКИ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ
ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫХ МИКРОКАПСУЛ

Кочеткова О.Ю., Райхман Е.В., Антонова О.Ю.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
лаборатория роста клеток и тканей, Пушино, Россия

o.y.kochetkova@gmail.com

Целью данной работы было исследовать влияния способа инкапсулирования белка и условий инкубирования на функциональные характеристики микрокапсул, сформированных из биodeградируемых полиэлектролитов.

Были получены микрокапсулы, состоящие из сульфата декстрана (ДС) и поли-L-аргинин гидрохлорида (ПАр), с архитектурой (ДС/ПАр)₃. БСА включали в микрокапсулы методами: копреципитации (К) (на стадии формирования биоминерального ядра) и адсорбции (А) (включение в «условно-полые» микрокапсулы). В качестве условий инкубирования были выбраны три температуры (4, 22 и 37°C) и различные значения рН (5 и 7.4), соответствующие различным условиям хранения и моделирующие условия внутри клетки.

Исследование влияния рН на диссоциацию оболочки микрокапсул (А) показало, что влияние рН 7.4 завесило от температуры. Максимальный выход ПАр в среду инкубирования наблюдался при 37°C и составлял 23%, снижение температуры до 4°C снижало высвобождение ПАр до 9%. Высвобождение полимера при рН 5 были близки к контрольным условиям (деионизованная вода). Динамика процесса диссоциации оболочки микрокапсул (К) был схожа с микрокапсулами (А). Однако наличие в среде солей (NH₄)₂SO₄ и 2М NaCl приводило к значительной диссоциации оболочки микрокапсул (К), более >50% в присутствии сульфата аммония и >30% хлорида натрия. Высокая ионная сила приводит к дестабилизации оболочки и десорбции цепей полиэлектролитов в среду инкубирования. Микрокапсулы (А) были менее подвержены действию высокой ионной силы, по-видимому, белок, иммобилизованный адсорбцией, стабилизирует верхние слои оболочки, связываясь электростатически с некомпенсированными зарядами полиэлектролитов.

Исследование профилей высвобождения БСА-РБИТЦ из микрокапсул (А) и (К) показало, что выход белка из микрокапсул (А) не превышал 20% во всех исследованных условия при экспозиции в течение 8 суток. Как и в случае с диссоциацией оболочки, максимальный выход наблюдался в условиях высокой ионной силы и рН 7.4. Повышение температуры, так же, приводило к высвобождению иммобилизованного адсорбцией белка. Максимальное высвобождение БСА из микрокапсул (К) наблюдалось в условиях высокой ионной силы 2М NaCl при всех исследованных температурах и составляло от 20 до 30% (4 и 37°C, соответственно).

Суммируя вышеизложенное, можно заключить, что иммобилизация БСА методом адсорбции увеличивает стабильность внешних полиэлектролитных слоев, снижая дестабилизирующее действие высокой ионной силы и температуры. При обоих способах иммобилизации происходит пролонгированное высвобождение: 20 % – (А), 30% – (К) за 8 дней экспозиции. Выбор способа иммобилизации белка является важным фактором для эффективного хранения и дальнейшего использования в условиях *in vitro* и *in vivo*.

ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ МАТРИКСА НА ТРАНСДИФФЕРЕНЦИРОВКУ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ШВАННОПОДОБНЫЕ КЛЕТКИ

Кравченко В.И.^{1,2}, Райхман Е.В.¹, Кочеткова О.Ю.¹, Зозуля Л.В.², Антонова О.Ю.¹

¹ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН», Пушкино, Россия

²ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет», Краснодар, Россия

8Victory8@bk.ru

Эффективная регенерация поврежденных нервных отростков во многом зависит от размера травмы. Наложение швов «конец в конец» возможно при небольших повреждениях. Имплантация ауто- или аллотрансплантата нерва может устранить повреждения с такими большими промежутками. Поэтому все большее внимание уделяется исследованиям по разработке искусственных нервных проводников, включающих в себя несколько характеристик, таких как биосовместимость, биоразлагаемость, гибкость, стабильность и функциональный дизайн. Важную роль в процессах регенерации поврежденных нервных отростков играют шванновские клетки, синтезирующие миелин и продуцирующие различные факторы. Клиническое использование собственных шванновских клеток ограничено сложностями получения, влекущего за собой еще большую травматизацию. Основным источником таких клеток является седалищный и другие крупные нервы. Хорошей альтернативой могут стать дифференцированные в шванноподобные клетки МСК, выделенные из жировой ткани. Однако и здесь возникают сложности с ускоренной дифференцировкой и пролиферацией.

Целью данной работы являлась экспериментальная оценка влияния нанотопологии материала на трансдифференцировку МСК в шванноподобные клетки.

Было исследовано влияние диаметра ориентированных нейлоновых волокон и состава волокнистого материала на эффективность процесса дифференцировки МСКж в шванноподобные клетки. Предварительно было исследовано влияние полученных волокнистых скаффолдов из ультратонких (AT, 100 нм), субмикронных (AS, 300 нм) и смешанных (MIX (AT+AS)) волокон на адгезию и жизнеспособность МСКж. Клетки МСКж 3 пассажа рассеивали на подложки с плотностью $2,8 \cdot 10^4/\text{см}^2$ и культивировали в течение 5 дней. МСКж активно пролиферируют на скаффолдах с разным диаметром волокон. По сравнению с контрольными клетками, культивируемыми на стекле, клетки имеют веретеновидную морфологию и ориентированы вдоль волокон. Таким образом, как и в случае ШК предложенные волокнистые материалы способствуют активной пролиферации МСКж.

В процессе трансдифференцировки при культивировании на скаффолдах с разным диаметром волокон индуцированные клетки выглядят биполярными и веретенообразными по форме, сходными с морфологией ШК. Более выраженное изменение морфологии наблюдается при трансдифференцировке МСК на волокнистых материалах. Волокнистая структура подложки способствует удлинению и поляризации клеток по направлению укладки волокон. Также была проведена оценка экспрессии нескольких генов и белков-маркеров ШК с помощью РТ-ПЦР, которая выявила значительно повышенные уровни мРНК GFAP, MPZ, p75NGFR и CNTF в трансдифференцированных МСК после 13 дней дифференцировки.

Таким образом, трансдифференцировка проходит успешно, более того ультраструктура материала способствует более высокому выходу Шванноподобных клеток.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-25-00519, <https://rscf.ru/project/23-25-00519/>

РОЛЬ КИНАЗЫ TAK1 И СИГНАЛЬНОГО ПУТИ NF-KB ФОРМИРОВАНИИ ПЕНИСТЫХ КЛЕТОК ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ

Ли А.А.^{1,2}, Хотина В.А.², Сухоруков В.Н.^{1,2}

¹Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского, Москва, Россия

²Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва, Россия

Lee.1000@inbox.ru

Введение. Известно, что атеросклероз – это хроническое заболевание воспалительной природы, связанное с формированием пенных клеток, которые представляют собой макрофаги, поглощающие холестерин и другие липиды, что способствует образованию бляшки и развитию атеросклеротического повреждения сосудов. Сигнальный путь NF-kB имеет большое значение в формировании провоспалительного ответа. Один из важных компонентов данного сигнального пути – киназа TAK1, активирующая транскрипционный фактор NF-kB под воздействием паттерн-распознающих рецепторов. Было показано, что нокаут гена TAK1 предотвращает поглощение холестерина макрофагами и их трансформацию в пенные клетки.

Цель. Исследовать потенциальную роль активации сигнального пути NF-kB во внутриклеточном накоплении холестерина через активацию киназы TAK1.

Материалы и методы. Для выявления функции киназы TAK1 были получены нокаутированные по гену TAK1 клетки моноцитарной линии THP-1. Для генетического редактирования применяли технологию CRISPR/Cas9. Был сконструирован плазмидный вектор, основанный на плазмиде рх330. Эффективность нокаута оценивалась методом ПЦР в реальном времени. Полученные клетки затем использовались для изучения накопления холестерина под воздействием липопротеидов низкой плотности, выделенных из плазмы крови пациентов с атеросклерозом.

Результаты. Экспозиция клеток THP-1 атерогенными ЛПНП привела к увеличению накопления холестерина на 133% по сравнению с клетками без добавления ЛПНП. Нокаут гена TAK1, напротив, привел к уменьшению накопления холестерина.

Выводы. Активация сигнального пути NF-kB через киназу TAK1 может играть важную роль во внутриклеточном накоплении холестерина.

ИНГИБИТОРНЫЙ АНАЛИЗ ПОДВИЖНОСТИ МСК ИЗ ВАРТОНОВА СТУДНЯ ПУПОЧНОГО КАНАТИКА ЧЕЛОВЕКА В ПРОЦЕССЕ РЕПЛИКАТИВНОГО СТАРЕНИЯ

Лукачева А.В.^{1,2}, Горб А.И.³, Мусорина А.С.¹, Полянская Г.Г.¹, Бобков Д.Е.^{1,2}

¹Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

²Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова Минздрава
России, Санкт-Петербург, Россия

³Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия

av.lukacheva@yandex.ru

Репликативное старение (РС) – процесс, которому подвержены все неиммортизированные клетки человека, включая МСК. РС характеризуется снижением или полной остановкой пролиферации, укорочением теломер, изменением морфологии клетки, увеличенной активностью β-галактозидазы и изменением ряда других важнейших характеристик клеточной линии. Влияние РС на МСК необходимо учитывать при длительном культивировании, а также для применения МСК в регенеративной медицине. Регенерация тканей происходит за счет миграции клеток в место повреждения. Клеточная миграция – сложный динамический процесс, основанный на постоянном ремоделировании актинового цитоскелета. Известно, что ключевыми регуляторами реорганизации актинового цитоскелета являются малые ГТФазы, такие как RhoA, Rac1 и Cdc42. Для изучения роли малых ГТФаз в регуляции подвижности МСК в процессе РС мы использовали ингибиторы Rho- и Cdc42-сигнальных путей. Y-27632 является ингибитором ROCK1 – даунстрим-эффектора RhoA, отвечающего за сборку стресс-фибрилл и образование фокальных контактов. ZCL 278 является ингибитором Cdc42 ГТФазы, которая контролирует полярность клеток и образование филоподий.

В работе использовали клетки MSCWJ-1, полученные и охарактеризованные в ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных» ИНЦ РАН (Санкт-Петербург). Результаты окрашивания клеток на содержание β-галактозидазы свидетельствуют о том, что MSCWJ-1 подвержены РС. Ингибиторный анализ подвижности MSCWJ-1 проводили на 6, 15, 26 и 31 пассажах. Для этого клетки в редком посеве помещали в 6-луночный планшет: 2 лунки с 5 % FBS (контроль), 2 лунки с добавлением 10 мМ Y-27632 и 2 лунки с добавлением 5 мМ ZCL278. Для измерения средней скорости клеток анализировали треки клеточных движений, записанные в течение 24 ч с помощью системы прижизненной конфокальной микроскопии CQ1 (Yokogawa, Япония). В результате анализа треков были получены следующие параметры: средняя скорость клеток, извилистость траекторий и средний квадрат смещения (MSD). Результаты измерения средней скорости клеток (среднее ± стандартное отклонение): пассаж 6 – 25,50 ± 6,72 мкм/ч, 15 – 25,23 ± 7,41, 26 – 30,00 ± 8,94, 31 – 28,42 ± 0,54. Достоверные отличия по результатам теста Манна-Уитни выявлены между пассажем 6 и 26. На других исследованных пассажах достоверных изменений скорости под действием ингибиторов не выявлено. Средняя скорость клеток под действием ингибиторов Y-27632 и ZCL278 достоверно снизилась только на 31 пассаже. Анализ траекторий клеточного движения показал, что в процессе РС происходит снижение извилистости. Сравнение траекторий клеток с симуляцией случайного блуждания показало, что MSCWJ-1 двигаются супердиффузивно. По результатам MSD анализа Y27632 увеличивает направленность движения клеток на всех изученных пассажах.

Таким образом, РС MSCWJ-1 сопровождается изменениями в направленности движений клеток и их чувствительности к действию Y-27632 и ZCL 278.

ПОДВИЖНОСТЬ СПЕРМАТОЗОИДОВ ПЛОДОВОЙ МУШКИ *DROSOPHILA*
MELANOGASTER ПОСЛЕ 12-СУТОЧНОГО КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА

Мальков А.А.^{1,2}, Бирюков Н.С.¹, Жданкина Ю.С.¹, Огнева И.В.¹

¹Лаборатория Биофизики клетки, Государственный научный центр – Институт медико-биологических проблем Российской академии наук, Москва, Россия

²Первый Московский государственный медицинский институт им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва, Россия

malkov.aa.2003@yandex.ru

Дизайн эксперимента. За 11 дней до старта космического полета пятьдесят пар виргинных имаго плодовой мушки *Drosophila melanogaster* линии Canton S возрастом 2 дня помещали в пробирки типа Falcon объемом 50 мл с воздухопроницаемой крышкой, содержащие стандартную для разведения дрозофилы среду. В течение 1 суток мухи откладывали яйца и затем их удаляли из пробирок, оставляя только яйца. Далее, эти пробирки экспонировали в реальном космическом полете и синхронном контроле. Вылет мух происходил на второй день пребывания в условиях невесомости.

Космический эксперимент «Цитомеханариум» (в рамках реального космического полета на борту РС МКС) был проведен три раза с шестью биологическими репликами. Космические полеты были проведены в период 05 октября 2021 – 17 октября 2021 (экспедиция МКС-65), 18 марта 2022 – 30 марта 2022 (экспедиция МКС-66) и 15-27 сентября 2023 (экспедиция МКС-69).

Определение параметров двигательной активности сперматозоидов. Семенники мух каждой группы исследования выделяли, разрезали в физиологическом растворе для извлечения сперматозоидов. Каплю полученной суспензии объемом 5 мкл переносили в камеру Маклера (Sefi Medical Instruments Ltd., Haifa, Israel) и размещали под фазово-контрастным объективом микроскопа (Eclipse E200 MV, Nikon, Tokyo, Japan) с общим увеличением 200X. Записывали видео движения сперматозоидов с частотой 60 кадров в секунду с разрешением 2 Мп. Для анализа видеоизображений использовали программный пакет Fiji с плагином Manual Tracking (открытый доступ <https://imagej.net/software/fiji/>). Определяли скорость движения (в мкм/с) как расстояние, пройденное концом хвоста за секунду.

Статистический анализ. Анализ полученных результатов проводили с использованием двухфакторного дисперсионного анализа (two-way ANOVA в программном пакете Origin) с использованием апостериорного критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони на множественность сравнений. Использовали уровень значимости $p < 0,05$ при оценке достоверности изменений. Данные представлены в виде $M \pm SE$ (M – среднее арифметическое, SE – стандартная ошибка среднего).

Результаты и обсуждение. Наиболее значимыми представляются данные, которые могут быть получены в условиях космического полета, либо сразу после него. Однако, организационно-технические трудности зачастую не дают такой возможности. В связи с этим, исследование двигательной активности сперматозоидов на месте посадки спускаемого аппарата корабля «Союз» с космонавтами на борту (147 км юго-восточнее г. Жезказган, Казахстан) не проводили, но доставляли мух в лабораторию, где была эта возможность.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что после 12-суточного космического полета, сопровождавшегося перегрузками при выведении космического корабля на орбиту и посадке спускаемого аппарата, а также 16-часовой реадаптации к силе тяжести скорость движения сперматозоидов снижается на 35% ($p < 0.05$) относительно контроля, но уже через 24 часа не отличается от него (47 ± 5 мкм/с в полетной группе vs. 46 ± 3 мкм/с в группе синхронного контроля).

Фундаментальные механизмы регуляции двигательной активности сперматозоидов в условиях космического полета требуют дальнейшего изучения, однако, полученные данные свидетельствуют об обратимости негативных изменений в двигательной активности сперматозоидов плодовой мушки после 12-суточного космического полета.

Работа поддержана программой фундаментальных исследований ГНЦ РФ – ИМБП РАН FMFR-2024-0041 и финансированием Госкорпорации «Роскосмос».

СВОЙСТВА ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПРИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ
ГИПОКСИЯ *IN VITRO*

Матвеева Д.К., Горностаева А.Н.

Институт медико-биологических проблем биологии РАН, Москва, Россия

matveeva.dajana@yandex.ru

Культивирование мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (МСК) при тканевых уровнях O_2 используется для моделирования ниши, а также для повышения их терапевтической эффективности (Buravkova et al., 2013; Bader et al., 2015; Beegle et al., 2015; Gornostaeva et al., 2020). Внеклеточный матрикс (ВКМ) является важным компонентом секрета МСК. На формирование ВКМ оказывают влияние условия культивирования, такие как pH, уровень O_2 и т.д., а также преколонизирование различными биологически активными молекулами. Все эти «программируемые» качества получаемых децеллюляризованных ВКМ (дцВКМ) отражаются на функциональной активности клеток при последующей рецеллюляризации. Целью данной работы было оценить как культивирование МСК при физиологической гипоксии (5 % O_2) повлияет на свойства продуцируемого ВКМ и клеток, засеваемых на децеллюляризованные препараты.

МСК из жировой ткани человека постоянно культивировали при 20 или 5% O_2 . После 14 суток монослой децеллюляризовали с помощью 0,5% Triton-X100 + 20 mM NH_4OH в PBS, получая дцВКМ (далее 20% O_2 - и 5% O_2 -дцВКМ). Проводили оценку характера упаковки фибрилл ВКМ. Далее МСК высевали на препараты дцВКМ, культивировали 3-е суток при 20% O_2 , оценивали морфологию клеток, их прирост, а также митохондриальный компартмент (MitogreenFM, JC1) с помощью проточной цитофлуорометрии (CytoFlex, Beckman Coulter).

Были выявлены различия в характере упаковки ВКМ, продуцируемого при различных уровнях O_2 : в 20% O_2 -дцВКМ наблюдались мембраноподобные структуры перекрещенных извилистых фибрилл разного размера, тогда как 5% O_2 -дцВКМ был представлен выровненными коаксиальными фибриллами, собранными в решетчатые структуры. Морфометрически (плагин OrientationJ программного обеспечения FIJI) подтверждено увеличение показателя когерентности волокон в 5% O_2 -дцВКМ, что коррелирует с их разнонаправленным отклонением от горизонтального направления. Через 3-е суток после рецеллюляризации не выявлено различий в клеточном приросте МСК на дцВКМ, полученных при различных уровнях O_2 . При этом их пролиферация значительно стимулировалась в сравнении с культуральным пластиком. Не было выявлено различий в объеме митохондрий и их трансмембранном потенциале в МСК, культивируемых на различных матриксах. Однако морфология МСК на дцВКМ, полученных при различных уровнях O_2 , значительно отличалась. На 20% O_2 -дцВКМ МСК имели округлую форму с несколькими псевдоподиями, тогда как на 5% O_2 -дцВКМ приобретали веретенообразную форму и выстраивались вдоль волокон. Эти наблюдения показывают, что гипоксический дцВКМ за счет своих выровненных фибрилл контролирует ориентацию клеток.

Полученные результаты указывают на то, что при физиологической гипоксии происходит модификация структуры ВКМ, что отражается на характере роста рецеллюляризованных МСК. Дальнейшее исследование функциональной активности МСК на препаратах дцВКМ может быть востребовано для расширения протоколов экспансии МСК для нужд тканевой инженерии.

Работа поддержана грантом РФФИ № 23-15-00062.

ВЫЯВЛЕНИЕ НАИБОЛЕЕ ЭФФЕКТИВНОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК ПОД ДЕЙСТВИЕМ
ПРОТИВОРАКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ

Михеева А.М.^{1,2}, Богомолов М.А.^{1,2}, Valentina A. Gasca^{1,2}, Семенов М.В.^{1,2},
Спирин П.В.¹, Прасолов В.С.¹, Лебедев Т.Д.¹

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

²Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

alesyamikheeva@gmail.com

Скрининг действия низкомолекулярных ингибиторов на жизнеспособность культур злокачественных клеток является одним из основных подходов для поиска новых противораковых препаратов. Наиболее распространенные подходы для оценки выживаемости клеток в процессе скрининга основаны на измерении косвенных показателей, таких как уровень метаболической активности клеток. Развитие флуоресцентной микроскопии дало толчок к разработке прямых подходов измерения выживаемости клеток путем подсчета количества клеток под действием препарата. Однако, результаты скринингов имеют расхождения в зависимости от используемого подхода. Возникает вопрос: корректно ли сравнивать показатели, полученные разными методами, между собой?

Для ответа на этот вопрос мы провели оценку выживаемости четырех клеточных линий под действием шести препаратов четырьмя разными методами. Два метода оценки основаны на подсчете количества ядер с помощью флуоресцентной микроскопии. В первом случае мы определяли количество клеток с флуоресцентной вставкой H2B-mRuby в красном канале (565-605 nm), а во втором – количество клеток в том же поле, но в синем канале (435-485 nm), так как предварительно клетки были окрашены ядерным интеркалярным красителем Hoechst33342. Методы, основанные на микроскопии, сравнивали с двумя наиболее распространенными подходами: измерения метаболической активности с помощью ХТТ, и подсчет количества живых клеток с помощью окрашивания трипановым синим.

В результате работы мы выявили, что сравнивать показатели, полученные разными методами, лучше используя метрику AUC вместо IC50. Однако даже в этом случае результаты ХТТ отличаются от показателей других методов в случае некоторых препаратов. Нами было показано, что действие этих препаратов вызывает увеличение митохондриальной активности, что искажает результаты выживаемости клеток. Кроме того, с ростом концентрации некоторых препаратов было обнаружено увеличение интенсивности флуоресценции H2B-mRuby. ПЦР в реальном времени подтвердила, что препараты, ремоделирующие хроматин, способствуют росту уровня экспрессии H2B-mRuby. Таким образом, увеличение интенсивности флуоресценции H2B-mRuby может помочь в поиске ингибиторов эпигенетических модуляторов.

Работа поддержана грантом РФФИ №23-74-10103.

ВЛИЯНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ОПУХОЛЕВОГО И НЕОПУХОЛЕВОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА УРОВЕНЬ ГЛАДКОМЫШЕЧНОГО α -АКТИНА В КЛЕТКАХ СОСУДИСТОГО ЭНДОТЕЛИЯ ЧЕЛОВЕКА

Морева В.О.^{1,2}, Хотин М.Г.¹, Александер-Синклер Э.И.¹, Бильдюг Н.Б.¹

¹Институт Цитологии Российской Академии наук, Санкт-Петербург, Россия

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

00htlf00@gmail.com

Гладкомышечный альфа-актин (α SMA) представляет собой изоформу белка актина, характерную для гладкомышечных клеток сосудов и миоэпителиальных клеток. Однако появление α SMA может наблюдаться в других клетках при различных физиологических и патологических процессах. В частности, α SMA является общепринятым маркером эндотелиально-мезенхимного перехода (EndMT), при котором эндотелиоциты утрачивают свои исходные характеристики и приобретают свойства мезенхимных клеток. Показано, что EndMT является важным регулятором ангиогенеза в процессе опухолевого роста, при этом в последние годы активно обсуждается роль опухолевого микроокружения в индукции EndMT. В то же время данные наших предыдущих исследований указывают на то, что на экспрессию α SMA в различных клетках может влиять внеклеточный матрикс (ВКМ). В связи с этим в задачи настоящей работы входила оценка методами иммуноблоттинга и иммуноцитохимического (ИЦХ) анализа уровня α SMA в эндотелиоцитах, культивируемых на ВКМ опухолевого и неопухолевого происхождения.

В работе использовали эндотелиоциты пупочной вены человека (HUVES). Клетки культивировали в течение 11 сут на коллагене I типа (основном белке ВКМ большинства органов и тканей), ВКМ, наработанном нормальными фибробластами дермы человека (DF-2), ВКМ, наработанном клетками фибросаркомы человека (HT-1080), и матригеле (коммерческом препарате Corning® Matrigel® Matrix, полученном из ВКМ саркомы мыши). Контролем служили HUVES, культивируемые в отсутствие белков ВКМ (на культуральном пластике).

Согласно данным иммуноблоттинга, уровень α SMA в эндотелиоцитах на коллагене I типа был незначительным и сопоставимым с контролем. ИЦХ анализ не выявил α SMA в клетках, культивируемых на коллагене, при этом в контроле наблюдались α SMA-положительные клетки, а также были обнаружены их морфологические изменения. Полученные данные согласуются с данными литературы, свидетельствующими о том, что культивирование эндотелиоцитов на жестких поверхностях может привести к изменению их свойств.

В клетках HUVES на матригеле был выявлен значительный уровень α SMA с помощью иммуноблоттинга. ИЦХ анализ подтвердил существенное повышение α SMA в этих клетках. Неожиданные результаты были получены для эндотелиоцитов на ВКМ, наработанном культурой HT-1080. Согласно нашим предварительным данным, кратковременное культивирование клеток HUVES на матриксе HT-1080 приводит к значительному повышению α SMA. Однако по результатам настоящей работы к 11 сут культивирования в этих клетках наблюдалось снижение уровня α SMA до значений, сопоставимых с клетками на матриксе от фибробластов DF-2. Вероятно, в процессе продолжительного культивирования эндотелиоцитов, сопровождающегося ремоделированием наработанного HT-1080 ВКМ, происходит постепенная элиминация ключевых белков, отвечающих за индукцию α SMA. Данные электрофоретического анализа подтвердили, что общая концентрация белков в

полученном нативном матриксе НТ-1080 была существенно ниже по сравнению с коммерческим матригелем.

Полученные в настоящей работе данные дают основания полагать, что опухолевый ВКМ может включать компоненты, вносящие вклад в индукцию EndMT, в частности, как показали наши предыдущие исследования, ВКМ от клеток НТ1080 содержит белок ламинин 5, который входит в составе матригеля, но не выявляется в матриксе от нормальных фибробластов дермы.

Исследования поддержаны Министерством науки и высшего образования Российской Федерации 15.БРК.21.0011 (Соглашение № 075-15-2021-1063).

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ РИБОКСИНА, МЕДНОГО ХЛОРОФИЛЛИНА, ТРОЛОКСА И
РАСТВОРИМОЙ ФОРМЫ ИНДРАЛИНА НА РОСТОВЫЕ СВОЙСТВА В КУЛЬТУРЕ
КЛЕТОК A549 ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Московский А.А.^{1,2}, Ромодин Л.А.¹, Яшкина Е.И.¹

¹Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна, лаборатория Радиационной биофизики, лаборатория Радиационной иммунологии и экспериментальной терапии радиационных поражений, Москва, Россия

²Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ), кафедра биоэкологии и биологической безопасности, Москва, Россия

moskowsky.sch858@yandex.ru

Введение. В настоящее время весьма широко использование культур клеток в качестве экспериментальной модельной системы в радиобиологических исследованиях. Поэтому крайне важным представляется разработка корректной методологии проведения научных исследований с использованием данной модельной системы.

При исследовании влияния различных факторов на клетки необходимо понимать их влияния на клеточные культуры. Именно поэтому перед проведением исследований действия препаратов на модели культур клеток предварительно нужно изучить влияние данных веществ на свойства данных культур.

Материалы и методы. Эксперимент проводился в 96-луночном планшете с использованием клеточной линии аденокарциномы лёгкого человека, A549 (AmericanTypeCultureCollection, США). В ячейки планшета мы вносили по 20000 клеток в 100 мкл полной среды RPMI 1640. Далее в ячейки планшета было внесено по 100 мкл следующих растворов: 4 мМ тролокс (Sigma-Aldrich, Merck, США), медный хлорофиллин (Macklin, Китай), 4 мМ рибоксин (ОАО «Дальхимфарм», Россия), 4 мМ винная кислота (Macklin, Китай) или смесь 3,79 мМ индралина (НПЦ «Фармзащита», Россия) и 4 мМ винной кислоты (Китай). Далее планшет инкубировался в течение суток в CO₂-инкубаторе при 37°C. После этого из каждой ячейки было отобрано по 40 мкл клеточной среды и внесено 40 мкл раствора флуоресцирующего красителя Hoechst-33342 (ThermoFisherScientificInc., США) концентрацией 5 мкг/мл (8,1 мкМ). Далее с использованием планшетного флуориметра FLUOstarOmega (BMG LABTECH, Германия) была зарегистрирована интенсивность флуоресценции (коэффициент усиления 1500) на длине волны 460 нм при возбуждении проб светом длиной волны 355 нм. В качестве пробы сравнения, значение интенсивности флуоресценции в которой вычиталось из таковых значений в других пробах, выступила проба, в которую вносились только клетки в среде, без внесения изучаемых препаратов. Каждая проба выполнялась в 8 повторностях.

Результаты исследования и их обсуждение. Все изучаемые вещества статистически значимо влияют на ростовые свойства культуры клеток в сторону их угнетения. При этом наибольшее угнетение оказывает медный хлорофиллин. Существенное угнетение наблюдается и под действием тролокса и индралина.

Заключение. Таким образом, мы на основании флуоресценции красителя Hoechst-33342 показали статистически значимое подавление ростовых свойств клеток аденокарциномы лёгкого человека линии A549 под действием 2 мМ растворов медного хлорофиллина, рибоксина, тролокса, винной кислоты и смеси 1,9 мМ индралина и 2 мМ винной кислоты.

Работа поддержана грантом РФФ №23-24-00383.

ПРИМЕНЕНИЕ ЛИНЕЙНОЙ МОДЕЛИ ДЛЯ ОЦЕНКИ СОЗРЕВАНИЯ СТРУКТУРЫ МОЗГА

Одринская М.С., Манолова А.О., Мидзяновская И.С., Раевский В.В., Гуляева Н.В.

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

odrinskai@mail.ru

При моделировании нарушения процессов онтогенеза на животных необходимо объективно оценивать различия траекторий созревания структур мозга при экспериментальном воздействии и в норме. Такая оценка необходима для выяснения степени влияния экспериментального фактора, например, для оценки способности различных препаратов нормализовать процессы онтогенеза. Показано, что созревание микроглиальных клеток, а следовательно, и степень рамифицированности ее отростков, в значительной мере соответствует состоянию нейрональных сетей. В данной работе предлагается один из вариантов оценки созревания с использованием линейной регрессионной модели, основанной на морфологических показателях микроглиальных клеток при нормальном онтогенезе.

Работа была выполнена на крысах линии Wistar. На 10-й, 14-й и 18-й постнатальные дни (ПД) проводили кардиоперфузию 4% раствором параформальдегида. Затем получали фронтальные 50-микронные срезы мозга, которые иммуногистохимически окрашивали антителами к белку Iba-1 – маркеру микроглиальных клеток. Получали микрофотографии из stratum oriens поля CA1 гиппокампа и из слоя IV сенсорной коры (S1). Оценку фрактальной размерности микроглиальных клеток (ФР) проводили с использованием программы ImageJ/Fiji и плагина FracLac. Построение линейных моделей и их сравнение осуществляли с использованием программы R-Studio.

Средние значения ФР составили: в гиппокампе 1.37 ± 0.02 , 1.40 ± 0.05 и 1.42 ± 0.01 и в сенсорной коре 1.39 ± 0.02 , 1.41 ± 0.02 и 1.43 ± 0.02 для возрастов ПД10, ПД14 и ПД18, соответственно. Увеличение ФР с возрастом соответствует представлению о том, что по мере созревания отростки микроглии становятся более рамифицированными. Для обеих исследованных структур линейные регрессионные модели показали значимость фактора «возраст»: $p=0.014$ для гиппокампа, $p=0.004$ для сенсорной коры. Модель, построенная по данным сенсорной коры, имела несколько лучшие показатели линейности, как по критериям AIC (-66 для гиппокампа, -75 для сенсорной коры) и BIC (-63 для гиппокампа, -72 – для сенсорной коры), так и по показателю R^2 (0.298 – для гиппокампа, 0.415 для сенсорной коры). Сравнение моделей показало статистически достоверную разницу между ними ($p=0.014$). Учитывая, что средние значения ФР в гиппокампе для каждого возраста, хотя и не достоверно, но меньше, чем значения ФР в сенсорной коре, можно предположить, что статистически достоверная разница между моделями свидетельствует об отставании созревания гиппокампа по сравнению с сенсорной корой. Действительно, по данным литературы формирование долговременной потенциации *in vivo* в сенсорной коре происходит к концу первой постнатальной недели, в то время как в гиппокампе не раньше конца второй постнатальной недели.

Таким образом, в данной работе показана принципиальная возможность использования линейных моделей, построенных на морфологических характеристиках глиальных клеток, для сравнения траекторий созревания структур мозга.

Работа поддержана грантом РФФИ № 23-25-00463.

**ЭНУКЛЕАЦИЯ ООЦИТОВ МЫШИ И ЧЕЛОВЕКА ПРИ ПОМОЩИ 1033 нм
ФЕМТОСЕКУНДНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ**

Осыченко А.А., Егорова М.С., Мартиросян Д.Ю., Залесский А.Д.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный
исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук,
Москва, Россия

alina.chemphys@gmail.com

Получение реципиентного цитопласта – яйцеклетки, не содержащей ДНК – актуальная задача для современной биомедицины. Реципиентный цитопласт используется для переноса ядер соматических клеток (клонирования) у животных и для реализации метода цитоплазматической замены (получения «детей от трех родителей») – на ооцитах человека. В обычной практике эта процедура выполняется при помощи микроманипулятора: плазматическую мембрану прокалывают микроиглой, а затем проводят аспирацию метафазной пластинки. Этот процесс традиционно так же принято называть энуклеацией. В настоящей работе демонстрируется иная, малоинвазивная методика подготовки реципиентного цитопласта, которая предполагает использование остросфокусированного фемтосекундного лазерного излучения ближнего инфракрасного диапазона для инактивации метафазной пластинки ооцита.

Ранее энуклеация при помощи пико- и фемтосекундного лазера была показана на ооцитах мыши и ооцитах свиньи. В этих работах для визуализации метафазной пластинки использовали витальный флуоресцентный краситель Hoechst. Наша научная группа разработала иной, оригинальный подход: при помощи поляризационной микроскопии без всякого окрашивания в ооцитах визуализировали веретено деления, и, ориентируясь на его расположение, проводили лазерное воздействие, за счет которого инактивировалась метафазная пластинка. Эффективность данной методики доказана при помощи флуоресцентного окрашивания, а также при помощи партеногенетической активации: энуклеированные ооциты теряли способность развиваться, в то время как ооциты, облученные аналогичным образом в свободную от метафазной пластинки цитоплазму, развивались на уровне ооцитов контрольной группы. Кроме того, нами продемонстрирована так же принципиальная возможность проведения фемтосекундной лазерной энуклеации на ооцитах человека.

Работа поддержана грантом РФФИ №21-75-10155.

РОЛЬ БЕЛКОВ ТЕПЛООВОГО ШОКА Hsp90 α И Hsp90 β В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ КЛЕТОК В НОРМАЛЬНЫХ И СТРЕССОВЫХ УСЛОВИЯХ

Петренко В.С., Врублевская В.В., Скарга Ю.Ю., Жмурина М.А., Моренков О.С.

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

79182797935@yandex.ru

Белок теплового шока 90 (Hsp90) является консервативным молекулярным шапероном, участвующим в фолдинге, стабилизации и регуляции активности клеточных белков, называемых «клиентскими» белками Hsp90. Более 700 белков, включая рецепторы стероидных гормонов, протеинкиназы, факторы транскрипции и многие другие, являются белками-клиентами Hsp90. В этой связи, Hsp90 опосредует множество клеточных процессов, таких как выживание, пролиферация и дифференцировка клеток, миграция, контроль клеточного цикла, внутриклеточная сигнализация. В клетках млекопитающих существуют две изоформы Hsp90 – Hsp90 α и Hsp90 β (гомология ~ 86%). Считается, что Hsp90 α является стресс-индуцибельной изоформой Hsp90, экспрессируемой в ответ на негативные воздействия на клетку, в то время как Hsp90 β – конститутивная изоформа, выполняющая функции, связанные с поддержанием жизнедеятельности клетки. Однако, существует мало экспериментальных данных, подтверждающих функциональные различия между двумя изоформами. Целью работы была оценка роли Hsp90 α и Hsp90 β в функционировании клеток в нормальных и стрессовых условиях.

Ранее, используя технологию CRISPR/Cas9, мы получили несколько мутантных линий клеток фибросаркомы человека HT1080 с нокаутом гена *HSP90AA1*, кодирующего Hsp90 α (Hsp90 α -КО), и гена *HSP90AB1*, кодирующего Hsp90 β (Hsp90 β -КО). Клетки Hsp90 α -КО оказались больше по размеру по сравнению с остальными линиями, клетки Hsp90 β -КО занимали промежуточное положение, а наименьший размер имели клетки материнской линии. Выявлена положительная корреляция между интенсивностью прямого светорассеяния и площадью распластывания клеток: площадь распластывания клеток HT1080 составляла менее 40 μm^2 , в то время как у Hsp90 β -КО клеток диапазон данного показателя варьировал от 40 до 60 μm^2 , у Hsp90 α -КО – от 50 до 75 μm^2 . Нокаут генов *HSP90AA1* и *HSP90AB1* практически не влиял на пролиферацию клеток, по сравнению с исходной клеточной культурой. Однако, отсутствие Hsp90 β изоформы критически сказалось на подвижности клеток Hsp90 β -КО клонов, которые мигрировали значительно медленнее всех остальных клеточных линий. Нокаут *HSP90AB1* влиял на адгезию клеток: клоны Hsp90 β -КО имели более слабые адгезивные контакты с поверхностью подложки (пластик, стекло), чем клетки Hsp90 α -КО и HT1080. Мы не выявили различий в устойчивости всех мутантных линий к воздействию теплового шока и окислительного стресса, по сравнению с исходной культурой клеток.

Полученные данные свидетельствуют, что изоформы Hsp90 α и Hsp90 β обладают функциональной взаимозаменяемостью в основных процессах жизнедеятельности клетки: пролиферации, миграции, ответе на стрессовые воздействия. Обе формы играют важную роль в организации и поддержании цитоскелета, от которого зависит размер и распластывание клеток на поверхности. Hsp90 β играет более важную роль в процессах миграции и адгезии клеток и Hsp90 α изоформа, синтезируемая в Hsp90 β -КО клетках, не способна полностью компенсировать потерю Hsp90 β в этих клеточных процессах.

КОМПОЗИТЫ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ И ХИТОЗАНА ДЛЯ ДОСТАВКИ L-АСПАРАГИНАЗЫ В ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ

Петряев Е.Р.¹, Королёва С.А.^{2,3}, Шишпарёнок А.Н.², Жданов Д.Д.²

¹Московский политехнический университет, Москва, Россия

²Институт биомедицинской химии (ИБМХ), Москва, Россия

³Российский университет дружбы народов (РУДН), Москва, Россия

e.r.petriaev@gmail.com

L-аспарагиназа (L-АСП) представляет собой фермент, используемый в клинике в качестве химиотерапевтического средства для лечения острого лимфобластного лейкоза. Недавние исследования показали, что L-АСП также обладает клиническим потенциалом при лечении некоторых солидных опухолей. Известно, что коммерческие L-АСП обладают коротким периодом полувыведения и быстрым клиренсом из плазмы крови под действием нативных протеаз. Для улучшения данных характеристик для ферментов часто применяется инкапсуляция или иммобилизация на различных носителях. Бактериальная целлюлоза (БЦ) может использоваться в качестве носителя для лекарственных соединений, поскольку биосовместима, нетоксична, проста в производстве и имеет высокую чистоту по сравнению с целлюлозой растительного происхождения. Высокая пористость БЦ придает ей большие сорбционные свойства, что важно для иммобилизации белков.

Различные модификации изменяют сорбционные свойства БЦ и влияют на активность иммобилизованных ферментов. Одним из перспективных соединений для модификации БЦ является хитозан.

Нами оптимизирована стратегия получения модифицированных хитозаном пленок БЦ, на которые осуществлена иммобилизация 0.06 мг фермента L-АСП *Erwinia carotovora*. Было показано, что наилучшими характеристиками обладали пленки, выращенные в течение 72 ч. Модификацию БЦ проводили 0.05% хитозаном (50 кДа) в течение 1 ч при 37°C при постоянном перемешивании и последующим погружении в 0.5% глутаровый альдегид. Реакцию в глутаровом альдегиде проводили в течение 1 ч при 22°C и останавливали 0.1 М HCl. Релиз L-АСП из пленок БЦ-хитозан *in vitro* определяли путем инкубации пленки в 25 мл 50 мМ буфера HEPES (pH 8.0) без субстрата в течение 7 ч. Через каждый 1 ч отбирали 300 мкл индивидуальной пробы и определяли активность L-АСП по концентрации ионов аммония методом прямой нesslerизации.

С помощью кинетических моделей релиза (0-го порядка, 1-го порядка, Higuchi, Korsmeyer-Peppas и Hixson-Crowell) были получены данные о модели релиза L-АСП из композитов БЦ-хитозан и определен механизм релиза. Наиболее подходящими моделями для описания релиза была модель Higuchi ($R^2 = 0.913$) и модель Korsmeyer-Peppas ($n < 0.45$), что позволяют рассматривать высвобождение L-АСП из композитов БЦ-хитозан как диффузионный процесс, подчиняющийся I закону Фика. Пленки, загруженные L-АСП, также обладали высокой цитотоксичностью в отношении линии меланомы A875: выживаемость составляла менее 15% через 72 ч. Таким образом, пленки БЦ, модифицированные хитозаном, можно использовать для иммобилизации L-АСП и ее доставки в клетки некоторых солидных опухолей.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021-2030 годы) (№ 122022800499-5).

ФОРМИРОВАНИЕ АЛЬГИНАТНЫХ МИКРОГЕЛЕЙ С ГЕТЕРОГЕННОЙ СТРУКТУРОЙ С ДВУМЯ ТИПАМИ КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ КАПЕЛЬНОЙ МИКРОФЛЮИДИКИ

Плешаков П.С.¹, Букатин А.С.^{1,2}, Филатов Н.А.¹

¹Санкт-Петербургский национальный исследовательский Академический университет имени Ж.И. Алфёрова РАН, Санкт-Петербург, Россия

²Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург, Россия

avekip@gmail.com

В настоящее время вырастает потребность в развитии технологий создания стандартизированных моделей тканей и органов для тестирования лекарств, изучения межклеточных взаимодействий, а также использования в тканевой инженерии. Обычно для этого используют гидрогели, наполненные клетками, которые имитируют внеклеточный матрикс. Это позволяет клеткам формировать тканеподобные структуры. Интерес представляют собой гидрогелевые микрочастицы – микрогели. В отличие от макромасштабных гидрогелей, в них нет проблемы плохой диффузии газов и питательных веществ. Технологии капельной микрофлюидики позволяют получать микрогели с настраиваемыми одинаковыми размерами, составом и внутренней структурой. Упорядоченно помещая несколько типов клеток в такой миниатюрных носитель, возможно создать модельный образец ткани, более похожего на нативные, чем в случае использования одного типа клеток, беспорядочно распределенных по микрообъёму.

В работе были получены комплексные альгинатные микрогели диаметром 100-120 мкм с внутренними компартментами и инкапсулированными клетками. Альгинат был выбран в качестве гидрогеля из-за простой реализации полимеризации водной эмульсии внутри микрофлюидного чипа. Полимеризация происходила в чипе с использованием в водной фазе комплекса Са-ЕДТА в качестве агента сшивки с содержащейся в масляной фазе уксусной кислоты в качестве инициатора реакции. В качестве водной дисперсной фазы использовали раствор предшественника альгинатного гидрогеля (2 мас./об.%). В качестве непрерывной масляной фазы использовалось фторированное углеродное масло (HFE), содержащее 1 об.% поверхностно-активных веществ и 1,2-1,5 % об./об. уксусной кислоты, а HFE, содержащую 10 об.% разрушителя эмульсии, использовали в качестве фазы непрерывной промывки для нарушения стабильности границы раздела вода/масло для последующим переходом микрогелей в питательную среду.

Для формирования клеточных микрогелей со структурой ядро-оболочка суспензию с клетками СТ26 EGFP в растворе предшественника альгинатного гидрогеля добавляли во внутреннюю дисперсную фазу, в то время как во внешней дисперсной фазе оставили чистый раствор гидрогеля. Для формирования двухсторонних клеточных микрогелей использовали раковые клеточные культуры СТ26 EGFP и HeLa. Собранные клетки HeLa предварительно окрашивали 1мМ раствором красителя Hoechst. Суспензию двух типов клеток в растворе предшественника гидрогеля соответственно добавляли в два параллельных микроканала водной фазы. Для оценки жизнеспособности клеток использовали live/dead test. В качестве красителя мертвых и поврежденных клеток был йодистый пропидий. Живые клетки линии СТ26 EGFP флуоресцировали зеленым светом.

В результате были получены структурированные микрогели с клетками, содержащие один или два типа клеток. Разработаны микрофлюидные устройства и протокол по получению микрогелей. Были исследованы жизнеспособность клеток и динамика роста сфероидов внутри микрогелей. Результаты показывают, что такой способ получения микрогелей с клетками является многообещающей стратегией для использования в качестве микромоделей тканей для тестирования лекарств, а также как компонента нового поколения биочернил для создания искусственных органов.

Работа поддержана грантом РФФИ № 20 74 10117.

ВЛИЯНИЕ КАТАЛАЗЫ НА ОКИСЛЕНИЕ ЛИПОСОМАЛЬНОГО ГЕМОГЛОБИНА

Пукасева А.А., Чертолясова А.М., Шилова Е.В., Колтаков И.А., Артюхов В.Г.

Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

alenaaleksandrovna962@gmail.com

В настоящее время актуальной задачей биомедицины является разработка безопасных и эффективных заменителей крови на основе гемоглобина. Инкапсуляция гемоглобина в липосомальные структуры может предотвратить негативные токсические эффекты применения свободных форм гемоглобина. Однако гемоглобин в составе липосом подвергается окислению в силу отсутствия защищающих факторов, которые присутствуют в эритроцитах (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза и др.) и низкомолекулярных антиоксидантов (НАДФН, глутатион, аскорбат, α -токоферол и др.). Цель работы – включение каталазы в гемосомы и оценка состояния гемоглобина в структуре липосом. «Stealth»-липосомы получали, «пришивая» полиэтиленгликоль-400 (ПЭГ) к молекуле холестерина [1], в результате образовался комплекс холестерин-полиэтиленгликоль-холестерин (Хл-ПЭГ-Хл). Получение комплекса контролировали с помощью метода ИК-спектрофотометрии. Раствор фосфатидилхолина (Sigma) (0.5%), холестерина (Sigma) (0.5%) и синтезированного Хл-ПЭГ-Хл (0.01%) выпаривали на ротормном испарителе IKA Control. Далее к липидной пленке добавляли 0.1 М натрий – фосфатный буфер, содержащий гемоглобин, выделенный по методу D.Drabkin [2]. В опытном образце использовали буфер, содержащий, помимо гемоглобина, раствор каталазы с концентрацией 10^{-6} М (Sigma). Перемешивали образцы в течение минуты, осуществляя самосборку липосом. Размер стандартизировался путём продавливания суспензии липосом через поликарбонатные фильтры с размером пор 200 нм. Методом динамического рассеяния света было установлено, что гидродинамический диаметр синтезированных частиц составил $150,8 \pm 19,1$ нм. О состоянии гемоглобина судили с помощью метода спектрофотометрии. Регистрацию разностных спектров поглощения проводили на спектрофотометре Shimadzu UV-2401 PC (Япония). Через 12 часов инкубации при температуре 37°C в контрольном образце гемосом максимум полосы Core сдвинулся в коротковолновую область (с 410 до 405 нм), при инкубации гемосом с каталазой статистически значимых изменений положения полосы Core зафиксировано не было.

Результаты исследований были частично получены на оборудовании ЦКП НО ВГУ.

Работа выполнена за счет Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2023-2025 годы, проект № FZGU-2023-0009.

1. Yufang Wang, Jianzhu Wang, Mingshuang Sun, Jiyan Zhang and Yanping Bi. Coating liposomes with ring-like PEG: the synthesis and stealth effect of cholesterol-PEG-cholesterol / Materials Mater. Adv., 2022, **3**, 2417-2424
2. Артюхов В.Г. Практикум по биофизике / В.Г. Артюхов [и др.] — Воронеж: Изд-во ВГУ, 2016. – 314 с.

ПРОТИВОРАКОВЫЙ ПОТЕНЦИАЛ РЕСВЕРАТРОЛА: ДОЗОЗАВИСИМОСТЬ И МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ

Романова С.А., Мамошина А.А., Дружбина А.А., Снытко Д.В.

Направление «Биоквантум», Детский технопарк «Кванториум» – структурное подразделение
БУООДО «Дворец пионеров и школьников им. Ю.А. Гагарина», Орел, Россия

s.pirogova09@mail.ru

Тема БАД вообще и применения ресвератрола, в частности, привлекает значительное внимание со стороны как коммерческих предприятий, так и потребителей. Столь сильный интерес к БАДам был спровоцирован и недавно прошедшей пандемией, и хорошей маркетинговой политикой компаний, производящих БАДы. В свою очередь, ресвератрол заявляется как вещество, обладающее широким спектром биологической активности, включающей в себя антиоксидантное, нейро- и кардиопротекторное, противораковое и другие свойства. В связи с этим значительный интерес для потребителей представляет употребление содержащих ресвератрол БАД. Тем не менее до сих пор ведутся дискуссии о достоверности положительного эффекта ресвератрола. И целью работы выступила проверка противоракового свойства ресвератрола, которую заявляют производители БАД в рекламе.

Для проведения исследований использовали культуру клеток мышинной меланомы В16, которую культивировали по стандартной методике на среде на основе ДМЕМ. Для приготовления концентрата ресвератрола использовался БАД известный фирмы Solgar, содержащий в одной капсуле 100 мг вещества, а в качестве растворителя выбрали этанол. В опыте было решено использовать следующие концентрации действующего вещества: 20 мкМ, 40 мкМ, 60 мкМ, 80 мкМ и 100 мкМ. Клетки меланомы были рассажены в 12 чашек Петри, 10 из которых содержали концентрат ресвератрола, а 2 представляли контрольную группу, т.е. в них добавляли этанол. А через 24 часа исследованы на предмет развития некроза с помощью красителей Ноеchst 33342, окрашивающего ядра всех клеток, и Propidium Iodide, окрашивающего ядра некротических клеток, и с использованием лазерной сканирующей конфокальной микроскопией.

Ресвератрол показал токсичность в отношении раковых клеток при любой концентрации, демонстрируя достаточно необычную дозозависимость эффекта. Наибольшую противораковую активность ресвератрол проявил при средних значениях (40 мкМ), но при увеличении концентрации некротических клеток становилось меньше. Однако необходимо понимать, связано ли это с иным механизмом гибели клеток, или с тем, что ресвератрол стимулирует пролиферацию клеток при высокой концентрации.

Для этого проведен эксперимент, при котором в течение нескольких дней осуществлялся мониторинг за пролиферацией клеток меланомы под воздействием максимальной концентрации ресвератрола (100 мкМ). В результате было выявлено, что ресвератрол сдерживает рост клеток и сильно изменяет их морфологию, что тоже является проявлением токсического эффекта. Однако механизм такого действия отличается от экспериментов с более низкой концентрацией.

Исходя из полученных данных, следующий эксперимент был направлен на сравнение механизма действия ресвератрола на самой активной концентрации – 40 мкМ и максимальной – 100 мкМ. Клетки меланомы В16 были рассажены в 9 чашек Петри и обработаны соответствующими концентрациями ресвератрола и этанола. Жизнеспособность клеток

оценивалась через 24 часа после их обработки. Для этого дополнительно к Hoechst 33342 и Propidium Iodide добавлялся аннексин 5, связывающийся с мембранами апоптотических клеток.

Как показывают полученные результаты, для средней концентрации ресвератрола (40 мкМ) характерно стимулирование именно некроза, в то время как при содержании в 100 мкМ наблюдается существенное увеличение доли апоптотических клеток.

На основе совокупности экспериментальных данных можно сказать, что прогнозирование эффекта от приема ресвератрола из БАДов является достаточно трудной задачей. И подобная неоднозначность в механизме действия ресвератрола позволяет говорить о необходимости создания комплекса синергических веществ, который в совокупности позволял бы получать прогнозируемый эффект. На этом и будет сконцентрировано развитие данной исследовательской работы.

РЕЗУЛЬТАТЫ СРАВНИТЕЛЬНОЙ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ НЕРВНОГО КОНДУИТА НА ОСНОВЕ ИОНООБМЕННОЙ МЕМБРАНЫ

Русинова Т.В., Асякина А.С., Мелконян К.И., Виноградов Р.А.

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

alevtina.asyakina@mail.ru

Ежегодно более одного миллиона людей в мире получают травмы периферических нервов, что оказывает существенное влияние на их качество жизни. Патология сопровождается нарушением иннервации тканей, расстройствами двигательной и/или чувствительной функции. «Золотым стандартом» для устранения дефектов является аутологичная трансплантация нерва. Однако ограниченное количество донорских участков у пациента и необратимые последствия после удаления нерва ограничивают использование данного метода. В настоящее время наибольший интерес при разработке нервных кондуитов представляют электропроводящие материалы, в особенности графен и другие углеродные нанотрубки, которые показали положительные результаты в регенерации периферических нервов. Среди электропроводящих материалов также перспективными являются катионообменные мембраны за счет наличия в структуре карбоксильных групп, протоны или гидроксильные группы замещаются положительно заряженными ионами Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , что обеспечивает проведение химических сигналов в сторону дистальной части нерва.

Цель исследования – оценить эффективность восстановления седалищного нерва крысы при использовании ионообменной мембраны ЛФ4-СК в эксперименте *in vivo*.

Работа была выполнена на крысах линии Wistar ($n=15$), возрастом 3 месяца. Крысам под общим газовым наркозом «Изофлуран» моделировали дефект седалищного нерва размером $1\pm 0,3$ см, после чего имплантировали нервные кондуиты. Крысы были разделены на три экспериментальные группы: контрольная группа №1 ($n=5$) – аутографт; опытная группа №2 ($n=5$) – имплантация трубки из ионообменной мембраны ЛФ-4СК, покрытой полилактидом; группа сравнения №3 ($n=5$) – трубка из полилактида. На 90-е сутки эксперимента проводили электрофизиологические тесты и оценку соотношения обхвата голени оперированной конечности к интактной. Стимулирующий игольчатый электрод вводили в проксимальную часть седалищного нерва примерно на 5 ± 3 мм выше места трансплантата, регистрирующий электрод вводили дистальнее места повреждения, а заземляющий – в мягкие ткани на той же конечности животного. Нервную активность стимулировали импульсом длительностью 0,2 мс каждые 10 с. Скорость проведения потенциала действия измеряли путем деления расстояния между стимулирующим и записывающим электродами на латентное время. Обхваты голени на оперированной и интактной конечностях определяли с помощью измерительной ленты в миллиметрах (мм) в срединной части голени и сравнивались между группами в динамике.

Результаты электрофизиологической оценки экспериментальной модели повреждения седалищного нерва крыс были оценены на основе расчета скорости проведения возбуждения (мм/мс): группа №1 – $56,6\pm 4,14$; группа №2 – $47,2\pm 5,69$; группа №3 – $36,5\pm 2,18$. Соотношение обхвата голени прооперированной конечности по отношению к интактной у крыс группы №1 составило 91%, у крыс группы №2 – 79%, а у крыс группы №3 – 63%. У крыс группы №2 и №3 наблюдалось уменьшение обхвата голени оперированной конечности по сравнению со

здоровой лапой, что говорит о нарушении иннервации и частичной мышечной атрофии икроножной мышцы.

Кондуиты из ЛФ-4СК продемонстрировали лучшую регенерацию седалищного нерва крысы при восстановлении дефекта 10 мм по сравнению с кондуитами из полилактида, что указывает на то, что обеспечение биоэлектрического сигнала имеет важное значение для регенерации периферических нервов. Таким образом, нервные кондуиты на основе ионообменной мембраны являются оптимальным материалом для проведения биоэлектрического сигнала, способствующей регенерации периферических нервов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках научного проекта № 23-25-00540.

РАЗРАБОТКА РЕЛЕВАНТНОЙ МОДЕЛИ НЕРВНЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ИМИТАЦИИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ

Рыкунова Е.Б., Микеладзе М.А., Гужова И.В., Лазарев В.Ф.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии
Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

rykunova.lisa@gmail.com

Нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Гентингтона, вызывают прогрессирующую дегенерацию нервной ткани. Разработка модели нервных клеток человека позволяет более точно изучить молекулярные и клеточные механизмы, лежащие в основе нейродегенеративных процессов, не прибегая к модели на животных. Такие модели могут быть использованы для исследования эффективности потенциальных лекарственных препаратов, а также для понимания основных процессов, приводящих к гибели нервных клеток. Ранее в нашей лаборатории была продемонстрирована дифференцировка мезенхимальных стволовых клеток человека в нейрональный фенотип при помощи изменений компонентов среды, в которой культивируются клетки. В результате исследования влияния различных сред для дифференцировки фибробластов крысы DFK-3, было установлено, что уровень экспрессии генов основных нейрональных маркеров в клетках DFK3-Neu (эмбриональные фибробласты после нейрональной дифференцировки) в среднем в 2-4 раза превышает их уровень экспрессии в клетках DFK3. Повышение экспрессии маркеров зрелых нейронов свидетельствует о приобретении клетками нейронального фенотипа. На молекулярном уровне, вторичные повреждения, приводящие к усугублению нейродегенеративных процессов, выражаются в токсичных метаболитах гибнущих клеток, которые могут накапливаться в спинномозговой жидкости. Для анализа вторичных повреждений мы проводили культивирование дифференцированных клеток DFK3-Neu в присутствии СМЖ травмированных крыс. Таким образом, нами была разработана новая удобная модель для оценки вторичных повреждений после ЧМТ. Ключевой особенностью представленной модели является то, что она позволяет оценить цитотоксического действия СМЖ травмированных крыс на культуру клеток крысы, обладающих нейрональным фенотипом. Подобные модели могут быть использованы при изучении вторичных повреждений при нейродегенеративных процессах различного генеза.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 24-45-10013.

АДЕНОЗИНОВЫЕ РЕЦЕПТОРЫ ПЕРВОГО ТИПА КАК МИШЕНИ ДЛЯ ПОДАВЛЕНИЯ ЭПИЛЕПТИФОРМНОЙ АКТИВНОСТИ

Рязанцева П.Е.¹, Гайдин С.Г.², Майоров С.А.², Косенков А.М.²

¹Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

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

polina.ryazantseva@mail.ru

Эпилепсия является одним из наиболее распространённых неврологических расстройств, поэтому поиск новых соединений, способных подавлять эпилептиформную активность с минимальным побочным действием, остаётся актуальной задачей. Потенциальными мишенями для лечения эпилепсии могут выступать G_i -сопряжённые рецепторы аденозина первого типа (A_1 рецепторы). Целью исследования являлось изучение молекулярных механизмов противоэпилептического действия активации аденозиновых A_1 рецепторов. Объектом исследования являлась нейрон-глиальная культура гиппокампа (возраст культуры 12-14 дней) новорождённых крыс линии Wistar. В экспериментах оценивали динамику внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) в нейронах с использованием ратиометрического Ca^{2+} -чувствительного зонда Fura-2 AM. Изучение механизмов антиэпилептического действия проводили с использованием модели эпилептиформной активности, индуцированной конкурентным антагонистом ГАМК(A)-рецепторов бикикуллином (20 мкМ). Добавление бикикуллина вызывало возникновение квазисинхронных осцилляций $[Ca^{2+}]_i$ (кальциевых колебаний) в нейронах.

Нами было установлено, что агонисты A_1 рецепторов N^6 -ЦГА (N^6 -циклогексиладенозин, 50-1000 нМ) и ССРА (2-хлоро- N^6 -циклопентиладенозин, 50-500 нМ) достоверно подавляли индуцированные кальциевые колебания, в то время как предварительная инкубация с этими агонистами предотвращала их генерацию. Добавление положительных аллостерических модуляторов (PAM) A_1 рецепторов VCP 171 (10 мкМ) и PD81723 (10 мкМ) в свою очередь снижало эффективную концентрацию агонистов (N^6 -ЦГА и ССРА), требуемую для полного подавления колебаний (до 1 нМ в случае N^6 -ЦГА). Мы показали, что в реализацию антиэпилептического действия активаторов A_1 рецепторов вовлечена $\beta\gamma$ -субъединица сопряжённого с рецептором G_i -белка, так как предварительная инкубация в течение 30 минут с ингибитором $\beta\gamma$ -опосредованной сигнализации, галлеином (50 мкМ), приводила к отмене подавления ССРА (100 нМ) индуцированной эпилептиформной активности. Инкубация с ингибитором фосфолипазы C, U-73122 (5 мкМ, 30 минут), частично отменяла эффект ССРА. Селективные ингибиторы $G_i(\alpha)$ -субъединицы, протеинкиназы C, кальмодулина, Ca^{2+} -зависимых калиевых каналов не отменяли эффекта ССРА на эпилептиформную активность.

Негативные последствия отмечающейся при эпилепсии эксайтотоксичности связаны с повышением $[Ca^{2+}]_i$ в нейронах при чрезмерной активации NMDA-рецепторов. В модели острой глутаматной токсичности, вызванной кратковременной аппликацией глутамата (100 мкМ), агонисты A_1 рецепторов предотвращали развитие наблюдаемой в контрольных экспериментах дисрегуляции кальциевого гомеостаза в нейронах.

Полученные данные позволяют рассматривать активаторы A_1 рецепторов не только в качестве перспективных антиэпилептических препаратов, но и в качестве соединений, способствующих нормализации кальциевого гомеостаза в нейронах после острой эксайтотоксичности.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ПНЦБИ РАН № 075-00609-24-01 (№ 1022080100047-5-1.6.4 «Нейропротекторные препараты нового поколения»).

ИССЛЕДОВАНИЕ ФАЗОВЫХ И ХИМИЧЕСКИХ ТРАНСФОРМАЦИЙ ПРЕКУРСОРОВ ГИДРОКСИАПАТИТА В МОДЕЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ

Салынкин П.С.^{1,3}, Минайчев В.В.^{1,2}, Шлыков М.А.², Сенотов А.С.¹

¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики, РАН, Пушино, Россия

²Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова, РАН, Москва, Россия

³Пушинский государственный естественно-научный институт – филиал РОСБИОТЕХ,
Пушино, Россия

salynkin.pavel@yandex.ru

Создание биоактивных материалов для регенерации костной ткани остается актуальной задачей. В настоящее время в качестве главного компонента остеопластических материалов используется гидроксиапатит (ГАп), однако как в нашей лаборатории, так и другими исследователями было показано, что ГАп может проявлять токсические свойства. В связи с этим более перспективными кальцийфосфатными соединениями для создания остеопластических хирургических материалов могут являться физиологические предшественники ГАп.

В качестве исследуемого материала был выбран дикальцийфосфат дигидрат (ДКФД), так как он обладает наибольшей биосовместимостью в сравнении с другими кальцийфосфатными соединениями. Исследование состояло из двух этапов: на первом этапе в модельных средах (фосфатный буферный раствор (PBS) и среда имитирующая ионный состав плазмы крови (SBF)) образцы ДКФД инкубировались в течение 84 дня при 37°C. Образцы извлекались на 1, 3, 7, 14, 28, 42, 56 и 84 сутки. В каждой точке производилась оценка изменения массы образца ДКФД и измерение pH инкубируемых сред. В обоих модельных средах наблюдалось снижение pH и уменьшение массы образцов. С помощью инфракрасной спектроскопии было показано, что на поверхности образцов произошло образование октокальцийфосфата (ОКФ), являющегося промежуточным соединением при трансформации ДКФД в ГАп.

Следующий этап исследования проводился с использованием трех модельных сред: дистиллированная вода, PBS, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) с добавлением неинaktivированной фетальной бычьей сыворотки (ФБС). Исследование проводилось в условиях CO₂-инкубатора с содержанием CO₂ 5% при температуре 37°C в течение 7 суток. Каждый день производилось измерение pH, оценка содержания кальция и подмена 50% среды на новую. Для дистиллированной воды было показано постепенное накопление свободного кальция до 1,09±0,06 мМ на 7 сутки. Для PBS было показано накопление свободного кальция до 0,201±0,01 мМ в первые сутки с дальнейшим снижением концентрации до 0,049±0,003 мМ на 7 сутки. Для среды DMEM + 10% ФБС было показано постепенное уменьшение концентрации свободного кальция с 0,8 мМ до 0,19±0,03 мМ на 7 сутки.

Таким образом было продемонстрировано изменение фазового состава прекурсора ГАп – ДКФД, в модельных условиях. Было показано, что для PBS фактором перекристаллизации ДКФД в ОКФ является накопление свободного кальция до критического значения, что подтверждается результатами первого этапа исследования. Предполагается, что снижение содержания свободного кальция в среде DMEM + 10% ФБС связано с тем, что присутствующие в составе среды белки, аминокислоты и свободный кальций создают подходящие условия для образования ОКФ.

ПОСТРОЕНИЕ ПРОФИЛЯ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ МОДЕЛЬНОГО БЕЛКА АЛЬБУМИНА ИЗ КОМПОЗИТОВ СОСТАВА ПОЛИКАПРОЛАКТОН/ФОСФАТ КАЛЬЦИЯ

Самофалов П.С.¹, Голубчиков Д.О.², Путляев В.И.^{1,2}

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

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Факультет наук о материалах, Москва, Россия

samofalovpavel638@gmail.com

Для лечения сложных повреждений костной, хрящевой и других соединительных тканей используют биосовместимые имплантаты, состоящие из металлов, полимеров или кальцийфосфатной керамики. В частности, наиболее перспективным вариантом является использование скаффолдов – каркасов различного состава, в том числе композитных, состоящих из полимерной матрицы с частицами фосфатов кальция. Данные структуры обеспечивают остеокондуктивность материала, что способствует эффективному восстановлению поврежденных участков ткани. Для обеспечения остеоиндуктивности, ускоренной и эффективной регенерации нативной ткани, в материал помещают стволовые клетки вместе с факторами роста или морфогенетическими белками – сигнальными молекулами, дающие биохимические сигналы к стимуляции роста, пролиферации и дифференциации живых клеток. К факторам роста относят пептиды и гормоны, разделяя их по семействам, основываясь на типе клеток или тканей, рост которых они обеспечивают. Каждая такая молекула имеет ряд важных физико-химических и биологических свойств, которые необходимо учитывать при высвобождении. К таким относятся размер, заряд, изоэлектрическая точка, температурная устойчивость, биологическая активность и многое другое.

Мгновенное высвобождение всего загруженного белка, таких как BMP-2 или PDGF, вызывает раковые заболевания, неврологические заболевания и неправильный рост поврежденной ткани [1]. Таким образом, возникает фундаментальная задача иммобилизации загруженного белка и обеспечения пролонгированного высвобождения за счет модификации материала. В данном исследовании для моделирования процесса выхода факторов роста и морфогенетических белков (BMP) из матрицы материала был использован сывороточный бычий альбумин (BSA), который обладает схожими физико-химическими свойствами с конкретным семейством факторов роста.

В рамках исследования были изучены химический состав и свойства полимерно-неорганического скаффолда, состоящего из поликапролактона (ПКЛ) и частиц аморфного фосфата кальция (АФК). АФК был направленно синтезирован с применением различных ингибиторов, подобранных на основе констант устойчивости комплексов соответствующих лигандов с ионами кальция Ca^{2+} [2]. Для уточнения состава АФК использовались методы инфракрасной спектроскопии и рентгенофазового анализа. Удельная поверхность материала была измерена с помощью метода БЭТ. Размер частиц определяли с использованием методов динамического светорассеяния и растровой электронной микроскопии. Концентрацию белка определяли по протоколу согласно методу Лоури [3]. Для этого погружали материал в фосфатный буфер с белком и измеряли концентрацию через определенные промежутки времени спектрофотометрически.

Список литературы

1. Subbiah R., Guldberg R. E. Materials science and design principles of growth factor delivery systems in tissue engineering and regenerative medicine //Advanced healthcare materials. – 2019. – В. 8. – №. 1. – P. 1801000.
2. Zuev, D.M., Golubchikov, D.O., Evdokimov, P.V. et al. Synthesis of Amorphous Calcium Phosphate Powders for Production of Bioceramics and Composites by 3D Printing. Russ. J. Inorg. Chem. 67, 940–951 (2022).
3. Waterborg J. H. The Lowry method for protein quantitation //The protein protocols handbook. – 2009. – P. 7-10.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗАВИСИМОСТИ МЕЖДУ КОПИЙНОСТЬЮ ТРАНСГЕНА В ГЕНОМЕ И ПРОДУКТИВНОСТЬЮ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ

Сергеев А.О.¹, Дрожжачих М.С.²

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

²Акционерное общество «БИОКАД», Санкт-Петербург, Россия

alexandrsergeev100@gmail.com

Предполагается, что большое число копий трансгена (копийность трансгена) в геноме клетки-продуцента коррелирует с высоким уровнем экспрессии целевого белка. Целью работы является определение зависимости между копийностью трансгена в геноме клонов двух клеточных линий и уровнем их продуктивности. Для выполнения цели были поставлены следующие задачи:

- Оценка числа копий целевых генов (генов тяжёлых и лёгких цепей моноклональных антител) в выбранных клеточных линиях-продуцентах;
- Анализ продуктивности данных клеточных линий в формате периодического культивирования клеток с подпиткой и без подпиток;
- Поиск взаимосвязи измеренных параметров.

В ходе работы использовали клеточные линии СНО-К1, продуцирующие два разных антитела (АТ). Продуктивность выбранных клеточных линий определяли по титру секретируемых ими в культуральную среду рекомбинантных антител с использованием системы Forte-Bio The Octet QK^e System. Для исследования копийности трансгенов лёгкой и тяжёлой цепей выделяли геномную ДНК (гДНК) из клеточных осадков и проводили метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

В ходе исследования было выявлено, что для клонов клеточной линии А, полученных разным количеством раундов введения целевых генетических конструкций в клетки, не наблюдается явной зависимости между копийностью трансгенов лёгкой и тяжёлой цепей антитела в геноме и титром секретируемого клоном белка. Так, у более продуктивных клонов число копий трансгена было ниже, чем у менее продуктивных. Вероятно, это объясняется проведением наибольшего количества раундов введения генетической конструкции в клетки при получении менее продуктивных, а отсутствие у них высокого значения титра – потенциально возможным встраиванием гена интереса в область гетерохроматина.

Тем не менее, для клонов клеточной линии В, полученных проведением одинакового количества раундов введения генетических конструкций, кодирующих цепи антитела В, наблюдается тенденция повышения титра антитела с увеличением копийности трансгенов. Интересным наблюдением является более высокое значение титра АТ, нарабатанного клонами клеточной линии В, в сравнении с титром антитела, продуцируемого клонами клеточной линии А, при меньшем числе копий трансгена обеих цепей антитела в геноме.

Результаты исследования также свидетельствуют о том, что для клонов клеточной линии А наблюдается более широкий разброс значений соотношения копийности трансгена лёгкой и тяжёлой цепей в геноме (от 2:1 до 4:1), чем для клонов клеточной линии В (1:1).

В ходе работы был сделан вывод о том, что универсальная зависимость между копийностью трансгена лёгкой и тяжёлой цепей антитела в геноме и уровнем продуктивности разных клеточных линий СНО не прослеживается. На текущий момент проводится поиск зависимости между уровнем экспрессии матричной РНК цепей антитела в клонах клеточных линий для определения корреляции между параметрами копийности трансгена, уровня экспрессии мРНК и титром нарабатанного клетками белка.

Работа выполнена при финансовой поддержке АО «БИОКАД».

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ В СЕРДЕЧНОЙ ТКАНИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ТКАНЕВОИНЖЕНЕРНЫХ КОМПЛЕКСОВ ИЗ КАРДИОМИОЦИТОВ

Сергеева Т.О.¹, Слотвицкий М.М.¹, Аитова А.А.¹, Цвеляя В.А.^{1,2,3}, Агладзе К.И.^{1,2}

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

²Московский областной научно-исследовательский клинический институт
им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия

³Альметьевский государственный нефтяной институт, Татарстан, Россия

sergeeva4247@gmail.com

Особенностью строения сердечной ткани является ярко выраженная структурная и функциональная анизотропия, необходимая для поддержания нормальной работы сердца [1]. Наиболее распространенной моделью исследования возбудимости сердечной ткани является монослой из кардиомиоцитов, помещаемый на тканево-инженерную субстратную подложку, структурированную таким образом, чтобы придать клеточной культуре требуемую архитектуру. В качестве клеточного материала используют клетки, выделяемые из неонатальных сердец крыс [2] или клетки иммортализованной клеточной линии [3].

В настоящей работе было изучено взаимодействие хозяин–трансплантат при трансплантации кардиомиоцитов на монослой с использованием нановолоконных микроносителей. Были использованы полимерные нановолокна для формирования архитектуры ткани, волны возбуждения регистрировали с помощью установки оптического картирования возбуждения, трехмерные структуры пятна контакта подсаженной сокультуры и монослоя кардиомиоцитов исследованы с помощью конфокальной микроскопии.

Первым и основным компонентом является фрагмент полимерного волокна толщиной приблизительно $0,85 \text{ мкм} \pm 0,18 \text{ мкм}$ ($n = 20$), полученный путем электроформования раствора PLLA. Вторым элементом является белковое покрытие полимерного волокна путем помещения волокон в раствор HFN на 24 часа. Это привело к отложению белка на поверхности волокна, что проявилось в способности кардиомиоцитов прилипнуть к волокнам заданной толщины.

Убедительным доказательством клеточной адгезии является восстановление спонтанной возбудимости клеток. Средний сигнал (mean) был получен на основе следов кальция, полученных из 16 различных клеток (4 разных образца) с частотами спонтанного возбуждения в диапазоне от 0,5 до 1,5 Гц. Важным условием было отсутствие связи между клетками.

Список литературы

1. Baig M.K., Mahon N., McKenna W.J., Caforio a.L., Bonow R.O., Francis G.S., Gheorghide M. The pathophysiology of advanced heart failure // Heart & lung: the journal of critical care. – 1998. – V. 28, N 2. – P. 87-101.
2. Chlopc'ikov'a S., Psotov'a J., P. Miketov'a P. Neonatal rat cardiomyocytes—a model for the study of morphological, biochemical and electrophysiological characteristics of the heart // Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palack'ý, Olomouc, Czechoslovakia. – Dec. 2001. – V. 145. – P. 49-55.
3. Claycomb W.C., Lanson N.A., Stallworth B.S., Egeland D.B., Delcarpio J.B., Bahinski A., Izzo N.J. HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – Mar. 1998. – V. 95. – P. 2979-84.

ВЛИЯНИЕ КАРБАХОЛИНА И БЛОКАТОРОВ ХОЛИНОРЕЦЕПТОРОВ НА НАЧАЛЬНЫЕ СТАДИИ МИОГЕНЕЗА *IN VITRO*

Токмакова А.Р.¹, Сибгатуллина Г.В.¹, Маломуж А.И.^{1,2}

¹Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ Казанский научный центр РАН,
Казань, Россия

²Казанский национальный исследовательский технический университет
им. А.Н. Туполева – КАИ, Казань, Россия

annna.tok@gmail.com

Исследование процессов миогенеза имеет важное значение не только для эмбриологии и фундаментальной биологии, но и для прикладной медицины. Процесс миогенеза обеспечивается дифференциальной экспрессией множества генов, среди которых *MeF*, *Wnt*, *MyoD*, и способен регулироваться рядом сигнальных молекул. В последнее время стали появляться данные о том, что ацетилхолин (основной нейромедиатор в периферической нервной системе) способен интенсифицировать процесс слияния миобластов, а сами мышечные клетки могут быть источником этих сигнальных молекул. При этом механизм действия ацетилхолина на различные этапы миогенеза до конца ещё не установлен.

Целью нашего исследования стала оценка влияния карбахолина (структурного аналога ацетилхолина) и блокаторов ацетилхолиновых рецепторов на развитие первичной культуры миоцитов, полученной из новорожденных крысят. Оценивали такие параметры, как индекс деления (ИД, соотношение делящихся клеток на общее количество клеток) на 2 сутки и индекс слияния (ИС, соотношение ядер в миотрубках к общему количеству клеток в поле зрения) на 4 сутки культивирования.

Установлено, что карбахолин в концентрации 0.1 нМ увеличивает ИД на 54%, тогда как в концентрациях 10 нМ и 1 мкМ это увеличение составляло лишь 22% и 10%, соответственно. Эффект карбахолина (0.1 нМ) на ИД не устранялся ни атропином (блокатором мускариновых холинорецепторов), ни тубокурарином (блокатором никотиновых холинорецепторов). При этом было отмечено, что в присутствии тубокурарина снижается общее количество клеток. Снижение выживаемости культуры при инкубации с тубокурарином было подтверждено с помощью МТТ-теста.

ИС при инкубации с холиномиметиком (0.1 нМ) увеличивался на 17%, а в присутствии более высоких концентраций (10 нМ и 1 мкМ) снижался на 17-20%. ИС при аппликации блокаторов как мускариновых, так и никотиновых рецепторов достоверно снижается на 16%. При этом, положительный эффект карбахолина отсутствует при наличии в среде каждого из используемых нами блокаторов.

Таким образом, мы можем заключить, что наномолярные концентрации холиномиметика оказывают положительное модулирующее влияние на культуру миоцитов млекопитающего (как на этапе роста, так и на этапе дифференцировки культуры). Блокада холинорецепторов оказывает негативное влияние на процесс слияния миоцитов в миотрубки. Но на ростовые параметры культуры негативное влияние оказывает только инактивация никотиновых холинорецепторов.

ПЕРСПЕКТИВЫ МОДЕЛИРОВАНИЯ НЕАПОПТОТИЧЕСКОЙ ГИБЕЛИ
КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
КОМПЛЕКСОВ ПЛАТИНЫ (II)

Тохтуева М.Д.¹, Мелехин В.В.^{1,2}, Абрамов В.М.¹, Ельцов О.С.¹

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

²Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург, Россия

maria.tokhtueva@urfu.ru

Избирательная индукция клеточной гибели в злокачественно перерожденных клетках по механизмам, отличным от апоптоза, является перспективной фармакологической стратегией, так как представляет собой потенциальный способ подавления опухолевого роста без возникновения резистентности к терапии и выраженной токсичности для нормальных клеток. Мы показали, что ранее синтезированный хлор платиновый (II) комплекс 6-(4-((2-этилгексил)окси)фенил)-2,2'-бипиридина действует по отличному от цисплатина механизму действия и является индуктором окислительного стресса и перекисного окисления липидов в клетках глиобластомы A172.

Цитотоксический эффект и показатель полумаксимального ингибирования жизнеспособности культур ($IC_{50} \pm SE$) был исследован с помощью МТТ-теста на пяти клеточных линиях: A549 (карцинома лёгкого), HepG2 (карцинома печени), A172 и T98G (глиобластома), HEK-293 (почка эмбриона человека), в результате чего была определена высокая активность комплекса Pt^{II} в отношении подавления роста культивируемых клеток глиобластомы A172 ($IC_{50} < 10 \mu M$). Дополнительные тесты с применением флуоресцентно меченого аннексина V и пропидия йодида, а также исследования на пролиферативную активность клеток после воздействия на них изучаемым агентом, позволили установить отсутствие индукции апоптоза и блокирования синтеза ДНК, что является основным механизмом действия, широко применяющегося в медицинской практике препарата, цисплатина. Между тем, наличие данных эффектов у цисплатина обуславливает ряд существенных недостатков химиотерапии, связанных с выраженной токсичностью и возникновением устойчивости к лечению. При этом, хлор платиновый (II) комплекс 6-(4-((2-этилгексил)окси)фенил)-2,2'-бипиридина индуцировал значительную выработку активных форм кислорода (АФК) в клетках глиобластомы, что, как мы предполагаем, вызывало перекисное окисление липидов (ПОЛ) мембран, приводящее к необратимым процессам запуска клеточной смерти. Данный эффект был подтвержден в экспериментах с применением антиоксиданта N-Ацетил-L-цистеина, в присутствии которого действие изучаемого соединения блокировалось, что говорит об его выраженных окислительных свойствах.

Таким образом, установлено, что ранее синтезированный комплекс Pt^{II} является индуктором выработки АФК в неопластических клетках, вызывающим ПОЛ и клеточную гибель по неапоптотическим механизмам.

Работа поддержана грантом РФФ №23-23-00375.

ТРИКУЛЬТУРА ГИППОКАМПА КАК ПЕРСПЕКТИВНАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ

Тумозов И.А., Гайдин С.Г., Мальцева В.Н.

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

ivantumoz@mail.ru

Ключевую роль в развитии нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, рассеянный склероз, играет нейровоспаление, участниками которого являются астроглиальные и реактивные микроглиальные клетки центральной нервной системы. Следовательно, для полноценного моделирования указанных патологий *in vitro* популяционный состав нейрон-глиальных культур должен включать эти типы глиальных клеток. Однако в рамках классического протокола получения нейрон-глиальных культур микроглия является минорной популяцией, что не позволяет в полной мере моделировать нейровоспаление. Целью данного исследования являлась разработка протокола приготовления смешанных нейрон-глиальных культур гиппокампа крысы, обеспечивающего сохранение и пролиферацию микроглии в течение длительного срока культивирования.

В ходе исследования были проверены комбинации ростовых факторов, включающие трансформирующий фактор роста (TGF β), интерлейкин 34 (IL-34) макрофагальный колониестимулирующий фактор (MCSF), холестерин. Нами было установлено, что в результате использования комбинации TGF β +IL-34+холестерин увеличения количества микроглиальных клеток не отмечалось, тогда как при использовании комбинации TGF β +MCSF+холестерин популяция микроглии заметно увеличивалась. Для определения зрелости микроглии в культурах, выращенных с использованием этой комбинации факторов (трикультурах), осуществляли моделирование нейровоспаления и оценку индуцированной им клеточной гибели. В качестве индуктора нейровоспаления применялся липополисахарид (LPS), который приводит к активации микроглии и выбросу ей провоспалительных цитокинов, приводящих к гибели нейронов и астроглии в культуре преимущественно по апоптотическому пути. Наибольшая гибель клеток путём апоптоза наблюдалась в трикультурах по сравнению с обычными нейрон-глиальными культурами. Также для определения функциональности микроглии в трикультурах была проведена оценка реактивации астроцитов при добавлении LPS и механическом повреждении (нанесение царапины). В ходе экспериментов было установлено, что реактивация астроцитов происходит в течение трёх дней после нанесения царапины. Астроциты в трикультурах начинали формировать подобие глиального рубца в месте повреждения. Добавление LPS приводило также к реактивации астроцитов в трикультурах уже на вторые сутки инкубации, о чем свидетельствует повышение экспрессии, GFAP (глиальный фибриллярный кислый белок), нестина и виментина в астроцитах по сравнению с обычными нейрон-глиальными культурами. Было установлено, что микроглия отвечает на добавление LPS повышением внутриклеточной концентрации Ca²⁺ и изменением морфологии.

Таким образом, можно заключить, что трикультура гиппокампа может стать перспективной моделью для изучения молекулярных механизмов развития нейровоспаления.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ПНЦБИ РАН № 075-00609-24-01 (№ 1022080100047-5-1.6.4 «Нейропротекторные препараты нового поколения»).

РАЗРАБОТКА НОВЫХ ПРОТОКОЛОВ ХИМИЧЕСКОЙ ТРАНСДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ФИБРОБЛАСТОВ В КАРДИОМИОЦИТЫ С ПОМОЩЬЮ БИОИНФОРМАТИЧЕСКОГО ПРОГНОЗИРОВАНИЯ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ

**Турчанинова Е.А., Аитова А.А., Романова С.А., Коваленко С.Г., Цвеляя В.А.,
Слотвицкий М.М., Агладзе К.И.**

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

turchaninova.ea@phystech.edu

Нарушение нормального режима распространения электрических волн в сердечной ткани может стать причиной сердечной аритмии, асинхронных сердечных сокращений и даже способно привести к остановке сердца или внезапной сердечной смерти. Электрические волны передают возбудимые клетки – кардиомиоциты. Чрезмерное содержание фибробластов в сердечной ткани мешает распространению электрических сигналов. Такое нарушение называется фиброзом, оно является частой причиной аритмии.

Представляемая работа посвящена разработке протоколов химической трансдифференцировки фибробластов в кардиомиоциты. Осуществление прямого репрограммирования без стадий эмбрионального клеточного развития [1, 2, 3] позволит осуществить новые подходы в области терапии фиброзных изменений сердца. Основной целью данной работы было создание новых протоколов трансдифференцировки из фибробластов в кардиомиоциты с повышенной эффективностью и проверкой функциональности получаемых клеток. В задачи работы входили в том числе подбор и постановка контрольных протоколов трансдифференцировки для фибробластов животных, их последующая модификация и разработка протоколов трансдифференцировки для фибробластов человека на основе контрольных.

Для решения представленных задач в работе использовались эмбриональные фибробласты крысы и мыши, а также иммортализованные фибробласты человека. Был поставлен контрольный протокол трансдифференцировки для эмбриональных фибробластов мыши, который был перенесен на эмбриональные фибробласты крысы. Было проведено сравнение четырех различных протоколов трансдифференцировки эмбриональных фибробластов крысы с различными концентрациями молекулярного коктейля CHIR, а также факторов роста. Полученные кардиомиоциты были проанализированы с точки зрения функциональной и электрофизиологической зрелости.

Список литературы

1. Tamer M. A. Mohamed, PhD; Nicole R. Stone, MSc; Emily C. Berry, PhD; Ethan Radzinsky, BSc; Yu Huang, MD; Karishma Pratt, BSc; Yen-Sin Ang, PhD; Pengzhi Yu, PhD; Haixia Wang, PhD; Shibing Tang, PhD; Sergey Magnitsky, PhD; Sheng Ding, PhD; Kathryn N. Ivey, PhD; Deepak Srivastava, MD Chemical Enhancement of *In Vitro* and *In Vivo* Direct Cardiac Reprogramming // 2016
2. Paul W. Burrridge, Elena Matsa, Praveen Shukla, Ziliang C. Lin, Jared M. Churko, Antje D. Ebert, Feng Lan, Sebastian Diecke, Bruno Huber, Nicholas M. Mordwinkin, Jordan R. Plews, Oscar J. Abilez, Bianxiao Cui, Joseph D. Gold, and Joseph C. Wu Chemically Defined and Small Molecule-Based Generation of Human Cardiomyocytes // 2014
3. Xiaojun Lian, Jianhua Zhang, Samira M. Azarin, Kexian Zhu, Laurie B. Hazeltine, Xiaoping Bao, Cheston Hsiao, Timothy J. Kamp, and Sean P. Palecek Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions // 2013

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ГРАФЕНА С КЛЕТКАМИ ЛИНИИ ТНР-1

Усанина Д.И.^{1,2}, Бочкова М.С.^{1,2}, Шардина К.Ю.¹

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, Пермь, Россия

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

usanina_d@mail.ru

Введение. Оксид графена представляет собой перспективный для биомедицины наноматериал. Одна из возможных сфер его применения – терапия опухолевых заболеваний путём фототермического воздействия на раковые клетки. Для внедрения подобных стратегий необходимо комплексное изучение влияния наноматериала на различные параметры как здоровых, так и патологически измененных клеток. Целью нашего исследования было изучение влияния наночастиц оксида графена на цитокиновый профиль клеточной линии ТНР-1 (острый моноцитарный лейкоз).

Материалы и методы. В работе использовали наночастицы оксида графена (Ossila Ltd, Великобритания), размерами 100-200 нм (ОГм) и 1-5 мкм (ОГб), функционализированные линейным (П-ОГ) и разветвленным (рП-ОГ) полиэтиленгликолем. Клетки помещали в питательную среду на основе RPMI-1640 (Gibco, США) с добавлением 2мМ L-глутамин (ICN Pharmaceuticals, США), 100 Ед пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина, 2,5 мкг/мл амфотерицина В (В1, Израиль) и 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки. Далее клетки помещали в 96-луночный планшет в концентрации 50 тыс. клеток/мл и добавляли наночастицы оксида графена до конечных концентраций 5 и 25 мкг/мл (n=4). Контролем служили клетки без добавления наночастиц. Клетки вместе с наночастицами инкубировались в течение 72 часов в CO₂-инкубаторе (37 °С, 5% CO₂). После окончания инкубации супернатанты культур осветляли и замораживали, после чего при помощи мультиплексного анализа определяли содержание 48 цитокинов и хемокинов (набор “Bio-Plex Pro Human Cytokine Screening Panel, 48-Plex”, Bio-Rad, США).

Результаты. В супернатантах культур обнаружено 16 из 48 исследуемых цитокинов, при этом уровень 9 из них (MIP-1β, IL-5, IL-8, MIF, TNF-α, Eotaxin, VEGF, IP-10, PDGF-BB) не изменялся под воздействием наночастиц ОГ. Установлено, что в концентрации 5 мкг/мл наночастицы П-ОГм и П-ОГб приводят к снижению уровня HGF (вне зависимости от размера частиц). Аналогичный эффект оказывали частицы рП-ОГм (25 мкг/мл); кроме того, они вызывали снижение количества TNF-β, RANTES, IL-9, SCGF-β и усиление синтеза MIP-1α и G-CSF. Частицы П-ОГм и П-ОГб в высокой концентрации приводили к снижению уровня SCGF-β и повышали секрецию MIP-1α и G-CSF. Снижение уровня RANTES также происходило при сокультивировании клеток с частицами рП-ОГб (25 мкг/мл).

Выводы. Таким образом, наше исследование впервые продемонстрировало, что наночастицы пегилированного оксида графена способны оказывать воздействие на цитокиновый профиль клеток линии ТНР-1.

Работа выполнена в рамках государственного задания «Исследование функциональной активности лейкоцитов и клеток опухолевых линий в условиях хронических инфекций и под влиянием соединений химического и биологического происхождения», номер государственной регистрации темы: 124021900006-5.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ НА ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННОМ ВНЕКЛЕТОЧНОМ МАТРИКСЕ КАК СПОСОБ ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ/СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Ушаков Р.Е.¹, Ратушный А.Ю.², Буравкова Л.Б.², Бурова Е.Б.¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

²Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

uszakow@yandex.ru

Мезенхимные стромальные/стволовые клетки (МСК) не одно десятилетие привлекают интерес исследователей благодаря способности оказывать терапевтический эффект при многих патологических состояниях. Терапевтические свойства МСК во многом связаны с секрецией ими ростовых факторов, цитокинов, хемокинов, протеаз, шаперонов и внеклеточных везикул. В настоящее время ведётся поиск подходов к прекондиционированию МСК, то есть к усилению секторной функции в целях повышения эффективности применения МСК. Мы предположили, что культивирование МСК на децеллюляризованном внеклеточном матриксе (дВКМ), который обеспечивает более физиологически релевантное микроокружение по сравнению с пластиком, используемым при рутинном культивировании, может оказывать влияние на секреторную функцию МСК.

В исследовании использовались МСК человека из разных источников: десквамированный эндометрий менструальной крови, пульпа зуба, фетальный костный мозг и вартонов студень пупочного канатика. Для получения дВКМ использовались МСК вартонова студня. С помощью ОТ-ПЦР, коллагеновой зимографии и мультиплексного иммуноанализа ростовых факторов, цитокинов и хемокинов мы обнаружили существенную апрегуляцию (вплоть до трёх порядков) матричной металлопептидазы MMP-1, ростовых факторов HGF и FGF-2, цитокинов и хемокинов IL-6, IL-8, GRO-a, GRO-b, CXCL5, CXCL6, G-CSF и MCP-1 при культивировании МСК на дВКМ по сравнению с пластиком. Был проведён ряд *in vitro* тестов с целью оценить, как изменяются свойства кондиционной среды МСК при культивировании на дВКМ (КС-дВКМ): КС-дВКМ существенно стимулировала заживление *in vitro* раны на модели фибробластов 3Т3 и кератиноцитов HaCaT, усиливала хемотаксис моноцитов THP-1 и способствовала образованию капилляроподобных структур клетками эндотелия пупочной вены (HUVEC). Таким образом, культивирование на дВКМ значительно усиливает секрецию МСК паракринных факторов, что приводит к функциональным изменениям кондиционной среды.

Также, мы обнаружили, что культивирование МСК на дВКМ приводит к снижению фосфорилирования киназы фокальной адгезии (ФАК), одного из ключевых регуляторов в передаче сигналов из внеклеточного матрикса через интегриновые рецепторы. Обработка химическим ингибитором ФАК дополнительно усилила дВКМ-индуцированный паракринный ответ МСК. Таким образом, ингибирование ФАК в комбинации с культивированием на дВКМ может рассматриваться как новый способ прекондиционирования МСК.

Для валидации полученных результатов *in vivo* мы использовали мышиную модель острого некроза скелетных мышц, вызванного хлоридом бария. Гистологический анализ показал, что инъекции концентрата КС-дВКМ стимулировали восстановление повреждений, снизив площадь некроза и грануляционной ткани на пятые сутки после индукции некроза и увеличив медианную площадь поперечного сечения регенерирующих мышечных волокон на десятые сутки после индукции некроза.

Полученные данные свидетельствуют о том, что культивирование на дВКМ может использоваться для улучшения терапевтических свойств МСК.

Работа поддержана грантом РФФ №24-24-00324.

ПЛАЗМИДЫ НА ОСНОВЕ НЕТРАНСЛИРУЕМЫХ ЧАСТЕЙ ГЕНА EEF1A1
КИТАЙСКОГО ХОМЯЧКА В КАЧЕСТВЕ ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ
ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ Fc-БЕЛКОВ

Шайфутдинов Р.Р., Гаямова Е.А., Синегубова М.В., Воробьев И.И., Орлова Н.А.

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,
Институт биоинженерии, Москва, Россия

carabustauricus@mail.ru

Fc-слитые белки представляют собой рекомбинантные белки, состоящие из доменов целевого белка и димеризующего Fc-домена иммуноглобулина G. Лекарственные препараты Fc-слитых белков широко используются в клинической практике как разновидность моноклональных антител или варианты терапевтических белков и пептидов с пролонгированным действием.

Данные белки были использованы в качестве модельных объектов для проверки пригодности для практического применения новых экспрессионных векторных плазмид с аттенуацией селекционного маркера, связанного с целевым геном сайтом внутреннего связывания рибосом (IRES). Были выбраны три Fc-слитых биофармацевтических белка, сильно различающиеся по размеру – этанерцепт (TNFR2-Fc, молекулярная масса 150 кДа), абатацепт (CTLA4-Fc, молекулярная масса 92 кДа) и афлиберцепт (EGFR1-EGFR2-Fc, молекулярная масса 115 кДа). Их открытые рамки считывания (ORF) были клонированы в исследуемую векторную плазмиду на основе нетранслируемых частей гена EEF1A1 китайского хомячка, содержащую аттенуированный IRES (internal ribosome entry site — участок внутренней посадки рибосомы) и область ORF дигидрофолатредуктазы (DHFR) с одним PEST-доменом, который приводит к быстрому расщеплению DHFR в цитоплазме клеток. Свойства полученных плазмид сравнивали с контрольными плазмидами, содержащими стандартный IRES и кодирующими интактную DHFR. В качестве клеток-хозяев использовали линию CHO 4BGD, не содержащую активных аллелей гена DHFR, селекцию и генетическую амплификацию проводили путем использования возрастающих концентраций ингибитора DHFR метотрексата.

В случае афлиберцепта для вектора, содержащего маркер с ослабленной аттенуацией уровня экспрессии была получена продуктивность 18 пг/клетку после первичной селекции, однако амплификация не привела к увеличению продуктивности и составила 17 пг/клетку; для вектора, содержащего стандартный маркер была получена продуктивность 12 пг/клетку, амплификация привела к увеличению продуктивности до 56 пг/клетку. В случае абатацепта для вектора, содержащего маркер с ослабленной аттенуацией уровня экспрессии была получена продуктивность 11 пг/клетку после селекции, амплификация привела к увеличению до 17 пг/клетку; для вектора, содержащего стандартный маркер была получена продуктивность 0.46 пг/клетку, амплификация привела к увеличению продуктивности до 12 пг/клетку. В случае этанерцепта для вектора, содержащего маркер с ослабленной аттенуацией уровня экспрессии, была получена продуктивность 3 пг/клетку, после селекции, амплификация привела к увеличению продуктивности до 29 пг/клетку.

Таким образом, аттенуация IRES и дестабилизация селекционного маркера в некоторых случаях приводят к повышению удельной продуктивности клеток в несколько раз, но не являются универсальным способом получения высокопродуктивных линий.

РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К РЕДАКТИРОВАНИЮ ГЕНОМА ПРИ ПОМОЩИ КОМПАКТНЫХ РНК-НАПРАВЛЯЕМЫХ НУКЛЕАЗ

Шептий В.В., Золотаренко А.Д., Брускин С.А.

Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия

v.sheptiy2002@mail.ru

В последнее время технология CRISPR/Cas находит широкое применение в генной инженерии, в научных исследованиях и терапевтических разработках. Наиболее изученной и широко применяемой является нуклеаза SpCas9, относящаяся ко II типу CRISPR/Cas. Несмотря на ее широкое применение, SpCas9 не является оптимальной для редактирования генома клеток млекопитающих из-за трудностей ее доставки в связи с большим размером кодирующей последовательности. В недавних исследованиях был открыт новый тип более компактных ферментов, осуществляющих разрезание двуцепочечной ДНК. К ним относится нуклеаза Un1Cas12f1, основным преимуществом которой по сравнению с SpCas9 является вдвое меньший размер, что повышает эффективность доставки, а также позволяет доставлять экспрессионные конструкции в клетки млекопитающих с помощью аденоассоциированных вирусов.

Целью данной работы являлась разработка подходов к редактированию генома клеток млекопитающих компактной РНК-направляемой нуклеазой Un1Cas12f1 и сравнение ее активности с ферментом SpCas9. В ходе исследования нами были разработаны и собраны конструкции для экспрессии нуклеаз, оптимизированные для работы в клетках млекопитающих, а также различные системы для детекции событий разрезания и репарации на основе гомологичной рекомбинации. При осуществлении редактирования гена флуоресцентного белка tdTomato в клетках НЕК293Т с последующим негомологичным восстановлением концов мы наблюдали потерю клетками способности к флуоресценции в результате целевого нокаута гена. Сравнение по количеству нокаутных клеток не выявило существенных различий в нуклеазной активности систем Un1Cas12f1 и SpCas9. Для количественного анализа целевого редактирования были разработаны системы с двумя гидовыми РНК для получения более протяженных делеций.

Для сравнения эффективности репарации, основанной на гомологичной рекомбинации, были созданы векторы, несущие исследуемые нуклеазы с направляющими РНК к гену CCR5 и донорные конструкции, содержащие плечи гомологии и селективный маркер tdTomato. При осуществлении редактирования нуклеазой SpCas9 и анализе эффективности целевой интеграции методом количественной ПЦР была выявлена тенденция к снижению количества интактного аллеля в отредактированных клетках. Ведутся работы по осуществлению редактирования нуклеазой Un1Cas12f1 с использованием донорных конструкций для последующей оценки эффективности встройки селективного маркера при редактировании клеток.

Результаты данного исследования позволят лучше охарактеризовать нуклеазу Un1Cas12f1 в качестве нового инструмента для направленного редактирования генома.

АНАЛИЗ ВКЛАДА КАСПАЗА-3-ЗАВИСИМОЙ ГИБЕЛИ КЛЕТОК ЭПИДЕРМОИДНОЙ КАРЦИНОМЫ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ РАЗНОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ

Шмакова Д.Е., Горохова А.А., Балалаева И.В.

Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет
им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

dasha-shmakoffa@mail.ru

Фотодинамическая терапия (ФДТ) способна индуцировать различные типы клеточной гибели, как случайной, так и регулируемой природы. Согласно литературным данным, изменение интенсивности воздействия способно привести к изменению типа клеточной гибели, а значит, и к последствиям для организма. Однако экспериментальных данных, проверяющих это предположение, довольно мало, а результаты противоречивы. В связи с этим, целью данной работы стал анализ вклада каспаза-3-зависимой клеточной гибели в ответе эпидермоидной карциномы человека на фотодинамическом воздействии различной интенсивности.

Объектом исследования стала клеточная линия A431-Casper3BG, экспрессирующая FRET-сенсор активности каспазы-3 — Casper3-BG. В качестве фотосенсибилизатора был использован фотосенс (ФГУП «ГНЦ «НИОПИК»). Методом МТТ-теста была исследована фотодинамическая активность фотосенса и определена IC_{50} – концентрация, при которой жизнеспособность клеточной культуры снижается на 50% от контроля без фотосенсибилизатора спустя сутки.

После фотодинамического воздействия (20 Дж/см^2) различной интенсивности (IC_{50} , $2 \times IC_{50}$, $5 \times IC_{50}$ и $10 \times IC_{50}$.) был проведен анализ на развитие каспаза-3-зависимой гибели клеток с помощью конфокальной микроскопии (Axio Observer Z1 LSM-710). Чтобы идентифицировать клеточную гибель, сопровождающуюся нарушением целостности клеточной мембраны, в среду был внесен йодид пропидия (PI). В ходе исследования были выделены несколько групп: «живые» клетки без активированной каспазы-3 или окраски PI, «каспаза+PI-» — клетки, в которых активировалась каспаза-3, «каспаза-PI+» — клетки, окрашенные только PI, «сенсор-» — клетки с потерей сигнала сенсора. При сравнении ответа клеток спустя 4 часа после облучения отмечали наибольшее развитие каспаза-3-зависимой гибели при $5 \times IC_{50}$ и $10 \times IC_{50}$ (34%). При этом доля клеток, погибающих по каспаза-3-независимому механизму, не превышала 4%. Считается, что регулируемая клеточная гибель требует времени, поэтому была проанализирована динамика развития ответа исследуемых клеток в разные временные точки (1, 2, 4, 24 часа) после облучения с фотосенсом в концентрации $2 \times IC_{50}$ и $10 \times IC_{50}$. При $2 \times IC_{50}$ развитие клеточной гибели начиналось через 2 часа после облучения с преобладанием каспаза-3-зависимой клеточной гибели. При этом каспаза-3-независимый путь гибели клеток определялся только через 4 часа после облучения и не превышал 2%. При интенсивности $10 \times IC_{50}$, в отличие от $2 \times IC_{50}$, развитие клеточной гибели начиналось уже через час после облучения. Каспаза-3-независимая гибель клеток наблюдалась уже спустя 2 часа после облучения и с увеличением времени инкубации возрастает, достигая примерно 30% от всей популяции.

Таким образом, фотодинамическое воздействие разной интенсивности действительно является одним из определяющих факторов, способных влиять на тип клеточной гибели линии A431-Casper3BG, увеличение интенсивности воздействия приводит к возрастанию вклада каспаза-3-независимой гибели клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке НЦМУ «Центр фотоники» (соглашение с Минобрнауки РФ № № 075-15-2022-293).

Секция 3

МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ СТРЕПТОКОККОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С МАСТИТОМ И ЭНДОМЕТРИТОМ КРС

Абашин И.Ю., Козырева Н.Г., Горбатов А.В.

Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт
экспериментальной ветеринарии имени К. И. Скрябина и Я. Р. Коваленко
Российской академии наук, Москва, Россия

abashin.il@yandex.ru

Многочисленные исследования подтверждают взаимосвязь *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* и *S. uberis* с воспалением молочной железы и эндометрия матки крупного рогатого скота. Данные заболевания являются причиной снижения качества молока и выхода телят.

Применение молекулярно-биологических методов диагностики, на основе амплификации нуклеиновых кислот (мультиплексной ПЦР тест-системы в режиме реального времени, ПЦР-РВ), позволяет сократить время выявления бактериальных патогенов крупного рогатого скота.

Цель работы: оценить диагностические характеристики, разрабатываемой мультиплексной ПЦР-РВ тест-системы для выявления ДНК стрептококков, ассоциированных с воспалением молочной железы и эндометрия крупного рогатого скота.

Материалы и методы. В ходе исследования использовались пробы молока ($V=1\text{ см}^3$) коров с воспалением молочной железы, смывы с поверхности кожи пораженной доли вымени и вагинальные смывы от животных с воспалением эндометрия матки из хозяйств Ленинградской, Вологодской областей (в общей сложности материал отбирался от 47 животных); музейные штаммы ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (суспензии микроорганизмов в концентрации 6×10^8 КОЕ/см³). Бактериальную ДНК выделяли из 100 мм³ образца с помощью набора «ДНК-Сорб-В». ПЦР-РВ проводили с использованием реагентов отечественного производства. Принадлежность к серогруппе, согласно классификации *Lancefield*, определяли коммерческими наборами отечественного и импортного производства.

Результаты. На основе результатов амплификации ДНК музейных штаммов в качестве положительного контрольного образца и полевых образцов, выявлена частота встречаемости стрептококков: в пробах молока – 9,41% случаев, в смывах – 5,88% случаев. Установлена видовая структура данных микроорганизмов в полевом материале: ДНК *S. agalactiae* встречается в 9,41% случаев (в пробах молока (50%) и смывов (50%)), *S. dysgalactiae* – 4,71% случаев в пробах молока.

В результате сравнения ПЦР исследования и определения серогруппы (группа «В» для *S. agalactiae*; группа «С» для *S. dysgalactiae*) получено 100% совпадение. В случае сравнения с бактериологическими методами обнаружено завышение в 3,5 раза случаев выявления ДНК *S. agalactiae* методом ПЦР-РВ, что свидетельствует о превышении относительной чувствительности методики ПЦР.

В группах здоровых животных с отрицательными результатами серологических и бактериологических методов при применении метода мультиплексной ПЦР-РВ для выявления ДНК *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* и *S. uberis* получили: негативных результатов – 100%, позитивных – 0.

Выводы. В процессе исследования материала от животных с клиническим и субклиническим воспалением молочной железы, и воспалением репродуктивных органов получены данные по диагностическим специфичности (100%) и чувствительности (не ниже таковой у валидационных методов), разрабатываемой мультиплексной ПЦР-РВ тест-системы.

В дальнейшем планируется продолжение широкомасштабных экспериментов по изучению диагностических характеристик.

О ВСТРЕЧАЕМОСТИ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ В МИКРОБИОМЕ КИШЕЧНИКА
ЕВРОПЕЙСКОГО ХАРИУСА *THYMALLUS THYMALLUS* (LINNAEUS, 1758) ИЗ р. ПАЗ
(МУРМАНСКАЯ ОБЛАСТЬ)

Абуладзе В.Г.¹, Зацаринная Е.А.^{1,2}, Головашкина Е.Ю.¹

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Рязанский государственный университет имени С.А. Есенина», Рязань, Россия

²Институт проблем промышленной экологии Севера – обособленное подразделение ФИЦ Кольский научный центр РАН, Апатиты, Россия

microbiog@mail.ru

Микробиом кишечника представляет собой сложную систему, состоящую из разнообразных сообществ микроорганизмов, имеющих решающее значение в физиологическом функционировании организма животных. Формирование системы организм-микробиом происходит под действием различных факторов, в том числе в результате взаимодействия между микроорганизмами, организмом хозяина и окружающей средой. Европейский хариус встречается повсеместно, постоянно, ежегодно в водохранилищах гидроэлектростанций и на участках с быстрым течением р. Паз, протекающей вдоль границы России-Норвегии. Участок реки, где проводилось изъятие образцов рыб, находится вблизи заповедных территории обеих стран, что нивелирует влияние антропогенного фактора на водную экосистему реки. В связи с этим представилась возможность рассматривать микробиом кишечника хариуса в «естественных» условиях. Материалом для бактериологического анализа служил кишечник восьми особей европейского хариуса (5 ♀ и 3 ♂). Определение количества энтеробактерий в составе кишечного микробиома проводили методом предельных разведений (титрационным методом) с высевом на поверхность среды Эндо. В учет включали: энтеробактерии – грамтрицательные, оксидазоотрицательные, не образующие спор палочки, способные ферментировать глюкозу до кислоты и газа при температуре (37 ± 1) 0С в течение 24–48 ч.; общие колиформные бактерии – грамтрицательные, оксидазоотрицательные, не образующие спор палочки, способные расти на дифференциальных лактозных средах, ферментирующие лактозу до кислоты и газа при температуре (37 ± 1) 0С в течение 24–48 ч.; *Escherichia coli*. Идентификация энтеробактерий проводилась с помощью тест-системы для ускоренной биохимической идентификации энтеробактерий «Рapid-энтеро 200 М» (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург). Представители порядка *Enterobacterales* обнаружены во всех обследованных образцах. Среднее содержание энтеробактерий в кишечнике составило от 4,57 x 10⁵ до 2,12 x 10⁹ КОЕ/г, общих колиформных бактерий от 1,2 x 10⁵ до 8,6 x 10⁸ КОЕ/г. В четырех образцах не обнаружено *Escherichia coli*. Изолировано 115 штаммов микроорганизмов. Результаты родовой и видовой идентификации показали принадлежность выделенных энтеробактерий к 12 родам. При этом в анализируемом материале наиболее часто обнаруживались бактерии родов *Citrobacter*, *Providencia* и *Proteus*. Половых различий в представленности энтеробактерий в кишечном микробиоме не обнаружено. Таким образом, исследование показывает, что представители порядка *Enterobacterales* являлись типичными представителями кишечного микробиома европейского хариуса в реке Паз.

ТЕСТИРОВАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИЗОЛЯТОВ ПРОМЫШЛЕННЫХ ЭКОТОПОВ Г. УФЫ НА СУБСТРАТНУЮ АКТИВНОСТЬ ПО ОТНОШЕНИЮ К БЕНТАЗОНУ

Анисимова Л.Г.¹, Жарикова Н.В.²

¹Научно-исследовательский технологический институт гербицидов и регуляторов роста растений с опытно-экспериментальным производством АН РБ, Уфа, Россия

²Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН, Уфа (Россия)

biotechexpert22@gmail.com

Бентазон [3-изопропил-1Н-2,1,3-бензотиадиазин-4(3Н)-он, 2,2-диоксид] – действующее вещество гербицидов контактного действия, проявляющее активность к двудольным сорнякам. Препарат предназначен для уничтожения сорняков после их всходов в посевах зерновых злаковых культур, многолетних трав (клевер, люцерна), в смешанных посевах яровых зерновых с подсевом многолетних трав. По механизму действия вещество относится к препаратам, ингибирующим фотосинтез.

В почве бентазон считается малоустойчивым, среднее время его полуразложения составляет 13 суток, в редких случаях может увеличиться до 3-4 месяцев.

Проведенный анализ литературы показал, что доступных данных по микробной деградации этого соединения очень немного, единичные исследования были сосредоточены в основном на судьбе бентазона в окружающей среде – в почве, воде и песке фильтров водопроводных станций.

Цель работы – изучить субстратную активность бактерий промышленных экотопов по отношению к бентазону как единственному источнику углерода и энергии.

Объектами исследований служили более 20 природных бактериальных штаммов, выделенных из образцов почв территорий крупнотоннажного производства гербицидов (г. Уфа, Республика Башкортостан).

Эксперименты проводились в пяти повторностях на минимальной жидкой солевой среде М9 (г/л: Na₂HPO₄ – 6.0, KH₂PO₄ – 3.0, NaCl – 0.5, NH₄Cl – 1.0, MgSO₄ 7H₂O – 0.3, CaCl₂ – 0.15), содержащей бентазон в концентрации 250 мг/л качестве единственного источника углерода и энергии. Контролем служила минеральная среда с бентазоном без инокуляции клетками бактерий. Оценка результатов исследования проводилась после 7 дней инкубирования при 28°C.

В результате работы из 21 испытанного бактериального изолята бентазон в концентрации 250 мг/л как единственный источник углерода и энергии были способны использовать пять штаммов, а именно ДФ-2, R 2, Lif-1, 3Lif и, в меньшей степени, 26D. Можно сделать вывод, что бентазон является сложным источником углерода для исследованных бактериальных культур.

ОПТИМИЗАЦИЯ ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЭНДОЛИЗИНА МЕТОДОМ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ ФЕРМЕНТА

Антонова Н.П., Климова А.А., Лендел А.М., Григорьев И.В., Васина Д.В.

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного
академика Н. Ф. Гамалеи, Москва, Россия

northernnatalia@gmail.com

Органами здравоохранения ежегодно фиксируются новые случаи инфекционных заболеваний, вызванные бактериями с множественной лекарственной устойчивостью. Одним из подходов для решения данной проблемы является разработка альтернативных лекарственных средств, в частности, на основе литических ферментов бактериофагов – эндолизинов. В настоящее время для эндолизинов и их модифицированных производных показана высокая активность *in vitro*, эффективность на животных моделях инфекций и безопасность в доклинических исследованиях. Тем не менее, при внутривенном применении эндолизины, как и другие терапевтические белки, быстро подвергаются деградации за счет действия протеаз крови, фильтрации через почки, и выводятся из системного кровотока. В связи с этим, данное исследование направлено на создание модифицированных молекул эндолизинов для внутривенного применения с целью улучшения их фармакокинетических параметров и пролонгации действия в системном кровотоке.

В качестве модельной молекулы был выбран эндолизин LysAp22-SMAP, чья последовательность была получена на основе литического фермента бактериофага, заражающего *Acinetobacter baumannii*. Нами было показано, что данный эндолизин обладает антибактериальной активностью в отношении широкого спектра грамотрицательных патогенов. С помощью направленной генно-инженерной модификации в его структуру были введены несколько типов альбумин-связывающих доменов (АСД) размером от 12 до 58 аминокислот на N- и C-концах молекулы. Такой тип модификации позволит ферменту связываться с альбумином крови, снизить клубочковую фильтрацию целевой молекулы и увеличить время полувыведения.

Рекомбинантные белки экспрессировали в штамме-продуценте *E. coli* BL21(DE3)pLysS и очищали с помощью двухстадийной хроматографии (ионообменная и гель-фильтрационная). Часть молекул экспрессировалась в составе телец включения, и была успешно рефолдирована. Было показано, что все исследованные варианты модификаций значимо не влияют на *in vitro* антибактериальную активность фермента в отношении модельного штамма *A. baumannii*. При этом, продукция рекомбинантного белка зависела как от типа АСД, так и от способа гибридизации (на N- и C-конец полипептида эндолизина). В дальнейшем будут проведены фармакокинетические исследования данных белков при внутривенном введении лабораторным животным по сравнению с исходным эндолизином. Реализация данной стратегии создаст предпосылки для разработок инновационных антибактериальных препаратов для парентерального применения с пролонгированным действием на основе энзимотиков для лечения угрожающих жизни бактериальных инфекций, вызванных устойчивыми к антибиотикам грамотрицательными штаммами.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-74-01068, <https://rscf.ru/project/23-74-01068/>.

ОЦЕНКА УСТОЙЧИВОСТИ ШТАММА *ACHROMOBACTER INSOLITUS* LCU2 К СОЛЯМ ТЯЖЁЛЫХ МЕТАЛЛОВ

Астанкова А.С.¹, Бурыгин Г.Л.^{1,2}

¹Саратовский национальный исследовательский государственный университет
им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия

²Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ «Саратовский
научный центр РАН», Саратов, Россия

asastankova@gmail.com

Тяжелые металлы, как микроэлементы, при низких концентрациях являются необходимой частью питания организмов и благотворно воздействуют на рост бактерий, растений и животных. Однако при высоких концентрациях они становятся токсичными, вызывая функциональные нарушения и отравления. Антропогенное загрязнение тяжелыми металлами окружающей среды является серьезной проблемой, поэтому одним из главных направлений современной науки является поиск эффективных методов биологической ремедиации почвы и воды. Рост-стимулирующие ризобактерии, обладающие устойчивостью к тяжёлым металлам, могут одновременно снижать негативное действие поллютантов и улучшать в стрессовых условиях рост растений, используемых для аккумуляции токсикантов из природных источников.

В данном исследовании проводилось определение устойчивости к тяжелым металлам ризосферного штамма *Achromobacter insolitus* LCU2, выделенного из корней люцерны в условиях загрязнения глифосатом и солями меди. Ранее для этой бактерии была продемонстрирована устойчивость к высоким концентрациям меди (II) в среде культивирования.

Бактериальную культуру выращивали на жидкой малатно-солевой среде, в которую были добавлены соли серебра, меди, кадмия, свинца и цинка в концентрациях от 100 нМ до 100 мМ. Культивирование проводили в 96-луночных планшетах при 35°C в течение 24 часов. После внесения бактерий (10^5 кл./мл) и по окончании инкубирования в каждой лунке измерялась оптическая плотность при 595 нм с помощью планшетного ридера Multiskan Ascent (Thermo). Рост бактериальной культуры в каждой лунке оценивался по изменению оптической плотности. Для каждого токсиканта рассчитывались значения минимальной ингибирующей концентрации (МИК), угнетения роста на 50% (EC_{50}) и максимальная толерантная концентрация (МТК) относительно контрольной культуры (без токсикантов).

Анализ результатов показал, что штамм *Achromobacter insolitus* LCU2 был способен к росту при концентрациях более 1 мМ солей меди (II), цинка (II), кадмия (II) и свинца (II). Значения EC_{50} для этих токсикантов составили: 1,6 мМ для Cu^{2+} , 15 мМ для Zn^{2+} , 13 мМ для Pb^{2+} и 0,2 мМ для Cd^{2+} . В отличие от добавления в среду культивирования нитрата серебра (I). Рост штамма LCU2 наблюдался только при концентрации в среде серебра (I) ниже 3 мкМ, а значение EC_{50} для Ag^+ составило 0,6 мкМ. Таким образом, на основании проведенных экспериментов можно сделать вывод об устойчивости штамма *Achromobacter insolitus* LCU2 к высоким концентрациям меди, цинка, кадмия и свинца и чувствительности к серебру. Предположительно, такая устойчивость к тяжёлым металлам у штамма LCU2 обеспечивается функционированием эффлюкса системы RND, гены которой ранее были описаны в геноме данного штамма (номер в GenBank – CP038034). Дальнейшая работа будет направлена на выявление генов, вовлечённых в устойчивость к каждому из исследованных тяжёлых металлов.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-24-00520,
<https://rscf.ru/project/24-24-00520/>.

БИОДЕГРАДАЦИЯ КРАСНОГО ФОСФОРА ПРИ ПОМОЩИ АСПЕРГИЛЛА

Ахбарова Л.И.¹, Миндубаев А.З.², Бабынин Э.В.³, Бадеева Е.К.¹

¹Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова Казанского научного центра
Российской академии наук, Казань, Россия

²Казанский национальный исследовательский технологический университет
(КНИТУ КХТИ), Казань, Россия

³Татарский НИИ АХП ФИЦ КазНЦ РАН, Казань Россия

a.mindubaev@knc.ru; mindubaev-az@yandex.ru

В представленной работе исследовалась возможность использования метода биотрансформации для ликвидации последствий загрязнения красным фосфором с использованием грибов черных аспергиллов *Aspergillus niger*. Ранее данный метод использован для окисления белого фосфора, который имеет первый класс опасности, до безвредных фосфат-ионов. Красный фосфор намного более термодинамически стабилен, и это затрудняет его ферментативный метаболизм. Вследствие большей термодинамической устойчивости, красный фосфор, в сравнении с белым, должен медленнее и с большим трудом подвергаться биологической, ферментативной деструкции. Опасность загрязнений красным фосфором состоит, главным образом, в том, что это вещество горючее и продукты горения токсичны. Попытки использовать красный фосфор в качестве высококонцентрированного фосфорного удобрения делались ранее, но не привели к практическому внедрению результатов. Тем не менее, более поздние исследования показали, что красный фосфор служит источником биогенного элемента для тех же самых грибов, которые использовались для биотрансформации белого фосфора. Поэтому, разработка способа биотрансформации красного фосфора актуальна. В представленной работе показаны полученные количественные данные по биотрансформации красного фосфора *A. niger* AM1 ВКМ F-4815D.

Установлено достоверное увеличение скорости окисления красного фосфора, выраженное через накопление фосфат-ионов. Фосфат-ионы являются конечным продуктом окисления под воздействием метаболизма растущего в культуральной среде аспергилла. Для точной оценки биотрансформации красного фосфора проводилось добавление содержания фосфатов в биомассе гриба, который интенсивно поглощает фосфат-ионы из окружающей среды, к измеренной концентрации фосфат-ионов в культуральной среде. Соответственно, можно предполагать, что с учетом фосфатов в биомассе разница между контролем и опытом должна быть существенной. По сравнению с контролем – стерильной средой, содержащей красный фосфор, скорость возрастает в 1.25 раз. Разница достоверная и проявляется в каждом повторе эксперимента. Причина небольшого увеличения скорости окисления заключается в окислении красного фосфора в процессе хранения. Поскольку аспергилл изначально рос в среде, обогащенной фосфатами, активность процесса биотрансформации красного фосфора была снижена по сравнению с теоретически возможной.

Работа поддержана грантом ИВФ РТ №4277-23092021.

RHODOCOCCUS SP. SP12-1 – ДЕСТРУКТОР ДИОКТИЛТЕРЕФТАЛАТА

Башкиров С.Д.¹, Корсакова Е.С.^{1,2}

¹Пермский государственный национальный исследовательский университет,
Пермь, Россия

²«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» –
филиал ФГБУН ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

super.bashkirov@mail.ru

Ежегодный рост промышленного производства пластика во всём мире приводит к увеличению попадания и накопления пластиковых отходов в окружающей среде. Одним из компонентов производства пластмассовых материалов является диоктилтерефталат (ДОТФ). Несмотря на пониженную токсичность данного соединения в сравнении с другими эфирами фталевых кислот, используемыми в качестве пластификаторов, имеющиеся методы его переработки не универсальны и оказывают неблагоприятное воздействие на экологию почв и водных объектов. В последнее время все более перспективным направлением является использование микроорганизмов для разработки технологий, направленных на очистку загрязненных природных объектов.

Цель работы – характеристика штамма-деструктора ДОТФ *Rhodococcus* sp. SP12-1, выделенного из активного ила биологических очистных сооружений нефтехимического предприятия (г. Пермь) и исследование его способности к утилизации данного субстрата.

Ростовые характеристики штамма *Rhodococcus* sp. SP12-1 были исследованы при периодическом культивировании в минеральной среде К1 с ДОТФ (1 г/л) в качестве единственного источника углерода и энергии. Установлены максимальная оптическая плотность ($OP_{600}=1,14$) после 120 часов культивирования и максимальная удельная скорость роста ($\mu=0,01572 \text{ ч}^{-1}$). Показано, что данный штамм способен к росту в диапазоне концентрации ДОТФ от 1 до 50 г/л. Исследована утилизация субстрата штаммом *Rhodococcus* sp. SP12-1 при концентрации 200 мг ДОТФ/л. Установлено, что за 72 часа культивирования утилизация ДОТФ составила 52,02% и удельная скорость утилизации – $5,23 \text{ сут}^{-1}$.

Исследуемый штамм SP12-1 способен к эффективному росту на дибутилфталате, терефталевой и *орто*-фталевой кислотах, а также рос на диэтилфталате, диметилфталате и протокатеховой кислоте. Концентрация субстратов в среде культивирования составляла 1 г/л.

Таким образом, штамм *Rhodococcus* sp. SP12-1 является активным деструктором диоктилтерефталата и имеет потенциал к разложению других эфиров фталевой кислоты (диэтилфталата, диметилфталата), что делает его перспективным для использования в биотехнологиях направленных на очистку сточных вод и восстановление загрязненных почв.

Работа выполнена в рамках государственного задания (номер государственной регистрации темы: 124020500028-4).

ДИАГНОСТИКА POTATO VIRUS A В ОБРАЗЦАХ КАРТОФЕЛЯ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ РЕГИОНОВ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Башкирова И.Г.

ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений», р.п. Быково, г.о. Раменский, Россия

bashkirova@mail.ru

Картофель (*Solanum tuberosum*) поражается широким спектром болезней, главным образом – вирусными. А-вирус картофеля (Potato virus A, PVA) считается одним из наиболее значимых вирусов, инфицирующих культуры семейства Пасленовые (*Solanaceae*). Основным растением-хозяином для вируса считается картофель, экспериментальными растениями-хозяевами являются табак обыкновенный (*Nicotiana tabacum*), никандра физалисовидная (*Nicandra physalodes*), картофель южноамериканский (*Solanum demissum* x *S. tuberosum*). При заражении PVA на растениях-хозяевах проявляются следующие симптомы: мозаика, светло-желтая крапчатость с небольшим сморщиванием листьев; волнистые края листьев; стебли изгибаются наружу; клубни растрескиваются [1–3].

В работе тестировали образцы из различных регионов Российской Федерации. Отобраны и проанализированы 125 образцов растений картофеля из Амурской, Рязанской, Смоленской, Свердловской, Волгоградской областей и Краснодарского края с симптомами PVA. Для диагностики Potato virus A в исследованиях использовали набор для проведения ИФА фирмы Bioreba (Швейцария). Для выделения РНК вируса использовали набор «Проба-НК» (АгроДиагностика, Россия) и набор «Potato Virus S и Potato Virus A-PB» для дифференциальной диагностики и выявления РНК вирусов картофеля методом ОТ-ПЦР-РВ (Синтол, Россия), согласно прилагаемым инструкциям. Первый этап исследований состоял из проведения серологического метода ИФА. Затем, образцы были протестированы методом ПЦР в режиме реального времени.

Установлено, что А-вирус картофеля выявлен в восьми образцах картофеля из Свердловской области (р-н Белоярский; г.о. Богданович); в двух образцах из Амурской области (м.о. Тамбовский). Помимо PVA, в работе проводили комплексные исследования по распространению других вирусов картофеля: Y-вирус картофеля (Potato virus Y), M-вирус картофеля (Potato virus M), S-вирус картофеля (Potato virus S), X-вирус картофеля (Potato virus X), вирус скручивания листьев картофеля (Potato leafroll virus). Большинство образцов показало смешанную инфекцию данных вирусов.

Исследования выполнены в рамках Государственного задания Рег. № НИОКТР 122041400201-9.

Литература

1. Приходько Ю.Н., Шнейдер Ю.А., Живаева Т.С., Мазурин Е.С., Шероколава Н.А., Магомедов У.Ш., Усков А.И., Варицев Ю.А., Анисимов Б.В. Совершенствование фитопатологического контроля объектов карантинного значения // Защита и карантин растений. М., №11, 2010. С. 31-38.
2. Gammelgard E. Interactions of potato virus A with host plants. 2007, Vol. 2007, P. 111.
3. Kerlan C. Potato Viruses. 2008, P. 296-309.

ИЗУЧЕНИЕ ВИДОВОГО СОСТАВА МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ МОЛОЧНОЙ ПРОДУКЦИИ И ПРОБИОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Бикмуллина А.М., Бондарева А.А., Тутукина М.Н.

Школа имени Маршала В. И. Чуйкова, Москва, Россия
Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

Alina_2101@bk.ru

Проблема устойчивости к антибиотикам является одной из ключевых проблем современного мира. Зачастую гены устойчивости закодированы на плазидах и могут передаваться между бактериями разных родов. Эта проблема может коснуться и молочной продукции из-за использования в животноводстве большого количества антибиотиков. Количество пробиотических бактерий в молочнокислой продукции может быть меньше заявленного, также они могут приобретать устойчивость к антибиотикам и передавать эту способность бактериям, живущим в организме человека, тем самым снижая эффективность принимаемых пациентом антибиотиков.

Целью нашей работы была оценка соответствия заявленных и реально содержащихся в молочнокислой продукции штаммов, изучение и сравнение резистентности этих бактерий и пробиотиков к различным классам антибиотиков.

На первом этапе мы выбрали пробиотики для исследования, взяв препараты из разных групп – как содержащих один вид бактерий, так и их смесь. Мы вырастили исследуемые пробиотики на питательных средах в анаэробных условиях при 37°C, после этого измерили с помощью планшетного ридера Mindray MR-96A оптическую плотность образца из каждой пробирки. Также мы посеяли пробиотики на твердую среду LB, чтобы оценить их рост в аэробных условиях и узнать, соответствует ли их количество колониеобразующих единиц (КОЕ), заявленному производителем, и оценили устойчивость к различным классам антибиотиков. Затем из каждого пробиотика была выделена ДНК с помощью набора PureLink Microbiome kit по инструкции производителя, амплифицирован переменный участок 16S рРНК V4. Качество ампликонов было проверено электрофоретически в 1,5% агарозном геле. Ампликоны были вырезаны, выделены из геля с помощью набора Lumiprobe и переданы в ЦКП (центр коллективного пользования) геномики Сколтеха для секвенирования.

Измерения оптической плотности показали, что в жидкой культуре лучше всего выросли бактерии из препаратов «Бифиформ» и «Симбиотик макс», а хуже всех – из «Бифидумбактерина» и «Аципола». При этом на твердой среде «Бифидумбактерин» не вырос совсем, а «Аципол», наоборот, очень хорошо. Исходя из этого, мы можем сделать вывод, что для бифидобактерий, входящих в состав «Бифидумбактерина», необходимы строго анаэробные условия, а в состав «Аципола» входят аэробные бактерии. Полученное при росте на твердой среде количество КОЕ составляло примерно 10^7 КОЕ/мл. В целом, совпадало со значением, заявленным производителем, за исключением препаратов «Симбиотик макс» и «Линекс форте», в которых заявлено $\text{КОЕ}=10^9$. Мы проанализировали выращенные на антибиотиках пробиотики, и оказалось, что все исследуемые пробиотики чувствительны к ампициллину, тогда как «Линекс» и «Бифиформ» устойчивы к хлорамфениколу, канамицину и тетрациклину. Для того, чтобы узнать, соответствует ли состав исследуемых препаратов заявленному, мы выделили из них ДНК и амплифицировали переменный участок 16SpРНК V4. После проверки качества ампликонов они были вырезаны из геля, очищены и отданы на секвенирование на платформе Illumina MiSeq в ЦКП Геномики Сколтеха. В исследованных молочнокислых препаратах нами были обнаружены *Streptococcus* и *Lactobacillus bulgaricus*, что соответствует заявленному производителем составу, но данные бактерии оказались устойчивы к канамицину.

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ АССОЦИИРОВАННОЙ МИКРОБИОТЫ ЭПИЛИТНОГО ЛИШАЙНИКА *PARMELIA SAXATILIS* (L.) ACH.

Бобко А.С., Локтева А.В.

Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург, Россия

Bobko@scamt-itmo.ru

Лишайники представляю собой сложную симбиотическую ассоциацию между гетеротрофным микобионтом и фотоавтотрофным фотобионтом. Исследования в области лихенологии направлены на изучение экологических аспектов лишайников, поскольку они являются «пионерами» растительности, а также выделение биотехнологически значимых соединений, синтезируемые микобионтом. Несмотря на достаточную изученность лишайников, они до сих пор являются перспективным объектом изучения. Так, в последнее время исследователи всё больше внимание обращают на микробный компонент, ассоциированный с талломом лишайника, и отмечают, что микроорганизмы населяющие лишайник имеют неравномерный характер распределения по таллосу. Наиболее стабильный микробиом находится в центре, в то время как с краю таллома микробный состав более переменчивый. Данные особенности распределения, влияния фотобионта, микобионта и окружающей среды являются причиной синтеза широкого спектра антимикробных компонентов и вторичных метаболитов сообществами микроорганизмов лишайников. Одними из наиболее значимых являются антибактериальные соединения, поскольку в контексте возрастающей угрозы множественной лекарственной устойчивости бактерий, необходим поиск новых антибактериальных соединений. Основываясь на этом цель исследования заключалась в выявление антимикробной активности у ассоциированной микробиоты эпилитного лишайника *Parmelia saxatilis* (L.) Ach.

Для эксперимента было отобрано 6 поликультур ассоциативной микробиоты, извлеченные с края таллома лишайника, в разных биотопах – 3 образца с лесного и 3 образца с супралиторальной зоны Белого моря и проведён их метагеномный анализ по 16S rRNA. Были исследованы монокультуры, искусственные поликультуры и поликультуры из лишайников на антибактериальную активность с помощью кросс-стрик метода в отношении грамположительного *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, грамотрицательных *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* 1926 и гриба *Candida albicans*. Исследование проводилось в трех биологических повторах. Исследования показали, что штамм, выделенный с лишайника, собранного с лесного биотопа, ингибирует рост *S. aureus* ATCC 29213 с зоной ингибирования $3,3 \pm 0,3$ мм, однако при тестировании в поликультурах со штаммами, не показавших антагонистическую активность средняя зона ингибирования увеличилась более чем в 2 раза и составляла $7,3 \pm 0,5$ мм, что указывает на синергетический эффект бактерий. Результаты исследования поликультур из лишайников с супралиторальной зоны характеризовались ингибированием роста патогенов у двух образцов. Один образец проявил антимикробную активность против *C. Albicans* 1926 и *S. aureus* ATCC 29213 средняя зона ингибирования составляла $7,6 \pm 0,7$ мм и $8,3 \pm 0,8$ мм соответственно. Другой образец поликультур ингибирует рост только *C. albicans* с размером средней зоны ингибирования $3,9 \pm 0,2$ мм.

Полученные результаты указывают на то, что *P. saxatilis* содержит микробиоту способную к синтезу антимикробные соединения. Стоит отметить, что образцы, произрастающие в супралиторальной зоне Белого моря, содержат микроорганизмы, синтезирующие более широкий спектр антимикробных соединений, чем образцы, произрастающие в условиях лесного биотопа, и ингибирующая активность по отношению к росту патогенов у них более выражена. Также полученные результаты указывают на перспективы изучения влияния межвидовых коммуникаций внутри микробных сообществ для увеличения синтеза антимикробных соединений.

САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ ОЗЕР КЕНОЗЕРСКОГО НАЦИОНАЛЬНОГО ПАРКА

Братушева А.А.

Северный (Арктический) федеральный университет им. М.В. Ломоносова,
Архангельск, Россия

bratusheva.a@edu.narfu.ru

Кенозерский национальный парк является особо охраняемой территорией. По всей площади расположились природные и культурные памятники, в том числе уникальные водоемы. Озера относятся к водоемам категории питьевого и культурно-бытового назначения. Самым большим и глубоким является Кенозеро, на него приходится самая высокая антропогенная нагрузка. Происхождение – ледниковое. По величине водосборной площади 90% территории относится к бассейну Белого моря и 10 % к бассейну Балтийского моря. Водораздел проходит вдоль западной границы парка.

Целью данной работы является оценка санитарно-микробиологического состояния водоемов Кенозерья, так как наряду с химическими показателями этот фактор влияет на качество воды. Проанализированы пробы воды на ОМЧ (общее микробиологическое число) при $(22\pm 1)^\circ\text{C}$ (показатель естественной микрофлоры водоема) и при $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ (показатель антропогенного загрязнения) МУК 4.2.1018-01, а также определение БГКП (бактерии группы кишечной палочки) ГОСТ 24849-2014.

Полученные результаты приведены в таблице 1 и таблице 2.

Таблица 1 – Результаты микробиологического анализа проб воды (ОМЧ) при 37°C .

Точка отбора	Дата отбора проб/показатель ОМЧ, КОЕ/мл			ПДК, КОЕ/мл
	27.05.2023	17.07.2023	17.08.2023	
1	19	1	1	Не более 20
2	2	2	4	
3	1	9	3	
4	0	2	3	

Таблица 2 – Результаты микробиологического анализа проб воды (ОМЧ) при 22°C .

Точка отбора	Дата отбора проб/показатель ОМЧ, КОЕ/мл			ПДК, КОЕ/мл
	27.05.2023	17.07.2023	17.08.2023	
1	2	0	1	Не более 100
2	7	0	10	
3	12	0	0	
4	2	1	2	

БГКП были обнаружены только в двух точках: точка 2 (17.08.2023) – район купания и стоянки катеров, точка 5 (17.08.2023) – район фермы.

Таким образом, микробиологическое состояние озер, за исключением двух точек, в которых были обнаружены БГКП в период максимальных температур, в целом соответствует требованиям СанПиН 2.1.4.1116-02.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ПЯТНИСТОСТЯМИ НА ЛИСТЬЯХ ДРЕВЕСНЫХ ПОРОД

Бруснова Н.А., Поротикова Е.В., Виноградова С.В.

Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Москва, Россия

brusnova.natasha@yandex.ru

Изучение генетического разнообразия фитопатогенных микроорганизмов является важным шагом, следующим за его обнаружением и идентификацией. Это дает более четкое представление о состоянии популяции патогена и существовании различных видов или штаммов, что зачастую невозможно сделать по результатам фенотипических исследований и биохимических тестов. Кроме того, на основе этих данных возможно составление прогнозов о развитии эпифитотий и мер их предотвращения, описание экологических характеристик и генетической изменчивости патогенов.

В Теллермановском лесу Воронежской области и заповеднике Галичья гора Липецкой области обнаружено распространение пятнистостей неизвестной этиологии на клене татарском (*Acer tataricum*), вязе малом (*Ulmus minor*) и ясене обыкновенном (*Fraxinus excelsior*). Цель данной работы заключалась в идентификации бактерий, ассоциированных с проявившимися пятнистостями, с помощью биохимических методов и филогенетического анализа на основе мультилокусного филогенетического анализа (MLST).

По результатам фенотипического анализа и биохимических тестов по системе LOPAT, а также способности утилизировать различные источники углерода, обнаруженные бактерии были предварительно отнесены к родам *Pseudomonas* и *Pantoea*. Анализ гена 16S рРНК с помощью секвенирования по Сэнгеру подтвердил идентификацию. Патогенность типичных из обнаруженных изолятов была подтверждена на растениях-хозяевах.

Для проведения MLST бактерий рода *Pseudomonas* использовали гены: *gapA* (кодирует глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу); *gltA* (ген цитратсинтазы); *gyrB* (ген ДНК-гиразы В); *rpoD* (ген σ -субъединицы РНК-полимеразы) и *rpoB* (ген β -субъединицы РНК-полимеразы). Для MLST бактерий *Pantoea* использовали гены: *gyrB*, *rpoB*, *fusA* (ген фактора элонгации G), *leuS* (ген лейцил-тРНК-синтазы), *purG* (ген СТР-синтазы). Анализ показал наличие нескольких видов *Pseudomonas* и *Pantoea*, с высокой бутстреп-поддержкой выделяющихся в отдельные клады от референсных изолятов.

Таким образом, мы определили, что обнаруженные пятнистости на клене татарском (*A. tataricum*), вязе малом (*U. Minor*) и ясене обыкновенном (*F. excelsior*) ассоциированы с инфекцией несколькими видами бактерий родов *Pseudomonas* и *Pantoea*.

Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ 24-26-00284 на базе оборудования ЦКП «Биоинженерия» и ЭУИК (U-73547).

ПОТЕНЦИАЛ ВИРУЛЕНТНОГО БАКТЕРИОФАГА SE ДЛЯ ТЕРАПИИ АНТИБИОТИКО-РЕЗИСТЕНТНЫХ ЭНТЕРОКОККОВЫХ ИНФЕКЦИЙ

Бузиков Р.М., Казанцева О.А., Шадрин А.М.

Институт физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН – обособленное
подразделение ФИЦ Пушчинский научный центр биологических исследований РАН,
Пушино, Россия

a87h5n1@gmail.com

Проблема антибиотикорезистентности возбудителей инфекций человека и животных уже приобрела угрожающие масштабы. Особенно остро обстоят дела с нозокомиальными инфекциями вызванными возбудителями группы ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter spp.*). Скорость, с которой в клинической практике появляются новые антибиотики, существенно отстает от темпов эволюции бактерий, в этой ситуации решением проблемы может стать фаготерапия – использование бактериофагов в качестве антимикробного средства. Коэволюция фагов и их бактерий-хозяев предоставляет нам практически неисчерпаемый ресурс для преодоления защитных механизмов бактерий. В случае с энтерококками наблюдается закономерность: штаммы без защитной CRISPR-CAS системы легче приобретают устойчивость к антибиотикам путем горизонтального переноса генов, но при этом гораздо менее устойчивы к воздействию бактериофагов. Таким образом фаги и их бактериолитические ферменты могут стать хорошим дополнением для комплексной противобактериальной терапии.

В рамках этой работы был выделен и охарактеризован литический *Enterococcus phage SE*, поражающий представителей видов *E. faecium*, *E. hirae*, *E. avium* и *E. faecalis*. Бактериофаг принадлежит к семейству *Siphoviridae*. Его капсид имеет вытянутую голову и хвост с сократительным чехлом.

С помощью секвенирования методом Illumina, последующей сборки Unicycler v0.4.8 и аннотированием утилитой PharoKka v 1.2.0 в геноме фага длиной в 58247 пн обнаружено 117 предполагаемых генов. На основании полученных данных были проведены полногеномное и полнопротеомное сравнения и выявлена группа наиболее гомологичных бактериофагов, но ни у одного из них не был определен механизм упаковки ДНК в капсид. Наиболее близким оказался протеом *Enterococcus phage UTI-EfS7*, причем филогенетический анализ позволяет четко разделить их на 2 кластера и выделить SE и еще 6 фагов в отдельный род близкий к роду *Sarbovirus*. При помощи анализа длин фрагментов фаговой ДНК и секвенирования концов генома удалось выявить короткие прямые терминальные повторы длиной 343 пн. Таким образом можно с высокой степенью уверенности предполагать подобную организацию геномов и их упаковки у всех фагов этой группы.

В числе прочего в геноме фага был обнаружен ген эндолизина – фермента, разрушающего клеточную стенку бактерий, имеющего потенциал в качестве терапевтического средства.

Бактериофаг демонстрирует отсутствие зависимости от внесения Ca^{2+} до 10 мМ и угнетение кинетики роста фага при добавлении Mg^{2+} до 10 мМ. Одна зараженная клетка производит порядка 150 фаговых частиц за 40 минут, что позволяет бактериофагу эффективно подавлять рост культуры даже при низкой множественности заражения.

Бактериофаг SE демонстрирует устойчивость в диапазоне pH от 5 до 9 (оптимумом pH 8) и термостабильность в диапазоне от 6 до 60°C, с практически полной инактивацией при 70°C. Отлично переносит заморозку в 15% растворе глицерина, а при лиофильной сушке имеет выживаемость 93±5%. Что в совокупности выгодно характеризует его, как действующий агент для терапевтического препарата.

Работа поддержана грантом РФФИ №22-15-00385.

СОВМЕСТИМОСТЬ ШТАММОВ *PANTOEA BRENNERI* С ПЕСТИЦИДАМИ ДЛЯ ИНТЕГРИРОВАННОЙ СИСТЕМЫ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

Бульмакова Д.С., Беркутова Е.С., Сокольников Л.В., Егорова Е.А.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Россия

daria_bulmakova@mail.ru

Химические средства защиты растений занимают лидирующие позиции среди мер борьбы с возбудителями болезней, насекомыми-вредителями и сорной растительностью. Необходимость такой борьбы очевидна, поскольку вызываемые ими потери урожая в мировом земледелии, по разным оценкам, могут достигать 50%. Однако неуклонный рост глобального спроса, производства и применения пестицидов привели в настоящее время к серьезной угрозе для человека. Альтернативным решением является внедрение в сельское хозяйство биопрепаратов. Биологические средства на основе штаммов микроорганизмов могут рассматриваться не только как замена химических препаратов, но и как важный компонент в интегрированной системе защиты, позволяющий во многом снизить пестицидную нагрузку на агроценозы. Поэтому, в основе разработок новых биопрепаратов на основе микроорганизмов должна стать оценка их совместимости к используемым пестицидам.

Целью работы явилось определение совместимости штаммов *Pantoea brenneri* с применяемыми в сельском хозяйстве пестицидами. Выбор в качестве объекта исследования выделенных нами ранее штаммов *P. brenneri* обусловлен рядом их положительных свойств, связанных со стимуляцией роста растений, среди которых – синтез гидролитических ферментов, деструкция цианидов, продукция фитогормонов и сидерофоров, фунгицидная активность против ряда фитопатогенных микромицетов, а также способность штаммов к мобилизации широкого спектра труднорастворимых фосфатов неорганической и органической формы.

Для исследования были отобраны коммерческие пестициды таких групп, как фунгициды («Фитофлавин», «Раёк», «Триходерма»), гербициды («Зонтран», «Торнадо 500», «Лазурит») и инсектициды («Биокилл», «Сонет+», «Танрек»). Определение совместимости штаммов с пестицидами проводили методом диффузии в агар. Для этого культуры штаммов (ОП₅₉₅=0.1) высевали газонем на чашки Петри с питательной средой LA. Затем стерильным сверлом вырезали лунки диаметром 8 мм, в которые вносили 0.1 мл химического препарата в рабочей концентрации. В контрольном варианте в лунки вносили стерильную дистиллированную воду в объеме 0.1 мл. Чашки помещали в термостат на 30°C на 5 суток. По образованию зон задержки роста вокруг лунок оценивали совместимость штаммов *P. brenneri* с исследуемыми пестицидами. В случае с инсектицидами штаммы были совместимы с препаратами «Сонет+» и «Танрек», тогда как с препаратом «Биокилл» наблюдали зоны задержки роста бактерий. Штаммы также были совместимы с фунгицидами «Раёк» и «Триходерма», однако при использовании «Фитофлавина» задерживали свой рост. В случае с гербицидами, бактерии были совместимы со всеми изучаемыми препаратами. Таким образом, нами установлена совместимость штаммов *P. brenneri* с рядом пестицидов, что позволит в будущем применять их в композиционных составах в интегрированной системе защиты растений.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 23-76-01078.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ И СРОДСТВА К МЕТАЛЛАМ МЕТИОНИН АМИНОПЕПТИДАЗЫ БАКТЕРИИ *T. THERMOPHILUS* (Tth-МАП)

Быков В.В.¹, Трунилина М.В.¹, Кудряшов Т.А.¹,
Вологжанникова А.А.¹, Шевелева М.П.¹, Азев В.Н.², Горбунова Е.Ю.², Мустаева Л.Г.²
Соколов А.С.¹, Лаптева Ю.С.¹

¹Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН – обособленное
подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушино, Россия

²Филиал Института Биоорганической Химии РАН, Пушино, Россия

naggilan88@gmail.com

Метионин аминокпептидаза (МАП) – представляет собой металл-зависимую протеазу (Co^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+}), которая удаляет N-концевой метионин (Met) во время синтеза полипептидной цепи. Специфичность отщепления Met определяется радиусом боковой цепи второго после метионина остатка в основном это Gly, Ala, Ser, Pro, Thr или Val. Рекомбинантная МАП из *P. furiosus* активна в отношении Met1 перед Ala, Gly и Pro, фермент *E. coli* активен в отношении Met1 перед Gly, Ala, Ser.

Ввиду низкой термостабильности и ограниченной субстратной специфичности МАП *E. coli* актуальным является поиск ферментов из экстремофильных организмов. В этой связи цель данной работы заключается в изучении свойств МАП бактерии *T. thermophilus* (Tth-МАП). До настоящего времени данные о трехмерной структуре фермента, его специфичности и физико-химических свойствах отсутствовали.

Методом кругового дихроизма в дальней ультрафиолетовой области исследована вторичная структура фермента. Tth-МАП характеризуется преобладанием α -спиралей (34,8 %), причём связывание катионов кобальта не приводит к изменению в соотношении элементов вторичной структуры фермента. Методом дифференциальной сканирующей калориметрии была исследована термостабильность фермента. Устойчивость Tth-МАП к повышению температуры, для апо-формы белка составляет 56°C. Добавление кобальта приводит увеличению термостабильности белка на 35°C.

Методами химического сшивания глутаровым альдегидом и динамического светорассеяния оценена четвертичная структура Tth-МАП. Белок склонен к мультимеризации в широком диапазоне концентраций (1,5 мкМ – 45 мкМ). Интересно, что катионы кобальта и восстановители не оказывают влияние на четвертичную структуру белка.

Методом флуоресценции с использованием флуоресцентного субстрата Met-АМС (L-метионин 7-амино-4-метилкумарин) изучена функциональная активность Tth-МАП. Повышенную функциональную активность Tth-МАП проявляет при температуре 90±5°C. Проведена оценка влияния различных катионов металлов на активность Tth-МАП. Наибольшую активность фермент проявляет в присутствии катионов Ni^{2+} и Co^{2+} . Методом собственной флуоресценции белка было показано, что сродство Tth-МАП к катионам кобальта на 1,7-2,1 порядка больше, чем к никелю.

С использованием библиотеки пептидов (MXSSRWGRG) показано, что фермент специфичен к отщеплению Met1, за которым стоят Gly и Ala (эффективность 95%), Thr (15%), но не Val. Фермент Tth-МАП бактерии *T. thermophilus* может быть востребован в биотехнологии для удаления метионина из рекомбинантных белков и пептидов, содержащих Gly, Ala и Thr после Met1, в условиях повышенных температур.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-00563, <https://rscf.ru/project/23-24-00563/>.

ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ *BACILLUS SUBTILIS* SP. ДЛЯ ИНАКТИВАЦИИ ГЕНОВ
СУРФАКТИНА И СИДЕРОФОРА, ОТВЕТСТВЕННЫХ ЗА ФОРМИРОВАНИЕ
ISR-ПРАЙМИНГА

**Васильева Ю.А., Гильмутдинова А.И., Хасанов Д.И., Данилова Ю.В.,
Рудакова Н.Л., Шарипова М.Р.**

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

vasileva891@mail.ru

Бактерии рода *Bacillus* характеризуются широким спектром антагонистической активности против различных фитопатогенов. Благодаря способности образовывать споры и биопленки, а также продуцировать различные ферменты, антибиотики, сурфактины и сидерофоры, эти бактерии успешно выживают в условиях почвы. Взаимодействуя с корнями растений, бациллы могут вызывать индуцированную системную устойчивость (ISR), однако данный процесс еще не полностью изучен. В связи с этим актуальным является изучение механизмов формирования индуцированной системной устойчивости (ISR) у растений, вызываемых представителями рода *Bacillus*. В последние годы для выявления роли ключевых молекул в биологических процессах активно применяется система CRISPR-Cas9. Данная технология позволяет редактировать определенные последовательности ДНК с высокой точностью и эффективностью.

Цель исследования – трансформация клеток *Bacillus subtilis* sp. векторными конструкциями для направленной инактивации генов сурфактина и сидерофора, ответственных за формирование ISR-прайминга.

В работе использовался шаттл-вектор pJOE9282.1, содержащий систему CRISPR/Cas9. Путем гибридизации праймеров были получены спейсерные фрагменты (sgRNA), которые интегрировали по сайту рестрикции BsaI. Фрагменты генов сурфактина и сидерофора были амплифицированы с геномной ДНК *B. subtilis* sp. и встроены в плазмиды по сайту SfiI. Полученные конструкции pVYs07.23 и pGAb07.23, содержащие систему CRISPR/Cas9, sgRNA и фрагменты генов, клонировали в клетках *E. coli* DH5a. Целостность созданных векторов подтверждали секвенированием. Полученные плазмиды pVYs07.23 и pGAb07.23 были внедрены в клетки *B. subtilis* sp. методом химической трансформации. Наличие плазмид с CRISPR/Cas9 системой подтверждали ПЦР-анализом.

Таким образом, нами были созданы и трансформированы векторные конструкции pVYs07.23 и pGAb07.23 для инактивации генов сурфактина и сидерофора соответственно. В дальнейшем планируется инактивация генов ответственных за синтез сурфактина и сидерофор в геноме различных штаммов *B. subtilis* sp.

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (приоритет 2030).

ГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ И ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ШТАММА *DELFTIA TSURUHATENSIS* ULWDIS3 ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА НАФТАЛИНЕ

Вершинина Д.Д.^{1,2}, Ветрова А.А.¹, Иванова А.А.¹, Сазонова О.И.¹

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

²Пуштинский филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)», Пушино, Россия

dina-20002001@mail.ru

Штамм *Delftia tsuruhatensis* ULwDis3 был выделен как деструктор дизельного топлива из морской воды Финского залива Балтийского моря. Позднее было установлено, что штамм ULwDis3 может утилизировать нафталин. Несмотря на то, что для штаммов рода *Delftia* показана способность к росту на нафталине, анализ геномов в базах данных NCBI и BV-BRC не выявил штаммов *Delftia* sp., обладающих генами, кодирующими ферменты разложения нафталина. Целью данного исследования являлось изучение генетических характеристик *D. tsuruhatensis* ULwDis3 и его физиолого-биохимических особенностей в отношении деградации нафталина, как модельного соединения при изучении деградации полициклических ароматических углеводородов.

Секвенирование геномной ДНК *D. tsuruhatensis* ULwDis3 с использованием технологий Illumina и Oxford Nanopore позволило установить, что геном данного штамма представлен одной хромосомой и составляет 6944 т.п.н. Он содержит 6616 белок-кодирующих последовательностей (CDSs), 79 генов тРНК, 5 кластеров генов рРНК и 3 некодирующие РНК; определенное функциональное значение было присвоено 4956 CDSs, а 1664 CDS относятся к гипотетическим белкам. Хромосома штамма ULwDis3 содержит все гены, необходимые для конверсии нафталина через салицилат и гентизат (*nag*-гены) в интермедиаты Цикла Кребса; *nag*-гены организованы в один оперон, который содержит 17 генов расположенных на участке размером 15,8 т.п.н. Структура *nag*-оперона штамма ULwDis3 схожа с таковой штаммов *Cupriavidus necator* U2 (*nag*-гены расположены на плазмиде pWWU2) и *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2 (*nag*-гены имеют хромосомную локализацию). Также в геноме штамма ULwDis3 обнаружены три последовательности, кодирующие гентизат 1,2-диоксигеназу, одна из которых входит в состав *nag*-оперона.

Изучены физиолого-биохимические характеристики штамма ULwDis3 при культивировании в жидкой минеральной среде с нафталином. В ходе *лаг*-фазы не происходило потребления нафталина. Максимальный уровень его потребления приходился на экспоненциальную фазу. Обнаружено накопление салицилата и гентизата – ключевых метаболитов деградации нафталина через гентизат, которые после 19 ч культивирования быстро потреблялись штаммом ULwDis3. В середине фазы экспоненциального роста (18 ч) наблюдалось плато характерное для периода адаптации культуры к накопленному салицилату и перестройки метаболической системы к его потреблению. Стационарной фазы роста не наблюдалось, а за экспоненциальной фазой сразу следовала фаза гибели культуры. Максимальные активности нафталин 1,2-диоксигеназы (NO), салицилат 5-гидроксилазы (S5H) и гентизат 1,2-диоксигеназы (GDO) были обнаружены во второй половине экспоненциального роста штамма на нафталине. Данные ферменты были индуцибельными. С момента начала гибели культуры активности NO и S5H не детектировались. Активность GDO была обнаружена с момента образования гентизата до гибели культуры.

Работа поддержана: Минобрнауки РФ (Госзадание № FMRM-2022-0014).

ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ГЕМОЛИМФЫ БАЙКАЛЬСКИХ АМФИПОД ВИДА *EULIMNOGAMMARUS VERRUCOSUS*

Власевская А.Д.¹, Золотовская Е.Д.¹, Дроздова П.Б.^{1,2}

¹ФГБОУ ВО «ИГУ», Иркутск, Россия

²Байкальский исследовательский центр, Иркутск, Россия

ananastasi.vl@gmail.com

В озере Байкал, самом глубоком пресноводном озере мира, обитает 2595 видов и подвидов животных, а эндемизм составляет около 56,5 %. Долгое обособленное развитие биоты озера что позволяет сделать предположение о наличии как особенностей в молекулярном строении, так и о приобретении специфичных функций внутренних систем, например, иммунной. Самой распространенной и разнообразной группой животных в озере Байкал являются ракообразные, что делает исследования данных объектов актуальными и значимыми. Иммунный ответ ракообразных относится к врожденному типу, при этом основные иммунные компоненты циркулируют в гемолимфе, который является аналогом крови у беспозвоночных. Тем не менее, пока многие свойства данной соединительной ткани остаются неизученными.

Работа была посвящена изучению антимикробных свойств гемолимфы байкальских амфипод вида *Eulimnogammarus verrucosus*.

Отлов амфипод осуществляли в прибрежной зоне оз. Байкал в районе пос. Листвянка. После отлова животных акклиматизировали к лабораторным условиям в аэрируемых аквариумах при температуре отлова в течение 4 суток. Далее из животных отбирали гемолимфу с последующей заморозкой при температуре -80 °С. Оценку влияния гемолимфы на скорость роста культур проводили методом микро-разведений в 96-луночных оптически прозрачных планшетах. В качестве дополнительной среды для проверки использовали фильтра гемолимфы после центрифугирования через колонки, который далее будет обозначен как плазма. Антимикробные свойства замороженной нефракционированной гемолимфы и плазмы оценивали на трех бактериальных тест-культурах: грам-отрицательный вид *Pseudomonas putida* и грам-положительные виды *Kocuria rhizophila* и *Bacillus subtilis*. Для анализа относительной скорости роста бактерий фиксировали изменение во времени оптической плотности культуральной среды LB с бактериями в присутствии потенциальных ингибирующих веществ (гемолимфа, плазма, антибиотик) и без них в планшетном ридере CLARIOstar Plus (BMG Labtech) до начала инкубирования и через 18 часов. Измерение проводили при длине волны 600 нм. На основе полученных данных строили графики в программной среде «R» (<https://www.r-project.org/>).

В результате проведенного эксперимента были получены следующие результаты. У *Bacillus subtilis* присутствовали статистически значимые различия между средой и нефракционированной гемолимфой, средой и плазмой, из чего можно сделать вывод о возможном наличии во внутренней среде *E. verrucosus* веществ, подавляющих рост бактерий. Рост в среде с добавлением антибиотика тетрациклина отсутствовал. График *K. rhizophila* показал присутствие различий между ростом в среде и плазме; различия между ростом в среде и в нефракционированной гемолимфе не были статистически значимыми. Рост в среде с добавлением антибиотика тетрациклина отсутствовал. Рост бактерии *P. putida* статистически значимо не ингибировала ни плазма, ни гемолимфа. Рост в среде с добавлением антибиотика канамицина отсутствовал. Можно предположить, что этот штамм бактерий устойчив к антимикробным веществам амфипод *E. verrucosus*.

Полученные данные говорят о возможном наличии антимикробных веществ в плазме и нефракционированная гемолимфе амфипод *E. verrucosus*.

РАЗРАБОТКА СИНБИОТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ЛАКТОБАКТЕРИЙ И АГРОМИНЕРАЛОВ И ЕГО ОЦЕНКА НА ПЕРЕПЕЛАХ

**Гаврилова Е.А.¹, Карасева О.С.¹, Монир Я.М.¹, Ежкова А.М.², Ежков В.О.²,
Никитина Е.В.^{1,3}, Яруллина Д.Р.¹, Каюмов А.Р.¹**

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

²Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана,
Казань, Россия

³Казанский национальный исследовательский технологический университет, Казань, Россия

Alalila@yandex.ru

Применение кормовых добавок на основе пробиотических препаратов и агроминералов способствует улучшению иммунного статуса животных и птицы, стимуляции роста и развития молодняка и повышению качества получаемой продукции. В качестве пробиотиков в биотехнологии и пищевой промышленности широко применяются лактобациллы.

Целью работы являлась разработка синбиотического препарата на основе новых штаммов лактобактерий и агроминералов (бентонит и цеолит). В работе использовали штаммы: *Lactiplantibacillus plantarum* AG10, *Lactiplantibacillus plantarum* AG16, *Ligilactobacillus salivarius* LS 4-4, *Lactiplantibacillus plantarum* FCa3L, выделенные из растительного сырья, и штамм *Limosilactobacillus fermentum* HFD1 и из кишечника человека.

После исследования штаммов на антагонистическую активность и сохранение жизнеспособности при добавлении агроминералов провели оценку влияния препарата на перепелов (работа выполнена с одобрения локального этического комитета КФУ – протокол №40 от 9 марта 2023). Опыт проводился в два этапа. В ходе первого эксперимента группы перепелов получали в качестве добавки разные пробиотические штаммы, выращенные в молочной сыворотке. Контрольная группа получала только молочную сыворотку. Во втором эксперименте группы перепелов получали комбинацию пробиотических штаммов, продемонстрировавших высокие показатели в первом опыте, и агроминералов. На протяжении экспериментов птиц взвешивали и оценивали прирост биомассы. По окончании опытов оценили массу различных внутренних органов птиц, показатели биохимического и форменного анализа крови, оценили показатели качества яиц и мяса, состав микробиоты кишечника. В работе проведен сравнительный анализ данных показателей у различных групп птиц.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект РНФ-22-16-00040).

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА НОВОЙ БАКТЕРИОЛИТИЧЕСКОЙ АМИДАЗЫ AMi *LYSOBACTER CAPSICI* XL1, ПЕРСПЕКТИВНОЙ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ НА ЕЕ ОСНОВЕ АНТИМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

Галемина И.Е.^{1,2}, Кудрякова И.В.¹, Афошин А.С.¹, Зеленов Д.В.^{1,2},
Леонтьевская Е.А.¹, Леонтьевская Н.В.¹

¹ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН» (Институт биохимии
и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН), Пушкино, Россия

²Пушкинский филиал федерального государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего образования «Российский биотехнологический университет
(РОСБИОТЕХ)», Пушкино, Россия

99inna@inbox.ru

В наши дни особенно актуальной задачей является поиск новых антимикробных агентов, эффективных против патогенных микроорганизмов, устойчивых к целому ряду антибиотиков. Одними из таких агентов являются бактериолитические ферменты, которые гидролизуют различные связи в бактериальном пептидогликане, что приводит к гибели клеток. Мощными продуцентами бактериолитических ферментов являются грамотрицательные бактерии. Однако ферменты именно этой группы бактерий изучены недостаточно, что затрудняет их применение в медицине. Таким образом, выделение и характеристика бактериолитических ферментов грамотрицательных бактерий является актуальной задачей.

Грамотрицательные бактерии рода *Lysobacter* относятся к бактериям-хищникам и продуцируют целый комплекс антибактериальных веществ, в том числе и ферментов. Недавно проведенные протеомные и транскриптомные исследования у *Lysobacter capsici* XL1 позволили определить пул генов предполагаемых бактериолитических ферментов, ранее не выделенных у этой бактерии. Один из таких генов *ami* кодирует фермент Ami, о котором в литературе нет данных. Целью данной работы было выделить и изучить бактериолитический фермент Ami.

Для экспрессии гена *ami* был сконструирован экспрессионный штамм *L. capsici* IAEN-*ami*. Для очистки фермента Ami из культуральной жидкости экспрессионного штамма разработана схема очистки, включающая осаждение белков сульфатом аммония, катионообменную хроматографию и гельфильтрацию. В результате был получен фермент Ami *L. capsici* XL1 в гомогенном виде.

Для характеристики Ami в качестве субстрата использовали автоклавированные клетки *Micrococcus luteus* Ac-2230^T. Установлено, что для проявления бактериолитической активности оптимальными являются: pH 8.0, концентрация буфера Трис–HCl 5–10 мМ. Температура полуинактивации фермента составила 65 °С. Ингибиторный анализ показал, что п-ХМБ и фенантролин ингибируют Ami на 100%, что указывает на значимость металла и цистеина в активном центре фермента. Помимо автоклавированных клеток микрококка Ami гидролизует клетки *Bacillus cereus* 217, *Proteus vulgaris* H-19, *Escherichia coli* K-12 и *S. aureus* 209P. Фермент не обладает протеазной активностью в отношении белковых субстратов (азофибрин, желатин, казеин, эластин, гемоглобин, коллаген). Установлено антимикробное действие фермента в отношении живых клеток бактерий *M. luteus* Ac-2230^T, *B. cereus* 217, *S. aureus* 209P, *B. thuringiensis* VKM-83 и *B. megaterium* MS941. Разработана липосомальная форма Ami. В результате антимикробная активность Ami в составе липосом увеличилась в отношении живых клеток *S. aureus* 209P, *M. luteus* Ac-2230^T, *B. cereus* 217. В отношении *K. rosea* Ac-2200^T фермент Ami начал проявлять активность только в составе липосом.

Таким образом, впервые выделен бактериолитический фермент Ami *L. capsici* XL1, способный гидролизовать живые клетки бактерий и перспективный для разработки антимикробных препаратов нового поколения для борьбы с супербактериями.

Работа поддержана грантом Президента РФ (проект № МК-1864.2022.1.4).

СОЗДАНИЕ МУТАНТНОГО ШТАММА *BACILLUS SUBTILIS* ПО ГЕНУ
БАЦИЛЛИБАКТИНА МЕТОДОМ РЕДАКТИРОВАНИЯ CRISPR/CAS9

Гильмутдинова А.И., Васильева Ю.А., Хасанов Д.И., Данилова Ю.В., Рудакова Н.Л.,
Ласточкина Е.Э., Волкова Е.С.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

aigwinrygilmyzn@gmail.com

Ризобактерии, стимулирующие рост растений (PGPR), широко используются в качестве биоудобрений для повышения урожайности сельскохозяйственных культур. Это достигается за счёт различных прямых и косвенных механизмов, таких как фиксация азота, солубилизация фосфатов, производство сидерофоров, индольных соединений, устойчивость к тяжелым металлам, биоконтроль и подавление стрессовых реакций. PGPR способствуют росту растений, подавляя патогены с помощью прямого антагонизма и индуцируют системную резистентность (ISR). Среди них род *Bacillus* является одним из наиболее изученных, в частности *Bacillus subtilis* широко признан в качестве модельного организма для изучения взаимодействия растений и микроорганизмов. Синтезируя сидерофоры, *B. subtilis* хелатирует Fe³⁺ в почве для растений. Кроме того, было показано, что бактериальные сидерофоры изменяют состав почвенных микробных сообществ, стимулируют рост растений и способствуют биоремедиации тяжелых металлов.

Таким образом, целью исследования являлось оценить вклад сидерофора бациллибактина в ISR, путем создания мутантного штамма *B. subtilis* с помощью технологии CRISPR/Cas9.

В проведённом исследовании использовали челночный вектор pJOE9282.1 на основе системы CRISPR/Cas9 типа II *Streptococcus pyogenes*. На первом этапе данный вектор рестрицировали по сайту BsaI, вследствие чего фрагмент *lacZα* заменяли на sgRNA, полученную путем гибридизации праймеров. Вставка sgRNA приводит к замене фрагмента *lacZα* и позволяет проводить сине-белый скрининг. На втором этапе два фрагмента, фланкирующие целевую последовательность гена бациллибактина (*dhbF*), были амплифицированы с использованием ПЦР из геномной ДНК *Bacillus subtilis* sp. Затем, полученные фрагменты и вектор были рестрицированы по сайту SfiI и соединены методом упорядоченной сборки генов в *Bacillus subtilis*. Подтверждение наличия вставок на каждом этапе осуществлено секвенированием. Таким образом, был сконструирован вектор pGAb08.23 для инактивации гена *dhbF* в геноме *B. subtilis* sp.

С целью получения мутантного штамма, данную плазмиду трансформировали методом химической трансформации. Производили отбор колоний и инкубировали при 30 °C на среде с добавлением 0.2 % ксилозы, необходимой для индукции гена *cas9*, находящегося под контролем ксилоза-индуцируемого промотора (P_{xyI}). Колонии, появившиеся в течение 2 дней, помещали на среду LA без антибиотика и инкубировали при 42 °C. Повышение температуры должно приводить к потере плазмиды, это связано с тем, что pGAb08.23 имеет температура-чувствительный ориджин репликации pE194^{ts}. Внесение изменения в геном штамма подтверждали секвенированием.

В настоящем исследовании был сконструирован вектор (pGAb08.23) для инактивации гена *dhbF* в геноме *B. subtilis* sp., а также получен делеционный мутант с инактивированным геном бациллибактина.

Работа поддержана грантом РФ № 22-16-00138.

ПОЛНОГЕНОМНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ И АННОТАЦИЯ ГЕНОМА БАКТЕРИИ РОДА *JANTHINOBACTERIUM* ИЗ ТАЛЫХ ВОД АНТАРКТИДЫ

Горохов И.А., Безручко М.В., Саитова А.Т., Гончаров Н.Е., Полев Д.Е.

Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера,
Санкт-Петербург, Россия

ivgor1004@mail.ru, ivangorochov@gmail.com

Представители рода *Janthinobacterium* – граммотрицательные подвижные палочковидные бактерии, способные к жизни в различных средах обитания, зачастую в почвенных и водных экосистемах. Помимо свободноживущих представителей, встречаются и патогенные виды, выделенные из зараженных тканей гриба (*Agaricus bisporus*), губок (*Lubomirskia baicalensis*) и радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*). Бактерий рода *Janthinobacterium* – психрофилы, для них также характерны устойчивость к тяжелым металлам и антибиотикам. Одной из отличительной особенностей представителей *Janthinobacterium* sp. является продукция пигмента виолацеина, проявляющего противобактериальные и противовирусные свойства.

Коллекция кафедры эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии СЗГМУ имени И. И. Мечникова включает в себя представителей рода *Janthinobacterium*, выделенных из талых вод Антарктиды. Целью работы была молекулярно-генетическая характеристика бактерии рода *Janthinobacterium*. Для этого были поставлены следующие задачи: получение чистой культуры исследуемой бактерии; выделение геномной ДНК (гДНК) из клеток изучаемого микроорганизма; прочтение полного генома методами секвенирования следующего поколения (от англ. Next Generation Sequencing, NGS); сборка полного генома бактерии и его аннотация.

Бактерии пересеивали на кровяной агар и культивировали при 20°C в течение нескольких суток. гДНК выделяли из клеток отдельных колоний с помощью набора QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Швейцария). Из полученной гДНК готовили библиотеки коротких и длинных фрагментов ДНК и секвенировали на платформах DNBSEQ-G50 и MinION. Гибридную сборку *de novo* получили с помощью сборщика Unicycler, видовую принадлежность изучаемой бактерии и аннотацию проводили с помощью Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP).

Видовая принадлежность бактерии была определена по средней идентичности нуклеотидов (Average Nucleotide Identity, ANI) как *Janthinobacterium tructae* (ANI = 95.901). Общий размер генома составил 6154679 пар нуклеотидов. Гибридная сборка состояла из 4 контигов, включавших 5431 открытую рамку считывания, 18 генов рРНК, 93 тРНК, 1 мРНК. Среди предсказанных генов были гены, кодирующие белки системы секреции б типа (tss и Hcp), белки, образующие пили, и белки чувства кворума. Также были предсказаны белки системы PER-STERM/XrtA и регулирующие её prsK и prsR, необходимые для синтеза экзополисахаридного матрикса биопленок. Хотя считается, что образование биопленок и синтез виолацеина регулируются в пределах общего метаболического пути, среди проаннотированных генов не было найдено генов синтеза виолацеина. Предсказаны гены устойчивости к мышьяку, теллуру, меди и ртути, а также к антибиотикам фосфомицину и пенициллину.

В продолжение работы мы планируем провести более точный филогенетический анализ изучаемого штамма, микробиологические тесты на чувствительность к антибиотикам и неорганическим субстратам, а также проверить наличие антагонистической активности против других микроорганизмов.

ПРОДУКЦИЯ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ КРЕВЕТКИ *PANDALUS BOREALIS* В
КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI* И *KOMAGATAELLA PHAFFII*

Горшкова М.А.¹, Калинин Д.С.², Шляпников М.Г.³, Грановский И.Э.³

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

²ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

³Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина – обособленное
подразделение ФИЦ Пушкинский научный центр биологических исследований РАН,
Пушино, Россия

gorshkovamary@gmail.com

Щелочная фосфатаза креветки *Pandalus borealis* (SAP) является металлозависимой фосфомоноэстеразой. Щелочные фосфатазы находят широкое применение в молекулярной биологии, например, для дефосфорилирования 5'-концов линейной ДНК или для удаления из ПЦР-смеси свободных дНТФ, не включившихся в ДНК в ходе реакции амплификации. Преимущество SAP перед другими щелочными фосфатазами заключается в её термостабильности, это свойство позволяет легко исключить её из реакции.

Целью данного исследования был анализ продукции рекомбинантной щелочной фосфатазы креветки *Pandalus borealis* в *Escherichia coli* и *Komagataella phaffii*. Для этого нами был использован ген SAP, оптимизированный по составу кодонов для экспрессии в *K. phaffii* в качестве основного хозяина и в *E. coli* в качестве дополнительного.

Для экспрессии в *E. coli* было получено пять конструкций, несущих открытую рамку считывания SAP под контролем промотора фага T7. Данные конструкции кодируют щелочную фосфатазу, имеющую цитоплазматическую либо периплазматическую локализацию за счет слияния с сигнальным пептидом пектатлиазы PelB *Erwinia carotovora*. В двух случаях SAP была слита с белком-шапероном SlyD. Все варианты химерных белков имели олигогистидиновую последовательность (His-tag) на N- или C-конце для упрощения процедуры очистки.

Производство щелочной фосфатазы креветки анализировали в штаммах *E. coli* Origami(DE3), *E. coli* Rosetta(DE3) и *E. coli* BL21(DE3)/pLysE. Накопление химерных белков наблюдалось только в штамме *E. coli* Rosetta(DE3). Продукция вариантов SAP как с сигнальным пептидом, так и без него сопровождалась накоплением целевых белков в тельцах включения, при этом специфическая фосфатазная активность в клетках не наблюдалась.

Поскольку нам не удалось получить активный препарат SAP при экспрессии в *E. coli*, в качестве потенциального продуцента были исследованы метилотрофные дрожжи *Komagataella phaffii*. Для этого была получена генетическая конструкция, кодирующая SAP, слитый с His-Tag на C-конце, под контролем метанол-зависимого промотора AOX1. Производство проводили в штамме *K. phaffii* GS115. Максимальная продукция белка наблюдалась на третий день индукции. В условиях индукции белок интереса накапливался в среде культивирования, что проявлялось в появлении специфической фосфатазной активности. Была показана возможность очистки белка с использованием Ni-NTA-аффинной хроматографии.

В результате работы была изучена продукция щелочной фосфатазы креветки в различных штаммах *Escherichia coli* и *Komagataella phaffii*. Условия продукции щелочной фосфатазы *Pandalus borealis* в *Komagataella phaffii* GS115 требуют дополнительной оптимизации. Тем не менее, полученный на основе этого штамма дрожжей продуцент можно рассматривать в качестве кандидата для биотехнологического производства щелочной фосфатазы креветки *Pandalus borealis*.

ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОБИОТЫ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА У ДИКИХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА ФАЗАНОВЫХ

Данилова О.А.¹, Сенина А.М.¹, Хуснутдинова Д.Р.¹, Григорьева Т.В.¹,
Александрова М.В.², Радченко В.В.³

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

²ООО ФАРМАПАРК, Москва, Россия

³ООО «ДНК Экспертиза», Краснодар, Россия

olya66624@yandex.ru

Кавказский фазан (*Phasianus colchicus*) является важным представителем рода *Phasianus*, отряда *Galliformes* и семейства *Phasianidae*. В последнее время увеличилась частота использования фазанов для разведения в условиях промышленного птицеводства в связи с их высокой пищевой ценностью и гипоаллергенностью продукции. Однако, в отличие от домашней птицы, сведения о физиологических особенностях фазанов, включая состав кишечной микробиоты, ограничены. По данным литературы известно, что условия интенсивного производства приводят к деградации микробиоты, снижению её функций и распространению заболеваний, как у животных, так и у людей. Для борьбы с заболеваниями птиц активно используются антибиотики, однако их применение приводит к распространению бактериальной резистентности и ухудшению качества продукции. Изучение микробиоты диких фазанов необходимо для поиска эффективных пробиотических штаммов и понимания механизмов адаптации к условиям интенсивного производства.

В данном исследовании впервые при помощи секвенирования ампликонов гена 16S рРНК охарактеризован состав микробиоты из пяти отделов (зоб, желудок, слепая кишка, толстая кишка, прямая кишка) желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) дикого фазана *Phasianus colchicus*.

Метагеномный анализ 12 особей диких фазанов позволил составить усредненный профиль бактериального сообщества по каждому отделу ЖКТ. Бактериальный состав слепой кишки был наиболее разнообразным (OTU – 1151.4, Индекс Шеннона – 6.42). Микробиота зоба была наименее разнообразной (OTU – 447.8, Индекс Шеннона – 5.73). Бактериальный состав можно охарактеризовать наличием представителей 7 фил: *Firmicutes* (53%), *Actinobacteria* (27%), *Proteobacteria* (11%), *Bacteroidetes* (8%), *Tenericutes* (0.4%), *Chloroflexi* (0.2%), *TM7* (0.1%). На уровне семейств во всех отделах, кроме зоба и толстой кишки доминировали бактерии семейства *Coriobacteriaceae* (17%), в зобе доминировали *Bacillaceae* (11.3%), в толстой кишке *Ruminococcaceae* (20.4%). Также высокие значения доли в сообществе для всех отделов ЖКТ были у семейств *Lachnospiraceae* (16.3%), *Bifidobacteriaceae* (5.8%), *Bacteroidaceae* (5.4%) и *Ruminococcaceae* (14.9%). Представители семейства *Lactobacillaceae* как потенциальные пробиотики встречались только в составе микробиоты мускульного желудка (2.7%) и слепой кишки (1.8%).

Таким образом, впервые была получена характеристика микрофлоры по 5 отделам кишечника *Phasianus colchicus*. Результаты метагеномного анализа показали, что микробиота дикого фазана обладает характерными особенностями в зависимости от отдела ЖКТ. Эти результаты имеют важное значение не только для понимания физиологии фазанов, но и для выявления ассоциаций микробиоты с иммунитетом птицы, разработки стратегий улучшения условий содержания, поиска и создания потенциальных пробиотиков для ветеринарных биопрепаратов. Дальнейшие исследования в этом направлении могут значительно продвинуть знания в области сохранения биоразнообразия, экологии, зоологии и улучшения условий птицеводства.

Исследование проведено в рамках выполнения проекта №FZSM-2023-0013 государственного задания КФУ.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СООБЩЕСТВ КСИЛОТРОФНЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ ПРИ УТИЛИЗАЦИИ ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗНЫХ СУБСТРАТОВ

**Драница И.С., Орлова А.А., Сигова А.А., Ярыгин Д.А., Михайленко В.Л.,
Юринова Г.В., Приставка А.А.**

Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

dranitsa.irina@mail.ru

Биотехнологическая переработка лигноцеллюлозных субстратов позволяет не только решать экологические проблемы, связанные с накоплением растительных отходов, но при этом одновременно получать коммерчески важные соединения (этанол, органические кислоты, ферменты и т.д.). В настоящее время практическое применение этих процессов ограничивается устойчивостью нативных субстратов к действию ферментов, которая в наибольшей степени определяется лигнином. В связи с этим особый интерес представляют ксилотрофные базидиомицеты – возбудители белой гнили, обладающие уникальным комплексом окислительных ферментов, которые оказывают направленное воздействие на лигнин. Однако, даже при участии этой группы продуцентов утилизация лигноцеллюлозы занимает длительное время (месяцы минимум). Для повышения эффективности процесса предлагается использовать грибной комплекс, включающий одновременно несколько видов базидиомицетов, между которыми могут возникать синергетические связи.

Цель работы – изучить возможность совместного культивирования нескольких видов ксилотрофных базидиомицетов и оценить эффективность ферментных композиций, полученных на основе объединенных лигноцеллюлазных комплексов из разных продуцентов.

Объектом исследования являлись 4 вида грибов: *Pleurotus ostreatus*, *Flammulina velutipes*, *Phanerochaete chrysosporium*, а также базидиомицет, выделенный из кородревесных отходов предприятия целлюлозобумажной промышленности (пока не определен).

На первом этапе оценивалась антагонистическая активность исследуемых культур: была определена средняя радиальная скорость роста каждого гриба на плотных агаризованных средах, а затем виды выращивались совместно в разных сочетаниях. Скорости роста всех видов оказались сопоставимы, и антагонистическая активность не выявлена ни в одной из исследованных межвидовых комбинаций.

На втором этапе был проведен сравнительный анализ активностей ферментов лигноцеллюлазного комплекса, продуцируемых каждым видом в отдельности, и ферментных композиций на основе смешанных культуральных жидкостей (КЖ) разных видов. Для этого продуценты раздельно культивировались в жидких питательных средах и в полученных КЖ были измерены содержание белка, биомасса и активность внеклеточных ферментов – общая целлюлазная, фенолоксидазная, лигнинпероксидазная. Затем культуральные жидкости были смешаны в равных пропорциях и в полученных растворах так же была измерена активность. Фактические значения активностей в смесях сравнивались с теоретическими, рассчитанными на основе предположения об аддитивности ферментов из разных продуцентов. При объединении всех четырех ферментных комплексов возникал достоверный эффект усиления фенолоксидазной и целлюлазной активностей (в 25 и в 20 раз соответственно), а лигнинпероксидазная активность оказалась аддитивна по продуцентам.

Таким образом, между грибами, входящими в состав исследуемого сообщества, не только отсутствует антагонизм на клеточном уровне, но также существует синергизм на уровне некоторых внеклеточных ферментов, поэтому данный комплекс видов может оказаться эффективным при переработке лигноцеллюлозного сырья. Более однозначный вывод будет сделан по результатам проводимой в настоящее время твердофазной ферментации древесных субстратов в присутствии рассмотренных базидиомицетов.

ВЫДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИОФАГОВ, ЛИЗИРУЮЩИХ КЛЕТКИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* И *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

Закарова Н.Д., Ильина В.Н., Каюмов А.Р.

ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) Федеральный Университет», Казань, Россия

nargizazakarova@gmail.com

Известно, что *Pseudomonas aeruginosa* и *Klebsiella pneumoniae* являются грамотрицательными условно-патогенными микроорганизмами, способными вызывать смешанные инфекции, приводящие к тяжелой пневмонии. Данные патогены ВОЗ причислил в группу бактерий с множественной лекарственной устойчивостью, что дополнительно усугубляет терапию данных заболеваний. Поэтому в настоящее время остро стоит необходимость поиска и исследования альтернативных методов борьбы с данными патогенами для разработки эффективной противомикробной терапии. Одной из таких альтернатив является использование фаговых коктейлей, содержащих в себе смесь бактериофагов, направленных против нескольких патогенов.

Целью данной работы явилось получение бактериофагов из природных водоемов, способных лизировать бактерии *Pseudomonas aeruginosa* и *Klebsiella pneumoniae*.

Источником для получения бактериофагов служила вода, собранная из озера Средний Кабан г. Казань, которая подвергалась последующей фильтрации и инкубированию индивидуально в насыщенной среде, содержащей бактериальные клетки. Для получения чистого фаголизата без бактериальных клеток проводили дополнительную очистку суспензии при помощи хлороформа и мембранных фильтров. Далее проводили идентификацию бактериофагов и оценивали их вирулентные свойства в отношении тестируемых штаммов микроорганизмов с использованием метода Отто (“метод стерильной дорожки”) на двухслойном агаре. Так, на средах, на которых отдельно выращивались клетки *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae* были получены отчетливые зоны лизиса, что доказывает присутствие в водоеме бактериофагов, способных инфицировать данные патогены.

Таким образом, нами были выделены бактериофаги, лизирующие клетки *Pseudomonas aeruginosa* и *Klebsiella pneumoniae*, под условными названиями *Pseudomonas phage* и *Klebsiella phage*, которые в дальнейшем могут рассматриваться как составные компоненты новых антибактериальных препаратов.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности. Проект № FZSM-2022-0017.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА НОВОГО БАКТЕРИОЛИТИЧЕСКОГО ФЕРМЕНТА *SERP3 LYSOBACTER CAPSICI VKM B-2533^T*

Зеленов Д.В.^{1,2}, Афошин А.С.¹, Кудрякова И.В.¹, Галемина И.Е.^{1,2},
Леонтьевская Е.А.¹, Леонтьевская Н.В.¹

¹ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН» (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН), Пушкино, Россия

²Пушкинский филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)», Пушкино, Россия

zelenovdimal@mail.ru

На данный момент существует проблема увеличения числа антибиотикорезистентных микроорганизмов. Исследования, направленные на поиск и разработку антимикробных препаратов, с каждым годом становятся все более актуальными.

Одним из способов решения данной проблемы является создание новых антимикробных препаратов на основе бактериолитических ферментов. Однако применение в биомедицине ограничено плохой их изученностью. Активными продуцентами бактериолитических ферментов являются бактерии. В лаборатории биохимии клеточной поверхности микроорганизмов ИБФМ РАН изучаются перспективные бактерии рода *Lysobacter*, известные своей способностью продуцировать множество антимикробных соединений, таких как антибиотики, пептиды, бактериолитические ферменты. Ранее в лаборатории с помощью транскриптомного подхода был определен пул генов *Lysobacter capsici* VKM B-2533^T с предполагаемой бактериолитической активностью. Один из этих генов аннотируется как сериновая протеаза семейства S1E (UOF12968.1) с предполагаемой бактериолитической активностью. Ранее этот фермент не был выделен и охарактеризован. Таким образом, целью данной работы являлось выделение и изучение бактериолитического фермента *Serp3*.

Для экспрессии гена *serp3* был сконструирован экспрессионный штамм *L. capsici* P_{GroEL(A)}-*serp3*. Для получения *Serp3* в электрофоретически гомогенном состоянии была разработана схема очистки с использованием методов гель-фильтрации, аффинной и катионообменной хроматографии. Для характеристики *Serp3* в качестве субстрата использовали автоклавированные клетки *Staphylococcus aureus* 209P. Установлено, что для проявления бактериолитической активности *Serp3* оптимальными являются: 10 мМ Трис–НСI, рН 7.0. Температура полуинактивации фермента составила 70 °С. Помимо автоклавированных клеток стафилококка *Serp3* гидролизует клетки *Micrococcus luteus* Ac-2230^T, *Pseudomonas aeruginosa* и *Proteus vulgaris* H-19. *Serp3* эффективно гидролизует субстраты для протеаз казеин и азофибрин.

Таким образом, выделена и охарактеризована новая бактериолитическая протеаза *Serp3*, представляющая интерес как для фундаментальной науки, так и для биомедицины как «биологический скальпель» для удаления некротических масс из гнойных ран.

Исследование выполнено за счет гранта Министерства науки и высшего образования (соглашение № 075-10-2021-113, уникальный идентификатор контракта RF----193021X0001).

КАК ЕЩЕ *MICROPHALLUS PYGMAEUS* МОЖЕТ ВЛИЯТЬ НА ГОЛОБИОНТА.
ИЗМЕНЯЕТСЯ ЛИ МИКРОБИОМ ЛИТОРИН ПРИ ПАРАЗИТАРНОЙ ИНВАЗИИ

Зубова Е.В.¹, Гафарова Е.Р.¹, Курячий Д.С.¹, Репкин Е.А.^{1,2},
Гранович А.И.¹, Мальцева А.Л.

¹Department of Invertebrate Zoology, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

²Research Park, Centre for Molecular and Cell Technologies, St. Petersburg State University,
St. Petersburg, Russia

zubova.15@list.ru

Трематоды рода *Microphallus* используют в качестве промежуточных хозяев различных гастропод (Mollusca: Gastropoda). Многие аспекты влияния трематодной инвазии на поведение, морфологию и физиологию их промежуточных хозяев достаточно полно изучены, однако ранее не было исследовано влияние трематод на бактериальную микрофлору хозяина. Важно рассматривать воздействие трематодозов на гастропод как на целостный организм в составе голобионта, поскольку роль бактерий в организме может иметь большое значение для понимания механизмов формирования и устойчивости системы паразит-хозяин.

Для нашего исследования мы использовали микробиом пищеварительной системы морских литоральных гастропод *Littorina saxatilis* и *L. obtusata* в качестве модели для анализа влияния трематод *Microphallus pygmaeus* на голобионта.

Наша гипотеза заключалась в том, что моллюск и его микробиом способны отвечать на заражение трематодами как единая система. В качестве пилотного исследования для проверки этого предположения мы решили выяснить, какие последствия для микробиома пищеварительной системы моллюсков влечет заражение *M. pygmaeus*. Индивидуальные кишечные образцы в количестве 56 штук (фрагменты задней кишки зараженных и незараженных *L. obtusata* и *L. saxatilis* с верхнего и нижнего уровня литорали, по 7 повторностей) были собраны в августе 2021 года на побережье Баренцева моря. Для анализа состава кишечного микробиома неинфицированных и инфицированных *M. pygmaeus* моллюсков двух видов рода *Littorina* был использован 16S рДНК метабаркодинг. Анализ показал, что состав кишечных бактерий качественно и количественно различался как у зараженных и незараженных улиток, так и между видами *L. saxatilis* и *L. obtusata*, но не зависел от уровня литорали. Бактерии рода *Nitrososphaerales* были в большей степени характерны для *L. obtusata*, а бактерии рода *Rhizobiaceae* оказались характерны для *L. saxatilis*. В бактериомах кишечника обоих видов моллюсков заражение *M. pygmaeus* приводит к снижению численности бактерий из родов *Psychromonas*, *Psychrilyobacter* и *Halochromatium*. Мы предполагаем, что снижение обилия представителей этих родов существенно отражается на пищеварении моллюсков рода *Littorina*: может ухудшиться метаболизм моно- и олигосахаридов. У зараженных моллюсков отмечена повышенная численность бактерий рода *Mycoplasma*, которая может свидетельствовать о большей вероятности сопутствующих инфекций при трематодозе.

Изменения в таксономическом составе кишечного микробиома *Littorina saxatilis* и *L. obtusata* в связи с инвазией *Microphallus pygmaeus* позволяют предположить, что действие паразита на промежуточного хозяина сказывается на голобионте целиком, влияя и на моллюска, и на его кишечный микробиом.

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ БАКТЕРИЙ РОДА *EXIGUOBACTERIUM*

Иминова Л.Р.^{1,2}, Поливцева В.Н.², Абашина Т.Н.², Делеган Я.А.²,
Сузина Н.Е.², Соляникова И.П.²

¹Пушинский филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)», Пушино, Россия

²Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН (ИБФМ РАН), Пушино, Россия

uzdleila90@gmail.com

Представители рода *Exiguobacterium* обнаруживаются в эконишах с широким диапазоном температур (от -12 до +55 °С), включая ледники Гренландии и горячие источники. Большинство представителей данного рода также способны расти при повышенной солености среды (до 13 %) и в широком диапазоне значений рН (5-11). Данные уникальные способности этих бактерий выживать при экстремальных условиях обеспечивают возможность их применения в качестве основы для разработки и создания высокоэффективных биопрепаратов.

Штамм *Exiguobacterium alkaliphilum* Ex.1 был выделен из ризосферной почвы, загрязненной нефтепродуктами (г. Ярославль). Изучение физиологических пределов выживаемости штамма *Exiguobacterium alkaliphilum* Ex.1 показало, что данный изолят растет при температуре от +10 до +42°С, в диапазоне рН 6-11 и при солености до 15 %. Это позволило определить, в каких климатических зонах его использование в качестве основы для биопрепаратов-деструкторов будет наиболее эффективно. Геном штамма секвенирован и представлен кольцевой хромосомой размером 2903369 п.н. и двумя кольцевыми плазмидами размером 73590 п.н. и 52125 п.н. Идентифицированы гены деградации бензоата, хлоралканов и хлоралкенов, ксилолов, этилбензола и нафталина.

В ходе исследования определено, что штамм *E. alkaliphilum* Ex.1 активно деградирует углеводороды при 28°С и солености 11 %. Процент убыли нефтепродуктов в образцах, обработанных исследуемым штаммом, составил от 34,5% за 14 суток и до 50 % за 30 суток в модельном растворе при оптимальных условиях культивирования.

Для данного штамма характерна целлюлозолитическая активность. Процент деструкции бумажных фильтров с содержанием целлюлозы около 99% составил 87% на 5-7 сутки по сравнению с контролем, в который бактериальная биомасса не вносилась. Убыль в исходном весе микрокристаллической целлюлозы составила 51% на 12 сутки после внесения исследуемого штамма в образец.

В геноме штамма также выявлены гены, участвующие в метаболизме сидерофоров, железа и биосинтезе ауксинов. Полевые и лабораторные испытания подтвердили ростостимулирующую способность данного изолята на пшенице, подсолнечнике, кукурузе и яровом ячмене.

Проведенные исследования позволили включить штамм *Exiguobacterium alkaliphilum* Ex.1 в основу трех биопрепаратов, а также показали возможность применения этого изолята в качестве монокультуры для рекультивации и биоремедиации загрязненных нефтепродуктами почв и водных систем.

Исследования поддержаны Грантом № 19-54-80003 БРИКС.

ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЕЙ ГЛУТАТИОНА ПРИ ДЕЙСТВИИ ЦИПРОФЛОКСАЦИНА НА *ESCHERICHIA COLI*, РАСТУЩУЮ НА СРЕДЕ С ЦИСТИНОМ

Калашникова Т.В., Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н.

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН,
Пермь, Россия

tatyana-kalashnikova22@yandex.ru

Согласно одной из гипотез, механизм бактерицидного действия ряда антибиотиков, включая хинолоны, сопряжен с окислительным стрессом. Также известно, что избыток внутриклеточного цистеина способствует образованию гидроксильного радикала – наиболее токсичной активной формы кислорода (АФК). Ранее мы показали, что снабжение бактерий *E. coli*, растущих на минимальной среде, цистином сопровождается повышением уровня цистеина. Было показано также, что обработка клеток *E. coli* фторхинолоном ципрофлоксацином приводит к ускорению синтеза глутатиона (GSH), который, среди прочих функций, выступает в роли буфера внутриклеточного цистеина. С этой точки зрения, глутатион, играя существенную роль в гомеостазе цистеина и предотвращении образования АФК, может влиять на восприимчивость бактерий к ципрофлоксацину. Целью данной работы было выявить влияние цистина в среде культивирования на уровень GSH при действии ципрофлоксацина.

Объектом исследований служил штамм *E. coli* BW25113 из коллекции Keio. Бактерии выращивали на минимальной среде M9 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ – 15.13 г/л, KH_2PO_4 – 3 г/л, NH_4Cl – 1 г/л, NaCl – 0.5 г/л, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – 0.246 г/л, CaCl_2 – 0.011 г/л) с глюкозой (0.2%). Ночную культуру разбавляли в 100 мл среды до начальной OD_{600} около 0.05 и культивировали в 250-мл колбах на термостатируемом шейкере (37 °C, 150 об/мин) до OD_{600} 0.4, после чего в среду вносили ципрофлоксацин (ЦФ) в концентрациях 0.03, 0.3 и 3 мкг/мл и продолжали инкубацию в течение двух часов. Добавление цистина осуществлялось дробно по 15 мкМ каждые 45 минут. Периодически отбирали пробы для определения OD_{600} и глутатиона внутри и снаружи клеток. Глутатион измеряли спектрофотометрическим циклическим методом Tietze, используя реагент дитионитробензоат (DTNB) и глутатионредуктазу.

В среде M9 без добавления цистина уровень внутриклеточного GSH (GSH_{in}) в контрольной культуре постепенно увеличивался с 4.46 до 8.71 $\mu\text{M}/\text{OD}_{600}$. В присутствии цистина в среде культивирования начальная концентрация GSH_{in} была в 2.4 раза выше, при этом в течение 2 часов культивирования наблюдалось снижение уровня глутатиона в 2 раза (с 10.69 до 5.21 $\mu\text{M}/\text{OD}_{600}$). Ципрофлоксацин в концентрации 0.03 мкг/мл не оказывал значимого влияния на GSH_{in} в среде без цистина. Внесение 0.3 мкг/мл антибиотика снижало, а 3 мкг/мл повышало уровень глутатиона по сравнению с контролем, при этом максимум наблюдался через 1 час после внесения антибиотика. В среде с дробным добавлением цистина уровень GSH_{in} был выше при действии всех концентраций ципрофлоксацина, наибольшее различие в сравнении с контролем наблюдалось при внесении 3 мкг/мл ЦФ.

Во второй фазе ответа на 3 мкг/мл ЦФ наблюдался выход глутатиона из клеток и его накопление в среде (GSH_{out}) вне зависимости от наличия цистина, при этом максимальная концентрация GSH_{out} наблюдалась через 2 часа после внесения антибиотика. Время выхода глутатиона в среду совпадало с падением удельной скорости роста до отрицательных значений, что свидетельствует о начале SOS-зависимой «клеточной смерти». При дробном внесении цистина накопление GSH_{out} наблюдалось также при 0.3 мкг/мл ЦФ.

Таким образом, внесение цистина в среду, а также воздействие повышенной концентрацией ЦФ увеличивают уровень GSH в клетках *E. coli*, тогда как минимальная ингибирующая концентрация (0.3 мкг/мл) снижает GSH_{in} . В условиях присутствия цистина уровень глутатиона повышается при всех воздействующих концентрациях антибиотика.

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда № 22-14-00093.

ФУМАРОЛЬНЫЕ ПОЛЯ ВЫСОКОГОРНЫХ ВУЛКАНОВ КАК АНАЛОГ ВНЕЗЕМНЫХ СРЕД ОБИТАНИЯ: МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Касаткина А.Н.¹, Абрамов А.А.², Белов А.А.^{1,3}

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

²Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения
Российской академии наук – обособленное подразделение ФИЦ Пуштинский научный центр
биологических исследований РАН, Пушино, Россия

³ФИЦ Почвенный институт имени В.В. Докучаева, Москва, Россия

aya.kasatkina@gmail.com

В последнее время высокогорные вулканы все больше и больше привлекают к себе внимание исследователей-астробиологов. Фумарольные поля в зоне вечной мерзлоты характеризуются целым сонмом природных факторов, делающих жизнь здесь практически невозможной: низкое содержание органического вещества, сухость, засоленность, разреженная атмосфера, стерилизующее воздействие УФ-излучения и резкие колебания температуры способствуют образованию уникальной высококонтрастной экосистемы, способной функционировать в широком диапазоне условий.

В рамках данного исследования нами были оценены показатели общей численности прокариот, численности культивируемых бактерий разных экологических групп в отношении температуры окружающей среды и физиологических характеристик выделенных бактерий, а также функциональное и таксономическое биоразнообразие бактериальных сообществ фумарольных полей Кавказа, Камчатки, вулкана Фудзияма и шлаковых полей горного массива Хадсон.

В исследуемых образцах общая численность прокариот в фумарольных и вулканических отложениях была выявлена на уровне 10^7 - 10^8 кл/г что превышает известные литературные данные (10^5 кл/г). Уровень pH оказался основным лимитирующим фактором: выделенные бактерии репродуцируют *in vitro* преимущественно при нейтральных значениях pH, при этом 14% штаммов проявили полиэкстремофильные свойства в отношении температуры культивирования и содержанию хлорида натрия.

Наиболее разнообразные в функциональном отношении бактериальные сообщества были выявлены в образцах шурфа на Эльбрусе, при этом количество изолятов, выделенное из данных образцов, было одним из самых низких, что по всей видимости обусловлено сложными трофическими взаимодействиями *in situ*. Исследование филогенетической структуры культивируемых сообществ выявило ведущую роль филума *Bacillota* в исследуемых образцах с Эльбруса и Ушковского.

Таким образом, прокариотные комплексы фумарольных полей проявляют высокую устойчивость к воздействию целого ряда неблагоприятных факторов внешней среды и, соответственно, представляют собой перспективный модельный объект в контексте астробиологических исследований и изучения происхождения жизни на Земле.

ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕКТРА АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ НОВЫХ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ ЭНДОЛИЗИНОВ

Климова А.А., Васина Д.В., Антонова Н.П.

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Москва, Россия

arina.klimova10012001@gmail.com

Применение эндолизинов, литических ферментов бактериофагов, на сегодняшний день является одним из перспективных способов терапии бактериальных инфекций. Воздействуя на клеточную стенку бактерий и гидролизуя пептидогликан, они вызывают разрушение клетки за счет гипотонического лизиса. Механизм действия эндолизинов особенно актуален в свете распространения антибиотикорезистентности (АБР), так как развитие бактериальной устойчивости в данном случае менее вероятно за счёт того, что эндолизины воздействуют на уже сформированный пептидогликан клеточной стенки, которая является высоко консервативной структурой. Большинство препаратов, находящихся в разработке, в том числе на разных фазах клинических исследований, содержат в своём составе эндолизины, действующие на грамположительные бактерии. Для расширения спектра действия в отношении грамотрицательных патогенов применяют методы белковой инженерии и модификации эндолизинов. В данной работе эндолизин LysSi3 был модифицирован антимикробными пептидами (АМП) различных групп: цекропином А (LysSi3-CeA) – лизин-содержащим АМП; пептидом Tur1A, богатым остатками пролина (LysSi3-Tur1A); гистатином 5 (LysSi3-His5); глицин-богатым пептидом GG3 (LysSi3-GG3), аргинин-богатым пептидом тритрптицином (LysSi3-ТТРС), амфифильным альфа-спиральным пептидом LK, состоящим из остатков лейцина и лизина (LysSi3-LK). Спектр действия полученных бактериолитических ферментов исследовали на группе грамотрицательных организмов ESKAPE, вызывающих внутрибольничные инфекции, которые характеризуются, как правило, множественной лекарственной устойчивостью.

По результатам экспериментов было показано, что модифицированные эндолизины активны в отношении полирезистентных грамотрицательных клинических изолятов *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*. Полученные лизины, вне зависимости от модификации, в концентрации 100 мкг/мл проявляют максимальное антибактериальное действие в отношении *A. baumannii* и *P. aeruginosa*. Активность против *E. coli* была также высокой, однако зависела от исследуемого белка и была наибольшей у LysSi3-ТТРС, LysSi3-Tur1A, LysSi3-LK. В отношении штаммов *K. pneumoniae* высокую активность проявляли только два из исследованных ферментов – LysSi3-LK и LysSi3-Tur1A. Таким образом, эти два фермента действовали в отношении наибольшего количества исследованных штаммов и значительно отличались по спектру действия от нативного фермента LysSi3.

В результате экспериментов было показано, что ферменты различаются по спектру действия в отношении грамотрицательных бактерий, при этом среди ряда эндолизинов удалось выделить несколько перспективных вариантов модификаций для дальнейшей работы.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-74-10027, <https://rscf.ru/project/23-74-10027/>

ОТКАЗ ОТ КУРЕНИЯ СИГАРЕТ КАК ФАКТОР МОДУЛЯЦИИ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ

**Коваленко А.В., Булыгина Е.А., Сенина А.М., Синягина М.Н., Хуснутдинова Д.Р.,
Маркелова М.И., Абдулхаков С.Р., Григорьева Т.В.**

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

annashabot@gmail.com

Микробиота кишечника человека прямо или косвенно влияет на все системы органов и может изменяться под влиянием диеты, лекарств, возраста, заболеваний и образа жизни. Недавние исследования связывают изменения кишечной микробиоты с курением табака.

Целью работы являлась оценка влияния отказа от курения сигарет на качественные и количественные изменения состава микробного сообщества кишечника.

Исследуемую когорту составили 27 добровольцев обоих полов, выкуривающих не менее 10 сигарет в день. Во время исследования добровольцы находились в условиях стационара, половина из них (14 человек) полностью отказались от курения, остальные продолжали. Анализ фекальной микробиоты проводили в двух точках – перед началом исследования и через 5 дней. Библиотеки переменных участков V3-V4 гена 16S рНК секвенировали на платформе Illumina MiSeq. Прочтения анализировали с помощью алгоритма QIIME v.2 с использованием базы данных SILVA v. 138. Для выявления значимых отличий в составе микробиоты между группами добровольцев был применен парный тест Вилкоксона, расчеты выполнялись в среде R с помощью RStudio.

В начале эксперимента между группами не было отличий в значении индекса Шеннона и количества таксономических категорий. Микробиота кишечника характеризовалась преобладанием бактериальных семейств: *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae*, *Oscillospiraceae* (суммарная доля примерно 65%), и родов: *Faecalibacterium*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Blautia*, *Bifidobacterium* (32%). Спустя 5 дней после отказа от курения микробиота добровольцев, продолжающих курить, достоверно не изменилась, тогда как микробиота бросивших курить имела тенденцию к увеличению разнообразия. Основные представители кишечной микробиоты остались теми же, однако менялось их соотношение в сообществе. Анализ бета-разнообразия методом главных компонент показал, что отказ от курения способен влиять на изменения в составе кишечной микробиоты. Было обнаружено 19 родов со средней долей в сообществе более 1%, значимо меняющих свою представленность на пятые сутки после отказа от курения. В частности, доля родов *Blautia* и *Sutterella* снижалась, а доля трех родов семейства *Oscillospiraceae* и одного рода семейства *Christensenellaceae* повышалась, что, согласно данным литературы, говорит о приближении микробиоты содержимого кишечника к профилю характерному для некурящих людей.

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030) и финансируется за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету на выполнение государственного задания в сфере научной деятельности (#FZSM-2023-0013).

ПОЛИФАЗНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НОВЫХ ШТАММОВ ЦИАНОБАКТЕРИЙ
ИЗ КОЛЛЕКЦИИ CALU САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО
УНИВЕРСИТЕТА

Колган Н.Р., Аверина С.Г.

Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург, Россия

nika.kolgan@ya.ru

Цианобактерии, древние прокариоты, способные к фотосинтезу, возникли около 3,5 – 3,8 млрд лет назад. Играя ключевую роль в формировании экосистем и создании кислородной атмосферы, они считаются предшественниками пластид водорослей и растений. Роль цианобактерий в развитии биосферы Земли невозможно переоценить.

Коллекции культивируемых штаммов, такие как РСС Института Пастера (Франция) и АТСС (США), играют важную роль в исследовании цианобактерий. Коллекция CALU СПбГУ содержит около 1500 штаммов микроорганизмов, включая 511 цианобактерий, и постоянно пополняется новыми штаммами.

Целью нашей работы было описание и идентификация новых штаммов цианобактерий из коллекции CALU СПбГУ.

Понимание разнообразия и распространения этих микроорганизмов помогает улучшить наше знание о функционировании экосистем и влиянии на окружающую среду. Кроме того, идентификация новых видов цианобактерий может привести к разработке новых методов борьбы с вредными водорослями, а также к открытию потенциально ценных биологически активных веществ.

Были изучены морфология клеток и особенностей жизненного цикла исследуемых штаммов, выполнен филогенетический анализ с использованием последовательностей фрагментов гена 16S рРНК и участков внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS) рибосомного оперона.

В результате проведенного анализа выявлены два новых вида в составе р. *Altericista*, представленные штаммом CALU 1943 и штаммами CALU 1940 и CALU 1942, соответственно; штамм CALU 1842 принадлежит к новому виду в составе р. *Chalicogloea*.

По совокупности фенотипических и генотипических признаков идентифицированы до вида следующие штаммы рабочей коллекции: CALU 1885, CAL 1886, CALU 1939 – как *Chroococcus minutus*; CALU 1938 – как *Altericista lacusladogae*, CALU 1945 – как *Cyanobium gracile*, CALU 1946 – как *Geminocystis urbisnovae*. Штаммы CALU 1941 и CALU 1944 принадлежат к роду *Pseudanabaena*, однако их видовая принадлежность не установлена.

ТЕРПЕНЫ КАК ПОТЕНЦИАТОРЫ АНТИМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Колесникова А.И.¹, Гильфанов И.Р.¹, Байдамшина Д.Р.¹, Ядыкова Л.Л.¹,
Никитина Л.Е.², Каюмов А.Р.¹, Тризна Е.Ю.¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

²Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

kolesnikova.ai337@gmail.com

В связи с быстрым распространением устойчивости к антибиотикам у бактерий наблюдается снижение эффективности лечения заболеваний и повышению смертности пациентов. Поэтому все более актуальным становится применение комбинированной терапии с подходящими адьювантами, которые способствуют снижению концентраций действующих веществ.

Терпены и их производные – терпеноиды, способны нарушать структуру и состав мембран клеток, что приводит к изменению в метаболизме микроорганизма и его гибели, что делает эти соединения перспективными кандидатами для комплексной терапии бактериальных инфекций.

Исследована антимикробная активность 57 природных и синтетических терпенов и терпеноидов в отношении *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Candida albicans*. Обнаружено, что большинство веществ обладали низкой противомикробной активностью в отношении всех исследуемых бактерий. При этом абетиновая кислота проявляла наибольшее противомикробное действие в отношении *S. aureus* (МПК составила 16 мкг/мл), что может охарактеризовать ее как потенциальное противомикробное средство для лечения стафилококковых инфекций.

Также исследовали способность терпенов и терпеноидов к потенцированию противомикробных препаратов. Для этого микроорганизмы выращивали в присутствии только амикацина, мирамистина, цефтриаксона, ципрофлоксацина или флуконазола и совместно с исследуемым веществом. В результате было показано, что в присутствии терпенов и терпеноидов происходит повышение эффективности противомикробных препаратов, однако эффект зависит от выбранных препаратов и штамма. При этом (+)-3β,4β-карандиол проявлял синергизм со всеми исследуемыми классами противомикробных препаратов в отношении золотистого стафилококка.

Оценка противомикробной активности конъюгатов аминотерпеноидов и моксифлоксацина (**F1-F4**) показала, что эффективность **F1**, **F2** и **F4** в отношении *S. aureus*, *P. aeruginosa* и *C. albicans* была значительно ниже, по сравнению с моксифлоксацином. Однако, в отношении золотистого стафилококка вещество **F3** было в 10 раз эффективнее, чем препарат сравнения. При этом исследуемые вещества не обладали мутагенностью и цитотоксичностью. Оценка проницаемости новых производных фторхинолона в зрелые биопленки *S. aureus* с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии показала способность соединения **F3** проникать практически во все слои зрелой биопленки и внутрь бактериальных клеток.

Таким образом комбинирование природных терпенов и синтетических терпеноидов с противомикробными и противогрибковыми препаратами способно повышать их эффективность, а созданные на их основе конъюгаты оказывать сильное противомикробное действие.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности. Проект № FZSM-2022-0017.

ИЗУЧЕНИЕ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ РЕКИ ЛИСТВЯНКА (РЯЗАНСКАЯ ОБЛАСТЬ)

Крылова В.А.¹, Дарбаидзе П.М.¹, Зацаринная Е.А.^{1,2}

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Рязанский государственный университет имени С.А. Есенина», Рязань, Россия

²Институт проблем промышленной экологии Севера – обособленное подразделение
ФИЦ Кольский научный центр РАН, Апатиты, Россия

fgkvika07@gmail.com

Нефтеперерабатывающая промышленность занимает ведущее место в экономике Рязанской области, на территории которой расположены крупные нефтеперерабатывающие предприятия. В процессе переработки сырой нефти образуются сточные воды, которые содержат повышенные концентрации нефтепродуктов, таких как углеводороды, фенолы, парафины, циклические органические углеводороды и т.д. Пройдя очистные сооружения, образуемые сточные воды нефтеперерабатывающих производств г. Рязани попадают в реку Листвянка, которая является правым притоком реки Оки. Вода реки Листвянка в устье стабильно оценивается как умеренно загрязненная, третьего класса качества; приоритетными загрязнителями являются нефтепродукты и высокое содержание взвешенных веществ.

Нефть и продукты ее переработки способны накапливаться в донных отложениях, создавая долгосрочное загрязнение поверхностных водных объектов. С целью выделения углеводородоокисляющих бактерий были отобраны пробы донных отложений р. Листвянка на створе 500 м ниже последнего пруда системы очистных сооружений в летний период 2023 г. в соответствии с ГОСТ 17.1.5.01-80. Отбирали поверхностный (кислородный) слой керна.

Посев проб донных отложений производился методом предельных разведений (титрационным методом) с высевом на поверхность среды Ворошиловой-Диановой с добавлением 2,5% стерильной нефти и нефтяных продуктов (дизельное топливо, бензин, вазелиновое масло) в пятикратной повторности. Посевы инкубировали в течение 2-14 суток при комнатной температуре. Рост культур наблюдался на всех анализируемых источниках углерода – вазелиновое масло, нефть, мазут и бензин, т. о. углеводородоокисляющие бактерии являются постоянным компонентом микробиоценозов донных отложений реки Листвянка.

Наиболее оптимальным для процесса окисления являлось использование бензина в качестве источника углерода. Анализ проб, содержащих данный нефтепродукт, показал, что они имеют самое высокое содержание углеводородоокисляющих бактерий, составляющее $2,5 \times 10^6$ КОЕ/г иловых отложений. Нефть и вазелиновое масло обладают более медленными процессами окисления из-за их труднорастворимой природы, поэтому в пробах с этими веществами было обнаружено наименьшее количество колониеобразующих единиц углеводородоокисляющих организмов: $6,2 \times 10^3$ и $1,17 \times 10^2$ КОЕ/г соответственно. Эти результаты указывают на то, что различные углеводородные вещества имеют разную степень подверженности окислительным процессам.

Получение чистых культур углеводородоокисляющих микроорганизмов проводилось методом Коха на агаризованной питательной среде. Всего было выделено 49 чистых культур. Проведены тесты на определение грамм-принадлежности, оксидазной и каталазной активности. Выявлено, что основную массу (65%) образцов составляют грамотрицательные, каталаза-оксидаза-положительные палочки. Только 6% из общего числа составляют грамположительные виды и 9% оксидаза-, каталаза-положительные. Доминирующими среди выделенных чистых культур были представители р. *Pseudomonas*.

***S. NECATOR H16* КАК ПРОДУЦЕНТ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ ИЗ ОТРАБОТАННОГО КУЛИНАРНОГО МАСЛА РЕСТОРАНОВ БЫСТРОГО ПИТАНИЯ**

Кузнецова А.П., Несговорова Н.А., Перцева А.С., Аль-Шехадат Р.И.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский университет ИТМО», факультет биотехнологий (BioTech), Санкт-Петербург, Россия

apkuznetcova@itmo.ru

Обострение проблемы загрязнения окружающей среды пластиком приводит к поиску более экологичных решений для замены традиционных пластмасс. В качестве альтернативы рассматриваются биоразлагаемые полигидроксиалканоаты (ПГА), синтезируемые микроорганизмами внутриклеточно в виде аморфных гранул и расщепляемые по мере необходимости. Полигидроксиалканоаты выделяются среди других биоразлагаемых полимеров благодаря их биосовместимости. Более того, ПГА обладают близкими к традиционным пластикам физико-механическими свойствами, что позволяет получать из них большинство видов полимерных изделий. Высокая цена полимера ограничивает возможность его широкого производства и применения. Стоимость производства может быть снижена за счет смены основного вида сырья – глюкозы, на вторичные ресурсы. Отработанное кулинарное масло, являющееся опасным отходом согласно ФККО (Федеральный классификационный каталог отходов), выступает перспективным сырьем для получения ПГА ввиду своего химического состава, доступности, а также остро стоящей проблемой переработки в продукт, имеющий спрос на рынке.

Целью работы является разработка технологии получения биоразлагаемых ПГА из отработанного кулинарного масла с использованием в качестве штамма-продуцента *S. necator H16*. В работе исследованы возможности применения отработанного кулинарного масла в качестве основного источника углерода для штамма. Определены оптимальные условия культивирования, установлено время культивирования, необходимое для максимального выхода полимера. Особое внимание уделено анализу полученного полимера. Путем сканирующей электронной микроскопии исследована структура полимера для анализа влияния основного источника углерода (глюкозы или отработанного кулинарного масла). Также получены снимки гранул полимера, сформированных внутри клетки, и процесса выделения полимера из клеток штамма-продуцента. В процессе исследования апробированы процессы биосинтеза полимера, а также его экстракции и очистки.

В результате проведенной работы выявлена практически полная идентичность структур полимеров, полученных при использовании в качестве источника углерода глюкозы или отработанного кулинарного масла. При этом, количество полимера, получаемого из отработанного кулинарного масла сопоставимо с количеством полимера, синтезируемого при потреблении штаммом глюкозы. Разработаны основные процессы получения полимера, установлены оптимальные условия протекания процессов. Требуются дальнейшие исследования для детального анализа физико-механических свойств полимера, проверки его чистоты, а также возможности получения полимерной продукции из него. Будущие исследования также будут направлены на разработку подходов увеличения выхода полимера при культивировании штамма-продуцента.

Авторы выражают благодарность неправительственному экологическому фонду имени В.И. Вернадского.

ИССЛЕДОВАНИЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ СООБЩЕСТВА *MICROBACTERIUM AURUM* И *BREVUNDIMONAS BULLATA* В ПРИСУТСТВИИ ЧАСТИЦ МИКРОПЛАСТИКА

Кузьмицкая А.А., Калёнов С.В.

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

kuzmichwolf@gmail.com

В ходе скрининга сообществ микроорганизмов пойменных биотопов, загрязнённых синтетическими полимерными отходами различного происхождения, был выделен бактериальный консорциум, представленный грамположительными и грамотрицательными палочковидными клетками. Результаты секвенирования фрагментов гена 16S рРНК показали, что данный консорциум включает в себя два микроорганизма генетически наиболее близких к видам *Microbacterium aurum* (грамположительные, неподвижные, аэробные палочковидные клетки неправильной формы, образующие колонии жёлтого цвета) и *Brevundimonas bullata* (граммотрицательные, подвижные, аэробные палочковидные клетки, образующие слизистые полупрозрачные колонии белого цвета).

Бактерии *B. bullata* не способны использовать крахмал в качестве питательного субстрата. Поэтому культивирование *M. aurum* и *B. bullata* проводилось в жидкой питательной среде, содержащей крахмал и дрожжевой экстракт, в качестве источников углерода (рН 7, 28°C), что позволило индуцировать рост *M. aurum* и увеличить долю этих микроорганизмов в культуральной жидкости.

Спустя 12 суток культивирования консорциума в жидкой питательной среде, содержащей крахмал (150 об/мин, 28°C), суспензия полученных клеток пересевалась в жидкую питательную среду, содержащую стерильный порошок кристаллического полиэтилентерефталата (ПЭТФ; микропластик с размером частиц менее 1 мм). Для этого в каждую лунку двенадцатилуночного (12-луночного) планшета вносилось 600 мкл питательной среды различного состава, 200 мкл стерильной дистиллированной воды, содержащей порошок ПЭТФ массой 15 мг, и 200 мкл инокулята. Использовались три варианта питательной среды: без добавления дрожжевого экстракта; без добавления ПЭТФ-порошка, но с дрожжевым экстрактом; среда, содержащая и ПЭТФ-порошок, и дрожжевой экстракт. Культивирование на планшете проводилось 12 суток в режиме 22°C, 205 об/мин после чего проводились измерения показателей оптической плотности каждой лунки при длине волны 600 нм. Увеличение оптической плотности наблюдалось во всех лунках планшета, кроме контрольных (с незасеянной питательной средой, содержащей порошок ПЭТФ). Наиболее низкий средний показатель оптической плотности наблюдался в питательной среде, содержащей пластик без дрожжевого экстракта. Проведённые контрольные высевы из всех лунок планшета на плотные питательные среды продемонстрировали высокую выживаемость клеток сообщества *M. aurum* и *B. bullata* в данных условиях культивирования. Проведённый однофакторный дисперсионный анализ показал, что гипотеза о несущественности влияния фактора (состава питательной среды) на изменение результирующего признака (оптической плотности питательной среды в ходе культивирования) отвергается с вероятностью ошибки, равной 0,05, т.к. $F_{\text{набл.}} = 17,242 > F_{\text{крит.}} = 5,14$.

Необходимо провести дальнейшее исследование влияния содержания дрожжевого экстракта на популяцию бактерий данного сообщества в условиях их культивирования на средах, содержащих микропластик в виде порошка ПЭТФ различной дисперсности и степени кристалличности. Также необходимо выявить способы интенсификации процессов культивирования и активации метаболических процессов выделенного сообщества.

РАЗРАБОТКА ШТАММА *P. PUTIDA* С ЦЕЛЬЮ ПРИМЕНЕНИЯ ЕГО В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ

Кунгуров Г.А.^{1,2}, Суханов А.Ю.¹, Трахтман Н.В.¹, Валидов Ш.З.¹

¹Федеральный исследовательский центр Казанский научный центр Российской академии наук, Россия, Казань

²Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

gkungurov567@gmail.com

Штамм *Pseudomonas putida* PCL1760, выделенный из ризосферы авокадо, является агентом биологической защиты томатов против фузариозной корневой гнили. Эта способность обусловлена механизмом борьбы за питательные вещества и ниши (CNN – competition for nutrients and niches). Кроме того, этот штамм не относится к патогенам и не выделяет токсичных метаболитов, что делает его привлекательным для использования в биотехнологических целях. Одним из требований для таких штаммов является удовлетворительный рост в ферментерах с наименьшим образованием биопленок и отсутствие подвижности клеток.

Ранее мы провели секвенирование и анализ генома указанного штамма, где было показано, что размер его генома (6002785 п.н., GenBank CP099727) был меньше по сравнению с ближайшим родственным штаммом *P. putida* KT2440 (6181873 п.н., GenBank AE015451). Далее, в ходе анализа последовательности ДНК, были выявлены гены, отвечающие за образование альгинатных биопленок (*algA*) и жгутиков (*flhA*). Нам удалось получить производное штамма *P. putida* PCL1760 с делецией генов, отвечающих за подвижность и формирование биопленок. Для делеции генов нами были созданы плазмиды, содержащие последовательности, фланкирующие эти гены, длиной 1000 п.н каждый в составе вектора pK18-mobSacB не способного к репликации в клетках *P. putida*. Эти плазмиды были использованы для делеции генов за счет гомологичной рекомбинации с этими флангами.

Для полученного мутанта LN6160 была измерена динамика роста и показано, что делеционный мутант обладает большей скоростью роста по сравнению со штаммом дикого типа. Кроме того, были проведены тесты на образования биопленок и подвижность. Было продемонстрировано, что делеционный вариант *P. putida* LN6160 образовывал биопленку в 5 раз меньше, чем исходный штамм и был практически неподвижен в 0,3% агаре. Эти свойства генно-редактированного штамма позволяют эффективно использовать его в качестве платформы для решения биотехнологических задач.

Работа выполнена в рамках выполнения проекта «Разработка рекомбинантного штамма на основе *Pseudomonas putida* PCL1760 для биокаталитической трансформации ароматических производных лигнина», финансируемого Министерством Науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2022-254 от 17.06.2022 г.).

ВЫДЕЛЕНИЕ НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ ИЗ НЕФТЕШЛАМОВ С ТЕРРИТОРИИ ВЛАДИМИРСКОЙ ОБЛАСТИ

Левитская К.Д.^{1,2}, Герасимчук А.Л.¹, Ивасенко Д.А.^{1,2}

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

²ООО «Дарвин», Томск, Россия

ch.levitskaya@gmail.com

Одним из эффективных методов рекультивации нефтезагрязненных земель считается применение биопрепаратов микробного происхождения. Несмотря на большое количество разработок в этой области биотехнологии, поиск новых эффективных деструкторов нефти остается актуальным.

Целью исследования стал поиск нефтеокисляющих микроорганизмов из проб нефтяных шламов с загрязненных территорий Владимирской области для последующей разработки биопрепарата.

Накопительная культура, полученная при 28 °С на жидкой селективной питательной среде Аткинса (г/л: KH_2PO_4 – 1,5; K_2HPO_4 – 0,75; NH_4Cl – 1,0; NaCl – 2,5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; дрожжевой экстракт – 0,5), с добавлением пробы нефтешламов (10 %), характеризовалась активной деструкцией нефтесодержащих отходов, входящих в состав нефтешламов. Степень деструкции определяли визуально по сравнению с контролем, состоящем из среды Аткинса с добавлением стерильных нефтешламов. Чистые культуры выделяли методом разведений на агаризованной среде Аткинса с добавлением в качестве субстрата дизельного топлива, содержащего n-алканы (0,1 мл субстрата распределяли шпателем по поверхности чашки со средой, диаметр 90 мм). В итоге были отобраны два изолята. Штамм ННШ 6-2 образовывал желтоватые колонии, штамм ННШ 6-3 представлен колониями розового оттенка. Клетки обоих штаммов имели форму палочек и морфологически отличались друг от друга.

Филогенетическую принадлежность изолятов определяли с помощью анализа последовательностей ДНК, кодирующих ген 16S рРНК, как описано ранее (Герасимчук и др., 2022). Длина секвенированной последовательности гена для штамма ННШ 6-2 составила 1371 нуклеотид, для штамма ННШ 6-3 – 1379 нуклеотидов. Ближайшим типовым штаммом со 100 % сходства для изолята ННШ 6-2 является *Pseudomonas plecoglossicida* NBRC 103162, который известен как патоген животных, но относится микроорганизмам к группе риска 1 в соответствии с классификацией Всемирной организации здравоохранения, которые не являются патогенами человека. Второй штамм, ННШ 6-3, имеет 99,49 % гомологию с типовым штаммом *Stenotrophomonas maltophilia* DSM 50170T, относящимся к патогенам человека группы риска 2. Для обоих видов бактерий ранее были описаны углеводородоокисляющие свойства (Коршунова и др., 2021; Rajaei et al., 2013). На основе полученных результатов штамм ННШ 6-2 является перспективным для разработки биопрепарата.

Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект № FSWM-2020-0019).

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ СОЧЕТАНИЯ ВАНКОМИЦИНА И АДРЕНАЛИНА НА
МОНОВИДОВЫЕ И ДВУХВИДОВЫЕ БИОПЛЕНКИ *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS* И
CUTIBACTERIUM ACNES

Логинова Н.А., Ганнесен А.В.

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

nadya.loginova1@gmail.com

Ключевые слова: биопленки, ванкомицин, адреналин, *Cutibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*.

Проведено исследование взаимодействия микроорганизмов-комменсалов кожи человека *Cutibacterium acnes* и *Staphylococcus epidermidis* в составе бинарных биопленок и действия на данное сообщество антибиотика ванкомицина и гормона адреналина как по отдельности, так и в комбинации. Данная работа была проведена на основе предположения, что гормоны человека способны оказывать модулирующий эффект на действие антибиотиков в отношении биопленок бактерий. В ходе работы была подобрана концентрация антибиотика, при которой частично подавляется рост моновидовых биопленок: 0.1 мкг/мл. Также была выбрана рабочая концентрация адреналина 4.9 мкМ, на основании результатов предыдущих работ. В ходе работы предположение полностью подтвердилось: искомый модулирующий эффект адреналина на действие ванкомицина был обнаружен как в случае моновидовых биопленок *C. acnes*, так и в случае бинарных биопленок *C. acnes* и *S. epidermidis*. По отдельности ванкомицин и адреналин подавляли рост биопленок *C. acnes* и *S. epidermidis*, но при их комбинации эффект пропадал. Согласно анализу данных по подсчету КОЕ и метаболической активности, действие ванкомицина и адреналина в большей степени направлено на бинарные сообщества, и конкретно на *S. epidermidis*.

При исследовании динамики роста было показано, что комбинация активных соединений ускоряла рост обоих микроорганизмов в моновидовых культурах, в случае бинарного сообщества, напротив, рост замедлялся на начальных этапах. Анализ кинетических параметров роста показал доминирование *S. epidermidis* в бинарном сообществе.

Результаты позволяют предполагать, что ванкомицин в исследованной концентрации нарушает агрегацию клеток в биопленках, а адреналин ослабляет эффект антибиотика на биопленки.

Полученные результаты подтверждают перспективность выбранного направления исследований и открывают широкие перспективы как в прикладных областях знаний, таких как медицина и фармацевтика, так и в фундаментальной науке.

Работа поддержана грантом РФФИ №19-74-10071.

БИОТРАНСФОРМАЦИЯ (–)-ИЗОПУЛЕГОЛА АКТИНОМИЦЕТАМИ РОДА
RHODOCOCCLUS КАК СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ НОВЫХ
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Мальцева П.Ю.^{1,2}, Ильина И.В.³, Лучникова Н.А.^{1,2}

¹Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН, Пермь, Россия

²Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

³Новосибирский институт органической химии имени академика Н.Н. Ворожцова СО РАН,
Новосибирск, Россия

inbox.98@bk.ru

В условиях дефицита высокоэффективных фармакологических средств для лечения иммунозависимых и социально значимых заболеваний актуален синтез новых соединений с биологической активностью на основе растительных терпеноидов. В качестве исходного субстрата активно используется монотерпеновый спирт (–)-изопулегол (C₁₀H₁₈O, CAS 89-79-2), химическая трансформация которого позволяет получать соединения с противовирусной, обезболивающей и антипролиферативной активностью. Биокатализ (в отличие от химических методов), обеспечивает получение целевых продуктов без применения дорогостоящих катализаторов и агентов защиты реакционно-активных центров молекулы в экологически безопасных условиях. Однако на данный момент исследований, посвященных микробной трансформации (–)-изопулегола, крайне мало. Одной из перспективных групп микроорганизмов являются актиномицеты рода *Rhodococcus* Zopf 1891 (domain 'Bacteria', phylum *Actinomycetota*, class *Actinomycetes*, order *Mycobacteriales*, family *Nocardiaceae*; <https://psn.dsmz.de/genus/rhodococcus>, accessed on 28 февраля 2024), характеризующиеся высокой каталитической активностью в отношении сложных гидрофобных соединений. Цель настоящей работы – изучение способности коллекционных штаммов *Rhodococcus* spp. к биотрансформации монотерпеноида (–)-изопулегола для получения фармацевтически значимых соединений.

На основе биоресурсов Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним коллекции ИЭГМ, номер 285 во Всемирной федерации коллекций культур, УНУ/ЦКП 73559/480868, <http://www.iegmc.ru>) отобран штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 1362, катализирующий конверсию (–)-изопулегола с образованием ранее не идентифицированных 10-гидрокси и 10-карбокси производных. По данным проведенного компьютерного прогнозирования на основе взаимосвязи “структура-активность”, полученные нами метаболиты менее токсичны по сравнению с исходным субстратом и перспективны в качестве потенциальных стимуляторов дыхания и противоопухолевых агентов. С использованием методов электронной визуализации, электрофоретического рассеяния света и спектрофотометрии исследованы механизмы взаимодействия родококков с (–)-изопулеголом. Показано, что в процессе биотрансформации участвуют локализованные в цитоплазме ферменты, принадлежащие к семейству CYP450. На основе проведенного биоинформатического анализа результатов полногеномного секвенирования штамма-биотрансформатора (GenBank NZ_JANFQM000000000.1) и последующей постановки ПЦР составлен Каталог функциональных генов биотрансформации (–)-изопулегола.

Исследования выполнены в рамках госзадания №124020500028-4 и при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-1051) с использованием оборудования ЦКП «Региональная профилированная коллекция алканотрофных микроорганизмов» и «Исследование материалов и веществ» Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН.

НОВАЯ АНАЭРОБНАЯ ТЕРМОФИЛЬНАЯ БАКТЕРИЯ, ВЫДЕЛЕННАЯ ИЗ ДОННЫХ ОСАДКОВ ОХОТСКОГО МОРЯ

Махортых С.С.^{1,2}, Рыжманова Я.В.¹, Щербакова В.А.¹

¹Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Пушино, Россия

²Пушинский филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)» Пушино, Россия

sonyamakh@yahoo.com

Морские донные осадки играют важную роль в функционировании циклов серы и железа в глобальном масштабе. Современные молекулярные методы исследования расширили наши знания о микробном разнообразии морских донных осадков, привели к открытию многих некультивируемых линий бактерий и архей, обладающих способностью восстанавливать соединения серы и железа. Тем не менее, выделение и характеристика новых представителей микробных сообществ из уникальных экосистем остается основой классической микробиологии, позволяющей соединить фундаментальные и прикладные аспекты науки.

Все известные к настоящему времени бактерии трех видов рода *Tepidibacillus* являются термофильными обитателями подземной биосферы, участвуют в биохимических циклах серы и железа, а также могут быть перспективны в использовании в биотехнологии для получения ферментов, устойчивых к воздействию температур.

Цель работы – характеристика нового штамма термофильных анаэробных бактерий, выделенного из донных отложений северо-восточного изгиба Курильской котловины Охотского моря. Объектом исследования являлись образцы донных осадков, отобранные во время рейса на НИС «Академик А.М. Лаврентьев» (рейс № 92) с 17.04.21 по 26.05.21. Из накопительной культуры с донными осадками станции LV47 (50°51'545 с.ш., 155°30'66 в.д.) с глубины 786 метров и горизонта 100 см, методом десятикратных разведений на твердых и жидких средах при температуре 55°C был выделен штамм, обозначенный нами как LV47.

Новая бактерия была представлена прямыми подвижными палочками размером 0.2-0.4×2.0-4.0 мкм, располагающимися одиночно или соединенными в цепочки по 2-3 клетки. В клетках штамма обнаружены терминальные эндоспоры. Штамм LV47 являлся термофилом: рос в диапазоне температур от 35 до 70°C с оптимумом 65°C. Не нуждался для роста в NaCl, выдерживал соленость до 30 г/л, с оптимальным ростом при содержании 2 г/л NaCl. Изолят рос в широком диапазоне pH от 5.4 до 8.8 с оптимумом pH 6.25. Облигатно зависел от наличия дрожжевого экстракта в ростовой среде. Добавление витаминов существенно стимулировало рост штамма LV47. В качестве доноров электронов использовал сахара, пептон, триптон и дрожжевой экстракт. В качестве акцепторов электронов – элементную серу, нитрат, тиосульфат, AQDS, Fe(III) цитрат, аморфное Fe(III). Был способен сбраживать дрожжевой экстракт без добавления акцепторов электронов.

Филогенетический анализ гена 16S рРНК показал, что штамм LV47 относится к роду *Tepidibacillus* с ближайшим родственником *T. fermentans* STGH^T со сходством 97.8%. Уровень генотипических и фенотипических отличий позволяют предположить, что штамм LV47 (=VKM В-3744) является типовым штаммом нового вида рода *Tepidibacillus*.

ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ НА НАКОПЛЕНИЕ β -КАРОТИНА ОДНОКЛЕТОЧНОЙ ГАЛОФИЛЬНОЙ МИКРОВОДОРОСЛЬЮ *DUNALIELLA* SP.

Миняковский И.О., Егорова А.А., Калёнов С.В.

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

ivan.minyakovskiy@mail.ru

Микроводоросль *D. salina* была выделена методом накопительных культур на модифицированной среде Ven-Amotz с использованием проб кристаллов соли, грунта и воды, отобранных из Поморийского озера (Болгария). Посредством многократных пересевов была получена чистая культура. Полученные на твердой среде колонии имеют округлую форму, размер 3-5 мм, гладкую поверхность, плоский профиль, ровный край, однородную мягкую структуру ярко-зеленого цвета. Сами клетки имеют каплевидную форму, два жгутика, имеющие относительно равную длину, которые обеспечивают движение клетки в толще среды. Наблюдается ярко выраженный светочувствительный глазок и округлый пиреноид с запасными питательными веществами.

Для оптимизации условий культивирования с целью повышения выхода β -каротина была проведена серия экспериментов, в ходе которых изменялись параметры солености среды, pH и температуры. Выращивание производилось на модификации среды Ven-Amotz без лимитирования по неорганическим компонентам в течение 14 дней при постоянном освещении с помощью фотоламп полного спектра. Для определения количества клеток измерялась оптическая плотность среды при 540 нм. Оценка содержания β -каротина производилась методом разделения спектров поглощения ацетонового экстракта микроводоросли на основе распределения Гаусса. В эксперименте анализировались накопление биомассы, содержание β -каротина в сухой биомассе, а также выход β -каротина в мг/мл.

Концентрация хлорида натрия варьировалась в диапазоне 15 – 350 г/л. Рост культуры наблюдался во всех образцах, что характеризует микроводоросль как толерантный галофильный микроорганизм. Оптимум роста наблюдался при концентрации соли 60 г/л, наибольшее накопление β -каротина на клетку при 250 г/л, а наибольший выход был получен при концентрации соли 180 г/л.

Изменение pH проводилось в диапазоне 4,5 – 9,5. Микроводоросль развивалась в условиях pH выше 5,0. Оптимум накопления биомассы наблюдался при pH 8,15, наибольшее содержание β -каротина в клетке при pH 5,0 и 8,15, а наибольший выход был получен при pH 6,97.

Культивирование при различных температурах в диапазоне 15-37°C показало, что *Dunaliella* sp. показывает оптимум роста при 27°C, влияние температуры на накопление β -каротина обнаружено не было.

Таким образом, одноклеточная микроводоросль *Dunaliella* sp. способна развиваться в широком диапазоне солености среды и pH. Для наибольшего накопления β -каротина нужны экстремальные условия, то есть высокая соленость, высокие значения pH и оптимальная температура.

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ЭНДОЛИЗИНА PM9 В РАСТВОРИМОЙ ФОРМЕ

Мирзоян Р.А.¹, Загоскин А.А.²

¹Научно-технологический университет «Сириус», Сочи, Россия

²Пушчинский государственный естественно-научный институт, Пушино, Россия

renabarhat@gmail.com

Широкое использование антибиотиков способствует возникновению устойчивости бактерий к противомикробным препаратам, которая затрудняет клиническое лечение бактериальных инфекций и представляет собой проблему для глобального общественного здравоохранения. Использование эндолитических ферментов бактериофагов, или эндолизинов, которые вырабатываются бактериофагами в конце литического цикла и способны расщеплять клеточную стенку бактерий с последующим лизисом бактериальной клетки, представляет собой альтернативный подход к преодолению мультирезистентности бактерий.

Ранее нами был собран *de novo* ген неаннотированного эндолизина PM9_074 стафилококкового фага PM9 с предположительной литической активностью против *Staphylococcus aureus*. Одной из проблем наработки белка PM9_074 в системе экспрессии *Escherichia coli* BL21 (DE3) является образование нерастворимых белковых агрегатов. Для решения данной проблемы нами были получены генетические конструкции PM9_074 со слитыми белковыми метками для очистки (His6) и повышения растворимости (GST, SUMO, MBP, PPIB, urhB, tsf, trx, Fh8). Было показано, что мальтозосвязывающий белок (MBP) стабильно повышает растворимость эндолизина PM9_074.

Для изучения потенциальной литической активности конструкции PM9_074-MBP клонировали в экспрессионный штамм *Escherichia coli* BL21 (DE3) и нарабатывали белок при индукции 1 М Изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозидом (ИПТГ). Полученные лизаты чистили при помощи металлхелатной-аффинной хроматографии с Ni-NTA-агарозным сорбентом. После обработки полученных фракций с целевым белком TEV-протеазой, проводили исследование антимикробной активности эндолизина PM9_074 *in vitro* против *Staphylococcus aureus* ATCC 23235 с использованием микропланшетного фотометра. Было показано, что эндолизин PM9_074 препятствовал делению клеток стафилококка с усилением антимикробного действия при добавлении 1 мМ Mn²⁺. В настоящее время эксперимент продолжается. Предполагается усилить антимикробное действие эндолизина путем подбора различных агентов и/или рационального дизайна исходной последовательности существующего гена эндолизина PM9_074.

ВЛИЯНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ *S. AUREUS* НА СТРУКТУРУ И
БИОХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ БИОПЛЕНОК *K. PNEUMONIAE*

Миронова А.В., Федорова М.С., Тризна Е.Ю., Каюмов А.Р.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Россия

amironova2019@mail.ru

Разработка новых стратегий борьбы с биопленками на основе механизмов межвидовой конкуренции, а также последующее создание препаратов, воздействующих на медиаторы микробных взаимодействий, могут стать альтернативой традиционным подходам терапии бактериальных инфекций, связанных с формированием биопленок.

Внесение внеклеточных метаболитов *S. aureus* к моновидовой биопленке *K. pneumoniae* увеличивает содержание α -, β -полисахаридов и белков в матриксе до 2 раз. При этом, в контрольных лунках α -полисахариды располагаются равномерно, в то время как в лунках, обработанных внеклеточными метаболитами *S. aureus*, этот компонент визуализируется в виде отдельных скоплений, плотных по своей структуре. Увеличение полисахаридного компонента также подтверждается значительным повышением уровня экспрессии генов *pgaA* *K. pneumoniae* в присутствии внеклеточных метаболитов *S. aureus*.

Таким образом, внесение внеклеточных метаболитов золотистого стафилококка способствует увеличению белков и полисахаридов в составе матрикса биопленки *K. pneumoniae* и приводит к изменению ее структуры. Подобные изменения могут влиять на проницаемость биопленки для противомикробных препаратов, что необходимо учитывать при разработке подходов терапии инфекций, ассоциированных с образованием биопленок *K. pneumoniae*.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности. Проект № FZSM-2022-0017.

ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ КОМБИНАЦИИ ВАНКОМИЦИНА И ЭСТРАДИОЛА НА
МОНОВИДОВЫЕ И ДВУХВИДОВЫЕ БИОПЛЕНКИ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* И
LACTICASEIBACILLUS PARACASEI

Мосолова А.М.¹, Ганнесен А.В.²

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)»

²Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук

anya.mosolova@gmail.com

Ключевые слова: биопленки, ванкомицин, эстрадиол, *Staphylococcus*, *Lacticaseibacillus*.

В медицине традиционные методы химиотерапии инфекций малоэффективны в случае борьбы с биопленками, поэтому в настоящий момент активно ведутся поиски нетоксичных активных веществ, способных усилить действие антибиотиков в отношении биопленок. Такими агентами могут выступать вещества, продуцируемые организмом-хозяином, в частности факторы гуморальной регуляции человека – гормоны.

Таким образом, целью данной работы являлось изучение модулирующего эффекта эстрадиола на действие ванкомицина в отношении моновидовых и бинарных биопленок бактерий-комменсалов человека *Staphylococcus aureus* и *Lacticaseibacillus paracasei*.

По результатам данной работы было обнаружено, что ванкомицин в сочетании с гормоном оказывает эффект на микроорганизмы, отличный от эффектов, оказываемых веществами отдельно. По отдельности активные соединения подавляли рост биопленок *S. aureus*, но при их комбинации ингибирующий эффект пропадал. В случае *L. paracasei* картина была противоположной – по отдельности активные соединения стимулировали рост биопленок, тогда как в комбинации эффект сменялся на ингибирующий. Число КОЕ обоих микроорганизмов значительно изменялось под действием активных соединений.

Помимо этого, ванкомицин снимал эффект ослабления коагрегации клеток в биопленке этанолом (растворителем для растворов эстрадиола, добавляемых в среду), а эстрадиол ослаблял, в свою очередь, действие ванкомицина. Влияние активных веществ на микроорганизмы зависело и от присутствия второго микроорганизма в сообществе, поскольку описанный эффект наблюдали в основном на двухвидовых биопленках.

При исследовании динамики роста бактерий было показано, что эстрадиол и комбинация эстрадиола с ванкомицином значительно ингибировали рост моновидовых культур и бинарных сообществ. Из анализа кривых роста, было обнаружено, что в сообществах доминируют *L. paracasei*, что и определяло поведение сообщества в целом.

Полученные данные свидетельствуют о том, что эстрадиол способен модулировать действие ванкомицина, что подтверждает возможность гормонов изменять силу и характер действия антибиотиков на биопленки микроорганизмов, что открывает большие перспективы как для фундаментальной науки, так и для прикладных областей знания.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 19-74-10071.

ВЫДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИОФАГОВ, ЛИЗИРУЮЩИХ УСЛОВНЫХ ПАТОГЕНОВ
ESCHERICHIA COLI И *SALMONELLA ENTERICA*

Муталлапова Г.И., Азнабаева З.А., Федорова М.С., Каюмов А.Р.

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

555guzel01@mail.ru

В настоящее время чрезмерное применение антибиотиков способствует появлению патогенных бактерий с множественной лекарственной устойчивостью, которые представляют серьезную угрозу общественному здравоохранению. Известно, что *Salmonella enterica* (и ее серотипы) и энтеропатогенная *Escherichia coli* являются причинами развития тяжелых желудочно-кишечных заболеваний. За последние десятилетия, согласно данным Европейской сети по эпиднадзору за устойчивостью к антимикробным средствам, наблюдается значительное увеличение количества антибиотикорезистентных штаммов данных бактерий. Одним из альтернативных и перспективных терапевтических подходов для борьбы с бактериями с МЛУ является фаготерапия.

Известно, что сточные воды и естественные водоемы являются активным хранилищем бактериофагов, поэтому в данном исследовании проводился поиск, выделение из водоемов бактериофагов, вирулентных в отношении таких патогенных микроорганизмов как *Escherichia coli* и *Salmonella enterica*. Для выделения бактериофагов проводили отбор проб воды из рек Низьелга и Кусюкла (Республика Башкортостан), реки Малая Кокшага (Республика Марий Эл), сточных вод г. Казани (Республика Татарстан) с последующей фильтрацией и оценкой вирулентных свойств. Результаты показали значительную активность фаголизатов, полученных из рек Низьелга, Кусюкла, Малая Кокшага и сточных вод в отношении *S. enterica*; фаголизаты, специфичные в отношении бактерий *E. coli*, были получены из сточных вод.

Таким образом, нами были получены фаголизаты *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*. В дальнейшем планируется очистка, идентификация и характеристика бактериофагов и оценка их штаммоспецифичности и способности повышать активность антибактериальных препаратов при сочетанном использовании.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности. Проект № FZSM-2022-0017.

ВЫЯВЛЕНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ НОВОГО ШТАММА СТРЕПТОМИЦЕТОВ *STREPTOMYCES* SP. MUR LEM

Носков А.Е., Абашина Т.Н.

ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН),
Пушино, Россия

nosc0w@ya.ru

Ключевые слова: *Streptomyces*, фитопатогены, биопрепарат, защита растений.

Болезни растений являются одним из наиболее существенных факторов, снижающих продуктивность сельского хозяйства. Поскольку борьба с их возбудителями при помощи химических средств создаёт большие риски для окружающих экосистем, в настоящее время всё большее внимание уделяется биологическим методам воздействия с применением культур микроорганизмов, подавляющих рост патогенной микробиоты. Среди бактерий-антагонистов наибольший интерес представляют микроорганизмы, являющиеся исконными обитателями почвы и, следовательно, способные выживать в течение продолжительного времени после применения препарата. Одними из таких бактерий являются стрептомицеты, известные, в том числе, как природные симбионты ряда растений.

Исследователями постоянно ведётся поиск штаммов-антагонистов, выделяемых из разнообразных мест обитания. Из гнёзд муравьёв *Lasius flavus* из окрестностей города Пушино нами были выделены четыре штамма, которые относятся к роду *Streptomyces*. Для выявления наличия антимикробной активности у выделенных штаммов применялся диффузионный метод: на плотную питательную среду 5/5а газоном высевались тестовые штаммы бактерий, после чего в заранее подготовленные лунки вносили по 30 мкл 10-дневной культуральной жидкости штамма, выращенного на среде Ваксмана с глицерином в качестве источника питания. Оценку результата проводили по появлению зон задержки роста вокруг лунок, учёт осуществлялся дважды, через 20 и 48 часов культивирования.

В качестве тестовых микроорганизмов использовалась коллекция лаборатории из 12 штаммов бактерий, включающая ряд распространённых фитопатогенов. Наиболее эффективным оказалось воздействие *Streptomyces* sp. Mur lem, культуральная жидкость которого подавляла рост следующих микроорганизмов:

– грамположительные – *Kocuria rosea*, *Bacillus mucoides*, *Staphylococcus* sp. St35, *Bacillus subtilis*, *Arthrobacter* sp.,

– грамотрицательные – *Alcaligenes faecalis*, *Escherichia coli* S.

Клетки *Streptomyces* sp. Mur lem образуют светло-серые плотные колонии, выделяющие в среду пигмент коньячного цвета. Морфологически *Streptomyces* sp. Mur lem является типичным представителем стрептомицетов, образующим тонкий нитчатый разветвлённый мицелий.

Таким образом, нами был получен новый штамм стрептомицетов с выраженной антибактериальной активностью широкого спектра, преимущественно в отношении грамположительных микроорганизмов (5 из 6 протестированных штаммов). Данный результат открывает перспективы для его эффективного применения в качестве антагониста фитопатогенных бактерий. Дальнейшая работа направлена на выявление действующего вещества и изучение механизма его действия.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КРИВЫХ, АППРОКСИМИРУЮЩИХ ДИНАМИКУ ЧИСЛЕННОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ, МЕТОДАМИ ОРДИНАЦИИ

**Пеньдюхова А.С.¹, Драница И.С.¹, Михайленко В.Л.¹, Приставка А.А.¹,
Верхотурова С.И.², Белогорлова Н.А.², Юринова Г.В.¹**

¹Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

²Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН, Иркутск, Россия

annapend@yandex.ru

Данные о влиянии различных факторов на динамику численности микроорганизмов имеют большое значение в самых различных отраслях практической деятельности: в сельском хозяйстве, пищевой промышленности, биотехнологии и, особенно, в медицине при планировании и проведении эпидемиологических и терапевтических мероприятий. Однако измерять концентрацию клеток в непрерывном режиме возможно далеко не всегда, поэтому обычно получают дискретный набор значений с более или менее однородным временным интервалом, который затем можно аппроксимировать непрерывной кривой, например, по логистической модели. Такой подход имеет несомненную практическую и теоретическую ценность, но при этом часто возникает проблема множественного сравнения логистических кривых, которые, в зависимости от исследуемых объектов и условий, могут различаться по любым параметрам принятой модели (начальные и максимальные значения переменной, показатель степени экспоненциальной фазы, точка перегиба функции и т.д.).

Цель исследования – изучить возможность использования методов ординации для сравнительного анализа модельных кривых, аппроксимирующих динамику численности микроорганизмов, культивируемых в присутствии некоторых фосфорорганических соединений (ФОС). В качестве модельного объекта использовались *Bifidobacterium bifidum*. В питательную тиогликолевую среду добавляли растворы девяти ФОС из трех классов: фосфины, фосфиноксиды и фосфинсульфиды; каждый класс был представлен тремя соединениями, различающимися функциональными группами (арильные и пиридилные).

Динамику концентрации бактериальных клеток периодически регистрировали по OD₆₀₀ на спектрофотометре. Экспериментальные значения аппроксимировались логистическими кривыми, достоверность моделей оценивалась с помощью дисперсионного анализа и критерия χ^2 . Затем теоретические кривые были преобразованы в точечные проекции с помощью метода главных компонент.

Использованные ФОС оказывали разное влияние на бактерий: одни соединения стимулировали рост биомассы, другие оказывали подавляющее действие (вплоть до полного элиминирования клеток), а некоторые ФОС вообще не вызывали достоверных отклонений от контрольных значений. Распределение точечных проекций кривых в пространстве первых двух главных компонент полностью соответствовало биологической активности ФОС: контрольные среды, среды с токсичными фосфиноксидами и образцы с ростстимулирующими фосфинсульфидами ожидаемо группировались независимо друг от друга. Однако при этом логистические кривые для ФОС, относительно которых двухвыборочные статистические методы не выявили отличий от контроля, оказались сгруппированы в отдельных областях пространства в соответствии с химической природой функциональной группы.

Таким образом, предложенный алгоритм позволяет идентифицировать влияние на клетки веществ, которые в обычных тестах, скорее всего, будут признаны биологически пассивными. Особенно это актуально для соединений, для которых не полностью выявлены принципы, характеризующие взаимосвязь химической структуры и биологической активности.

УСТОЙЧИВОСТЬ К НЕКОТОРЫМ АНТИБИОТИКАМ БАКТЕРИЙ ИЗ РОДА *KOCURIA*

Плешко Е.М., Журина М.В.

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»,
Москва, Россия

lizapleshko@yandex.ru

Бактерии из рода *Kocuria* распространены повсеместно, среди них есть штаммы, вызывающие заболевания человека и домашних животных, и штаммы, имеющие биотехнологический потенциал. Устойчивость этих бактерий к антибиотикам имеет большое практическое значение, хотя на данный момент плохо изучена.

Для работы использовался штамм *K. carniphila* (988), выделенный с мясного производства и типовой штамм *K. rhizophila* 4R-31. Бактерии культивировались в 96-луночных планшетах при разных концентрациях антибиотиков, в том числе азитромицина (макролид, связывается с рибосомой и ингибирует трансляцию), фосфомицина (производное фосфоновой кислоты, ингибитор первого этапа синтеза клеточной стенки) и бацитрацина (полипептидный антибиотик, препятствует дефосфорилированию ундекапренилпирофосфата — мембранного переносчика строительных блоков пептидогликана). Каждые полчаса измерялась оптическая плотность в лунках планшета при длине волны 540 нм для получения кинетической кривой.

Был написан скрипт на языке Python, осуществляющий поиск генов, которые есть в геноме только одного из двух штаммов. Из найденных генов были отобраны те, которые могут влиять на устойчивость к антибиотикам.

Было показано, что *K. carniphila* 988 обладает значительно большей устойчивостью к азитромицину, фосфомицину и бацитрацину, чем штамм *K. rhizophila* 4R-31. Рост *K. carniphila* 988 не изменяется по сравнению с контролем даже при концентрации азитромицина 300 мкг/мл, в то время как рост *K. rhizophila* 4R-31 полностью подавляется уже при концентрации 1 мкг/мл. Значительного подавления роста *K. carniphila* 988 не происходит даже при концентрации фосфомицина 500 мкг/мл, а рост *K. rhizophila* 4R-31 полностью подавляется при концентрации 25 мкг/мл. Рост *K. rhizophila* 4R-31 полностью подавляется при концентрации 0.1 мкг/мл бацитрацина, в то время как 988 выдерживает концентрацию 10 мкг/мл. К другим исследуемым антибиотикам оба штамма обладают низкой устойчивостью.

Анализ генома показал, что у *K. carniphila* 988 достаточно много генов, потенциально влияющих на устойчивость к антибиотикам: найдено 18 генов помп множественного лекарственного выброса, которых нет у *K. rhizophila* 4R-31. Также у *K. carniphila* 988 были найдены гены, способные обеспечивать устойчивость к конкретным антибиотикам. Устойчивость к азитромицину может объясняться наличием гена макролид-2'-киназы, инактивирующей азитромицин, или гена 23S рРНК (аденин(2085)-N(6))-диметилтрансферазы, метилирующей аденин в 23S рРНК и препятствующей связыванию азитромицина с рибосомой. Устойчивость к фосфомицину может объясняться тем, что в геноме 988 отсутствует ген транспортера глицерол-3-фосфата, через который фосфомицин в основном проникает в клетку. В геноме есть только небольшой его фрагмент, а остальная часть, скорее всего, была утрачена в результате делеции. Устойчивость к бацитрацину может объясняться наличием у *K. carniphila* 988 протеаз, расщепляющих его, т. к. этот антибиотик является смесью пептидов. У *K. carniphila* 988 есть 6 протеаз, выполняющих неизвестные функции, которых нет у *K. rhizophila* 4R-31. Возможно, какие-то из них участвуют в инактивации бацитрацина.

Таким образом, *K. Carniphila* 988 обладает высокой устойчивостью к трем антибиотикам из разных групп, и эта устойчивость обеспечивается за счет разных механизмов.

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России 122040800164-6.

ИММОБИЛИЗАЦИЯ КЛЕТОК *ALCALIGENES FAECALIS* 2 ВКЛЮЧЕНИЕМ В СТРУКТУРУ АЛЬГИНАТНОГО ГЕЛЯ С УГЛЕРОДНЫМИ НАНОТРУБКАМИ

Протасова Е.М.¹, Максимова Ю.Г.^{1,2}

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, Пермь, Россия

²Пермский государственный научно-исследовательский университет, Пермь, Россия

19mochalova96@mail.ru

Амидазы – широко распространенные в живой природе универсальные ферменты.

Интерес исследователей к этим ферментам связан с их перспективой использования в биокатализе, способностью к трансформации широкого спектра субстратов и энантиоселективными свойствами. Для повышения эффективности процессов биотрансформации используют методы иммобилизации каталитически активных клеток бактерий. Это позволяет стабилизировать их ферментативную активность, повысить устойчивость к токсичным субстратам, продлить использование биокатализатора по сравнению с суспендированной биомассой и увеличить выход конечного продукта. Помимо получения разнообразных соединений, иммобилизованные бактериальные клетки, обладающие высокой амидазной активностью, могут быть использованы в качестве биоселектирующего элемента биосенсора, благодаря селективности, возможности повторного использования и легкой интеграции в портативные устройства.

Цель исследования – изучение влияния иммобилизации клеток бактерий, включенных в структуру геля альгината бария с многостенными углеродными нанотрубками (МУНТ), на амидазную активность и операционную стабильность иммобилизованного биокатализатора.

В работе был использован штамм *Alcaligenes faecalis* 2 с амидазной активностью, выделенный из активного ила биологических очистных сооружений г. Перми. Клетки бактерий иммобилизовали двумя способами: 1) альгинат натрия смешивали с МУНТ (УНИИКМ, г. Пермь, Россия) и затем добавляли бактериальную суспензию; 2) бактериальную суспензию смешивали с МУНТ, затем добавляли к альгинату натрия. Полученные смеси объемом 3 мл продавливали через шприц для подкожных инъекций в 10 мл холодного 0.1 М раствора $BaCl_2$. Гранулы диаметром 2 мм ресуспендировали в свежем $BaCl_2$ в течение 24 ч при температуре 4–6 °С и отмывали дистиллированной водой. Амидазную активность определяли в ходе реакции трансформации 100 мМ раствора акриламида в акриловую кислоту. Операционную стабильность биокатализаторов оценивали по количеству образованной кислоты при последовательном проведении полной конверсии субстрата, вносимого в каждом цикле в реакционную среду. Время полного цикла составляло 24 ч.

Установлено, что амидазная активность иммобилизованных клеток *Alcaligenes faecalis* 2 сохраняется на протяжении 19 циклов. Выявлено, что 35–40 мг акриловой кислоты за 1 цикл образуется при трансформации акриламида биокатализатором, содержащим 0.9 мг клеток, приготовленным как способом 1, так и способом 2. Ранее нами была изучена иммобилизация клеток данного штамма в структуре геля альгината бария без углеродных нанотрубок. Показано, что при длительной эксплуатации такого биокатализатора со временем снижалась его механическая прочность. Мы показали, что при добавлении МУНТ к альгинатному гелю увеличивается механическая прочность носителя, необходимая для многократного использования биокатализатора.

Следовательно, несмотря на недостатки такого метода иммобилизации клеток (лимитирование процессов диффузии, непрочность геля, снижение ферментативной активности), этот метод может быть успешным для некоторых биокаталитических процессов и иммобилизации клеток в биоселектирующем элементе биосенсора.

Работа выполнена в рамках госзадания, рег. номер 124020500028-4.

ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА СОСТОЯНИЕ ЗДОРОВЬЯ КИШЕЧНИКА ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ

Пудова Д.С., Шарипова М.Р.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

dasha171711@gmail.com

Ферментативные кормовые добавки используются в биотехнологии с целью улучшения пищеварения у сельскохозяйственных птиц и увеличения экономической эффективности их рационов. Ферменты фитазы и протеазы позволяют повысить перевариваемость фосфора и белка в кормах, что приводит к более эффективному использованию питательных веществ и улучшению роста птицы. В конечном итоге, улучшение пищевой ценности кормов, приводит к снижению затрат на кормление. При использовании новых кормовых добавок следует учитывать их влияние на состояние здоровья кишечника птиц. Целью данной работы являлось изучение влияния протеазы *Bacillus pumilus* 7P, фитазы *Pantoea brenneri* 3.5.1 и их комбинации на экспрессию генов кишечного барьера в тканях подвздошной кишки цыплят-бройлеров.

Для исследования цыплят случайным образом распределяли в одну из четырех диетических групп – контрольную, протеаза, фитаза и комбинированный препарат (фитаза+протеаза). Через 14 суток оценивали дифференциальную экспрессию транскриптов мРНК цитокинов (IL8, IL17F, TNFSF15), барьерных кишечных белков (JAM2, Occludin, ZO1) и муцина MUC2 в образцах кДНК подвздошной кишки. В опытных группах цыплят, которым вводили диету на основе ферментов, экспрессия генов провоспалительных цитокинов TNFSF15, IL8, IL17F отсутствовала ($p < 0.0001$). Продукты этих генов являются важными медиаторами воспаления и отвечают за рекрутирование лейкоцитов в слизистую кишечника. Для всех тестируемых в данном исследовании генов барьерных кишечных белков наблюдалось значительное увеличение экспрессии (в 1.42 раза для JAM2 ($p = 0.0019$), в 2.97 раз для Occludin ($p < 0.0001$) и в 1.28 раз для ZO1 ($p = 0.058$)) в группе цыплят, получавших протеазу в качестве кормовой добавки, по сравнению с остальными группами. Такая повышенная экспрессия транскриптов мРНК генов белков JAM2, Occludin и ZO1 может приводить к улучшению барьерной функции в кишечнике. Так же важным компонентом слизистой слоя кишечника является муцин. Он участвует в защите кишечника от действия патогенов, способствует процедуре восстановления и был признан индикатором здоровья кишечника у домашней птицы. Было показано, что в группе цыплят, получавших в диете протеазу, экспрессия гена муцина была выше в 2.04 раза ($p = 0.0321$) по сравнению с контрольной и другими опытными группами. Таким образом, использование бактериальных кормовых добавок благотворно модулируют иммунную активность кишечника 14-суточных цыплят-бройлеров и не вызывают ответной воспалительной реакции.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 24-26-00272.

ИЗУЧЕНИЕ ЦИРКУЛЯЦИИ ВИРУСОВ СВИНЕЙ В ПОПУЛЯЦИИ ДИКИХ КАБАНОВ МОСКОВСКОЙ И ТВЕРСКОЙ ОБЛАСТЕЙ

Рыкова В.С., Красников Н.Ю., Южаков А.Г.

Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт
экспериментальной ветеринарии имени К. И. Скрябина и Я. Р. Коваленко Российской
академии наук, Москва, Россия

valentinarycova@inbox.ru

Свиноводство активно развивающаяся отрасль сельского хозяйства России. Вирусные болезни свиней наносят ей большой экономический урон. Болезни свиней поражают в том числе и диких кабанов, которые могут распространять вирусные инфекции на большие расстояния, являться резервуаром для сохранения и эволюции вирусов.

Так как данных о циркуляции вирусов свиней в популяции диких кабанов на территории России недостаточно, целью нашей работы было исследовать пробы от диких кабанов на наличие возбудителей классической чумы свиней (КЧС), респираторно-репродуктивного синдрома свиней (РРСС) и цирковирус-ассоциированных болезней свиней. Последние связывают с цирковирусом свиней 2 типа (ЦВС-2) и цирковирусом свиней 3 типа (ЦВС-3).

Мы исследовали 30 кабанов из Московской и 19 из Тверской областей. Животные были добыты в рамках спортивной охоты за сезоны 2021-2023 годов. От кабанов отбирали кусочки органов: бронхиального лимфоузла, селезенки и легкого. Готовили 10% суспензию органов, нуклеиновые кислоты выделяли с помощью набора «РИБО-преп» (АмплиСенс, РФ) согласно протоколу производителя. Обнаружение геномов возбудителей проводили при помощи коммерческих тест-систем методом ПЦР в реальном времени (Ветбиохим, Россия). Генетический материал вирусов из положительных проб амплифицировали и секвенировали по Сэнгеру. Последовательности выравнивали с помощью алгоритма MUSCLE. Филогенетический анализ проводили в программе MEGA 7.0, для построения дендрограмм использовали метод максимального правдоподобия.

По результатам исследования геномов вирусов РРСС и КЧС обнаружено не было. В Московской области было выявлено 50% (15/30) кабанов с ЦВС-2, 10% (3/30) с ЦВС-3 и 13,3% (4/30) коинфицированных ЦВС-2 и ЦВС-3. В Тверской области 10,5% (2/19) с ЦВС-2, 21% (4/19) с ЦВС-3 и 36,8% (7/19) коинфицированных.

Среди проб положительных на ЦВС-2 удалось получить полные нуклеотидные последовательности вирусов для 15 кабанов из Московской области и 7 кабанов из Тверской области. Для проб положительных на ЦВС-3 – 4 последовательности из Московской области и 2 из Тверской области. Согласно результатам анализа полученные последовательности ЦВС-2 относились к 2 генотипам: ЦВС-2d (20/22) и ЦВС-2b (2/22). Генотип ЦВС-2b был обнаружен только среди проб из Московской области. Все полученные последовательности ЦВС-3 относились к генотипу ЦВС-3a.

Была выявлена широкая распространенность цирковирусов свиней в стадах диких кабанов на территории Московской (22/30) и Тверской (13/19) областей. Обнаружение инфицированных кабанов вблизи крупных свиноводческих хозяйств может представлять угрозу для свиноводства, так как повышает риски заноса вирусов домашним свиньям.

Работа выполнена в рамках гранта РНФ «Изучение циркуляции вирусных патогенов в стадах диких кабанов на территории отдельных субъектов Российской Федерации с применением молекулярных методов и метагеномных подходов» № 23-76-10055.

АЭРОБНЫЕ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИЕ БАКТЕРИИ, ПРОДУЦИРУЮЩИЕ биоПАВ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ ПЛАСТОВЫХ ВОД И НЕФТЕШЛАМА РОМАШКИНСКОГО НЕФТЯНОГО МЕСТОРОЖДЕНИЯ

Самигуллина С.Р.¹, Семёнова Е.М.², Соколова Д.Ш.²

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

²Институт микробиологии имени С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН,
лаборатория нефтяной микробиологии, Москва, Россия

SamigullinaSR@my.msu.ru

Активная разработка Ромашкинского месторождения продолжается уже более 75 лет, что постепенно приводит к снижению темпов добычи горючих ископаемых. Исследования показывают, что микробиологические методы успешно применяются для интенсификации нефтеизвлечения. Известно, что углеводородоокисляющие бактерии (УОБ), способны продуцировать биологические поверхностно-активные вещества (биоПАВ). При активизации УОБ в призабойной зоне нагнетательных скважин нефтяного месторождения или закачке микроорганизмов-нефтедеструкторов извне, продуцируемые ими биоПАВ снижают межфазное натяжение на границе вода/нефть, увеличивая подвижность нефти и вымывая ее из породы коллектора, тем самым увеличивая нефтеотдачу.

Целью данной работы являлось выделение аэробных УОБ из пластовых вод, нефтезагрязненной почвы и нефтешлама Ромашкинского нефтяного месторождения на территории Республики Татарстан, и изучение их способности к образованию биоПАВ.

Объекты исследования расположены на территории Сармановской площади Ромашкинского нефтяного месторождения Республики Татарстан. В июне 2023 года был произведен отбор проб воды нагнетательной скважины 5314, воды призабойной зоны скважины нагнетательной скважины 5204, нефтезагрязненной почвы у пробоотборника добывающей скважины 10171 и нефтешлама из шламохранилища карбон Е5.

Методы исследования, примененные в работе, включали в себя: микробиологические, аналитические, молекулярно-биологические и биоинформатические.

Численность аэробных органотрофных бактерий (АОБ) была максимальной в пробе из почвы и достигала 10^5 кл/мл и минимальной в пробе скважины 5204 (10 кл/мл). По результатам анализа V3-V4 регионов 16S рРНК было установлено, что в составе прокариотных сообществ исследуемых проб присутствовали представители филумов *Pseudomonadota*, *Actinobacteriota*, *Bacteroidota*, *Verucomicrobiota* и других. Из проб на питательных средах выделено 12 чистых культур УОБ, из которых для дальнейшего изучения физиологических свойств было отобрано 8 штаммов, относящихся к родам *Alkalihalobacillus*, *Halomonas*, *Microbacterium*, *Peribacillus*, *Planococcus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* и *Stutzerimonas*. Исследуемые штаммы относились к мезофильным микроорганизмам (температурный оптимум в пределах 15-30 °С), а их интервал оптимальных концентраций NaCl в среде составлял от 0 до 2%. Бактерии использовали широкий спектр субстратов, включающий сахара, спирты, летучие кислоты, углеводороды. Реологические характеристики показали, что штаммы *Rhodococcus erythropolis* TG82, *Planococcus citreus* TG72, и *Alkalihalobacillus clausii* TG76 при росте на нефти образуют биоПАВ, способные значительно снижать межфазное натяжение на границе культуральная жидкость/гексадекан с 60 мН/м до 25-35 мН/м.

Полученные штаммы могут быть применены для нагнетания в нефтяные пласты с целью повышения нефтеизвлечения, а также использоваться для биоремедиации нефтезагрязненных почв или водоёмов.

Работа поддержана грантом РФ №21-64-00019.

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ И ВИДОВОЙ СОСТАВ КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ГРИБОВ У ЖИВОТНЫХ

Самылина И.В., Овчинников Р.С.

Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт
экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко
Российской академии наук, Москва, Россия

Irencm26@mail.ru

В последнее время во всем мире отмечается рост заболеваемости микозами как среди людей, так и среди животных. Диагностика грибковых инфекций представляет сложности для практикующих врачей, их лечение длительное, дорогостоящее, что обуславливает существенные экономические потери.

При этом распространяются заболевания, вызываемые условно-патогенными или оппортунистическими грибами, т. е. грибами с низким для животных уровнем патогенности, которые проявляют патогенные свойства только в определенных условиях, на фоне угнетения естественной резистентности организма-хозяина.

Проведена оценка распространенности оппортунистических грибов среди животных, которые были поделены на 6 групп: собаки, кошки, птицы, грызуны и кролики, хладнокровные и другие виды животных (пчелы, лошади, коровы, козы и т.д.).

Клинический материал от животных, подозреваемых на инфекционные болезни, включал мазки с кожи, ушей, со слизистых оболочек, внутренних органов, выпоты, желчь, мочу, фекалии и т.д.

Методы исследования: культивирование и микроскопия грибов, выделение чистой культуры, изучение состава популяции, изучение культурально-морфологических свойств,

видовая идентификация грибов с помощью микологических определителей и биохимических тестов, идентификация методом MALDI-TOF-масс-спектрометрии с предварительной экстракцией клеточных белков посредством последовательной обработки микробной взвеси этиловым спиртом, 70% муравьиной кислотой с последующим добавлением ацетонитрила (АЛМАСС Био 2000, Россия).

Всего проведено 3202 исследования, из которых в 1515 случаях выявлены грибы в целом (дерматофиты, плесневые и дрожжевые), что составило 47%. Из них 3% – это грибы дерматофиты, а остальные – оппортунисты. В 28% случаях – это дрожжевые грибы, а в 16% случаях мицелиальные (плесневые) недерматофитные грибы. Было выявлено 14 различных видов плесневых грибов, среди которых доминировали *Aspergillus* spp., *Cladosporium* spp. и *Alternaria alternata*. Среди дрожжевых грибов выявлено 6 различных родов (*Malassezia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Aureobasidium*, *Trichosporon*, *Moesziomyces*).

Далее был изучен видовой состав дрожжевых грибов для каждой категории животных по отдельности.

У кошек, птиц, грызунов и других видов животных доминируют грибы рода *Candida*. У собак в этиологической структуре преобладает вид *M. pachydermatis*. У хладнокровных доминируют грибы рода *Trichosporon*.

Выделено значительное количество видов *Candida non-albicans*, таких как *C. lusitaniae*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. famata*. Также были идентифицированы редкие виды дрожжевых грибов рода *Candida*, в том числе *C. haemulonii* и *C. membranifaciens* которые ранее у млекопитающих зарегистрированы не были.

Помимо распространенного *T. asahii* идентифицированы редкие виды грибов рода *Trichosporon* – *T. mucoides*, *T. japonicum*. Также был выделен вид *Moesziomyces bullatus*, который тоже ранее не встречался у млекопитающих.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что видовой состав оппортунистических грибов, появляются новые, ранее не встречавшиеся у животных виды.

ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ, ПРОДУКТИВНОСТЬ И ВИРУЛЕНТНОСТЬ
ШТАММОВ *BEAUVERIA BASSIANA*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПОЧВ
МОСКОВСКОЙ И ВЛАДИМИРСКОЙ ОБЛАСТЕЙ

Скачкова А.Д., Козлов А.В.

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

a.skachkova@list.ru

Целью работы явилась оценка жизнеспособности, продуктивности и вирулентности в отношении гусениц большой восковой огневки *Galleria mellonella* штаммов *Beauveria bassiana* выделенных из почв Владимирской и Московской области: *B. bassiana* DS3.2-O (Владимирская область, д. Сергеевка, луговая почва), *B. bassiana* DS3.2-O (Владимирская область, д. Сергеевка, садовая почва), *B. bassiana* БЭ5.2-O (Московская область, лесная подстилка). Выделение штаммов проводили методом приманки на гусениц *G. mellonella*. Отбор почвенных проб осуществляли методом конверта по ГОСТу 17.4.4.02-2017. Просеянную и увлажненную почву помещали в вентилируемые контейнеры (1 л), на поверхность раскладывали гусениц *G. mellonella* 3-4 возраста, плотно закрывали крышкой и оставляли на сутки при 25 °С, затем каждый день контейнеры переворачивали (для наиболее тесного контакта личинок с почвой). Через неделю контейнеры проверяли ежедневно, погибших особей удаляли. Гусениц перед экспериментом погружали в дистиллированную воду 56 °С (на 30 секунд) для ингибирования образования паутины.

Для выделения грибов погибших гусениц промывали в 0,1% растворе гипохлорита натрия (2-3 минуты), затем двукратно в стерильной дистиллированной воде, высушивали и раскладывали на картофельно-сахарозный агар с добавлением антибиотика.

Чистую культуру засеивали штрихом на овсяную искусственную питательную среду (ОИПС) и культивировали при 25°С в течение 15 суток. Определение родовой принадлежности изолятов производили с помощью справочников, по морфологии. Видовую принадлежность и подтверждение выполняли секвенированием ITS-региона.

Для определения жизнеспособности конидий производили посев споровой суспензии (10^9 конидий/мл) на «голодный» агар. Учет производили на 3-и сутки инкубирования методом прямого счета по 40 полям зрения микроскопа. Продуктивность определяли методом прямого счета конидий, образованных на 15-е сутки роста мицелия штаммов. Для определения вирулентности штаммов был использован контактный экспресс-метод: на поверхность 15 суточной культуры раскладывали по 10 личинок *G. mellonella* (по 3 повторности) и оставляли на 5 минут. Контрольную группу раскладывали на поверхность чистого агара. В ходе эксперимента гусениц содержали во влажных камерах при 25 °С без кормления. Всего в опыте было использовано по 30 гусениц на вариант.

Подсчет погибших насекомых осуществляли каждые 24 часа. Для подтверждения гибели от микоза трупы промывали и закладывали во влажные камеры.

Результаты анализа показали высокую вирулентность анализируемых штаммов *B. bassiana*: спустя 48 часов анализа минимальная гибель наблюдалась в варианте *B. bassiana* БЭ5.2-O и составила 30%. Максимальная гибель в варианте *B. bassiana* DS3.2-O 56,7%, у штамма *B. bassiana* DS4.2-O- 50%. При этом отмечена полная гибель (100%) через 72 часа во всех вариантах с применением грибов. Реизоляция показала гибель в результате микоза. Высокая продуктивность была отмечена у штамма *B. bassiana* БЭ5.2-O и составила 10^6 конидий/мл, на порядок меньше у штамма *B. bassiana* DS3.2-O (10^5 конидий/мл). Минимальной продуктивностью обладал *B. bassiana* DS4.2-O – 10^4 конидий/мл.

Максимальной жизнеспособностью в опыте обладал *B. bassiana* БЭ5.2-O (97,8%), 52% и 50% у штаммов *B. bassiana* DS4.2-O и *B. bassiana* DS3.2-O соответственно. Полученные результаты позволяют сделать выводы о перспективности штамма *B. bassiana* БЭ5.2-O в биологической защите растений от вредителей.

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ МИКРООРГАНИЗМАМИ В СОСТАВЕ МЕТАГЕНОМОВ УЛЬЯ

Смутин Д.В.^{1,2}, Гальдаев А.Х.^{3,4}, Лебедев Е.Е.², Адонин Л.С.^{2,3}

¹Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

²Институт экологической и сельскохозяйственной биологии (Х-БИО), Тюменский
государственный университет, Тюмень, Россия

³Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия

⁴Московский физико-технический институт, Москва, Россия

dvsmutin@gmail.com

Пчелиная колония часто описывается как единый суперорганизм. Общее функционирование всех геномов различных организмов, обитающих в этом сообществе, отражено в современной концепции «хологенома» [1]. Микробиомы оказывают глубокое влияние на общую работу пчелиной колонии. Это влияние не ограничивается модуляцией метаболизма пчел; скорее, микробиомы служат комплексной системой реагирования на внешние раздражители, фактически принимая на себя роль иммунной системы [2, 3]. Более того, они участвуют в формировании поведения пчел и даже играют роль в видообразовании [2]. Примечательно, что качественный и количественный состав микробиомов остается относительно постоянным в каждом отдельном микробиоме. Однако механизмы, ответственные за поддержание этой стабильности, а также специфические функции отдельных членов микробиома и способы их передачи между ульями – это вопросы, которые требуют дальнейшего изучения.

Проведя анализ литературы и обработав 338 образцов метагеномного shotgun-секвенирования, мы выявили как минимум 15 отдельных групп видов, которые неизменно присутствуют во всех пчелиных ульях. Среди этих групп 9 были обнаружены в метагеномах кишечника. Основные представители кишечной микрофлоры метаболически зависят друг от друга, что воспроизводится и для других метагеномов. Другими важными источниками стабильности являются гены синтеза и устойчивости к антибиотикам, гены, отвечающие за формирование биопленок. Некоторые линии, в частности, *Apilactobacillus kunkeei*, обнаруживают процессы гетеропатрического видообразования в разных средах улья.

Из всех микробиомов улья, микрофлора кишечника рабочих особей привлекает наибольшее внимание исследователей. У взрослых пчел всего 5 групп бактерий составляют 98 % от общей биомассы микробиома кишечника. В то же время, кишечник куколки на последних стадиях развития практически лишен микробиоты. Эта уникальная особенность делает пчел идеальным модельным организмом для изучения репопуляции кишечника. С другой стороны, другие метагеномы (микробиомы меда, маточного молочка, прополиса и сот) изучены. Изучение этих стабильных сообществ может быть значительно улучшено с применением пан-метагеномного подхода.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда (проект № 24-16-00226).

ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММА *PANTOEA BRENNERI* 3.2 С ДЕЛЕТИРОВАННЫМ ГЕНОМ ИНДОЛ-3-ПИРУВАТДЕКАРБОКСИЛАЗЫ (*ipdC*)

**Сокольникова Л.В., Егорова Е.А., Беркутова Е.С., Бульмакова Д.С.,
Сулейманова А.Д., Шарипова М.Р.**

Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия

lidasok00@mail.ru

Показано, что различные представители группы PGPR (Plant Growth Promotion Rhizobacteria) при взаимодействии с растениями способны вызывать у них состояние индуцированной системной резистентности (ISR), при котором повышаются защитные способности. Механизмы, с помощью которых бактерии регулируют ISR, до конца не изучены. Предполагают, что фитогормоны могут служить сигналами, запускающими ISR. Одним из наиболее часто продуцируемых фитогормонов является индол-3-уксусная кислота (ИУК). Ген, кодирующий индол-3-пируватдекарбоксилазу (*ipdC*) – один из ключевых ферментов пути биосинтеза ИУК, может быть потенциально вовлечен в развитие ISR у растений. Бактерии рода *Pantoea* обладают множеством биостимулирующих свойств и являются перспективными микроорганизмами, которые могут быть использованы в качестве биоудобрений.

Целью работы явилось получение и характеристика штамма *Pantoea brenneri* 3.2 с инактивированным геном индол-3-пируватдекарбоксилазы (*ipdC*).

При помощи рекомбиназы фага λ Red был получен мутантный штамм *P. brenneri* 3.2 $\Delta ipdC$. Инактивация гена *ipdC* приводила к снижению продукции ИУК мутантным штаммом на 29,9% в сравнении со штаммом дикого типа. Также у мутантного штамма на 32,4% снижалась способность к формированию глубинных биопленок. Однако делеция гена *ipdC* не приводила к изменению динамики роста бактерий, подвижности, способности к секреции сидерофоров и фосфатмобилизующей активности по сравнению с нативным штаммом. Таким образом, ген индол-3-пируватдекарбоксилазы играет ключевую роль в биосинтезе ИУК штаммом *P. brenneri* 3.2. Можно предположить, что мутантные штаммы будут менее эффективно колонизировать растения, снижая способность вызывать у них состояние ISR-праймирования. Необходимы дальнейшие исследования на растениях для более детального выяснения вклада ИУК в развитие ISR.

Работа поддержана грантом РФФИ №22-16-00138.

ФУНГИСТАТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЭФИРНОГО МАСЛА ЗВЕРОБОЯ ПЯТНИСТОГО
(*HYPERICUM MACULATUM* L.) В ОТНОШЕНИИ МИКРОМИЦЕТОВ *ASPERGILLUS*
WAKSMANII И *ASPERGILLUS SPINOSUS*

Сорокин Д.П.^{1,2}, Вольховский А.В.^{2,3}, Ильюшин В.А.³

¹Эколого-биологический центр «Крестовский остров», Санкт-Петербург, Россия

²Школа № 292 с углублённым изучением математики, Санкт-Петербург, Россия

³Ботанический институт имени В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург, Россия

dim.soroks@gmail.com

Приводятся результаты исследования фунгистатической активности эфирного масла зверобоя пятнистого (*Hypericum maculatum*), собранного на территории Киришского района Ленинградской области, в отношении двух штаммов аспергилла (*Aspergillus waksmanii* и *A. spinosus*). Показана выраженная антифунгальная активность препаратов эфирного масла в различных разведениях.

Поиск противогрибковых препаратов является перспективным направлением исследований в области фармакологии и защиты растений. Биопестициды на основе растительных эфирных масел предпочтительнее химических фунгицидов, так как последние плохо подвержены биодеградации и токсичны для человека и животных. Во многих районах России ведётся разработка природных запасов эфирномасличных растений и выращивание их в культуре. Эфирные масла являются комплексом гидрофобных соединений, в основном, терпеноидной природы. Они обладают антифлогистической, антисептической, антифунгальной активностью, вместе с тем низкотоксичны, не формируют резистентность микроорганизмов, обладают минимальным перечнем побочных эффектов.

Целью настоящего исследования является подбор оптимального разведения гидрофобной фракции водно-парового извлечения (эфирного масла) растения местной флоры – зверобоя пятнистого (*Hypericum maculatum* L.), проявляющей фунгистатическую активность в отношении штаммов микромицетов *Aspergillus waksmanii* Hubka и *Aspergillus spinosus* Kozak. Для выделения культур грибов использовался метод прямого посева. Использовали стандартную среда Чапека (CZ). Культуры штаммов предоставлены Лабораторией систематики и географии грибов БИН РАН.

Оба вида аспергиллов, реакция которых на эфирные масла зверобоя пятнистого исследовалась в эксперименте, относятся к серии Unilaterales секции Fumigati. Штаммы, послужившие модельными образцами, отобраны из угольных отвалов: *A. waksmanii* IVA-T2 MF-0205 в районе пос. Баренцбург (архипелаг Шпицберген), *A. spinosus* IVA-T6 MF-0208 в районе г. Воркута (Республика Коми). Оба исследованных вида способны выделять микотоксины (в большей степени *A. spinosus*). *A. spinosus* способен вызывать эндокардит, микотический кератит, а также лёгочный аспергиллёз, особенно у людей, перенесших трансплантацию костного мозга или в иммунодефицитных состояниях. В патогенезе участвуют вторичные метаболиты, которые, в целом, *A. spinosus* выделяет менее активно, чем другой микопатоген – *A. fumigatus*, но анализ его генома и метаболома позволяет выявить способность продуцировать глиотоксин, веррукулоген (изменяет электрофизические свойства эпителия носовой полости человека), псевротин А (является ингибитором иммуноглобулина Е). *A. waksmanii* стал известен науке сравнительно недавно (в 2013 г.) и сведениями о его патогенности для человека мы пока не обладаем. Но поскольку он филогенетически относится к секции Fumigati, является устойчивым в условиях крайнего севера (архипелаг Шпицберген), так и относительно жаркого климата штата Нью-Джерси (США), откуда был первоначально выделен вид его изолят, стоит предположить его потенциальную опасность для человека. Тем более актуальным представляется поиск препаратов, обладающих антифунгальной

активностью, на основе растительных эфирных масел. В эфирном масле *H. maculatum* биохимиками Института биологии Коми НЦ УрО РАН (г. Сыктывкар) обнаружено более 140 компонентов, из них достоверно идентифицированы 26, которые являются основными и составляют 75-82% от общего объема эфирного масла. Так сесквитерпеноиды составляют 45-62%, основным из которых является гермакрен D, массовая доля которого у *H. maculatum* может достигать 32,2-33,4%. Монотерпеноид β -пинен что в эфирном масле *H. maculatum* содержится в минорных количествах (1-2,4%) и в нем вместо циклических монотерпеноидов преобладает ациклический (*Z*)- β -оцимен (12-14%). В меньших концентрациях представлены ундекан (3,4-8,5%) и β -кариофиллен (2,9-4,7%).

Эфирное масло из сырьевой части растений *H. maculatum*, собранных в Киришском районе Ленинградской области (близ песчаного карьера, железнодорожная станция «52 километр») в июле 2023 г., было получено методом паровой дистилляции с использованием аппарата Клевенджера. Из 108 г. измельченного свежего сырья было получено 0,2 мл гидрофобной фракции. Из неё готовили эмульсию с разведениями 1:100, 1:50, 1:10, которую наносили на полоски фильтровальной бумаги и помещали на чашки Петри рядом с посевом грибной культуры. Посевы производились в сухом помещении при стандартной влажности и температуре 25 °С, в стерильных условиях на среду Чапека M075. Посев производился методом: укола в три точки. Опыт был заложен в трёх повторениях, всего исследовано 60 колоний. Первые съёмки и подсчёт площади колоний проводились на 7-е сутки после посева, при рассеянном освещении на миллиметровой бумаге. Второй точкой сбора результатов были 14-е сутки после посева. Результаты эксперимента представлены в таблице:

Табл. Подавление роста колоний микромицетов *Aspergillus waksmanii* и *A. spinosus* эфирным маслом зверобоя пятнистого *Hypericum maculatum* L.

Шт.	Размер колонии, мм ²							
	7 суток				14 суток			
	Разведение				Разведение			
	Контр.	1:100	1:50	1:10	Контр.	1:100	1:50	1:10
1	1569 ±18	55,6 ±2,2	51,2 ±1,2	41,8 ±2,3	2616 ±19	203,2 ±2,6	213,8 ±3,6	236,2 ±1,7
2	1572 ±11	102,0 ±4,1	99,8 ±1,6	93,2 ±1,8	2582 ±23	108,4 ±5,2	210,1 ±1,9	141,8 ±9,9

Шт. – штамм, 1 – штамм *A. waksmanii* IVA-T2 MF-0205, 2 – *A. spinosus* IVA-T6 MF-0208

Полученные данные говорят о выраженной фунгистатической активности компонентов эфирных масел *H. maculatum*. 38-кратное подавление роста колоний *A. waksmanii*, по сравнению с контролем достигалось на 7-е сутки разведением гидрофобной фракции дистиллята 1:10. В меньшей степени проявился эффект подавления роста колоний *A. spinosus* на 7-е сутки: разведение 1:10 снижало рост колонии почти в 17 раз, по сравнению с контролем, при этом разность средних диаметров колоний эмульсии 1:100 и 1:10 составила 8,6%. На 14-ые сутки подавление роста колоний всеми тремя концентрациями эфирного масла нивелируется и составляет $\frac{1}{13} - \frac{1}{11}$ для *A. waksmanii*, и $\frac{1}{24} - \frac{1}{12}$ для *A. spinosus* от диаметра контрольных колоний этих видов микромицетов. Причём фунгистатический эффект сохранялся дольше в разведении 1:100.

Таким образом, в ходе данного исследования установлено, что эфирное масло *H. maculatum*, собранного на территории Ленинградской области, существенно подавляет рост колоний штаммов микромицетов *A. waksmanii* и *A. spinosus* из коллекции Лаборатории систематики и географии грибов БИН РАН и может быть взято в качестве основы фунгистатического лекарственного препарата.

СОДЕРЖАНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ЦИСТЕИНА У УСТОЙЧИВЫХ И
ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ К АНТИБИОТИКАМ ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI* ПРИ
КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА БОГАТОЙ И МИНИМАЛЬНОЙ СРЕДАХ

Сутормина Л.В., Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н.

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН,
Пермь, Россия

lyubov-sutormina@mail.ru

Неконтролируемое применение антибиотиков в сельском хозяйстве, включая птицеводство, стало причиной возникновения и распространения бактерий, обладающих множественной резистентностью. Штаммы птичьей патогенной *Escherichia coli* (АРЕС) способны вызывать широкий спектр инфекционных заболеваний у многих видов домашней птицы. Так колибактериоз является одной из ведущих причин смертности птиц и приводит к значительным экономическим потерям в птицеводстве. Поэтому разработка новых стратегий воздействия антибиотиков имеет решающее значение на пути снижения антибиотикорезистентности.

Перспективным направлением считается изучение влияния L-цистеина и его производных на степень патогенности бактерий, а также на их чувствительность к окислительному стрессу и антибиотикам. Цистеин является компонентом белков, глутатиона и служит источником восстановленной серы для многих других органических молекул. Благодаря высокой редокс-активности сульфгидрильных групп он играет важную роль в метаболических процессах клетки, включая регуляцию активности ферментов, клеточную сигнализацию и антиоксидантную защиту. На основании этого представляет интерес сравнить внутриклеточное содержание цистеина у устойчивых и чувствительных к антибиотикам штаммов бактерий.

Цель данной работы – определение чувствительности к антибиотику ципрофлоксацину и сравнение содержания внутриклеточного цистеина у двух штаммов *E. coli*, растущих на богатой и минимальной средах. В экспериментах использовался лабораторный штамм *Escherichia coli* BW25113 из коллекции Keio, а также штамм *E. coli* АРЕС L-5876, выделенный из птиц, больных колибактериозом, на птицефабриках Пермского края. Бактерии выращивали на минимальной среде М9 с глюкозой и на богатой среде LB-Miller. Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) ципрофлоксацина определяли методом серийных разведений в планшетах. Цистеин определяли по методу Gaitonde.

Фторхинолон ципрофлоксацин (ЦФ) является широко используемым препаратом для лечения бактериальных инфекций у сельскохозяйственных животных и птиц. Лабораторный штамм BW25113 был чувствителен к ЦФ, значения МИК на среде М9 и на среде LB-Miller составляли 0.016 мкг/мл и 0.032 мкг/мл соответственно. Штамм АРЕС L-5876 проявлял устойчивость ко всем исследованным концентрациям антибиотика на обеих средах.

На среде М9 через 30 минут культивирования концентрация цистеина в штамме АРЕС L-5876 был в 1.6 раз выше, чем у BW25113, и составляла 0.181 ± 0.011 и 0.115 ± 0.016 $\mu\text{M}/\text{OD}_{600}$ соответственно. При культивировании на богатой среде LB уровень цистеина возрастал в 2 раза у АРЕС L-5876, и лишь в 1.4 раза у BW25113 в сравнении с результатами, полученными на минимальной среде. Можно предположить, что одним из факторов, определяющих устойчивость штамма АРЕС L-5876 к антибиотику, является повышенное содержание внутриклеточного цистеина. Требуется дальнейшие исследования о роли метаболизма цистеина в устойчивости бактерий к антибиотикам.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 22-14-00093.

СРАВНЕНИЕ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ НАТИВНЫХ И МУТАНТНЫХ ФОРМ О-ДЕМЕТИЛАЗ СЕМЕЙСТВА СУР255А

Суханов А.Ю., Кунгуров Г.А., Валиахметов Э.Э., Трахтман Н.В., Валидов Ш.З.

Лаборатория молекулярно-генетических и микробиологических методов,
ФИЦ Казанский Научный Центр РАН, Казань, Россия

ay.sukhanov@gmail.com

В мире остро стоит проблема переработки лигниновых отходов, которые, свою очередь, являются отходами производства целлюлозы из древесины. Осложняет переработку факт того, что мономеры лигнина (монолигнинолы) имеют О-метильные радикалы, которые затрудняют расщепление ароматического кольца для дальнейшей деградации. В литературе этот этап описывают как «бутылочное горлышко» в процессе биологического разложения лигнина.

Одним из способов О-деметилирования монолигнинолов является использование цитохромных Р450 ароматических О-деметилаз семейства СУР255а. Они отщепляют СН₃-группу с образованием формальдегида и свободной ОН- группы на ароматическом кольце.

Однако, нативные формы О-деметилаз СУР255а имеют ограниченное количество ароматических субстратов, с которыми они могут эффективно работать. При этом, монолигнинолы могут иметь различные радикалы по разным положениям, часть из которых не дают субстрату правильно связаться с активным центром. Сейчас известно несколько белков семейства СУР255а, которые работают с различными субстратами. Для работы деметилазы ей также необходима соответствующая редуктаза, которая переносит электроны на протопорфириновый гем в О-деметилазе. Целью этой работы стало конструирование гибридной О-деметилазы семейства СУР255а, которая сможет эффективно проводить реакцию с различными монолигнинолами.

Для этого было проведено сравнение аминокислотных последовательностей и пространственных моделей белков GcoA, AgcA и SuoA, также проводился докинг с рядом субстратов: гваякол, сириггол и их алкильные производные. Эти данные позволили определить, какие аминокислотные остатки предположительно связываются с субстратом и определяют субстратную специфичность. Для этих положений были предложены замены, которые должны изменить активный центр в соответствии с поставленной задачей.

Нуклеотидная последовательность нативных генов целевых белков была оптимизирована и синтезирована *in vitro* в векторе рЕТ-GB1, затем были попарно собраны О-деметилазы и редуктазы в векторе рJNTN-L методом Гибсона. Белки экспрессировали в *E. coli* DH5a с индукцией IPTG.

Работа нативных и мутантных белков оценивалась качественно по изменению цвета субстрата при окислении. В результате можно полагать, что эффективность работы дикой формы белка выше по сравнению с мутантной, но обладает большей специфичностью. Мутанты же охватывают большую часть спектра необходимых субстратов, но при этом эффективность конверсии несколько ниже.

Работа выполнена в рамках выполнения проекта «Разработка рекомбинантного штамма на основе *Pseudomonas putida* PCL1760 для биокаталитической трансформации ароматических производных лигнина», финансируемого Министерством Науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2022-254 от 17.06.2022 г.).

АНАЛИЗ НАЛИЧИЯ ГЕНОВ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ИЗ МОЛОКА БОЛЬНЫХ МАСТИТОМ КОРОВ

Сыромятников М.Ю.^{1,2}, Нестерова Е.Ю.^{1,2}, Каземзаде Ш.², Гладких М.И.²

¹Кафедра генетики, цитологии и биоинженерии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

²Лаборатория метагеномики и пищевых биотехнологий, Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

mihan.vrn@mail.ru

На протяжении длительного времени мастит занимает лидирующие позиции среди заболеваний молочного скота. Его развитие обусловлено каскадом воспалительных реакций, протекающих в молочных железах коров. Одним из основных индукторов патогенеза, как правило, выступает *Staphylococcus aureus*. Противомикробные препараты активно применяются не только для борьбы и профилактики распространения бактериальных и грибковых инфекций, но и в качестве биостимуляторов роста животных. Данный подход вызывает опасения со стороны здравоохранения, так как развитие мастита зачастую сопровождается микробными инфекциями, которые могут передаваться человеку. При этом нерациональная терапия и профилактика мастита коров противомикробными препаратами становится причиной такого явления, как антибиотикорезистентность.

Целью данной работы было оценить изолированные из молока больных маститом коров *S. aureus* на наличие генов антибиотикорезистентности с помощью метода высокопроизводительного секвенирования.

Для выявления генов антибиотикорезистентности штаммы *S. aureus* были изолированы из молока 11 коров. Секвенирование проводили с использованием платформы DNBSEQ-G50 (MGI, Китай) с моделью проточной ячейки для секвенирования DNBSEQ-G50RS: FCL. С помощью программного обеспечения GROOT осуществляли профилирование резистома на основе индекса ARG-ANNOT. Идентификация генов резистентности к антибиотикам проводили на основе сопоставления с эталонными последовательностями ARG, которые были получены из единой кластеризованной базы данных.

Биоинформатический анализ данных, полученных в результате секвенирования, позволил детектировать 24028 ридов, причём более 80% ридов приходилось на гены устойчивости к аминогликозидам. Остальные риды соответствовали генам резистентности к классу хинолоновых антибиотиков.

Ассоциированным с резистентностью к аминогликозидными антибиотиками оказался ген *APH-Stph*. Ранее сообщалось об его обнаружении в изолятах бактерий, полученных от коров, принимающих терапию в виде гентамицина и тобрамицина. Эти данные подтверждают полученные нами результаты. Устойчивость к хинолонам изолированных штаммов *S. aureus* была ассоциирована с геном *norA*. Его связывают с откачивающими насосами основного суперсемейства белков-фасилитаторов, участвующих в транспорте веществ через мембрану.

Таким образом, в ходе проведенного исследования было установлено, что в изолированных из молока маститных коров штаммах *S. aureus* присутствовали два гена устойчивости к антибиотикам – *APH-Stph* и *norA*, которые связаны с резистентностью к двум классами антибиотиков – аминогликозиды и хинолоны.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА, РАЗНООБРАЗИЕ И ФИЛОГЕНИЯ АМЕБ СЕМЕЙСТВА HARTMANNELLIDAE (АМОЕВОЗОА: ТУБУЛИНЕА: ЕУАМОЕБИДА)

Таймарова К.М.¹, Камышацкая О.Г.^{1,2}

¹Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра зоологии беспозвоночных,
Санкт-Петербург, Россия

²Институт Цитологии РАН, лаборатория Цитологии одноклеточных организмов, Санкт-
Петербург, Россия

st091701@student.spbu.ru

Семейство Hartmannellidae было установлено Волконским (1931), и долгое время включало четыре рода (*Hartmannella*, *Saccamoeba*, *Cashia*, *Glaeseria*), выделенных на основе свето-микроскопических признаков: морфологии клеток, особенностей движения локомоторных форм, наличия или отсутствия цист. Использование в систематике методов молекулярно-филогенетического анализа сильно изменило состав семейства. Было показано близкое родство рода *Hartmannella* с представителями родов *Copromyxa* и *Copromyxella* (Brown et al. 2011), обладающих жизненным циклом с формированием «плодовых тел», чего раньше не было показано для голых лобозных амёб. Выделен и описан новый род – *Ptolemeba* (Watson et al. 2014). На основе данных молекулярно-филогенетического анализа, род *Polychaos* перенесен из семейства Amoebidae в Hartmannellidae (Kamyshatskaya et al. 2020). В отличие от остальных хартманнеллид, для которых характерно наличие везикулярного ядра с центрально расположенным ядрышком, амёбы рода *Polychaos* обладают ядрами со сложной организацией ядрышкового материала. Это стало причиной изменения и расширения морфологического диагноза семейства Hartmannellidae. В настоящее время семейство Hartmannellidae включает 8 родов, насчитывающих в сумме более 30 видов.

В рамках нашей работы по изучению биоразнообразия амёб семейства Hartmannellidae были отобраны пробы из пресноводных и наземных местообитаний. Из накопительных проб были выделены три штамма амёб, идентифицированных с помощью методов световой микроскопии только лишь до статуса семейства (как амёбы семейства Hartmannellidae). Анализ литературных источников показал, что электронно-микроскопические исследования посвящены лишь небольшому числу представителей семейства и не существует значимых ультраструктурных признаков, необходимых для того, чтобы уверенно различать этих амёб между собой. Поэтому для более точной идентификации амёб для каждого из штаммов была получена последовательность гена 18S рРНК, проведен молекулярно-филогенетический анализ. В молекулярно-филогенетическом дереве каждая последовательность надежно группировалась с другими последовательностями представителей одного из родов *Saccamoeba* (штамм 145), *Ptolemeba* (штамм БсАм), *Copromyxa* (штамм БсАм 5s). Семейство Hartmannellidae в целом обладало высокой поддержкой, выделение основных родов: *Polychaos*, *Saccamoeba*, *Glaeseria* было полностью поддержано. При этом, род *Ptolemeba* формировал отдельную внешнюю ветвь к кладе Amoebidae плюс Hartmannellidae.

На данный момент, таксономические критерии амёб, семейства Hartmannellidae, требуют существенной доработки. Необходима полная ревизия семейства, основанная на комплексном анализе современных морфологических и молекулярных данных, требующая дополнительных современных свето-микроскопических, ультраструктурных и молекулярно-филогенетических исследований.

Работа поддержана грантом РФФИ №23-24-00264. При выполнении работы использованы технические возможности ресурсных центров «Культивирование микроорганизмов», «Развитие молекулярных и клеточных технологий», «Вычислительный центр СПбГУ» и «Биобанк» научного парка СПбГУ.

МАЛЫЕ СЕКРЕТИРУЕМЫЕ РНК *ESCHERICHIA COLI*
КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ БАКТЕРИОСТАТИКИ

Трошина Д.А.¹, Маркелова Н.Ю.², Кольжецов Н.П.², Шавкунов К.С.², Озолин О.Н.²

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

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

darya.troshina02@mail.ru

Благодаря накоплению данных глубокого секвенирования, был найден новый класс чрезвычайно малых РНК (12–40 н), выделяемых бактериями во внеклеточную среду. Значительная часть секретлируемых РНК (сеРНК) представлена фрагментами больших рРНК, продуктами расщепления функционально важных некодирующих белок РНК, включая тРНК, 4.5S РНК, 6S РНК, tmРНК, РНК из криптических профагов и межгенных областей. Способы секреции и участники биогенеза внеклеточных РНК бактерий не изучены, однако установлено их качественное отличие от пула клеточных коротких транскриптов, предполагающее наличие особых систем по их отбору и выделению во внеклеточную среду в дополнение к их высвобождению в составе везикул. Постулируется, что основной целью бактериальных сеРНК является участие в межклеточной сигнализации. Обнаружено, что они способны влиять на экспрессию генов в эукариотических клетках, в то время как некоторые микроРНК млекопитающих могут влиять на бактериальный транскриптом. Способность сеРНК играть роль сигнальных молекул в бактериальном сообществе пока практически не исследована, но уже установлено, что РНК, секретлируемые бактериями кишечного тракта человека, могут проникать в клетки кишечной палочки (*E. coli*) и влиять на динамику её роста.

E. coli стабильно секретирует свой собственный спектр коротких РНК, функции которых не изучены. Поэтому, для оценки их способности влиять на бактерии своей и чужих популяций, мы отобрали несколько олигонуклеотидов, присутствующих в секретоме в больших количествах, и протестировали их влияние на рост двух штаммов *E. coli* и *Pseudomonas aeruginosa*. Среди тестируемых РНК были фрагменты трех тРНК и транскрипт межгенной области *fimA-fimL*. Исследуя динамику роста бактерий в планшетном ридере, мы обнаружили негативное влияние синтетических аналогов модельных РНК на рост *E. coli* K-12 MG1655, которое зависло от их концентрации и состава питательной среды. Максимальное ингибирующее воздействие наблюдалось в минеральной среде, содержащей глюкозу в качестве основного источника углерода, тогда как в средах, содержащих органические компоненты (пептон, крахмал, дрожжевой и мясной экстракты), наблюдается лишь частичное подавление роста бактерий, и только при повышенных концентрациях олигорибонуклеотидов. Это может указывать на участие тестируемых РНК в регуляции энергетического метаболизма клеток. Интересно, что ингибирующее воздействие на рост пробиотического штамма *E. coli* Nissle 1917 оказалось менее выраженным, чем на *E. coli* K-12 MG1655, а бактериостатическое воздействие на эволюционно удаленный вид *Pseudomonas aeruginosa* практически отсутствовало. Это может указывать на видоспецифичность воздействия.

Обнаруженное нами бактериостатическое действие сеРНК может в будущем стать перспективной базой для разработки новых антимикробных препаратов, основанных на «программируемых РНК». Разработка таких РНК требует тщательного изучения их биогенеза, молекулярных механизмов регуляторного действия и рисков возникновения побочных эффектов.

НОВЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОМ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МЕТАНОГЕННЫХ АРХЕЙ

Трубицын В.Э., Щербакова В.А.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН – обособленное подразделение
ФИЦ Пушкинский научный центр биологических исследований РАН, Пушкино, Россия

lichoradkin43@gmail.com

Метаногенные микроорганизмы способны производить метан из простых органических (метанол, ацетат, метиламины) и неорганических (водород, углекислый газ, угарный газ) веществ. Эта способность делает их уникальными организмами, которые можно использовать для получения экологически чистого топлива, как в чистых культурах, так и в составе микробных сообществ.

До недавнего времени с точки зрения биотехнологии метанобразующие археи представляли ценность исключительно как ключевые участники процесса образования биогаза из различных органических отходов и, в небольшой степени, как продуценты витамина В₁₂ для обогащения кормовых продуктов для животных. Накопленные данные о продуцирующих метан археях и современные достижения в области молекулярной биологии, генетики и биоинженерии позволяют разрабатывать подходы к созданию высокопродуктивных штаммов метаногенов с расширенным субстратным рядом и увеличенной скоростью роста, а также штаммов, способных к синтезу ценных метаболитов. В работах зарубежных авторов теоретически обоснована возможность расширения субстратного ряда используемых в промышленности метаногенных штаммов, в частности, представителей рода *Methanosarcina*.

В настоящее время доступны генетические инструменты для трансформации мезофильных и термофильных метаногенных архей с целью получения биологически-активных субстанций. В успешных исследованиях используются различные подходы для редактирования геномов: трансформация с использованием полиэтиленгликоля, липосом и конъюгации; экспрессия генов из автономно реплицирующихся челночных плазмид; транспозонный мутагенез; методы гомологичной рекомбинации хромосомных изменений и системы CRISPR-Cas. С другой стороны, эти исследования очень немногочисленны, методология трансформации архей нуждается в дальнейшей доработке, а аналогичные работы, посвящённые холодоустойчивым штаммам, к настоящему времени полностью отсутствуют.

Другим направлением, быстро развивающимся в последние годы, является электрометаногенез, предполагающий ускорение выделения метана путём подачи в среду с водородиспользующими метаногенными микроорганизмами слабого электрического тока. Работы в этой области ведутся уже около 15 лет, описаны успешные эксперименты, как с чистыми культурами, так и со смешанными микробными сообществами. Исследовательскими группами по всему миру активно разрабатывается технология “power-to-gas”, которая предполагает получение метана путем подачи слабого электрического тока на метаногенную культуру. Считается, что биоэлектрохимические системы позволяют еще больше оптимизировать экономическую эффективность метаногенеза.

Таким образом, существует потребность как в поиске биотехнологически значимых метаногенных архей, в том числе среди холодоустойчивых представителей, так и в увеличении эффективности самих биотехнологических процессов путём внедрения биоэлектрохимических систем и поиска новых путей трансформации перспективных природных штаммов.

СРАВНЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ И БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ N-
АЦЕТИЛТРАНСФЕРАЗ RIML ИЗ *E. COLI* И *T. THERMOPHILUS*

Трунилина М.В.^{1,2}, Быков В.В.^{1,2}, Вологжанникова А.А.¹, Кудряшов Т.А.¹, Азев В.Н.³,
Горбунова Е.Ю.³, Мустаева Л.Г.³, Соколов А.С.¹, Лаптева Ю.С.¹

¹ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН», (Институт
биологического приборостроения с опытным производством РАН), Пушкино, Россия

²ПушГЕНИ – филиал РОСБИОТЕХ, Пушкино, Россия

³Филиал Института Биоорганической Химии РАН, Пушкино, Россия

masha.trunilina@mail.ru

NAT (N-ацетилтрансферазы) представляют собой большое GNAT (Gcn5-related N-acetyltransferase) суперсемейство ферментов, которые катализируют перенос ацетильной группы на субстрат и участвуют в различных функциях: от переноса ацетильной группы на N-концевую аминокислотную группу белка до устойчивости бактерий к антибиотикам. Ферменты суперсемейства GNAT обладают низким процентом идентичности последовательностей, но обладают схожими укладками трехмерных структур.

На данный момент мало изучено N-концевое ацетилирование у бактерий. Наиболее известными NAT бактерий являются RimL, RimI, RimJ и YiaC. Известно, что RimL из бактерии *E. coli* (EC-RimL) ацетилюет рибосомальный белок L12 с N-концевым Ser или Ala, но не известны его физико-химические свойства и структура. Для RimL из экстремофила *T. thermophilus* (TTh-RimL) известна только кристаллическая структура – димер (PDB: 2Z0Z), но не изучены его физико-химические и биохимические свойства.

Отсутствие N-концевого ацетилирования у рекомбинантных белков эукариот, например парвальбуминов, нарабатываемых в бактериях, критично сказывается на их структуре и функциональной активности. Учитывая важность ацетилирования, актуально изучение NAT, в особенности термофильных ортологов ацетилтрансфераз, поскольку ферменты экстремофилов приспособлены к нестандартным условиям. В этой связи, целью работы является изучение N-ацетилтрансфераз RimL из *Thermus thermophilus* и *E. coli* и их сравнительная характеристика.

Методом множественного выравнивания в программе AlignX был проведен протеомный анализ TTh- и EC-RimL, который показал аминокислотную идентичность 16-20%. Гены NAT EC-RimL (UniProt ID: P13857) и TTh-RimL (UniProt ID: Q5SHD1) (BKM B-1605) клонированы, сверхэкспрессированы в *E. coli*, и очищены до гомогенного состояния. Методом собственной флуоресценции белка показана сравнительная характеристика по устойчивости NAT к pH, высоким температурам и денатурирующим агентам: EC-RimL стабилен при pH 3-12, TTh-RimL стабилен при pH 4-12; температура полуперехода из нативного в денатурированное состояние EC-RimL 52°C, TTh-RimL 88°C; концентрация полуперехода из нативного в денатурированное состояние EC-RimL 3,3 М GdHCl, TTh-RimL 2,3 М GdHCl. Методом химического сшивания глутаровым альдегидом определено олигомерное состояние ферментов: TTh-RimL содержит моно- и димерные формы, EC-RimL склонен к олигомеризации. Методом ацетилирования *in vitro* пептидов с различными N-концевыми аминокислотами установлено, ферменты проявляют специфичность, которая снижается в ряду Ser→Gly→Ala для TTh-RimL, и Ser→Ala→Gly для EC-RimL.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 23-24-00478, <https://rscf.ru/project/23-24-00478/>.

ПОИСК НОВЫХ ПОДХОДОВ К ПОВЫШЕНИЮ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ
ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

**Федорова М.С., Муталлапова Г.И., Азнабаева З.А., Ядыкова Л.Л., Ильина В.Н.,
Тризна Е.Ю., Каюмов А.Р.**

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

MaSFedorova97@mail.ru

На сегодняшний день широкое распространение инфекционных заболеваний во всём мире вызвано быстрым развитием бактериальной резистентности к антибиотикам, поэтому поиск и разработка альтернативных подходов противомикробной терапии является актуальной задачей. В настоящее время одним из распространенных мультирезистентных патогенов и причиной многих инфекционных заболеваний является условный патоген *Pseudomonas aeruginosa*. Ранее в нашей лаборатории было показано, что при совместном культивировании бактерий *P. aeruginosa* и *S. aureus* повышается эффективность антибиотиков в отношении этих бактерий. Вероятно, это обусловлено метаболитами *S. aureus* из КЖ (культуральной жидкости). Поэтому, пробовали различные методы для выделения данных метаболитов. Наиболее оптимальными условиями для выделения антимикробных метаболитов оказались: инкубация КЖ в кислых условиях с последующей твердофазной экстракцией и элюцией проб 20-60% раствором ацетонитрила. Кроме того, адьювантами антибиотиков могут стать бактериофаги, усиливающие действие антимикробных препаратов в отношении толерантных к антибиотикам изолятов *P. aeruginosa*. Для выделения бактериофагов проводили отбор проб воды из рек Кусюкла (Республика Башкортостан) и Малая Кокшага (Республика Марий Эл), и сточных вод (Республика Татарстан) с последующей фильтрацией и оценкой вирулентных свойств фагов на двухслойном агаре. Следующим этапом оценивали вирулентные свойства полученных бактериофагов в отношении клинических изолятов бактерий, а также активность в сочетании с антибактериальными препаратами. В дальнейшем планируется идентификация единичных бактериофагов (описание морфологии, молекулярных характеристик).

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения задания в сфере научной деятельности. Проект № FZSM2022-0017.

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИПОПОЛИСАХАРИДА
LYSOBACTER GUMMOSUS GMNF6S

Черкасова Е.А.¹, Бурыгин Г.Л.^{1,2}

¹Саратовский национальный исследовательский государственный университет
имени Н.Г. Чернышевского Саратов, Россия

²Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ «Саратовский
научный центр РАН», Саратов, Россия

li.tcherkasova@yandex.ru

Липополисахариды (ЛПС) являются основными компонентами наружных мембран грамотрицательных бактерий, играющих важную роль во взаимодействии микроорганизмов с объектами окружающей среды. Представители рода *Lysobacter* обитают в почве, разлагающемся органическом веществе и пресной воде, иногда в больших популяциях, в гидротермальных источниках и восходящих реакторов анаэробного ила. Многие штаммы *Lysobacter* spp. представляют значительный экологический и биотехнологический интерес как продуценты экзоферментов и антибиотиков. При этом выделение биологически активных веществ из клетки у этих бактерий происходит в виде везикул, окружённых ЛПС. Целью данной работы было получение и характеристика ЛПС штамма *Lysobacter gummosus* GmNf6s, выделенного из клубеньков сои (*Glycine max* (L.) Merr.) сорта Натали.

Бактериальная культура штамма *Lysobacter gummosus* GmNf6s была предоставлена сотрудникам Вавиловского университета (Саратов, Россия). Биомасса клеток была получена культивированием на среде LB в течение 18 часов. Клетки осаждали центрифугированием, промывали фосфатно-солевым буфером и высушивали с помощью ацетона. Сухую биомассу использовали для получения препарата ЛПС с помощью водно-фенольной экстракции с последующим диализом. Белки и нуклеиновые кислоты были удалены осаждением трихлоруксусной кислотой. Финальный препарат ЛПС был лиофилизирован и использован для анализа биополимерного состава и физико-химических свойств. Содержание углеводов оценивали фенол-сернокислотным методом относительно экстринци глюкозы. Жирнокислотный состав был определён хроматографическим методом после метанолиза. Размер и характеристики надмолекулярных частиц, образуемых в водном растворе, измерялись с помощью метода динамического рассеяния света.

В результате проведённых экспериментов из 7,5 литров бактериальной культуры *Lysobacter gummosus* GmNf6s было получено 4,1 г сухой биомассы, из которой был выделен препарат ЛПС с выходом 11%. Полученный препарат характеризовался низким содержанием углеводов, вступающих в фенол-сернокислотную реакцию, – 16%, и высоким содержанием 2-кето-3-дезоксиктановой кислоты – 0,4%. Хроматографический анализ метилов жирных кислот показал преобладание в липиде А ЛПС штамма GmNf6s 3-гидрокситетрадекановой (3ОН-С_{14:0}; 72,4%) кислоты, с присутствием остатков гексадекановой (С_{16:0}; 14,6%), тетрадекановой (С_{14:0}; 4,8%) и додекановой (С_{12:0}; 1,9%) кислот.

ЛПС являются амфифильными молекулами и, соответственно, в воде образуют надмолекулярные частицы. Результаты измерений с использованием метода динамического рассеяния света показали, что в воде ЛПС штамма *Lysobacter gummosus* GmNf6s образует надмолекулярные частицы диаметром $65,5 \pm 2,2$ нм, имеющих две фракции, различающихся по заряду: $-3,6 \pm 0,9$ мВ и $-22,8 \pm 1,4$ мВ.

Таким образом, в работе был получен препарат ЛПС штамма *Lysobacter gummosus* GmNf6s, для которого были проведены исследования химического состава и физико-химических свойств надмолекулярных частиц, формирующихся в водной среде. Полученные результаты станут основой для дальнейших экспериментов по расшифровке структуры молекул ЛПС этого штамма и его практического применения в биотехнологии растений.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ДВУХ АМЕБ РОДА *THECAMOEBA* (АМОЕВОЗА:
THECAMOEVIDA), ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ИНДИИ

Чикадзе Е.Д., Мезенцев Е.С.

Кафедра зоологии беспозвоночных СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

st107864@student.spbu.ru

Представители рода *Thecamoeba* широко распространены в различных местообитаниях и встречаются в морских, пресноводных и наземных местообитаниях. Их можно отличить довольно легко идентифицировать в накопительных культурах благодаря набору характерных морфологических признаков: плавные округлые очертания, отсутствие псевдоподий и субпсевдоподий при движении, уплощенное тело и характерные складки на дорзальной поверхности. До недавнего времени считалось, что все виды *Thecamoeba* хорошо различаются по размерным характеристикам, особенностям локомоторной формы и морфологии ядра. Однако последние исследования показывают, что в рамках одного морфологического вида может быть обнаружено несколько близких видов, различить которые можно только на молекулярном уровне. Обнаружение видов-двойников у амёб поднимает несколько важных вопросов среди которых вопрос генетической структуры морфологических видов и вопрос стабильности традиционно используемых генетических маркеров для определения лобозных амёб.

В рамках нашего исследования наземных лобозных амёб были изолированы и установлены в клональных культурах 2 штамма текамёб из различных географических точек Индии. Для штаммов были проведены светомикроскопические исследования, а также получены образцы тотальной ДНК. Получены последовательности маркерного гена 18s рРНК и проведен филогенетический анализ.

Амёб штамма 46 по совокупности морфологических признаков, можно отнести к стриатному или ругозному морфотипу. Единственное ядро содержало периферически расположенные ядрышки сложного строения. В молодых культурах (1-2 недели) ядрышки имели округлую форму с радиально расположенными булавовидными выростами и напоминали небольшие звездочки. В более старых культурах (4-5 недель) ядрышковый материал был организован в неровные периферические ленты. Эти особенности указывают на принадлежность изученного штамма к виду *Thecamoeba astrologa*. Анализ молекулярных данных подтвердили наши предположения – последовательность гена 18s рРНК штамма 46 имеет лишь небольшие отличия от типовой последовательности *T. astrologa*. Этот вид, был лишь однажды изолирован из проб листового опада, собранного в Финляндии, а наша находка свидетельствует о его широкой распространенности.

Морфологические особенности локомоторной формы амёб штамма 14 позволяют отнести его к ругозному морфотипу. Ядрышки линзовидной формы были расположенные на периферии ядра. По этим признакам штамм был отнесен к группе близких видов *Thecamoeba similis*, к которой на данный момент можно отнести лишь два вида. Анализ нуклеотидной последовательности гена 18s рРНК показал, что штамм 14 ближе к виду *T. foliovenanda* (один из видов-двойников). Однако их последовательности не идентичны, и это позволяет предположить, что штамм является одной из генетических линий вида. Обнаружение новых генетических вариантов указывает на активную эволюцию этого морфологического вида, расширяет наши представления об их генетической структуре, и указывает на необходимость применения молекулярных методов для идентификации и различения видов текамёб.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 23-24-00397 с использованием оборудования РЦ «Развитие молекулярных и клеточных технологий», «Культивирование микроорганизмов», «Биобанк» Научного парка СПбГУ.

ИССЛЕДОВАНИЕ НОВОГО ШТАММА *THERMITHIOBACILLUS PLUMBIPHILUS* AAFK

Шайкин А.А.^{1,2}, Абашина Т.Н.¹, Вайнштейн М.Б.¹

¹ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН» (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН), Пущино, Россия

²Пущинский филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)», Пущино, Россия

shaikin.artem@gmail.com

В семействе *Thermithiobacillaceae* известен род *Thermithiobacillus*, который был создан после переклассификации *Thiobacillus tepidarius* в *Thermithiobacillus tepidarius*. В 2016 г. в род был включен новый автотрофный вид *Thermithiobacillus plumbiphilus*, описанный на основании единственного природного штамма, выделенного из техногенного сырья. Нами был получен и охарактеризован новый штамм данного вида *T. plumbiphilus* AAFK, выделенный из арсениопиритного флотоконцентрата (Казахстан).

Целью нашей работы было изучение нового штамма и его свойств, сопоставление их с известными для раннее описанного типового штамма вида, а также исследование перспектив и возможности использования штамма для биовыщелачивания минерального сырья.

Штамм *T. plumbiphilus* AAFK выращивали в среде на модифицированной среде АТСС 290, содержащий в качестве единственного источника энергии тиосульфат натрия. Для нахождения оптимальных условий исследовали рост при различных значениях pH и температуры. Контроль роста проводили в течении недели учетом количества КОЕ на агаризованном варианте среды. Результаты (КОЕ/мл) представлены в таблице:

pH (28°C)			Температура (pH 7)				
6	7	8	10	15	24	28	37
97,5±7,5	102±7,5	92,5±7,5	20±10	35±5	72,5±7,5	102,5±7,5	85±10

Экспериментальная проверка показала, что штамм *T. plumbiphilus* AAFK, как и типовой штамм, является нейтрофилом, мезофиллом, способен окислять тиосульфат до сульфата. Вместе с этим у нашего штамма впервые обнаружена способность выдерживать высокие концентрации мышьяка (2 г Na₃AsO₃×H₂O/л). Более того, присутствие арсенита в среде увеличивало количество КОЕ по сравнению с ростом только на тиосульфате: 145±15 и 102,5±7,5 КОЕ/мл соответственно. Впервые проведенный нами анализ генома для этого вида показал присутствие генов, отвечающих за преобразование соединений мышьяка.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-00380, <https://rscf.ru/project/23-24-00380/>

ПОЛУЧЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ НАНОАНТИТЕЛ
К ПРОСТАТ-СПЕЦИФИЧЕСКОМУ МЕМБРАННОМУ АНТИГЕНУ
В БАКТЕРИАЛЬНОЙ СИСТЕМЕ ЭКСПРЕССИИ

Шевченко А.С., Перцева А.С., Несговорова Н.А.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего
образования «Национальный исследовательский университет ИТМО»,
Санкт-Петербург, Россия

andrei.s.shevchenko@yandex.ru

Рак предстательной железы занимает второе место по распространенности среди злокачественных опухолей, поражающих мужчин во всем мире. В качестве основы для тераностических агентов таких раковых опухолей могут использоваться наноантитела, нацеленные на простат-специфический мембранный антиген (ПСМА). Гетерологичная экспрессия в клетках *Escherichia coli* является наиболее эффективным и экономически выгодным методом получения наноантител. Препятствием для использования *E. coli* в качестве продуцента терапевтических белков является наличие на её внешней мембране липополисахарида (ЛПС) – эндотоксина, вызывающего мощную воспалительную реакцию при попадании в организм млекопитающих, в том числе человека. На данный момент не описано ни одной методики, которая позволила бы полностью избавиться от примесей бактериальных эндотоксинов на этапе очистки. Для решения данной проблемы нами был разработан штамм *E. coli* с модифицированной клеточной мембраной, обеспечивающий экспрессию наноантител к ПСМА без эндотоксина. Однако наноантитела экспрессировались в неактивной нерастворимой форме, поскольку цитоплазма *E. coli* является неблагоприятной средой для формирования дисульфидных связей, играющих важную роль в фолдинге антител. Решением этой проблемы является дополнительная генетическая модификация штамма, способствующая образованию функционального белка в растворимой форме при его цитоплазматической экспрессии.

Правильному фолдингу целевого белка в цитоплазме может способствовать его коэкспрессия с ферментами, облегчающими образование дисульфидных связей. В ходе данного исследования была проведена трансформация разработанного ранее штамма плазмидным вектором, кодирующим тиоловую оксидазу Ery1p и дисульфид-изомеразу hPDI. Также было осуществлено культивирование полученного штамма для наработки наноантител к ПСМА с последующей оценкой экспрессии и растворимости целевого рекомбинантного белка. Полученные результаты свидетельствуют об эффективности предложенного метода для получения наноантител в растворимой форме.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов была осуществлена оптимизация экспрессии наноантител к ПСМА в ранее разработанном штамме *Escherichia coli*, свободном от эндотоксинов. Полученные наноантитела в дальнейшем могут быть использованы при разработке радиофармпрепарата для диагностики и лечения рака предстательной железы.

ПЕРВИЧНАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ,
СИНТЕЗИРУЕМЫХ БАЙКАЛЬСКИМ ОКСИФИЛЬНЫМ ШТАММОМ
JANTHINOBACTERIUM, НА СПЕРМАТОЗОИДЫ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

**Шелковникова В.Н., Дмитриева М.Е., Малыгина Е.В., Моргунова М.М.,
Власова А.А., Баталова А.А., Аксёнов-Грибанов Д.В.**

Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

shelkovnikova551@gmail.com

Окислительный стресс является одной из основных причин нарушения репродуктивной функции. Всемирная организация здравоохранения определяет бесплодие как неспособность зачать ребенка после 12 месяцев незащищенного полового акта. Мужской фактор является причиной 30-50% случаев отсутствия наступления беременности. Однако, несмотря на существенное развитие вспомогательных репродуктивных технологий, методы лечения бесплодия являются малоэффективными. В связи с этим возникает необходимость поиска природных соединений, которые могут выступить прототипами действующих веществ при разработке новых лекарственных препаратов.

Озеро Байкал является перспективным местом для поиска новых биологически активных соединений. Озеро характеризуется специфическими условиями среды, в том числе низкой температурой воды и высоким содержанием растворенного кислорода во всей толще воды. Таким образом, байкальские организмы обитают в условиях повышенного окислительного фона. Поэтому было предположено, что в таких условиях сформировались уникальные оксифильные микроорганизмы, имеющие механизмы защиты от окислительного стресса путем синтеза антиоксидантов. Целью данного исследования являлся анализ влияния экстракта байкальского оксифильного штамма *Janthinobacterium* sp. 2021M8, обладающего антиоксидантной активностью, на сперматозоиды *in vitro*.

Оценку влияния экстракта на сперматозоиды проводили с использованием микроскопа PLS-MY-B041A-3, программного обеспечения «Semen and sperm quality analyze system» (V1.12) и 96 луночного планшета с оптически прозрачным дном. Для контрольных условий в планшет наносили метанол и высушивали до полного испарения. К испарившемуся метанолу добавляли эякулят. Экспериментальные образцы были разделены на 2 группы. Для 1 группы использовали концентрированный метанольный экстракт штамма. Для 2 группы концентрированный экстракт был разбавлен метанолом в 10 раз. Также был проведен анализ влияния фракций экстракта штамма *Janthinobacterium* sp. 2021M8 на физиологические параметры сперматозоидов. Фракционирование проводили на хроматографической колонке, заполненной сефадексом LH-20. Измерение физиологических параметров сперматозоидов проводили после 1, 3 и 6 часов инкубации при 37°C по протоколам руководства ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека (5-ое издание). Анализ проводили в 3 аналитических повторностях.

Согласно полученным результатам, концентрированный экстракт штамма вызывал гибель сперматозоидов после 3 часов экспозиции. Однако, сперматозоиды сохраняли свою жизнеспособности спустя 6 часов экспозиции при воздействии разбавленного экстракта. При этом в контрольных условиях спустя 6 часов эксперимента наблюдали гибель сперматозоидов. Фракционирование экстракта штамма *Janthinobacterium* 2021M8 выявило, что не менее половины полученных фракций обладают спермицидным эффектом. В то же время, некоторые протестированные фракции обладали эффектом, способствующим повышению числа подвижных форм и скорости сперматозоидов.

Таким образом, полученные материалы могут способствовать разработке препаратов, направленных на повышение активности сперматозоидов и увеличение продолжительности их жизни.

Работа выполнена при финансовой поддержке проекта Минобрнауки России FZZE-2024-0003.

ОЧИСТКА ПРЕПАРАТА СЕКРЕТИРУЕМОЙ ХИТИНАЗЫ ИЗ РЕКОМБИНАНТНОГО ПРОДУЦЕНТА НА ОСНОВЕ *B. SUBTILIS* WB800n

Шорохова И.А.^{1,2}, Копосова О.Н.¹, Шадрин А.М.¹

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

²Пушкинский филиал федерального государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего образования «Российский биотехнологический университет
(РОСБИОТЕХ)», Пушкино, Россия

impia2807@gmail.com

Универсальные методики выделения ДНК часто подразумевают механическое разрушение клеток штамма-продуцента, приводящее к разрыву цепи ДНК. Длинные фрагменты ДНК позволяют максимально детально описать прошедшие генетические модификации. Помимо контроля генетических модификаций штамма (локусов интеграции экспрессионных конструкций, множественности их вставки и т.д.) полногеномное секвенирование позволяет вносить ясность в процедуру их патентования.

В качестве альтернативы механическому способу разрушения клеточных стенок можно использовать комбинированные ферментные препараты.

Использование энзиматического метода при полногеномном секвенировании *de novo*, позволяет получить высококачественные препараты, содержащие длинные молекулы ДНК. Это дает возможность проводить гибридную сборку полных геномов до хромосом, эписом и плазмид. В случае, когда клеточная стенка микроорганизма содержит хитин оптимально использовать комбинированный ферментный препарат, в составе которого присутствует хитиназа. Хитиназы представляют собой ферменты, катализирующие деградацию хитина путем гидролиза β -(1 → 4)-гликозидных связей.

Целью работы было оптимизировать продукцию экспрессии гена хитиназы рекомбинантного штамма-продуцента *B. subtilis* WB800n – *B. thuringiensis* с помощью перебора ряда условий культивирования.

Система экспрессии представляет собой плазмиду pPT7 – аналог pET.

Из литературных данных известно, что данная хитиназа имеет каталитическую активность в диапазоне рН от слабокислой до нейтральной, температурный оптимум +50–60°C.

Выращивание продуцента производили на питательных средах Luria-Bertani (LB), Terrific Broth (ТВ) и минимальной среде М9. Культивировали при +37°C со скоростью перемешивания 150 об/мин, индукцию белка производили при оптической плотности культуры 0.4-0.8 при различных температурных режимах: +18°C, +22°C, +27°C, +32°C и +37°C 0.5% раствором ксилитозы. Седиментацию белка осуществляли 25% PEG-6000 и PEG-8000. Очистку целевого белка проводили с помощью металл-хелатной хроматографии до гомогенного препарата высокой степени чистоты. Ферментативную активность измеряли по изменению оптической плотности 10%-раствора коллоидного хитина в течение 12 часов при +37°C.

Методом sdsPAGE показано, что хитиназа секретируется в культуральную жидкость. Наибольший выход белка удалось достичь на среде ТВ при +32°C. Осаждение белка PEG-8000 эффективнее, чем осаждение хитиназы PEG-6000 в 2,6 раза. Измерение активности фермента показало уменьшение оптической плотности в 2 раза по сравнению с контролем.

СОЗДАНИЕ ЭФФЕКТИВНЫХ БИОПЕСТИЦИДОВ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БАКУЛОВИРУСОВ И ИХ ПЕРВИЧНОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ С ПОМОЩЬЮ ЭКСПРЕССИИ В КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЕ НАСЕКОМЫХ

Шухалова А.Г.^{1,2}, Тимофеев С.А.¹, Сендерский И.В.¹, Долгих В.В.¹

¹Федеральное Государственное Бюджетное Научное Учреждение Всероссийский институт защиты растений, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия

²Ленинградский государственный университет имени А.С. Пушкина, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия

nastyadzh@mail.ru

Повсеместно используемые в сельском хозяйстве химически полученные пестициды могут оказывать неблагоприятное воздействие на окружающую среду и здоровье человека. В качестве альтернативы могут применяться биопестициды, не имеющие столь существенных побочных эффектов. Одним из перспективных направлений в биологической защите растений является использование естественных врагов насекомых вредителей, например вирусов. Главным недостатком этого метода является относительно низкая скорость воздействия пестицида на насекомых, что может быть отчасти решено увеличением вирулентности используемых вирусов, в том числе за счет их генетической модификации. Например, рекомбинантный вирус может заставить клетки насекомого синтезировать какую-либо чужеродную и токсичную для насекомых молекулу, что приведет к гибели зараженной особи гораздо раньше, чем при обычной вирусной инфекции.

Сельскохозяйственный вредитель кукурузная листовая совка (*Spodoptera frugiperda*) наносит значительный ущерб таким хозяйственным растениям, как кукуруза, рис и картофель. Однако именно из этого представителя чешуекрылых насекомых была выделена культура клеток Sf21, из которой в дальнейшем была получена линия Sf9 – повсеместно используемая для продукции различных белков с помощью бакуловирусной экспрессии. Так как в этом процессе клеточная культура заражается рекомбинантным вирусом множественного ядерного полиэдроза *Autographa californica* (AcMNPV), несущим последовательность, кодирующую синтезируемый белок, данную модель возможно использовать для изучения различных токсинов, перспективных для создания на их основе рекомбинантных вирусных пестицидов. В данной работе с помощью данной системы мы изучили 2 нейротоксина из яда осы-наездника *Habrobracon hebetor* с молекулярной массой 30 кДа (Т30) и 16 кДа (Т16). Ранее их пагубное действие на личинки чешуекрылых при инъекции в гемолимфу было описано в ряде патентов, срок защиты авторского права в которых к настоящему времени истек. Оба этих белка были синтезированы в бактериях *E. coli*, к рекомбинантным продуктам получены антитела, что позволило детектировать молекулы в других системах. Далее данные молекулы были синтезированы в клеточной культуре Sf9 с помощью системы бакуловирусной экспрессии Vac-to-Vac™, после чего клетки насекомых разрушали, отделяя растворимую и нерастворимую белковую фракцию, а также культуральную среду, в которой проводили экспрессию. Данные пробы анализировали с помощью иммуноблотинга с применением ранее полученных антител к токсинам. В результате было показано, что из двух молекул только Т30 синтезировался зараженными вирусом клетками в растворимой форме и секретировался ими во внешнюю среду. Таким образом, если заразить подобным вирусом уже самого насекомого вредителя – его клетки также будут синтезировать токсин в активной форме и секретировать его в гемолимфу, где белок воздействует на нервную систему насекомого, приводя к его парализации и гибели. На данный момент проводятся эксперименты по заражению гусениц для определения оптимальных условий использования инсектицида и его эффективности.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант № 23-26-00039.

Секция 4

ФИЗИОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ И БИОМЕДИЦИНА

ИЗУЧЕНИЕ ПСИХОФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ НООГЛЮТИЛА

Абдуллина А.А., Васильева Е.В., Фирстова Ю.Ю.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Россия

abdullina_aa@academpharm.ru

Большое число психотропных лекарственных средств помимо своей основной активности проявляет и другие. Ноотропные вещества, наряду со способностью улучшать мнестические функции, могут проявлять анксиолитический, седативный, противосудорожный или антидепрессивный эффекты. Нооглютил (N-(5-окси никотиноил)-L-глутаминовой кислоты) – ноотропное средство и нейропротектор, стимулирующий пластические и энергетические функции нейронов, агонист глутаматных AMPA-рецепторов (Фирстова, 2011). Так как AMPA-рецепторы играют важную роль в механизме реализации антидепрессивного эффекта конвенциональных и быстродействующих антидепрессантов (Witkin, 2024), можно предполагать наличие у нооглютила и антидепрессивной активности.

Целью настоящей работы стало изучение компонентов фармакологического действия нооглютила – ноотропного, анксиолитического и антидепрессивноподобного эффектов на мышцах BALB/c при одно- и двухнедельном внутрибрюшинном введении в дозе 50 мг/кг.

Материалы и методы. Исследования проводили на самцах мышей линии BALB/c массой 25-30 г. Нооглютил, растворенный в физрастворе, в дозе 50 мг/кг вводили внутрибрюшинно один раз в сутки в течение одной и двух недель, контрольной группе вводили физраствор, затем поведение мышей исследовали в закрытом крестообразном лабиринте (ЗКЛ) (Салимов, 1988) или в тесте Порсолта.

Результаты. У мышей BALB/c в тесте «Закрытый крестообразный лабиринт» (ЗКЛ) под влиянием однедельного введения нооглютила в дозе 50 мг/кг улучшились два параметра, отражающих ноотропное действие – снизился показатель величины 1-го цикла патрулирования (F_PatrN) на 22% и увеличилось число циклов патрулирования (PatrN) также на 22% (Т-тест, $p < 0.05$). Показатели анксиолитической и двигательной активностей в тесте ЗКЛ оставались неизменными. В тесте Порсолта после двухнедельного введения нооглютила в дозе 50 мг/кг поведение животных не отличалось от параметров контрольной группы.

Выводы. 1. Однедельное введение нооглютила в дозе 50 мг/кг улучшает исследовательскую активность и не влияет на двигательную активность и тревожность мышей линий BALB/c в тесте ЗКЛ. 2. Двухнедельное введение нооглютила в дозе 50 мг/кг мышам BALB/c не снижает продолжительность иммобилизации в тесте Порсолта. 3. Нооглютил действует исключительно на когнитивные функции и не обладает ни анксиолитической, ни антидепрессивноподобной активностью.

АНАЛИЗ РОЛИ БЕЛКА IRBIT, МОДУЛЯТОРА IP₃R1, В АГОНИСТ-ИНДУЦИРОВАННОЙ Ca²⁺-СИГНАЛИЗАЦИИ В КЛЕТКАХ IP₃R1-НЕК

Алёхина М.С., Копылова Е.Е., Рогачевская О.А.

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

mariaalekhina14@yandex.ru

Многие клеточные функции регулируются внутриклеточными Ca²⁺-сигналами, которые инициируются при связывании различных агонистов с мембранными рецепторами, включая гептаспиральные (G-protein coupled receptors, GPCR) рецепторы. Активированные GPCR рецепторы стимулируют G-белки и G-белок-активируемые изоформы фосфолипазы C, которая гидролизует сигнальный липид PIP₂, продуцируя два вторичных медиатора IP₃ и DAG. В свою очередь, IP₃ инициирует выброс Ca²⁺ из эндоплазматического ретикулума (ЭР), стимулируя IP₃-рецепторы. Последние представляют собой внутриклеточные IP₃-активируемые Ca²⁺-каналы, функционирующие преимущественно на мембране ЭР. В геноме позвоночных три гена кодируют субъединицы IP₃-рецепторов – IP₃R1, IP₃R2 и IP₃R3.

Ранее был идентифицирован IP₃R-связывающий белок – IRBIT, который модулирует активность IP₃-рецепторов, преимущественно IP₃R1, конкурируя с IP₃ за сайт связывания. Нашими коллегами была проведена работа по созданию конструкций для направленного редактирования генов IP₃-рецепторов с использованием системы CRISPR/Cas9. В экспериментах использовалась линия клеток НЕК293, в которых были инактивированы гены IP₃R2 и IP₃R3. В итоге была получена моноклональная линия IP₃R1-НЕК, в клетках которой оставалась функциональной только одна изоформа IP₃R1. Для исследования роли IRBIT в функционировании IP₃R1 в этой линии был дополнительно инактивирован ген IRBIT. В результате была получена моноклональная линия клеток IP₃R1-ΔIRBIT-НЕК, которая затем использовалась в физиологических экспериментах.

С использованием Ca²⁺-зонда Fluo-8 и микрофотометрии был проведен сравнительный анализ агонист-индуцированной Ca²⁺-сигнализации в клетках линий IP₃R1-НЕК и IP₃R1-ΔIRBIT-НЕК. Ожидалось, что в отсутствие белка IRBIT, конкурирующего за связывание IP₃, активность IP₃R1 должна быть выше, что должно было бы приводить к повышению чувствительности клеток IP₃R1-ΔIRBIT-НЕК к Ca²⁺-мобилизирующим агонистам по сравнению с клетками IP₃R1-НЕК. Клетки стимулировались агонистом мускариновых рецепторов ацетилхолином (ACh) в различных концентрациях. Поскольку клетки отвечали на агонист по принципу «всё или ничего», кривые доза-ответ генерировались как количество клеток, отвечающих на ACh при данной концентрации. Полученные кривые доза-ответ однозначно свидетельствовали о том, что клетки IP₃R1-ΔIRBIT-НЕК были более чувствительны к ACh, чем клетки IP₃R1-НЕК. Данный неожиданный результат свидетельствует о том, что IRBIT является не только антагонистом IP₃R1, но и регулятором каких-то процессов, определяющих эффективность каскада трансдукции ACh.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 22-14-00031.

СЕРТОНИНЕРГИЧЕСКАЯ СИСТЕМА В ЯИЧНИКЕ КАК МИШЕНЬ ДЕЙСТВИЯ АНТИДЕПРЕССАНТОВ

Алёшина Н.М.¹, Никишин Д.А.^{1,2}

¹ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН»,
Москва, Россия

²МГУ им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра Эмбриологии,
Москва, Россия

Депрессия является самым распространенным психическим заболеванием в мире (5% населения по данным ВОЗ), при этом женщины подвергаются этому заболеванию вдвое чаще мужчин. Препараты, используемые при медикаментозном лечении депрессии, способны изменять содержание нейротрансмиттеров, в частности, серотонина, в клетках и тканях организма. Среди этих антидепрессантов самыми распространенными являются селективные ингибиторы обратного захвата серотонина (СИОЗС), ингибирующие мембранный транспортер серотонина Sert (Slc6a4). Мы обнаружили, что системное введение самого популярного СИОЗС, флуоксетина (20 мг/кг), снижает содержание серотонина в крови (на 96%), тканях яичника и ооцитах, где показано стимулирующее действие этого нейрогормона. Так как серотонин способен влиять на функцию яичника, целью работы было изучение локализации компонентов серотонинергической системы и их механизмов их работы в яичнике.

Мы продемонстрировали, что в яичниках экспрессируется мРНК всех компонентов серотонинергической системы: ферментов синтеза, переносчиков и рецепторов. Функциональные эксперименты показали, что именно мембранный транспорт из внеклеточной среды (из кровяного русла) с помощью Sert является единственным источником серотонина в овариальных фолликулах. Клетки гранулезы в фолликулах способны активно накапливать серотонин с помощью Sert, а затем метаболизировать его благодаря активности моноаминоксидазы. Мы показали, что такая система формирует локальный «функциональный барьер» для серотонина в яичнике на ранних этапах фолликулогенеза.

В рамках работы также изучались прямые эффекты серотонина и флуоксетина на функцию яичника. При культивировании овариальных фолликулов в присутствии серотонина (1 мкМ) в клетках гранулезы повышается экспрессия генов-маркеров, отвечающих за дифференцировку в состояние кумулюса, а в ооцитах — одного из важнейших регуляторов фолликулогенеза (Gdf9). Наблюдаемые эффекты отменяются флуоксетином и обусловлены активностью Sert. При системном введении флуоксетина снижается экспрессия ряда генов-маркеров функционального состояния яичника: ооцитарных факторов роста, рецепторов к гонадотропинам, отвечающих за экспансию кумулюса и стероидогенез.

Полученные результаты говорят о том, что клетки яичника, ооциты и клетки гранулезы, являются потенциальными мишенями антидепрессантов СИОЗС. Таким образом, прием СИОЗС может негативно отражаться на процессах фолликулогенеза и созревания ооцитов, а механизмы, лежащие в основе этих эффектов, требуют дальнейшего изучения.

Работа выполнена в рамках Государственного задания № 0088-2021-0009 при поддержке гранта РФФИ №22-74-10009.

**АНАЛИЗ АКТИВАЦИИ МЕХАНИЗМА АУТОФАГИИ В ТКАНИ МОЗГА КРЫС,
ПЕРЕНЕСШИХ ПРЕНАТАЛЬНУЮ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИЮ**

Алов А.В.¹, Туманова Н.Л.², Михель А.В.², Васильев Д.С.²

¹Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург, Россия

²Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия

Пренатальная гипергомоцистеинемия (пГГЦ) – состояние организма при повышенном уровне содержания в тканях токсичной аминокислоты гомоцистеина, которая способна вызывать нарушение развития головного мозга, сопровождающееся гибелью нейронов в постнатальном онтогенезе. В коре и гиппокампе мозга потомства крыс, подвергшихся действию экспериментально вызванной пренатальной ГГЦ (пГГЦ), в период с 4 дня беременности до родоразрешения, в лаборатории ранее были выявлены признаки отставания в развитии и нейродегенеративных изменений (Shcherbitskaia et al., 2020; Shcherbitskaia et al., 2021). Однако молекулярные механизмы клеточной гибели, задействованные в развитии этого патологического состояния, слабо изучены. Так, не известна роль механизма аутофагии в гибели клеток мозга эмбриона при пГГЦ.

Нами была исследована возможность активации механизмов аутофагии в эмбриональном и постнатальном периодах онтогенеза пГГЦ крыс. пГГЦ создавали путём перорального введения беременным самкам 0,15%-го водного раствора L-метионина ежедневно, начиная с четвертого дня после оплодотворения и до родоразрешения. Ткань коры и гиппокамп мозга потомства анализировали с использованием электронной микроскопии и иммунохимического метода. С целью проверки образования аутофагосом в плаценте и мозге плода при ГГЦ была изучена локализация белков аутофагосом (LC3B-II) и лизосом (Lamp2).

Обнаружено появление большого количества аутофагосом в теменной коре пГГЦ потомства на P5-P20, что позволяет предположить активацию процессов аутофагии и в мозге плодов позднего пренатального периода. Флуоресцентный сигнал, соответствовавший Lamp-2, локализовался в виде флуоресцирующих точек во всём объёме цитоплазмы большинства клеток как в мозгу эмбриона, так и в ткани плаценты, что соответствует естественному распределению этого белка в цитоплазме всех клеток в норме. Флуоресцентный сигнал LC3B-II выявлялся в одиночных клетках плаценты и мозга пГГЦ эмбрионов. В пГГЦ группе клетки с сигналом LC3B-II встречались чаще, чем в контроле. При помощи набора Duolink® Proximity Ligation Assay была доказана колокализация сигналов маркерных белков LC3B-II и Lamp-2. Наличие колокализации этих белков указывает на возможность развития аутофагии в отдельных клетках ткани мозга плода и плаценты пГГЦ группы. В совокупности с наблюдениями аутофагосом на электронограммах мозга пГГЦ плодов, можно предположить активацию гибели одиночных клеток по механизму аутофагии, вызванной действием гомоцистеина.

Поддержано Российским научным фондом (№22-15-00393).

МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ ГАЗОМЕДИАТОРОВ НА АКТИВНОСТЬ АФФЕРЕНТОВ ТРОЙНИЧНОГО НЕРВА КРЫСЫ

Ананьев А.С., Свитко С.О., Шайдуллова К.С., Ситдикова Г.Ф.

Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия

anton990124@mail.ru

Мигрень – это распространенное неврологическое заболевание, характеризующееся повторяющимися приступами интенсивной головной боли с тошнотой, свето-и звукобоязнью. В течение многих десятилетий оксид азота (II) (NO), монооксид углерода (CO) и сероводород (H₂S) описывались как газы, оказывающие повреждающие эффекты на организм человека. Но было обнаружено, что NO, CO и H₂S эндогенно синтезируются и являются сигнальными молекулами, участвующими в том числе и в регуляции процессов ноцицепции. Таким образом, целью работы является исследование влияния газомедиаторов (NO, H₂S, CO) на активность афферентов тройничного нерва крысы.

С помощью электрофизиологического метода регистрации электрической активности афферентов тройничного нерва на препарате полочерепа крысы были получены следующие результаты. Было показано, что донор сероводорода – гидросульфид натрия (NaHS 100 мкМ) проявлял как про- (за счет активации TRPV1 рецепторов), так и анти-ноцицептивные свойства (за счет снижения активности P2X3 рецепторов в афферентах тройничного нерва и нейронах тройничного ганглия). Для изучения влияния монооксида углерода применялся раствор, аэрированный угарным газом, а также донор угарного газа CORM II. CO вызывает увеличение частоты потенциалов действия (ПД) в афферентах тройничного нерва крысы. Исследование про-ноцицептивного действия CO показало связь с активацией гуанилатциклазы, что согласуется с литературными данными. Интересно, что CO, также как и H₂S, угнетает АТФ-вызванную про-ноцицептивную активность, тогда как на фоне CO наблюдалось увеличение времени активности TRPV1 рецепторов. И этот эффект предотвращался блокатором аденилатциклазы, MDL. Таким образом, цАМФ-зависимые пути принимают опосредованное участие в про-ноцицептивном действии капсаицина. Исследование механизмов влияния NO в системе тройничного нерва показало, что как экзогенный, так и эндогенный NO оказывают про-ноцицептивный эффект, при этом эффект L-аргинина осуществляется при помощи нейрональной NOS. Одним из механизмов является активация цГМФ-зависимого пути. В отличие от H₂S и CO, эффекты NO не влияют на про-ноцицептивный эффект АТФ. Однако было показано, что NO положительно модулирует активность TRPV1 рецепторов путем S-нитрозилирования.

Таким образом, полученные данные вносят вклад в рассмотрение фундаментальных механизмов формирования болевого сигнала и могут быть использованы для поиска новых методов лечения и профилактики мигрени.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ № 20-15-00100.

ВЛИЯНИЕ КИШЕЧНОГО МИКРОБИОМА НА ФУНКЦИОНАЛЬНОСТЬ СЕМЕННИКОВ МЫШЕЙ В РАЗЛИЧНЫХ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ НА ФОНЕ ИНДУЦИРОВАННЫХ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ

Бабенкова П.И.¹, Гуреев А.П.^{1,2}, Сыромятников М.Ю.^{1,2}

¹Кафедра генетики, цитологии и биоинженерии, Воронежский государственный университет,
Воронеж, Россия

²Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

ms.babenkova@gmail.com

Клеточная стенка грамотрицательных бактерий, входящих в состав микрофлоры кишечника, является источником липополисахарида (ЛПС), который постоянно присутствует в системном кровотоке и в нормальных условиях эффективно нейтрализуется. ЛПС является одним из наиболее мощных естественных индукторов воспаления с его действием на организм связывают все объективные клинические проявления интоксикации, также исследования говорят о возрастании уровня окислительного стресса при повышении количества ЛПС. Сравнительно с изучением изменений нервной системы в меньшей степени внимание в исследованиях уделяется изменениям в репродуктивных органах. Учитывая, что многие исследования, посвященные оси «кишечник-мозг», подтвердили, что микробиота кишечника влияет на функции и активность мозга, а также что гипоталамо-гипофизарно-тестикулярная (ГПТ) ось рассматривается как классический нейронный регуляторный путь в процессе стероидогенеза. Аналогично путь «кишечник-микробиота-семенники» может быть вовлечен в регуляцию работы семенников. В своей работе мы предполагали положительное воздействие диеты с пробиотиками на митохондриальные функции семенников мышей самцов мышей, подвергшихся инъекциям ЛПС, благодаря снижению уровня системного воспаления и окислительного стресса при восстановлении микробиоты кишечника.

В ходе работы было показано, что экспрессия генов *Lepr* и *Amh* в семенниках, ответственных за гормональную регуляцию сперматогенеза, снижается в группе мышей, получавших инъекции ЛПС, однако в группах особей, принимавших пробиотики экспрессия группы данных генов выше, что подтверждает положительное влияние диеты на ось «кишечник-микробиота-семенники». Экспрессия генов антиоксидантов *Sod2*, *Txnrd2*, *Ptgs3*, *Gclc*, *Nfe2l2* (*Nrf2*) в группе ЛПС в ходе исследования оказалась сниженной в сравнении с контрольной группой, но в группах мышей, принимавших пробиотики экспрессия антиоксидантов возросла, что говорит о способности диеты снижать окислительный стресс на фоне индуцированных воспалительных процессов за счет активации Nrf2-зависимого пути. Nrf2 регулирует экспрессию генов, содержащих в своих промоторах антиоксидант-респонсивный элемент ARE. Он контролирует больше 500 генов, среди которых можно выделить две большие группы антиоксидантных ферментов и ферментов II фазы детоксикации ксенобиотиков. В клетке Nrf2 находится под постоянным контролем репрессорного белка Keap1, который является своеобразным молекулярным сенсором изменения внутриклеточного редокс-баланса. Главным значением редокс-чувствительной сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE является поддержание внутреннего гомеостаза при апоптоз-индуцирующих и стрессовых воздействиях. Таким образом, наше исследование говорит о пользе диеты, содержащей пробиотики, при восстановлении мужской репродуктивной системы после возникновения системного воспаления.

Работа поддержана Министерством науки и высшего образования в рамках нацпроекта «Наука и университеты» (проект FZGW-2024-0003).

ЗАКОНОМЕРНОСТИ МЕТАБОЛИЗМА РАДИОАКТИВНЫХ ИЗОТОПОВ ЙОДА У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Басова М.А., Снегирёв А.С., Козьмин Г.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Обнинск, Россия

maribasova97@mail.ru

Острый период радиационных аварий реакторного типа сопровождается загрязнением окружающей среды радиоактивными изотопами йода, которые являются источником внутреннего облучения сельскохозяйственных животных и населения (Алексахин и др., 2001). Степень радиационного воздействия радиойода существенно зависит от содержания в окружающей среде стабильного изотопа йода ^{127}I – эссенциального для животных микроэлемента (Долгушин и др., 2021). Различные уровни содержания стабильного йода оказывают влияние на гомеостаз щитовидной железы и кинетику метаболизма радиоактивных изотопов йода. В условиях йододефицита, характерного для большей части территории Российской Федерации, накопление радиоактивного йода в щитовидной железе дойных коров может быть до 10 раз выше, чем при нормальном уровне содержания стабильного йода в рационе (Бударков и др., 2017). При высоком уровне содержания стабильного йода в рационе (более 50 мг/сут) происходит резкое снижение накопления радиойода. Это обусловлено несколькими факторами: эффект Вольфа-Чайкова – блокировка органификации и образования гормонов щитовидной железы при избытке йода в организме (Шеремета и др., 2021); stunning effect – ингибирование кинетики метаболизма йода за счёт радиационного подавления экспрессии натрий-йодного симпортера, наблюдающееся при дозах $\sim 0,2 - 0,5$ Гр (Lundh et al, 2009).

Анализ закономерностей метаболизма радиоактивных изотопов йода у дойных коров проводили с использованием разработанной нами математической камерной модели, учитывающей рециклинг йода в системе «циркулирующая кровь – ЖКТ – циркулирующая кровь» (Miller et al, 1974) и влияние стабильного йода в рационе на кинетику накопления радиойода щитовидной железой животных. Исходными экспериментальными данными для построения математической модели явились, к сожалению, весьма малочисленные публикации, характеризующие закономерности накопления радиойода в щитовидной железе крупного рогатого скота в балансовых экспериментах (Сироткин и др., 1972, Miller et al, 1974, Буров, Антипова, 1989).

Расчеты выполняли на основе решения системы дифференциальных уравнений, соответствующих структуре принятой камерной модели, в виде конечно-разностных уравнений с применением численных методов Рунге-Кутты четвертого порядка (Вельмисов, 2016) многофункциональной интерактивной вычислительной системы РТС Mathcad Prime. Критериями адекватности математического моделирования экспериментально установленных зависимостей являлось достижение максимальных значений коэффициента детерминации ($R^2 \geq 0,75$) и минимальных значений коэффициента несовпадения Тейла (U) (Одейчук, 2009) в любом из рассматриваемых интервалов времени и во всех камерах модели одновременно. Выполнено моделирование сценариев и проведена оценка эффективности йодной профилактики дойным коровам при превентивном применении подкормок в виде KI, непосредственно в период радиоактивных выпадений и после радиоактивного загрязнения пастбищ.

Математическую модель предполагается использовать в цифровых технологиях поддержки принятия решений в животноводстве в острый период аварий реакторного типа.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ АНТИОКСИДАНТА АСТАКСАНТИНА НА
ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКУЮ И МЕТАБОЛИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ МОЗГА И
СЕРДЦА У КРЫС В ЛИТИЙ-ПИЛОКАРПИНОВОЙ МОДЕЛИ ЭПИЛЕПСИИ

Бельтюкова А.В.¹, Котихина Е.Е.¹, Мальков А.Е.², Лебедева А.В.¹

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

²ИТЭБ РАН, Пушино, Россия

beltyukovann.anna@gmail.com

Эпилептический статус (ЭС) обусловлен гиперсинхронной активацией нейронов. В отсутствие лечения может привести к серьезному повреждению головного мозга, нарушениям ритма сердечных сокращений. Применение противоэпилептических препаратов является наиболее эффективной превентивной мерой в отношении синдрома внезапной смерти при эпилепсии, которые могут оказывать проаритмогенное действие. В условиях невозможности отказа от терапии противоэпилептическими препаратами антиоксиданты могут стать дополнительной медикаментозной терапией.

Цель работы: изучить электрофизиологические свойства активности мозга и сердца на разных уровнях организации жизни, установить возможность нейро- и кардиопротекторного действия антиоксидантов в литий-пилокарпиновой модели эпилепсии у крыс.

Объектом исследования являются две группы самцов крыс линии Wistar возрастом 2 месяца: контрольные и «эпилептики» (воспроизведение ЭС с помощью литий-пилокарпиновой модели). В работе использовались методы: хронической регистрации нейрональной активности области СА1 гиппокампа *in vivo*; регистрации ВПСП в срезах гиппокампа *in vitro*; регистрации метаболизма глюкозы в срезах гиппокампа *in vitro*; мультиэлектродной регистрации электрической активности миокарда изолированного сердца.

Выводы. Были получены паттерны активности (полевые возбуждающие постсинаптические потенциалы) в срезах гиппокампа крыс в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. По предварительным результатам в эксперименте *in vitro* в срезах контрольного животного наблюдается потенциация ВПСП после ТБС, в срезах группы с эпилептиформной активностью потенциация не выражена.

По предварительным результатам выявлено, что частота сердечных сокращений и время задержки волны возбуждения миокарда в контрольной группе выше, чем крыс с эпилептиформной активностью. В первую минуту после введения адреналина электрическая проводимость миокарда в обеих группах снижается, но позже стабилизируется. Динамика изменений ОКК в обеих группах схожа.

При оценке метаболизма глюкозы в срезах гиппокампа крыс при разной частоте стимуляции были выявлены критические частоты активации в тета диапазоне с максимальным гликолитическим компонентом соответствующий максимальной активации нейронов СА1, при этом гликолитический НАДН непосредственно в ответах на стимуляцию не участвует. Оптимальные значения на тета частоте 8-10Гц, т.е. в таком режиме стимуляции мозгу не грозит энергодефицит при максимальной производительности. Предполагается, что у эпилептиков будет выявлено снижение гликолитического компонента.

Работа поддержана Минобрнауки (Соглашение FSWR-2024-0005).

СВЯЗЬ ГЕПАТОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТИ КСИМЕДОНА С ВОЗДЕЙСТВИЕМ НА P2Y ИЛИ β -АДРЕНОРЕЦЕПТОРЫ

**Беляев Г.П., Парфенов А.А., Выштакалюк А.Б., Ленина О.А., Шашин М.С.,
Галяметдинова И.В., Семенов В.Э., Зобов В.В.**

Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова – обособленное структурное
подразделение ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия

gregoir4@gmail.com

Несмотря на развитие медицины, заболевания печени остаются важной проблемой для системы здравоохранения. Тем не менее, производные пиримидина являются перспективными химическими агентами для использования в качестве гепатопротекторов. Производное пиримидина Ксимедон (1,2-дигидро-4,6-диметил-1-N-(2-гидроксиэтил) пиримидин-2-он) является российским лекарственным препаратом, стимулятором регенерации тканей. Также для него выявлены гепатопротекторные свойства. Однако механизм гепатопротекторного и других свойств Ксимедона не до конца ясен. Есть данные об изменении активности аденилатциклазы под влиянием Ксимедона, что может наблюдаться при активации P2Y или адренорецепторов.

Целью настоящей работы было изучить влияние Ксимедона на β -адренорецепторы клеток на *ex vivo* модели изолированного кишечника и дать оценку возможной взаимосвязи гепатопротекторной активности Ксимедона с активацией этих рецепторов.

Методика. Влияние Ксимедона на рецепторы изучалось тензометрическим методом, на модели гладкомышечного препарата подвздошного отдела тонкого кишечника крысы линии Wistar *ex vivo*. Для проведения тензометрии использовали установку для изолированных органов Radnoti Tissue-Organ Bath (ADInstruments, США) с программным обеспечением LabChart. Также оценивали влияние Ксимедона на уровень глюкозы в крови крыс методом глюкометрии с помощью глюкометра Accu-Chek active (Roche, Германия). Кроме того, оценивали антитоксический эффект Ксимедона в дозе 100 мг/кг по выживаемости мышей линии ICR (CD-1) после отравления парацетамолом в полулетальной дозе 425 мг/кг.

Результаты. Было показано, что Ксимедон в концентрации 3.6×10^{-2} М аналогично адреналину в концентрации 10^{-5} М значительно снижал силу спонтанных и вызванных ацетилхолином (10^{-5} М) сокращений гладкой мускулатуры тонкого кишечника крысы *ex vivo*. Выявлено, что Ксимедон в дозе 75 мг/кг, подобно адреналину в дозе 1.5×10^{-3} мг/кг, значительно повышал уровень глюкозы в крови крыс в среднем на 30% относительно контрольной группы. Показано, что Ксимедон в дозе 100 мг/кг приводил к повышению на 20% продолжительности жизни мышей после отравления полулетальной дозой парацетамола и к улучшению состояния ткани печени на 5 сутки после отравления.

Закключение. Таким образом, в данной работе было показано, что Ксимедон приводит к миорелаксации гладкой мускулатуры кишечника, не связанной с воздействием на β -адренорецепторы. Ксимедон влияет на рецепторы клеток печени, запуская процессы гликогенолиза и повышая уровень глюкозы в крови крыс. Мы предполагаем, что гепатопротекторный эффект Ксимедона может быть связан с влиянием на P2Y рецепторы клеток печени, приводящим к изменениям процессов метаболизма клеток, что в свою очередь способствует более быстрой детоксикации ксенобиотиков и проявлению гепатопротекторного эффекта. Кроме того, было показано возможное новое применение Ксимедона в качестве антидотоподобного соединения при острых токсических отравлениях печени лекарственными средствами, такими как парацетамол. Таким образом, мы надеемся, что понимание механизма гепатопротекторного действия производного пиримидина Ксимедона поможет открыть новые перспективы для его использования или новых химических модификаций.

Данное исследование выполнено в рамках государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН.

IN VITRO МОДЕЛИРОВАНИЕ ОСТРОЙ ГИПОКСИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ АНТИГИПОКСАНТОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ ПРИ ТЕПЛОВОЙ ИШЕМИИ ПОЧКИ

Беляков Д.Ю.¹, Попов Д.Ю.¹, Никулин А.С.²

¹Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, Орел, Россия

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

elderly_fighter@vk.com

Тепловая ишемия, применяемая при проведении частичной нефрэктомии на ранних стадиях развития рака почки, позволяет существенно улучшить условия проведения операции, но приводит к острой кислородной недостаточности, а после восстановления кровообращения – к ещё более жёстким последствиям реоксигенации. Для снижения указанных отрицательных эффектов разрабатываются препараты с антигипоксическим эффектом, исследование которых требует использования адекватной модели гипоксии. Для этой цели могут быть использованы способы удаления кислорода из среды с помощью химических соединений, в частности дитионита натрия. Однако его достаточно высокая реакционная способность и, соответственно, низкая стабильность ставят вопросы об оптимальных концентрациях и времени, в течение которого данное соединение может обеспечивать необходимый уровень связывания кислорода. Немаловажным аспектом рассматриваемой задачи являются методы оценки изменений, происходящих в клетке в условиях недостатка кислорода. Для этой цели может быть использовано выявление развития клеточной гибели.

В целях моделирования гипоксии использовали раствор дитионита натрия с концентрацией 5 мМ, которая обеспечивает развитие признаков гипоксии, но не оказывает иного токсического влияния на клетки. Как следует из экспериментов с использованием датчика Кларка, ввиду невысокой стабильности кислородсвязывающая способность дитионита натрия ограничена по времени и в случае раствора с толщиной слоя 9 мм концентрация кислорода удерживается на уровне менее 1 % от максимальной растворимости в течение около 100 минут с последующим быстрым увеличением до значения, не позволяющего говорить о наличии гипоксии в системе. Для проведения более длительных экспериментов оптимальным решением может быть герметизация среды для предотвращения поступления кислорода.

Как показали исследования с применением клеточной линии эпителия почек MDCK, указанные модельные условия приводят к существенно большему снижению способности клеток к обеспечению энергопотребляющих процессов, чем это происходит в условиях полного блокирования гликолиза и окислительного фосфорилирования одновременно. Данные различия могут объясняться расходом АТФ на поддержание величины митохондриального мембранного потенциала за счет инверсного режима работы комплекса V дыхательной цепи, что находит отражение в деполяризации митохондрий под влиянием олигомицина А.

Исчерпание запасов АТФ приводит в конечном итоге к гибели клеток. Как показывает анализ с использованием Hoechst 33342 и йодида пропидия, развитие некроза нехарактерно для рассматриваемых модельных условий (доля окрашенных йодидом пропидия клеток не превышала 0,1% как в контрольной культуре, так и культуре, которую выдерживали в присутствии дитионита натрия в течение 3 ч). Однако длительная гипоксия приводит к значительным изменениям как морфологии ядер, так и интенсивности флуоресценции Hoechst 33342, которые могут рассматриваться в качестве признаков апоптоза.

На основе полученных данных можно сделать вывод о том, что описанный метод моделирования гипоксических условий с использованием раствора дитионита натрия и детектированием уровня некроза можно использовать для скрининговых исследований антигипоксантов при клеточных исследованиях.

Работа выполнена при поддержке гранта Правительства РФ № 075-15-2022-1095.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ДЕКОМПРЕССИОННОЙ БОЛЕЗНИ У КРЫС

Бервинова А.В.^{1,2}, Мурашев А.Н.^{1,2}, Амиров Р.Р.³, Павлов Н.Б.³

¹Пушчинский филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)», Пушино, Россия

²Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ФИБХ), Пушино, Россия

³Институт медико-биологических проблем РАН (ИМБП РАН), Москва, Россия

bervinova@bibch.ru

Декомпрессионная болезнь – возникает из-за слишком быстрого всплытия, когда азот из крови начинает выпадать в виде пузырей, что может привести к серьезным различным осложнениям, включая смерть.

Патогенез декомпрессионной болезни (ДКБ) связан с изменениями в растворенных газах в теле водолаза под действием различного давления на разных глубинах. Во время глубокого погружения под воду, давление увеличивается, что приводит к тому, что газы (основным из которых является азот) растворяются в крови и тканях под давлением. При слишком быстром всплытии, газы начинают выделяться из раствора в виде пузырей из-за снижения давления. Эти пузыри могут образовываться в крови, тканях и органах и вызывать повреждение сосудов, воспаление или блокировку кровотока. В результате патологических процессов, связанных с ДКБ, могут происходить повреждения нервной системы, легких, сердца, суставов и других органов. Симптомы могут включать изменения в центральной нервной системе (головная боль, изменения сознания), боли в суставах, кожные проявления и другие.

Для оценки патологических процессов ДКБ возникает необходимость создание модели с использованием лабораторных животных. Нами была смоделирована модель ДКБ с различной скоростью перехода на поверхность (15 м/мин, 10 м/мин, 8 м/мин). При скорости перехода на поверхность 15 м/мин симптомы декомпрессионной болезни наблюдались у всех животных, и в течение первого часа погибло 6 крыс из 6. При скорости перехода на поверхность 10 м/мин, симптомы декомпрессионной болезни наблюдали у 9 из 10 крыс, в течение 24 часов наблюдалась гибель 4 из 10 крыс. Для предотвращения гибели животных возникла необходимость уменьшить скорость перехода на поверхность до 8 м/мин. В результате наблюдали симптомы ДКБ у 2 из 10 животных и 100% выживаемость.

В результате моделирования скорость перехода на поверхность 10 м/мин со временем экспозиции на грунте в течение 30 минут является адекватным для изучения декомпрессионной болезни.

МЕХАНИЗМЫ МЕМБРАННО-ЗАВИСИМОЙ АКТИВАЦИИ ФАКТОРА СВЁРТЫВАНИЯ X

Божко А.А.^{1,2}, Пантелеев М.А.^{1,2}

¹Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН,
Москва, Россия

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

bozhko.aa19@physics.msu.ru

Гемостаз – это сложная система, предотвращающая вытекание крови из сосуда при его повреждении. Плазменное звено гемостаза представляет собой последовательность ферментативных реакций, в которых участвуют белки плазмы крови, называемые факторами свертывания. Большинство реакций свертывания идут не в самой плазме крови, а на отрицательно-заряженных мембранах, чаще всего представленных тромбоцитами. Факторы свертывания способны обратимо и кальций-зависимо связываться с такими мембранами при помощи Gla-доменов, входящих в состав этих белков. Одной из важных реакций свертывания является активация фактора X фактором IXa на мембранах тромбоцитов. Существуют представления о роли мембран в этой реакции – в первую очередь это ускорение процессов свертывания крови, однако вопрос, каким образом мембрана влияет на отдельные механизмы активации фактора X фактором IXa, остается плохо изученным. Поскольку экспериментально ответить на этот вопрос достаточно проблематично, целью данной работы было исследовать механизмы активации фактора X фактором IXa, а также оценить роль поверхности тромбоцитов используя компьютерное моделирование.

В работе представлена математическая модель активации белка свертывания крови – фактора X. Модель представлена системой ОДУ, которая включает в себя два пути активации фактора X: 1) посредством образования мембранного комплекса фактора X с фактором IXa, где белки встречаются друг друга на поверхности тромбоцитов и 2) комплекса, где не связанный с поверхностью фактор IXa взаимодействует напрямую со связанным с мембраной фактором X. Взаимодействие белков было описано в соответствии с законом действующих масс. В математической модели мы учитываем переход факторов свертывания из трёхмерного в двумерное пространство поверхности тромбоцита. Константы реакций определялись при помощи численных методов на основе имеющихся литературных данных.

Для исследования роли мембран в реакции активации фактора X, в системе варьировалась концентрация тромбоцитов. Скорость образования комплекса из раствора уменьшалась с ростом концентрации тромбоцитов, в то время как скорость образования мембранного комплекса фактора X и фактора IXa имела куполообразную форму. При малых концентрациях фосфолипидной мембраны скорость образования мембранного комплекса, активирующего фактор X, росла, однако при повышенной концентрации тромбоцитов (от 5×10^5 кл/мл до 5×10^7 кл/мл) поверхностная плотность белков снижалась и происходило ингибирование реакции поверхностью и снижение поверхностной плотности мембранного комплекса. В результате исследования работы модели, были оценены вклады двух путей активации фактора X и роль тромбоцитов в системе.

Мы предполагаем, что роль мембран заключается в сложном регулировании процесса активации фактора свертывания крови X: ускорении или ингибировании реакции активации в зависимости от концентрации тромбоцитов.

ИНГИБИТОР α -АМИЛАЗ АКАРБОЗА ЭФФЕКТИВНО ПРЕДОТВРАЩАЕТ НАРУШЕНИЕ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА У МЫШЕЙ C57BL/6 ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА

Бороздина Н.А.^{1,2}

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

²Пушкинский филиал федерального государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего образования «Российский биотехнологический университет
(РОСБИОТЕХ)», Пушкино, Россия

natalia.borozdina2016@yandex.ru

Отличительной характеристикой сахарного диабета 2 типа является повышенный уровень глюкозы в крови из-за дефицита чувствительности к инсулину. В терапии сахарного диабета 2 типа важно контролировать постпрандиальный уровень глюкозы с целью снижения образования конечных продуктов гликирования, которые идентифицированы как основной фактор риска микрососудистых и макрососудистых осложнений.

Акарбоза является ингибитором α -амилаз. Акарбоза структурно похожа на природные олигосахариды, но имеет большее сродство к α -гликозидазам, и они конкурентно ингибируются при приеме пищи. Замедленное расщепление олигосахаридов приводит к тому, что непереваренные углеводы достигают нижних отделов тонкой кишки и стимулируют там секрецию глюкагоноподобного пептида-1. Так как этот гормон задерживает опорожнение желудка, снижает секрецию глюкагона и регулирует секрецию инсулина, то можно предположить, что монотерапия акарбозой может косвенно привести к корректировке углеводного обмена на фоне сахарного диабета 2 типа.

Целью работы являлось исследовать эффективность акарбозы при пероральном многократном введении на фоне моделирования сахарного диабета 2 типа в отношении углеводного обмена.

Сахарный диабет 2 типа моделировался у мышей C57BL/6 путем содержания их на высокожировой диете в течение 21 недели. Пероральное введение акарбозы в дозе 24 мг/кг проводилось в течение 4 недель ежедневно, начиная с 18 недели исследования. Через 2 и 4 недели введения акарбозы у животных регистрировался уровень глюкозы натощак, проводились глюкозотолерантный крахмальный тест и инсулинорезистентный тест.

В результате определено, что при нахождении мышей C57BL/6 на высокожировой диете в течение 19 и 21 недели, развивается инсулинорезистентность, повышается тощачовый и постпрандиальный уровень глюкозы. Введение акарбозы в дозе 24 мг/кг перорально в течение 2 и 4 недель на фоне моделирования сахарного диабета 2 типа привело к снижению тощачового уровня глюкозы и облегчению инсулинорезистентности. Таким образом, ингибитор α -амилаз акарбоза влияет на углеводный обмен не только посредством снижения постпрандиального уровня глюкозы.

Таким образом, эффективность акарбозы при моделировании сахарного диабета 2 типа обусловлена не только прямым ингибированием α -амилаз, но и косвенным влиянием на секрецию глюкагоноподобного пептида-1.

Работа поддержана грантом РФФИ №21-74-20147 (<https://rscf.ru/en/project/21-74-20147/>).

ПЕПТИДНЫЙ ИНГИБИТОР α -АМИЛАЗ ИЗ *HETERACTIS MAGNIFICA* СНИЖАЕТ
ПОСТПРАНДИАЛЬНЫЙ УРОВЕНЬ ГЛЮКОЗЫ У ГИПЕРГЛИКЕМИЧЕСКИХ МЫШЕЙ
ПРИ ПЕРОРАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ

Бороздина Н.А.^{1,2}, Попкова Д.В.³, Дьяченко И.А.^{1,2}

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

²Пушкинский филиал федерального государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего образования «Российский биотехнологический университет
(РОСБИОТЕХ)», Пушино, Россия

³Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН,
Владивосток, Россия

natalia.borozdina2016@yandex.ru

Препаратом первой линии для контролирования уровня глюкозы при сахарном диабете 2 типа является метформин. Чтобы снизить дозировку метформина и его неблагоприятные эффекты, но при этом добиться эффективного снижения постпрандиального уровня глюкозы, он применяется в комбинации с другими антигипергликемическими препаратами. К таким препаратам относятся ингибиторы α -амилаз.

В рамках работы рассматривается перспектива перорального применения пептидного ингибитора α -амилаз из морской анемоны *Heteractis magnifica* для снижения постпрандиального уровня глюкозы на модели гипергликемии.

Целью работы являлось определение эффективной дозы рекомбинантного аналога ингибитора α -амилаз из *H. magnifica* при однократном пероральном введении.

Гипергликемия вызывалась у мышей ICR путем однократного внутрибрюшинного введения стрептозоцина. На 14 день после введения стрептозоцина у 80% животных развилась гипергликемия со средним уровнем глюкозы в крови 19 ммоль/л натощак. На 14 день после введения стрептозоцина у животных проводился глюкозотолерантный крахмальный тест. Препарат сравнения акарбоза вводился однократно за 30 минут до начала крахмального теста в дозе 3 мг/кг. Ингибитор α -амилаз из *H. magnifica* изучался при однократном введении в следующих дозах: 0,01 мг/кг, 0,005 мг/кг, 0,001 мг/кг, 0,0005 мг/кг и 0,0001 мг/кг. Тестируемые дозы ингибитора вводились за 45 минут до начала крахмального теста. При проведении крахмального теста, животным вводился крахмал в дозе 3 г/кг перорально, и далее у животных регистрировался уровень глюкозы в крови через 0, 30, 60, 90 и 120 минут после введения крахмала. Эффективность акарбозы и ингибитора α -амилаз из *H. magnifica* оценивалась по постпрандиальному уровню глюкозы и площади под графиком концентрации глюкозы при проведении крахмального теста.

Ингибитор α -амилаз из *H. magnifica*, вводимый за 45 минут до крахмального теста, значительно снижал постпрандиальный уровень глюкозы у гипергликемических мышей, а также площадь под графиком концентрации глюкозы в крахмальном тесте. В то время как препарат сравнения акарбоза не снижал площадь под графиком концентрации глюкозы. Таким образом, пептид в дозах 0,005 мг/кг и 0,01 мг/кг превосходит по эффективности акарбозу в дозе 3 мг/кг при однократном пероральном введении. Пептидный ингибитор α -амилаз из *H. magnifica* является перспективным пероральным антигипергликемическим препаратом для лечения сахарного диабета 2 типа.

Работа поддержана грантом РФФ №21-74-20147 (<https://rscf.ru/en/project/21-74-20147/>).

СРАВНЕНИЕ РАДИОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ РИБОКСИНА (ИНОЗИНА) И ИНДРАЛИНА (Б-190) ПРИ ВНЕШНЕМ ОБЛУЧЕНИИ

**Бочаров Д.А.², Ромодин Л.А.¹, Никитенко О.В.¹, Бычкова Т.М.¹,
Зрилова Ю.А.¹, Родионова Е.Д.²**

¹ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, лаборатория Радиационной биофизики, лаборатория Радиационной иммунологии и экспериментальной терапии радиационных поражений, Москва, Россия

²ФГБОУ ВО «РОСБИОТЕХ», кафедра биоэкологии и биологической безопасности, Москва, Россия

dbo4arov204204@gmail.com

Актуальность. Разработка эффективных препаратов, способных предотвратить негативное влияние ионизирующего излучения на живой организм, является одной из первостепенных задач. Причём крайне важны как эффективность этих препаратов, так и отсутствие у них химической токсичности – применение препарата должно быть максимально безопасным. Достаточное число работ посвящено радиозащитным свойствам рибонуклеозида рибоксина (инозина). Однако исследований по сравнению непосредственно радиопротекторных свойств рибоксина и эталонного радиозащитного препарата, например, индралина, по тесту выживаемости облучённых животных до настоящего времени не проводилось.

Целью представляемой работы явилось проведение сравнительной оценки радиопротекторных свойств индралина и рибоксина (инозина) на модели самцов мышей, подвергнутых внешнему облучению рентгеновским излучением.

Методология. Эксперимент проводился на самцах мышей линии ICR (CD-1) SPF категории в двух повторностях. Животные были разделены на несколько групп, разделённые по массе тела, по 10 особей: виварный контроль, не подвергнутый воздействию препаратов и облучению, контроль облучения, подвергнутый только воздействию рентгеновским излучением в дозах 6,0, 6,5 и 6,75 Гр, экспериментальные группы, подвергнутые облучению в указанных дозах с предварительным введением рибоксина за 20 минут до облучения в дозировке 100 или 200 мг/кг массы тела или индралина в дозировке 100 или 150 мг/кг за 15 минут до облучения. Выживаемость оценивали за 30 суток после облучения. Расчет кумулятивной доли выживших животных производился по E.L. Kaplan и P. Mayer.

Основной параметр эффективности радиопротектора – это фактор изменения дозы (ФИД), определяющийся как отношение дозы излучения, вызывающей гибель половины облучённых животных, получивших препарат, к дозе излучения, вызывающей гибель половины облучённых животных без введения препарата. Расчёт данного параметра проведён с использованием пробит-анализа по Финни.

Результат. Применение индралина в дозах 6,0 Гр, 6,5 Гр и 6,75 Гр перед облучением привело к заметному увеличению выживаемости в сравнении с группой, получившей рибоксин и группой облучённого контроля. Отмечено снижение выживаемости в группах мышей, получивших рибоксин в дозах 100 мг/кг и 200 мг/кг, по сравнению с группой, получившей Б-190 в дозе 100 мг/кг. Отмечено статистически значимое снижение выживаемости в группах с введением рибоксина в дозах 100 мг/кг и 200 мг/кг по сравнению с группой с введением Б-190 в дозе 150 мг/кг ($p \leq 0,05$, критерий χ^2). По результатам проведенных

экспериментов нами были рассчитаны показатели ФИД для индралина и рибоксина с использованием уравнений, полученных с помощью пробит-анализа по Финни. Показатели фактора изменения дозы для индралина и рибоксина составили соответственно 1,8 и 1,07. По причине недостаточного количества данных, значение ФИД индралина является экстраполяцией и нуждается в дополнительной экспериментальной проверке.

Заключение. По результатам эксперимента можно сказать, что профилактические применение рибоксина для нивелирования последствий облучения в условиях, использованных в настоящей работе, нельзя считать эффективным. Однако этот препарат может быть полезен для снижения негативных последствий воздействия ионизирующего излучения при применении после облучения за счёт радиомодуляторных свойств, описанных ранее, и низкой химической токсичности. В будущих исследованиях необходимо изучить возможность использования рибоксина в качестве радиомодулятора, применяемого уже после облучения для повышения сопротивляемости организма, в том числе – и в комбинации с Б-190, вводимым до облучения.

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 23-24-00383, <https://rscf.ru/project/23-24-00383/>.

ВЛИЯНИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ДЛИНУ ТЕЛОМЕР ГИППОКАМПА И ПРЕФРОНТАЛЬНОЙ КОРЫ КРЫС В МОДЕЛИ АУТИЗМА

Валеева Е.В.¹, Никифорова Л.С.¹, Никитин Д.О.², Семина И.И.^{1,2}

¹Центральная научно-исследовательская лаборатория, Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

²Кафедра фармакологии, Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

vevaleeva@ya.ru

На сегодняшний день эффективное лечение аутизма остается вызовом, так как фармакологические методы могут иметь нежелательные побочные эффекты. Некоторые препараты, такие как антидепрессанты, нейролептики и ноотропы, применяемые при аутизме, улучшая функционирование отдельных структур мозга и поведение, могут влиять на процессы памяти, социального взаимодействия и эмоционального регулирования. Кроме того, они могут потенциально влиять на длину теломер, что связано с процессами старения клеток. Исследование длины теломер может помочь определить изменения, происходящие в организме под воздействием этих препаратов, и оценить их безопасность и эффективность. Целью данного исследования было изучение влияния амитриптилина, рисперидона и нооклерина на длину теломер гиппокампа и префронтальной коры у крыс самок и самцов в модели аутизма, индуцированной вальпроевой кислотой.

Биоматериалом для исследования служила выделенная ДНК гиппокампа и префронтальной коры крыс линии Вистар, поделенных на 4 группы: 1 – контроль (10 самок и 10 самцов), 2 – грызуны в вальпроатной модели аутизма (10 самок и 10 самцов), 3, 4 и 5 группу составляли крысы в модели аутизма после 30-дневного введения амитриптилина 4 мг/кг (9 самок и 10 самцов), рисперидона 1 мг/кг (10 самок и 10 самцов), нооклерина 20 мг/кг (10 самок и 9 самцов), соответственно. Для создания модели аутизма с использованием вальпроевой кислоты беременным самкам было проведено подкожное введение препарата в дозе 500 мг/кг в 13-й день беременности. Оценка относительной длины теломер проводили с помощью ПЦР в реальном времени на амплификаторе CFX96 (BioRad, США). Расчет относительной длины теломер проводился согласно протоколу Sawthorn (2002). Статистическая обработка проводилась с использованием программы GraphPad Prism.

При изучении длины теломер крыс линии Вистар в вальпроевой модели аутизма было отмечено, что в префронтальной коре у самцов в модели аутизма, которым вводили нооклерин, рисперидон и амитриптилин (3, 4 и 5 группа, соответственно), относительная длина теломер была значимо увеличена по сравнению с контрольной группой ($p \leq 0.0001$). Статистической значимой разницы у самок между группами в показателях относительной длины теломер гиппокампа и префронтальной коры не было обнаружено ($p > 0.05$).

Таким образом, только префронтальная кора крыс самцов в модели аутизма, леченные лекарственными препаратами, в отношении изменения длины теломер показала изменения. Дальнейшее изучение причины такой динамики длины теломер в других тканях и ее причины может предоставить дополнительную информацию о воздействии лекарственных средств на клетки различных тканей и оценить их потенциальные пользы и риски при лечении аутизма.

Работа поддержана грантом РФФИ № 23-25-00325.

ВЛИЯНИЕ БЛОКАДЫ ГЛЮКОКОРТИКОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ НА ПОВЕДЕНИЕ И СТРУКТУРУ ГИППОКАМПА У САМЦОВ КРЫС, ПЕРЕНЕСШИХ ФОКАЛЬНУЮ ИШЕМИЮ МОЗГА

Валиева Д.Г.^{1,2}, Нагаткина М.В.³, Недогреева О.А.²

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

²Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

³Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина, Москва, Россия

Valieva_d@mail.ru

Фокальное повреждение мозга, возникающее вследствие перенесенного инсульта, часто приводит к оставленному появлению целого ряда когнитивных нарушений. Одним из возможных механизмов, которые приводят к таким нежелательным последствиям, является избыточная активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси в период ишемии. Результатом этого является повышенный выброс кортикостероидов в кровоток. Увеличение концентрации глюкокортикоидов (ГК) и обусловленное этим активное поступление гормонов в мозг может приводить к повреждению церебральных структур и к последующим когнитивным нарушениям.

В работе ишемический инсульт моделировали у крыс методом окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА) по Коизуми. Было исследовано 5 групп животных: интактные, ложнооперированные животные, получавшие раствор полипропиленгликоля (ППГ) или раствор антагониста ГК рецепторов мифепристона (МФ) в ППГ, и животные с ОСМА, которым вводили ППГ или МФ+ППГ. Раствор МФ в ППГ вводили в дозе 20 мг/кг массы тела за сутки до, в день операции и в течение 3-х дней после операции. Через 24 ч после последней инъекции отдельные группы крыс (n = 4–5) анестезировали, перфузировали 4% формальдегидом. Срезы мозга окрашивали по Нисслию и иммуногистохимически на наличие белков апоптоза (Bax), маркеры астроцитов (GFAP) и микроглии (Iba-1). Через 30 дней после операции у крыс (n = 8–10 в группе) вырабатывали условную реакцию пассивного избегания (УРПИ) для проверки состояния долговременной памяти.

Ишемический инсульт приводил к нарушению сохранности УРПИ у крыс, что проявлялось в снижении латентного периода входа в темный отсек камеры через 24 ч после обучения. Введение блокатора ГК рецепторов МФ предотвращало негативное влияние ишемии, значимо улучшая показатели обучения в группе крыс, перенесших ОСМА и получавших МФ.

Была исследована структура гиппокампа, т.к. этот отдел участвует в процессах обучения и памяти у животных и может быть поврежден при ОСМА. ОСМА не приводила к снижению числа нейронов в клеточных полях СА1, СА3, СА4 гиппокампа и зубчатой извилине. Не было выявлено экспрессии проапоптозного белка Bax, хотя он четко детектировался в зоне ишемической полутени. Был проведен анализ изменений клеток глии.

Таким образом, наблюдавшиеся нарушения памяти у крыс, перенесших ОСМА, не были связаны с гибелью клеток гиппокампа или активацией в них апоптоза. Введение МФ, антагониста ГК рецепторов, может предотвратить ухудшение памяти в отдаленный период после ишемии независимо от его непосредственного влияния на гиппокамп.

ОСОБЕННОСТИ ОСМОТИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ ПТИЦ

Волкова А.А.¹, Альбертина А.А.², Скверчинская Е.А.¹, Миндукшев И.В.¹

¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия

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

10a.a.volkova@gmail.com

Эритроциты являются наиболее многочисленными клетками крови, играющими ключевую роль в транспорте кислорода и углекислого газа за счет содержания гемоглобина. Между клетками крови млекопитающих и птиц имеется существенное различие – эритроциты последних содержат ядро и митохондрии. Однако, исследований эритроцитов птиц крайне мало, хотя данная область имеет огромный прикладной и фундаментальный интерес – почему птицы сохранили клеточные органеллы, как это сказывается на деформируемости эритроцитов, как эритроциты птиц реагируют на клеточный стресс (окислительный, тепловой, водной нагрузки или депривации, условия высотного полета). Ранее для анализа деформируемости эритроцитов человека нами были использованы два оригинальных подхода, основанных на лазерной дифракции, что позволило охарактеризовать реакцию эритроцитов человека при окислительном стрессе и патологических состояниях. В связи с этим сравнение клеток крови птиц и млекопитающих, находящихся под воздействием стресса, может дать представление о том, почему птицы сохранили клеточные органеллы в своих эритроцитах, и как эритроциты млекопитающих функционируют без них.

Целью работы было выявление особенностей осмотической резистентности эритроцитов птиц и сравнение с эритроцитами человека при осмотическом и аммонийном стрессе.

Исследование проводилось на отмытых эритроцитах одомашненного перепела и человека. Регистрацию трансформации эритроцитов (форма, объем, скорость и полнота лизиса) при действии осмотической и аммонийной нагрузке проводили в динамическом режиме на анализаторе частиц LaSca-TM (ООО «Биомедицинские системы», Россия), методом лазерной дифракции. Рабочие среды соответствовали осмоляльности плазмы и температуре человека (300 ± 2 мОсм, 37°C) и перепелов (310 ± 5 мОсм, 41°C).

Выявлены особенности реакции эритроцитов перепелов на осмотическую нагрузку – по сравнению с человеком, эритроциты птиц начинали лизировать при более высоком уровне осмоляльности, но не достигали полного лизиса даже при нулевой осмоляльности, что указывает на гетерогенность популяции циркулирующих эритроцитов. Значения $H50$ (осмоляльность, при которой достигнут 50% гемолиз) всей популяции эритроцитов у птиц был ниже, чем у человека. Такая реакция обусловила более пологий наклон гемолизной кривой эритроцитов птиц, по сравнению с человеком. Для человека, подобная осмотическая ригидность эритроцитов наблюдается при негативном действии окислительного стресса, действии противоопухолевых препаратов, тепловом шоке, сепсисе. Аммонийный тест показал, что эритроциты перепелов набухают со значительно большей скоростью, чем эритроциты человека, но их полного лизиса не происходит – 22-30% клеток остаются в суспензии. Различия в реакции на осмотический и аммонийный стресс могут быть обусловлены различиями структурных белков мембраны, наличием ядра и активных митохондрий в эритроцитах птиц. Как реагируют эритроциты птиц на стрессовые нагрузки – запланированные задачи нашего дальнейшего исследования.

Впервые применен метод лазерной дифракции для оценки осмотической и аммонийной устойчивости эритроцитов птиц. Показано, что эритроциты перепелов более устойчивы к гипоосмотической и аммонийной нагрузке, чем эритроциты человека.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 23-15-00142.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ КАЛИЙ-ПРОВОДЯЩИХ КАНАЛОВ В ГИППОКАМПЕ МЫШЕЙ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРВОЗБУДИМОСТИ, ВЫЗВАННОЙ КАИНОВОЙ КИСЛОТОЙ

Галашин А.С., Федорова Е.В., Дынник В.В.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики, Пушино, Россия

galashin.alx@gmail.com

Одним из социально значимых заболеваний является эпилепсия. Несмотря на существование более 20 противосудорожных препаратов, не менее 30% пациентов нечувствительны к лечению. Более половины случаев мезиальной височной эпилепсии, при которой эпилептический очаг расположен во внутренних структурах височной доли головного мозга, характеризуются наличием склероза гиппокампа, часто – с сопутствующей фармакорезистентностью. Известно, что при эпилепсии с гиппокампальной локализацией очага происходит изменение экспрессии различных ионных каналов в клетках гиппокампа, которое может как способствовать, так и противодействовать эпилептогенезу. Важными регуляторами возбудимости нейронов являются калий-проводящие каналы. В настоящее время отсутствуют зарегистрированные противосудорожные препараты, направленные на модуляцию активности этих каналов. В связи с этим в рамках настоящего исследования изучалось изменение экспрессии четырех генов отдельных субъединиц калий-проводящих каналов в гиппокампе: *Hcn1*, *Hcn2*, *Kcnj2* и *Kcnma1*, кодирующих каналы HCN, $K_{ir}2.1$ и BK соответственно.

Эксперименты проводили на мышах линии SHK. Животным, наркотизированным смесью тилетамина/золазепам (90 мг/кг) и ксилазина (6 мг/кг), устанавливали канюлю над левым желудочком мозга. После 3-дневного адаптационного периода в желудочек мозга через канюлю подопытной группы животных вводили каиновую кислоту в дозе 0,8 мкг в объеме 0,4 мкл; контрольной подгруппе животных вводили физиологический раствор в объеме 0,4 мкл. Далее проводили наблюдение за поведением мышей. Через 10–60 минут после введения каиновой кислоты у животных подопытной группы развивалась судорожная активность. Животных, у которых не было судорог, исключали из дальнейших экспериментов. Через 7 дней после введения у животных ($n = 8$) выделяли левый гиппокамп для анализа экспрессии мРНК указанных генов с помощью ПЦР в реальном времени.

Результаты экспериментов показали, что через 7 дней после введения каиновой кислоты уровень экспрессии гена *Hcn1* снижался относительно контрольных животных, в то время как уровень мРНК *Hcn2*, *Kcnj2* и *Kcnma1* повышался. Выявленные результаты свидетельствуют о вовлечении данных каналов в процесс гипервозбуждения и могут помочь в планировании дальнейших исследований по применению фармакологических селективных активаторов и блокаторов данных каналов для снижения гипервозбудимости.

Работа выполнена в рамках государственного задания № 075-01025-23-01.

ОСМОТИЧЕСКАЯ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ ВЫСШИХ И НИЗШИХ ПОЗВОНОЧНЫХ

Герда Б.А.¹, Скверчинская Е.А.¹, Андреева А.Ю.¹, Волкова А.А.¹, Сафонова Т.А.²,
Бондаренко С.С.³, Миндукшев И.В.¹

¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия

²Санкт-Петербургский Политехнический Университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия

³Санкт-Петербургский государственный технологический институт
(технический университет), Санкт-Петербург, Россия

bgerda2525@gmail.com

Введение. Осмотическая резистентность (ОР) – степень устойчивости клеток к лизису в осмотическом градиенте. Данный параметр отражает деформируемость эритроцитов, обусловленную сложной структурой их мембранного и субмембранного аппаратов. Нарушения деформируемости связаны с развитием анемий различной этиологии. Деформируемость так же варьируется между различными таксонами, однако механизмы, лежащие в основе видовых особенностей, во многом остаются неопределенными. Цель данной работы – сравнительный анализ ОР эритроцитов высших (*Homo sapiens*, n=12; *Rattus norvegicus*, n=9; *Coturnix japonica*, n=6;) и низших (*Rana ridibunda*, n=15; *Carassius carassius*, n=12; *Lampetra fluviatilis*, n=30) позвоночных.

Материалы и методы. Все процедуры выполнены в соответствии с российскими и международными этическими стандартами, принципами Базельской и Хельсинской деклараций и одобрены комиссией по биоэтике ИЭФБ РАН. Осмотическая резистентность оценивалась при помощи метода лазерной дифракции на анализаторе частиц LASCA (БиоМедСистем, Санкт-Петербург, Россия). Суспензию эритроцитов физиологической осмоляльности последовательно разбавляли добавками воды в кювету, внося так же соответствующее количество клеток для поддержания постоянства их концентрации без учета лизиса. Процент лизировавших клеток оценивали по интенсивности светорассеяния. Оцениваемые параметры, получаемые из уравнения дозозависимости – H50 (осмоляльность, при которой лизирует половина клеток) и W (гетерогенность популяции по степени устойчивости: H10 – H90). Статистическая обработка результатов осуществлена при помощи однофакторного дисперсионного анализа и апостериорного критерия Тьюки. Сравнение производилось как в мОсм, так и в процентах от исходной физиологической осмоляльности.

Результаты и обсуждение. Эритроциты водных позвоночных существенно более устойчивы к гипоосмотическому лизису ($p < 0.001$ для H90 и H50 при сравнении с наземными видами). Наибольшей ОР обладают эритроциты *Rana ridibunda* (H50 = 46.7 ± 5.7 мОсм) и *Lampetra fluviatilis* (H50 = 57.9 ± 8.15 мОсм). Наиболее гетерогенны эритроциты *Rana ridibunda* ($W = 70.4 \pm 24.8$ мОсм, $p < 0.001$ при сравнении со всеми исследованными видами). Для остальных видов различия по W статистически не значимы ($p > 0.05$), а сами значения W более чем в 2 раза ниже, чем у амфибий. Сравнение по всем параметрам между млекопитающими не выявило значимых различий ($p > 0.05$). Эритроциты *Coturnix japonica* обладают наименьшей ОР (H50 = 123.0 ± 6.4 мОсм). В абсолютных значениях они менее устойчивы, чем эритроциты млекопитающих ($p < 0.05$ для H50). Тем не менее, эта разница нивелируется при оценке параметров, как долей от физиологической осмоляльности ($p > 0.05$). Так же часть популяции эритроцитов птиц не подвержена лизису при сколь угодно низкой осмоляльности ($13.1 \pm 2.9\%$ от всей популяции). Полученные данные, а также опубликованные ранее и затрагивающие пресмыкающихся и наземных амфибий, позволяют нам предположить, что эритроциты низших позвоночных более осмотически резистентны, чем эритроциты высших. Мы полагаем, что эта разница обусловлена особенностями эмбриогенеза, терморегуляции и средой обитания.

ВЛИЯНИЕ 24S-ГИДРОКСИХОЛЕСТЕРИНА НА АТФ-ОПОСРЕДОВАННЫЕ СОБЫТИЯ В ТРИГЕМИНОВАСКУЛЯРНОЙ СИСТЕМЕ КРЫСЫ

Гижиждинова К.Р., Ананьев А.С., Нурмиева Д.А., Шайдуллова К.С.

Казанский (Поволжский) федеральный университет, Казань, Россия

libera350@gmail.com

24S – гидроксистерин (24-ГХ) является главным и тканеспецифическим метаболитом холестерина в ЦНС. Известно, что он может проходить через ГЭБ, попадать в кровоток и влиять на другие системы. Так, он может действовать как положительный аллостерический модулятор для NMDA рецепторов, так и воздействовать на другие рецепторы, посредством встраивания 24-ГХ в цитоплазматическую мембрану.

Мигрень – хроническое нервно-сосудистое заболевание, опосредованное активацией ноцицептивных нейронов тройничного нерва, дегрануляцией тучных клеток и вазодилатацией. Целью данной работы было изучение влияния 24-ГХ на активность афферентов тройничного нерва, Ca^{2+} -сигналы в нейронах тройничного ганглия и состояние тучных клеток.

Для регистрации активности периферических отростков тройничного нерва, использовался препарат полочерепа крысы (P30-40), с сохраненными твердой мозговой оболочкой, ее сосудов и нервов. Все растворы апплицировались непосредственно во внутреннюю часть черепной коробки с помощью проточной перфузии. Полученные данные нормализовались относительно контрольной записи.

АТФ-вызванные ответы анализировались в изолированных нейронах тройничного ганглия, полученных у крыс P8-14. В исследовании использовались микроэлектродный метод patch-clamp в режиме current clamp; для кальциевого имиджинга нейроны предварительно инкубировались в флуоресцентном красителе Fluo-4 FM, чувствительном к внутриклеточному кальцию. Аппликация АТФ на нейроны тройничного нерва производилась с помощью системы быстрой перфузии. Инкубация клеточной культуры в 24S-гидроксистерине составляла 5 минут.

Для изучения влияния 24-ГХ на состояние тучных клеток, выделенные оболочки мозга крысы (P30-40) инкубировались в растворе с исследуемым веществом. Далее оболочки окрашивались толуидиновым синим. Готовые препараты просматривали при двадцатикратном увеличении. Степень грануляции оценивалась визуально. Эффект 24-ГХ считался как процентная доля дегранулированных тучных клеток от их общего количества.

Аппликация АТФ на препарат полочерепа привело к увеличению частоты возбудимости тройничного нерва: в 5.8 ± 2.2 (n=6). Предварительное добавление 24-ГХ вызывал угнетающий эффект: частота возбудимости снизилась в 3 ± 0.6 (n=7). 24-ГХ в концентрациях 1, 5 и 10 мкМ подавлял АТФ-вызванные ионные токи: до $60.7 \pm 6.9\%$ (n=9), $64.5 \pm 6.1\%$ (n=8), $63.9 \pm 11.6\%$ (n=5), соответственно. При анализе кальциевых сигналов выявилось, что АТФ вызывает свечение равное 1.57 ± 0.3 у.е. (n=30), а при предварительной инкубации в исследуемом веществе значение ответов составило 1.02 ± 0.1 у.е. (n=26). Инкубация оболочек мозга в растворе, содержащий АТФ, показала увеличение доли дегранулированных тучных клеток и составила $11 \pm 3.3\%$ (n=10) по сравнению с контрольными значениями: 1.9 ± 0.87 (n=5). Предварительная инкубация в 24-ГХ оказывала подавляющий эффект: доля дегранулированных тучных клеток составила 5 ± 1.26 (n=4).

Таким образом, 24S – гидроксистерин снижал эффекты АТФ на нейроны тригеминального нерва, угнетал АТФ-опосредованные ионные токи и кальциевые сигналы. Кроме того, исследуемое вещество повышало стабильность цитоплазматических мембран тучных клеток. Был сделан вывод, что 24S – гидроксистерин может оказывать нейропротекторное действие в развитии болевых ощущений при мигрени.

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

МОРФОГЕНЕЗ БОРОЗД ЗАТЫЛОЧНОЙ ДОЛИ В НЕОКОРТЕКСЕ ЧЕЛОВЕКА

Годовалова О.С., Прощина А.Е., Харламова А.С., Кривова Ю.С., Савельев С.В.

Научно-исследовательский институт морфологии человека им. академика А.П. Авцына
Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Российский научный
центр хирургии им. академика Б.В. Петровского» Москва, Россия

godovalova.brain@gmail.com

Неокортекс человека имеет огромную площадь поверхности с уникальной цитоархитектоникой, большая часть которой скрыта в бороздах. Некоторые цитоархитектонические поля связаны с макроскопическими ориентирами (бороздами). Известно, что в ходе пренатального развития человеческого мозга неокортикальные извилины и борозды подвергаются изменениям и модификациям после первичного формирования.

Для изучения морфогенетических процессов в зрительных полях во время формирования первичных (временных) и вторичных (постоянных) борозд была исследована затылочная доля мозга плода человека с помощью иммуногистохимических методов. Сравнивали распределение маркеров глиальной дифференцировки (S-100), нейрональной дифференцировки (NeuN, β -III-тубулин) и маркера миграции нейронов (рилин) в шпорной и теменно-затылочной бороздах.

Исследование проводилось на материале коллекции лаборатории развития нервной системы НИИМЧ им. ак. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского». Работа по созданию коллекции ведется в соответствии с законодательством РФ и принципами Хельсинской декларации. В данном исследовании проанализировано 56 аутопсийных образцов головного мозга (112 полушарий) плодов в возрасте от двенадцати недель гестационного развития (gw) до рождения. Частично набор данных этого исследования предоставлен на веб-сайте проекта по созданию Атласа развития человеческого мозга <https://brainmorphology.science>. Часть собранных образцов также находится в открытом доступе на веб-сайте лаборатории развития нервной системы <https://brainmicroscopy.com/collection/homo/brain-development>.

Была продемонстрирована неоднородность формирования первичных и вторичных зрительных полей. Исследование показало, что развитие первичного поля зрения 17, связанного со шпорной бороздой, предшествует развитию общей закладки полей 18 и 19, связанных с теменно-затылочной бороздой. Функциональная дифференциация первичного зрительного поля начинается в период вставания таламических афферентов. Этот процесс совпадает с временным сглаживанием шпорной борозды, что указывает на одновременное прогрессирование функциональной специализации и структурных модификаций. Также была продемонстрирована неоднородность созревания борозд и извилин в пределах одного цитоархитектонического поля. В позднем плодном периоде кортикальная пластинка извилин и губ борозд демонстрирует более высокий уровень NeuN-иммунореактивности, чем внутри борозд в том же цитоархитектоническом поле.

Исследование поддержано грантом РФФ № 22-15-00172.

РАЗВИТИЕ ГИПОСМИИ У КРЫС НА НИКОТИН-СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОЙ МОДЕЛИ САХАРНОГО ДИАБЕТА II ТИПА

Горская А.В.¹, Гренроос С.Б.²

¹Институт эволюционной физиологии и биохимии имени И.М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия;

²Факультет химической и биотехнологии, Санкт-Петербургский государственный
технологический институт, Санкт-Петербург, Россия

Снижение обоняния может быть одним из ключевых признаков широкого спектра нарушений. Так, ухудшение обонятельной функции может возникнуть, как макро- или микрососудистое осложнение или дисфункция центральной нервной системы при диабете. Однако на обонятельную систему в клинической практике обращают внимание реже, чем на зрительную или слуховую. Гипосмия чаще встречается при диабете 2 типа (СД2), и характеризуется снижением способности распознавать запахи, ухудшением памяти на обонятельные стимулы. Её развитие связывают с нарушением нейрогенеза и дифференцировки незрелых нейронов и изменением экспрессии ГАМКергических интернейронов в определённых областях мозга. При этом данных о развитии гипосмии в условиях экспериментальных моделей СД2 на грызунах крайне мало. Целью нашей работы было исследование обонятельной функции на никотин-стрептозотоциновой модели СД2 у крыс.

Диабет 2 типа моделировали стрептозотоцином (внутрибрюшинно – 65 мг/кг) с предварительным (за 15 мин.) внутрибрюшинным введением никотинамида (230 мг/кг). Для оценки обонятельной функции животных использовали поведенческий тест результативности поиска пищевых объектов, зарытых в опилки. Результативность поиска оценивали в баллах по количеству обнаруженных кусочков корма (0, 1, 2). Также оценивали время, затраченное на их нахождение и число обнюхиваний всех отверстий на полу камеры.

По результатам проведенного поведенческого теста, крысам с диабетом 2 типа требовалось больше времени на поиск печенья, чем контрольной группе. Результативность поиска у контрольной в 1,55 раза превышала таковую у группы с индуцированным диабетом 2 типа. Показатели исследовательской активности у крыс обеих групп достоверно не различались.

Таким образом, тест на результативность поиска пищи показал, что развитие диабета 2 типа у крыс оказывало негативное влияние на обоняние. Это позволяет предположить, что для данной модели СД2 на крысах характерно развитие гипосмии.

Выполнено в рамках Госзадания 075-00264-24-00.

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВАЦИИ ЭНДОГЕННЫХ КАЛЬЦИЙ-АКТИВИРУЕМЫХ ХЛОРНЫХ
КАНАЛОВ ANO6 ВХОДОМ КАЛЬЦИЯ ЧЕРЕЗ ДЕПО-УПРАВЛЯЕМЫЕ
КАНАЛЫ ORAI В КЛЕТКАХ НЕК293

**Григорьева Е.Р., Номеровская М.А., Решетин Д.С., Глушанкова Л.Н., Скобелева К.В.,
Шалыгин А.В., Колесников Д.О., Казначеева Е.В.**

Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

roma.grigorev.75@mail.ru

Кальций-активируемые хлорные каналы (CaCC) сформированы белками семейств аноктамины (ANO) и бестрофины. Представители семейства ANO играют роль во многих физиологических процессах и экспрессируются почти во всех тканях организма. Особенность данного семейства состоит в том, что часть его представителей формируют кальций-зависимые ионные каналы, а часть фосфолипидные скрамблазы.

ANO6 (TMEM16F) является наиболее необычным представителем данного семейства, так как совмещает в себе свойства скрамблазы и ионного канала. Он участвует в переносе фосфатидилсерина на наружный слой плазматической мембраны. В тромбоцитах фосфатидилсерин является посадочной платформой для факторов свертываемости крови, поэтому ANO6 необходим для нормального свертывания крови. Также, ANO6 участвует в минерализации костей, формировании плаценты, нарушение его работы приводит к развитию тяжелых форм Covid19- ассоциированной пневмонии. Показана роль ANO6 в регуляции и других физиологических процессов.

Одним из основных путей повышения внутриклеточной концентрации кальция в электронеозбудимых клетках является депо-управляемый вход. В нем участвуют сенсоры STIM на мембране эндоплазматического ретикулума и депо-управляемые каналы Orai и TRPC. При снижении концентрации ионов кальция в эндоплазматическом ретикулуме происходит изменение конформации сенсоров STIM, которые расположены на мембране ретикулума. После этого сенсоры STIM перемещаются к плазматической мембране, где активируют депо-управляемые каналы. Далее поступление ионов кальция через депо-управляемые каналы в цитоплазму приводит к активации факторов транскрипции генов, внутриклеточных сигнальных каскадов, различных кальций-зависимых каналов, в том числе и каналов CaCC семейства анактоминов.

Пути активации каналов ANO6 изучены недостаточно, в основном опираясь на косвенные данные и системы с оверэкспрессией. Нарушение работы депо-управляемых каналов и ANO6 приводит к формированию сходных патологий. Можно предположить, что вход кальция через депо-управляемые каналы участвует в активации ANO6.

Целью данной работы было изучение регуляции активности эндогенных CaCC в клетках НЕК293 депо-управляемым входом кальция.

Мы описали в клетках НЕК293 токи через одиночные эндогенные CaCC. Опыты с оверэкспрессией и нокдауном ANO6 в клетках НЕК293 показали, что CaCC сформированы белками ANO6. На уровне тока через отдельные каналы и при отведении тока от целой клетки показали, что при опустошении депо тапсигаргином активируются эндогенные CaCC, ANO6.

Далее, для установления роли депо-управляемых каналов в регуляции активности ANO6, мы использовали С-концевой фрагмент конститутивно-активного сенсора STIM1 с мутацией L251S и доминантно-негативные мутанты Orai1 E106Q. В конфигурации inside-out приложение С-концевого фрагмента сенсора STIM1 L251S приводило к активации эндогенных ANO6. А в опытах с подавлением тока через эндогенные депо-управляемые каналы Orai за счет оверэкспрессии Orai1 E106Q активность эндогенных каналов ANO6 при опустошении депо нарушалась.

Таким образом, активность эндогенных ANO6 зависит от входа кальция через депо-управляемые каналы Orai.

Работа была поддержана грантом РФФ № 23-44-00054.

АЦЕТИЛИРОВАНИЕ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА p53 В КЛЕТКАХ ПЕРИФОКАЛЬНОЙ ОБЛАСТИ ПОСЛЕ ФОТОТРОМБОТИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

Гузенко В.В., Калюжная Ю.Н., Куницина А.Е., Батальщикова С.А.

Лаборатория «Молекулярная нейробиология» ЮФУ, Ростов-на-Дону, Россия

vguzenko@sfedu.ru

Известно, что посттрансляционные модификации, а именно ацетилирование/деацетилирование, осуществляемое NATs и HDACs, влияет не только на активность гистонов, но и на активность негистоновых белков, таких как p53. Участие ацетилтрансфераз и деацетилаз гистонов в функционировании ацетилированного p53 в нейронах головного мозга после ишемии изучено недостаточно для понимания какую роль играет p53 в выживании и апоптозе клеток.

В связи с этим, целью данной работы стало изучение изменений уровня и внутриклеточной локализации транскрипционного фактора p53 в клетках перифокальной области в острый и восстановительный периоды после фототромботического инсульта (ФТИ). А также идентифицировать NATs и HDACs, которые способны ацетилировать/деацетилировать p53, влияя на его распределение, стабильность и проапоптотическую активность в ишемических клетках пенумбры коры мозга крыс после ФТИ. По результатам исследований, уровень p53 достоверно увеличивался в ядре и цитоплазме как в острый, так и в восстановительный периоды.

По данным вестерн-блот-анализа и иммунофлуоресцентной микроскопии, в перинфарктных клетках как в первые сутки после ФТИ, так и в восстановительный период наблюдали достоверное снижение уровня ацетилированного p53 по K320 в ядре и повышение в цитоплазме. Так же было выявлено усиление ацетилирования p53 по K373 преимущественно в ядрах перинфарктных нейронов в первые сутки после инсульта. Молекулярно-динамическое моделирование показало, что конформация ацетилированного фрагмента p53 по K320 является более компактной, чем аналогичный неацетилированный фрагмент. По всей видимости, более компактная конформация p53, которую он приобретает при ацетилировании K320 после инсульта, позволяет белку перемещаться между ядром и цитоплазмой в нейронах пенумбры. Анализ белок-белкового взаимодействия указывает на то, что PCAF и p300 ацетируют p53 в нейронах после ишемии. Согласно ингибиторному анализу, PCAF отвечает за ацетилирование p53 по K320, а p300 по K373. HDAC1, по-видимому, участвует в деацетилировании p53 по K320 в ядре и HDAC6 деацетирует p53 по K320 в цитоплазме.

Из этого следует, что, активируя PCAF/ ингибируя HDAC1 или HDAC6 и ингибируя p53, а также их комбинирование могут обладать нейропротекторными свойствами в терапии при восстановлении после инсульта.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания в сфере научной деятельности № FENW-2023–0018.

ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ РЕАГЕНТЫ НА ОСНОВЕ
НАНОМАТЕРИАЛОВ В КОНСТРУИРОВАНИИ ИММУНОФИЛЬТРАЦИОННОГО
АНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ ПРОТИВ SPIKE-БЕЛКА КОРОНАВИРУСА

Девятков С.О.¹, Никитина М.Д.^{1,2}, Заморина С.А.^{1,2}, Раев М.Б.^{1,2}

¹Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Пермский государственный национальный исследовательский университет»,
Пермь, Россия

²Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, Пермь, Россия

devyatovso@psu.ru

Иммунофльтрация – один из методов экспресс-диагностики. Принцип данного анализа заключается в вертикальном потоке компонентов анализа сквозь пористую мембрану, на поверхности которой происходит улавливание и распознавание аналита при помощи диагностического реагента (метки, связанной с распознающей молекулой). В подобных анализах в качестве цветной метки традиционно используют наночастицы коллоидного золота или ферментные метки (например, пероксидаза хрена). Однако на сегодняшний день описанные метки не в полной мере позволяют решить такие проблемы экспресс-анализов, как низкая чувствительность и стабильность используемых реагентов, а также неспецифические связывания. Решить обозначенные проблемы можно при помощи наноматериалов, обладающих способностью имитировать каталитическую активность ферментных меток. Одним из многообещающих миметиков пероксидазы хрена являются нанозимы берлинской лазури. В 2018 году группа химиков из Московского государственного университета под руководством Аркадия Карякина разработала способ получения высокоэффективных нанозимов берлинской лазури, основанный на восстановлении смеси солей трехвалентного железа при помощи перекиси водорода. Однако на сегодняшний день тест-системы для экспресс-диагностики с применением данной цветной метки не готовы к практическому применению ввиду малого количества исследований на эту тему.

В данной работе мы протестировали возможность применения высокоэффективных нанозимов берлинской лазури в конструировании иммунофльтрационного анализа для определения IgG против Spike-белка коронавируса. Для этого был синтезирован диагностический реагент на основе нанозимов берлинской лазури, функционализированных моноклональными антителами против IgG человека. В ходе исследований при помощи иммуноферментного анализа был проведен скрининг различных блокирующих агентов. Было показано, что использование фосфатного буфера с добавлением казеина до 1% позволяет достигать оптимального блокирующего эффекта. Данный вывод также был подтвержден в иммунофльтрационном анализе. Оптимальной концентрацией диагностического реагента для проведения иммунофльтрационного анализа является 0,24 мг/мл.

Таким образом, впервые была продемонстрирована возможность применения высокоэффективных нанозимов берлинской лазури в конструировании тест-системы в формате иммунофльтрации для определения IgG против Spike-белка коронавируса. Полученные результаты также можно использовать при разработке тест-систем к биомаркерам различных заболеваний. Следует отметить, что на данный момент требуются дальнейшие исследования по повышению чувствительности анализа.

Работа поддержана грантом РФФИ № 22-75-00025.

ПРОНИЦАЕМОСТЬ КИШЕЧНОГО ЭПИТЕЛИЯ В ДИНАМИКЕ РАЗВИТИЯ НЕФРОПАТИИ

Дмитриева Е.А., Федорова А.А.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

st085228@student.spbu.ru

Почка, обеспечивающая поддержание гомеостаза организма, и кишечник, вносящий вклад в изменение параметров внутренней среды, функционально связаны друг с другом. Для изучения влияния дисфункции почек на деятельность кишечника используют модель 5/6 нефрэктомии у животных, которая приводит к нарушению гомеостатической функции почек, повышая при этом ряд метаболитов, таких как, мочевины, в плазме крови, что приводит к усилению ее транспорта в кишечном эпителии. В свою очередь, это ведет к изменению микрофлоры кишечника, где увеличивается количество патогенных бактерий, секретирующих уремиические токсины. Такие токсины вызывают повышение проницаемости эпителия толстого кишечника. Исследование физиологических механизмов функциональной взаимосвязи этих двух органов является актуальной задачей физиологии внутренних органов с целью анализа механизмов совместной работы различных систем, а также разработки эффективных стратегий лечения и профилактики осложнений у пациентов с хронической болезнью почек (ХБП). Однако остается неясным, какие механизмы лежат в основе изменения проницаемости разных сегментов кишечного эпителия при хронической болезни почек.

Целью работы являлось исследование проницаемости тонкой и толстой кишки крысы в модели хронической почечной недостаточности через 2, 4, 6 месяцев после нефрэктомии.

Работа выполнена на самцах крыс Вистар 180-200 г. Крысам удаляли 5/6 объема почечной массы в 2 этапа: сначала 2/3 объема почечной массы левой почки, через неделю полностью удаляли правую почку. В качестве контроля использовали группу животных, которым проводили ложную операцию без иссечения почек. После нефрэктомии в разные временные периоды из крыс извлекали образцы тканей тощей и толстой кишки. В камере Уссинга была оценена парацеллюлярная проницаемость для флуоресцеина натрия (374 Да) тонкой и толстой кишки крысы.

Результаты исследования показали, что индуцированная ХБП вызывала нарушения со стороны кишечника, характерные для синдрома повышенной проницаемости кишки. Через 2 месяца после нефрэктомии у крыс с ХБП в эпителии тонкой и толстой кишки была увеличена парацеллюлярная проницаемость для флуоресцеина натрия. Через 4 месяца высокая проницаемость наблюдалась только в эпителии толстой кишки. Через 6 месяцев различия между проницаемостью у контрольных и опытных крыс не было обнаружено.

Таким образом, изменение функций почки влияет на парацеллюлярную проницаемость тонкой и толстой кишки. В различные периоды после нефрэктомии происходит развитие адаптационных процессов, направленных на усиление восстановления непроницаемости кишки.

АНАЛИЗ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ МОДУЛЯЦИИ РИТМОВ ГИППОКАМПА ПРИ НАВИГАЦИИ

Дубровин С.В.¹, Мысин И.Е.²

¹ФГБОУ ВО «Уфимский университет науки и технологий», Уфа, Россия

²Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушино, Россия

sonofatom@mail.ru

Последние исследования в области структурной организации гиппокампа в поле CA1 показывают, что близко расположенные нейроны имеют тенденцию к объединению в нейронные ансамбли. Типичным объектом для исследования нейронных ансамблей, являются клетки места, кодирующие положение животного в пространстве. Исследования микроорганизации демонстрируют, что нейроны в поле CA1 объединяются в кластеры, состоящие примерно из 70-100 клеток, с диаметром кластера около 100 мкм. Исходя из этих данных, мы предположили, что локальный полевой потенциал определяется несколькими кластерами нейронов, расположенных вокруг электрода. Учитывая, что эти нейронные кластеры включают клетки места, кодирующие одно место, мы решили проверить гипотезу с помощью определения зависимости мощности разных ритмов от положения животного при исследовании лабиринта. Была проанализирована динамика мощности для четырех ритмов гиппокампа: тета-ритма (4 – 12 Гц), медленного (25 – 40 Гц), среднего (60 – 80 Гц) и быстрого (90 – 120 Гц) гамма-ритмов.

Исходные записи локального полевого потенциала и передвижения животного в открытом поле были взяты из открытой базы данных scns.org, набор данных hc-3. Для определения динамики каждого ритма во времени мы использовали фильтр Баттерворта 3-го порядка в указанных выше диапазонах частот для каждого ритма, с последующим преобразованием Гильберта, амплитуду преобразования считали амплитудой ритма. Для исключения из анализа пребывания животного в одном месте, были исключены периоды, когда животное передвигалось со скоростью менее 5 см/сек. Также, были получены карты сопряжения амплитуд тета-ритма к фазам гамма-ритмов, они позволяют нам судить о синхронизации этих ритмов во время навигации животного. Для анализа пространственных карт мы использовали 2 параметра. Оценку пространственной информации, она показывает сколько информации о текущем положении животного дает измерение мощности данного ритма в данный момент времени. характеристики максимальных областей в картах. Анализ характерных точек, их распределения и размеры.

В результате проведённой работы мы можем утверждать, что мощность тета-ритма имеет наибольшую корреляцию с положением животного в лабиринте. Все диапазоны гамма-ритма проявляют низкую пространственную модуляцию и статистически достоверно не отличаются друг от друга. Этот результат показывает, что в генерацию гамма-ритмов вовлечены не только активные нейронные ансамбли, но и соседние нейроны.

L-DOPA КАК РЕГУЛЯТОР ФУНКЦИИ ЯИЧНИКА

Дубровская А.С.¹, Кисель А.А.², Ткаченко М.Д.², Никишина Ю.О.¹

¹Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

²МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

a.s.dubrovskaya@yandex.ru

L-дезоксифенилаланин (L-DOPA) ранее всегда рассматривался, как промежуточный продукт синтеза катехоламинов. В последние годы появились данные о том, что он выполняет самостоятельные функции в центральной нервной системе. Так же был обнаружен рецептор – GPR143, для которого L-DOPA является эндогенным лигандом. Так, для глаза L-DOPA выполняет регуляцию ангиогенеза посредством данного рецептора. А вот функции L-DOPA в других органах на данный момент практически не изучены. Профиль экспрессии GPR143 в различных тканях, помимо кожи и глаз, на данный момент очень плохо описан. Согласно анализу транскриптомных данных в яичнике наблюдается очень высокий уровень экспрессии GPR143, что может свидетельствовать о его важной функциональной роли в данном органе.

Цель нашей работы – проверить наличие данного рецептора в яичнике и оценить его функциональную активность.

В ходе выполнения работы в первую очередь мы показали экспрессию рецептора GPR143 на уровне мРНК и белка в яичнике. Данный рецептор локализован в ооцитах на всех стадиях развития фолликула.

Ранее было показано, что L-DOPA через рецептор GPR143 способен регулировать процесс ангиогенеза в сетчатке глаза путем влияния на экспрессию ангиогенных факторов. В яичнике, в отличие от любого другого органа, процесс ангиогенеза является активным и обусловлен циклическими изменениями, организованными чередующимися периодами гормональной стимуляции. В связи с этим, мы предположили, что в яичнике L-DOPA также может участвовать в процессе ангиогенеза.

Работа проводилась на органотипической культуре яичников половозрелых самок мышей C57Bl/6 в присутствии L-DOPA в разных концентрациях (1мкМ и 0,1 мкМ). В ходе работы было выявлено, что L-DOPA оказывает стимулирующее влияние на выделение такого важного антиангиогенного фактора, как фактор роста, полученный из пигментного эпителия (PEDF), что в свою очередь снижает уровень проангиогенного фактора – фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) в ткани яичника.

Таким образом, в ходе данной работы мы показали, что в яичниках млекопитающих экспрессируется и является функционально активным рецептор GPR143, а его лиганд L-DOPA способен оказывать влияние на процесс ангиогенеза в яичнике посредством контроля уровня проангиогенных и антиангиогенных факторов PEDF и VEGF.

В связи с тем, что большинство патологий яичника, таких как синдром поликистозных яичников, синдром гиперстимуляции яичников, эндометриоз и другие, сопряжено с нарушением ангиогенеза, полученные данные могут иметь важное прикладное значение.

Работа поддержана грантом РФФИ № 23-24-00621.

СОДЕРЖАНИЕ ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗ, МЕТИЛИРОВАННЫХ ГИСТОНОВ И ИНДЕКС SAM/SAH В ПЛАЦЕНТЕ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ

Дудина В.А., Михель А.В., Бочковский С.К., Горбова А.В.

Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии
им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия

dudinavalymail.ru

Введение. Гипергомоцистеинемия (ГГЦ) – это патологическое состояние, характеризующееся повышенным содержанием гомоцистеина в крови. В клетках из донора метильных групп S-аденозилметионина (SAM) образуется S-аденозилгомоцистеин (SAH), являющейся ингибитором активности ДНК-метилтрансфераз, в частности DNMT3a и DNMT3b. Соотношение SAM/SAH рассматривается как маркер потенциала клеточного метилирования [1]. Однако имеются данные, что повышенный уровень SAH является более информативным показателем, по сравнению с анализом соотношения SAM/SAH [2]. На данный момент имеются неоднозначные сведения о возможных нарушениях эпигенетической регуляции экспрессии генов при ГГЦ, в том числе в отношении изменения метилирования и ацетилирования гистонов [3]. Во время беременности у плода детерминируются процессы метилирования ДНК, что определяет важность оценки воздействия компонентов, изменяющих биодоступность и транспорт метильных групп.

Цель. Оценить влияние ГГЦ на уровень метилированных форм гистона H3, содержание SAM, SAH, DNMT3a и DNMT3b, соотношение SAM/SAH на 14-ый (E14) и 20-ый день беременности (E20) в плаценте.

Материалы и методы. Самок крыс линии Wistar разделили на две группы: контрольной группе с 4-го дня беременности и до дня родоразрешения ежедневно перорально вводили воду, подопытной – раствор метионина (0,6 г/кг массы). В материнской (МЧП) и плодной (ПЧП) частях плаценты на E14 и E20 было проведено исследование содержания SAM и SAH с помощью иммуноферментного анализа, DNMT3a, DNMT3b и триметилированного гистона H3 по 4-му (H3K4me3) и 9-му (H3K9me3) лизину при помощи Western-Blot метода.

Результаты. В опытной группе на E20 не наблюдалось изменений содержания DNMT3a, DNMT3b и SAM/SAH в МЧП. В группе с материнской ГГЦ в ПЧП на E20 было показано достоверное ($p < 0,05$) понижение SAM в 1,7 раза и повышение SAH в МЧП в 1,27 раза ($p < 0,05$) относительно контроля. В ПЧП выявлено понижение SAM/SAH в 1,7 раз и H3K4me3 в 1,6 раз относительно контроля ($p < 0,05$). В МЧП было показано статистически значимое повышение H3K9me3 в 1,4 раза ($p < 0,05$).

Выводы. Характер изменения соотношения маркера SAM/SAH в ПЧП и повышение уровня SAH в МЧП к концу беременности, может указывать на нарушение процессов метилирования в плаценте на фоне ГГЦ. Различия в содержании метилированных форм гистона H3 говорит о нарушении эпигенетической регуляции экспрессии генов в плаценте при ГГЦ.

Поддержано грантом РФФИ №22-15-00393.

Список источников

1. J. Loscalzo, D.E. Handy, Epigenetic modifications: basic mechanisms and role in cardiovascular disease (2013 Grover Conference series), *Pulm Circ*, 4 (2014) 169-174;
2. M.A. Caudill, J.C. Wang, S. Melnyk, I.P. Pogribny, S. Jernigan, M.D. Collins, J. Santos-Guzman, M.E. Swendseid, E.A. Cogger, S.J. James, Intracellular S-adenosylhomocysteine concentrations predict global DNA hypomethylation in tissues of methyl-deficient cystathionine beta-synthase heterozygous mice, *J Nutr*, 131 (2001) 2811-2818;
3. J. Perla-Kajan, H. Jakubowski, Dysregulation of Epigenetic Mechanisms of Gene Expression in the Pathologies of Hyperhomocysteinemia, *Int J Mol Sci*, 20 (2019).

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРА P13K LY294002 И ЕГО НЕАКТИВНОГО АНАЛОГА LY303511 НА Ca^{2+} - И cAMP-СИГНАЛИЗАЦИЮ, ИНИЦИИРУЕМЫЕ СЕРОТОНИНОМ

Дымова Е.А., Рогачевская О.А., Котова П.Д.

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

dymova.ek.a@gmail.com

Серотонин является важным нейромедиатором, чувствительность клеток к которому обеспечивают 5-НТ-рецепторы, большая часть которых сопряжена с G-белком. В зависимости от типа 5-НТ-рецепторов, сигнал о связывании с лигандом усиливается посредством фосфолипазного или аденилатциклазного сигнальных путей, активация которых приводит к значительному изменению внутриклеточных концентрации Ca^{2+} или cAMP, соответственно. В данной работе мы исследовали влияние ингибитора P13K LY294002 (LY294) и его неактивного аналога LY303511 (LY303) на индуцированные серотонином Ca^{2+} - и cAMP-сигналы индивидуальных клеток НЕК-293.

Мониторинг внутриклеточного Ca^{2+} проводили на клетках НЕК-293, гетерологически экспрессирующих рецептор 5-НТ2С, с помощью флуоресцентного Ca^{2+} -зонда Fluo-8 методом микрофотометрии. Кратковременная стимуляция этих клеток серотонином инициировала в них Ca^{2+} -ответы, которые полностью подавлялись в присутствии ингибитора P13K LY294. Тот факт, что подавление ответов в присутствии LY294 наблюдалось без предварительной инкубации с ним, хотя обычно ингибирование внутриклеточных мишеней требует времени для проникновения ингибитора через плазматическую мембрану, говорит о том, что оно могло быть связано не с ингибированием P13-киназы, а обусловлено прямым действием данного вещества на рецептор. При этом его аналог LY303, неактивный по отношению к P13K, инициировал Ca^{2+} -ответы в клетках с 5-НТ2С рецептором, тогда как в клетках НЕК-293 дикого типа, не экспрессирующих данный рецептор, подобного эффекта не наблюдалось. Перечисленное указывает на то, что LY303 неспецифическим образом активирует 5-НТ2С рецептор.

Мониторинг cAMP-сигналов проводили на клетках НЕК-293, экспрессирующих рецептор 5-НТ4 и генетически кодируемый сенсор cAMP (Pink Flamindo). Выяснилось, что LY294 не оказал никакого действия на cAMP-ответы, инициируемые серотонином, тогда как LY303 значительно уменьшал амплитуды cAMP-ответов даже без предварительной инкубации с ним. Перечисленное свидетельствует о том, что P13K не задействована в генерации cAMP-ответов на серотонин, а также что LY303 подавлял cAMP-ответы на серотонин вследствие его неспецифического действия.

Для установления неспецифической мишени LY303 и LY294 мы исследовали Ca^{2+} - и cAMP-ответы исследовавшихся клеток на аденозин, которые также генерируются при участии фосфолипазного и аденилатциклазного путей. Оказалось, что ни одно из исследуемых соединений не влияло на способность клеток генерировать ответы на аденозин, что исключает возможность воздействия этих соединений на внутриклеточные компоненты фосфолипазного и аденилатциклазного сигнальных путей.

Таким образом, P13K не задействована в генерации Ca^{2+} - и cAMP-ответов на серотонин, а описанные эффекты ингибитора P13K LY294 и его неактивного аналога LY303 могут быть связаны с их прямым действием на серотониновые 5-НТ2С и 5-НТ4 рецепторы.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 19-75-10068.

ПРОИЗВОДНЫЕ 2-АМИНОБЕНЗИМИДАЗОЛА ПОТЕНЦИРУЮТ ОТКРЫТОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОТОН-АКТИВИРУЕМЫХ ИОННЫХ КАНАЛОВ С МЕДЛЕННОЙ КИНЕТИКОЙ АКТИВАЦИИ И ДЕСЕНСИТИЗАЦИИ

Евланенков К.К., Николаев М.В., Дронь М.Ю.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

konstantin361@iephb.ru

Протон-активируемые ионные каналы (ASICs) широко представлены в центральной и периферической нервной системе позвоночных животных. ASICs активируются быстрым падением pH внеклеточной среды. Известные модуляторы данных каналов можно разделить на несколько классов: эндогенные регуляторы, синтетические соединения, пептидные токсины из ядов растений и животных. Известно большое количество высокоактивных и селективных соединений, действующих на ASIC1a и ASIC3, но не для ASIC2a. Мемантин, ИЭМ-1921, ИЭМ-2115 и тианептин, обнаруженные ранее, селективно действуют на ASIC2a, но обладают слабой активностью. В данной работе рассматривалось действие производных 2-аминобензимидазола, напоминающего по строению известные модуляторы ASICs амилорид и GMQ.

Эксперименты проводились на рекомбинантных рецепторах, трансфицированных в клетках линии CHO и на изолированных пирамидных нейронах 2 и 3 слоя медиальной префронтальной коры. Регистрация токов осуществлялась методом локальной фиксации потенциала в конфигурации «целая клетка» при потенциале фиксации -80 мВ.

2-аминобензимидазол селективно потенцировал ответы ASIC3. Соединение Ru-1355 (100 мкМ) потенцировало ответы ASIC2a, гетеромерных ASIC1a/ASIC2a, и слабо усиливало ответы нативных ASICs. Самое активное соединение Ru-1199 (100 мкМ) сильно потенцировало ответы ASIC2a и усиливало ответы нативных ASICs, ASIC1a и ASIC3. В концентрации 3 мкМ Ru-1199 селективно потенцирует ответы ASIC2a. Потенцирующий эффект соединений сильно зависел от pH внеклеточного раствора. Стационарные токи у ASIC2a и ASIC3 ответов менее чувствительны к блокатору диминазону, чем пиковые токи. Та же ситуация у ответов, усиленных производными 2-аминобензимидазола.

Действие модуляторов ASICs происходит обычно по одному из 3 механизмов: блокада поры (амилорид, мемантин), смещение кривой активации (GMQ, 9AA), смещение кривой равновесной десенситизации (GMQ, гистамин). В то же время, различная чувствительность пикового и медленно десенситизирующего стационарного компонента ответов ASIC2a и ASIC3 в присутствии производных 2-аминобензимидазола к блокатору пор диминазону не объясняется смещением кривой активации в щелочную сторону. Можно предположить, что пиковый и стационарный ток опосредуются разными открытыми состояниями канала. Таким образом, производные 2-аминобензимидазола представляют собой новый класс соединений, потенцирующих открытое состояние канала с медленной кинетикой активации и десенситизации.

**ГВАЗ ОПОСРЕДУЕТ СЕНОЛИТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ИНГИБИТОРА HSP90 β НА
КЛЕТКИ Caco2 ПРИ ИХ СЕНЕСЦЕНЦИИ, ВЫЗВАННОЙ РАДИАЦИЕЙ**

**Ерилина Д.А.¹, Глушкова О.В.^{1,2}, Парфенюк С.Б.², Хренов М.О.², Кузекова А.А.²,
Лунин С.М.², Холмуродов Х.Т.¹, Шарапов М.Г.²**

¹Кафедра химии, новых технологий и материалов Государственного университета «Дубна»,
Дубна, Россия

²Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение
Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный
исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований
Российской академии наук», Пушино, Россия

glushckova@mail.ru

Сенесценция клеток, защитный ответ на различные сигналы стресса, характеризуется стабильным прекращением клеточного цикла и значительными изменениями в морфологии и физиологии клеток, приводящие к формированию агрессивного фенотипа, ассоциированного со старением (SASP). К признакам сенесцентных клеток относят накопление SA- β -Gal, изменение клеточного метаболизма в результате митохондриальной дисфункции, макромолекулярные повреждения, стресс ЭПР и сверхэкспрессию или активацию ингибиторов клеточного цикла p16, p21 и p53. Учитывая тот факт, что стареющие клетки избегают иммунного клиренса и имеют ряд противоапоптозных механизмов, включая гиперактивацию защитных белков теплового шока HSP90, они представляют собой перспективную мишень терапии возраст-ассоциированных заболеваний. Если процесс сенесценции здоровых клеток, способствующий паракринному старению близлежащих клеток тканей и органов, является индуктором ассоциированных с возрастом заболеваний, то сенесценция раковых клеток делает их более чувствительными к сенолитической терапии. На сегодняшний день комбинация индуцирующих старение методов и сенолитической терапии является перспективной стратегией лечения онкологических заболеваний.

Целью настоящей работы явилось изучение механизмов комбинированного воздействия на клетки карциномы толстой кишки человека Caco2 высоких доз рентгеновского излучения с последующей сенолитической терапией. В качестве сенолитического агента был использован селективный ингибитор HSP90 β – KUNB31, сенотерапевтический потенциал которого была показан нами ранее.

Нами было показано, что добавление ингибитора в культуре клеток Caco, облученным в дозе 20 Гр, вызывает снижение содержания сенесцентных клеток на фоне усиления гибели этих раковых клеток. Удивительно, но добавление KUNB31 к культуре клеток сопровождалось накоплением цитозольной глюкозидазы с широким спектром функций бета-глюкозидазы GBA3.С помощью метода молекулярно-динамического моделирования мы исследовали возможность связывания цитозольных изоформ HSP90 (α и β) с бета-глюкозидазой GBA3. Для HSP90 β , но не для HSP90 α , обнаружили независимое от ориентации белков связывание на относительно малом расстоянии между ними. Удивительно, но в случае ингибирования NT-домена HSP90 β был обнаружен устойчивый, долгоживущий комплекс с GBA3, что, возможно, указывает на то, что GBA3 стабилизирует неактивную форму HSP90 β , но не HSP90 α . По-видимому, GBA3 способен стабилизировать неактивное состояние HSP90 β путем прямого физического связывания с белком, тем самым усиливая сенолитическое действие KUNB31 при вызванной радиацией сенесценции раковых клеток.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 24-24-00070.

МЕХАНИЗМЫ ИНГИБИРОВАНИЯ ИОНОТРОПНЫХ ГЛУТАМАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ НАФАМОСТАТОМ И СЕПИМОСТАТОМ

Жигулин А.С., Барыгин О.И.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

arseniy.zhigulin@yandex.ru

Нафамостат – ингибитор сериновых протеаз, применяющийся в клинической практике как антикоагулянт. Помимо своего основного действия, он известен как нейропротекторный ингибитор ионотропных глутаматных рецепторов NMDA типа. При этом ни механизмы ингибирования NMDA рецепторов, ни активность по отношению к другим важным типам ионотропных глутаматных рецепторов – кальций-непроницаемым и кальций-проницаемым AMPA рецепторам – ранее не исследовались. Поэтому мы решили изучить более подробно механизмы ингибирования NMDA и AMPA рецепторов нафамостатом и его структурным аналогом – сепимостатом.

Эксперименты проводились на изолированных нейронах крыс линии Вистар (13-18 дней). Для NMDA и кальций-непроницаемых AMPA рецепторов использовались пирамидные нейроны зоны CA1 гиппокампа, для кальций-проницаемых AMPA рецепторов – гигантские интернейроны стриатума. Изоляция нейронов из срезов осуществлялась методом вибродиссоциации. Регистрация трансмембранных токов, вызванных аппликацией агонистов, проводилась методом локальной фиксации потенциала в конфигурации «целая клетка» при потенциале -80 мВ.

Нафамостат и сепимостат ингибировали NMDA рецепторы концентрационно-зависимым образом, значения IK_{50} составили 0.20 ± 0.04 и 3.5 ± 0.3 мкМ, соответственно. Нафамостат действовал потенциал-зависимо ($z\delta = 1.1 \pm 0.1$), у сепимостата наблюдалась как потенциал-независимая, так и потенциал-зависимая ($z\delta = 0.6 \pm 0.2$) компонента. Учитывая, что при физиологическом pH нафамостат и сепимостат имеют заряд $+2$ и $+1$, соответственно, значение δ для обоих соединений составило ~ 0.6 , что предполагает схожий сайт связывания в поре ионного канала NMDA рецептора. Ни нафамостат, ни сепимостат не проявляли признаков «ловушки», но демонстрировали хвостовые токи, что свидетельствует о блокаде ионного канала по механизму «foot-in-the-door». При этом потенциал-независимая компонента действия сепимостата была связана с неконкурентным ингибированием по дополнительному поверхностному сайту.

Оба соединения оказались слабо активными по отношению к кальций-непроницаемым AMPA рецепторам ($IK_{50} > 100$ мкМ). Значения IK_{50} для кальций-проницаемых AMPA рецепторов составили 55 ± 24 и 56 ± 6 мкМ для нафамостата и сепимостата, соответственно, что предполагает отсутствие влияния их структурных отличий на активность. Потенциал-зависимости действия обоих соединений хорошо описывались уравнением для блокаторов, способных проникать через канал внутрь клетки, значения δ составили 0.76 ± 0.16 для нафамостата и 0.88 ± 0.12 для сепимостата. Сепимостат демонстрировал способность оставаться в «ловушке» закрытого канала и высвободиться из неё внутрь клетки, что характерно для классических блокаторов кальций-проницаемых AMPA рецепторов и хорошо соотносится с глубоким расположением его сайта связывания.

Таким образом, нафамостат и сепимостат блокируют NMDA рецепторы по механизму «foot-in-the-door» и AMPA рецепторы – по механизму «ловушка». Так как эти механизмы предполагают разные эффекты блокаторов на синаптическую передачу, исследование таких соединений, как нафамостат и сепимостат, может быть полезно при разработке новых нейропротекторных лекарственных препаратов. Кроме того, данное исследование может способствовать перепрофилированию нафамостата и лучшему пониманию его побочных эффектов. Исследование поддержано Минобрнауки РФ (Соглашение № 075-15-2022-296 на создание и развитие НЦМУ «Павловский центр»).

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЛОДОВ ТОМАТА ДЛЯ РАЗРУШЕНИЯ ЗУБНОГО КАМНЯ

Задорина И.И., Тризна Е.Ю., Саченков О.А., Каюмов А.Р.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

zadorina1994@icloud.com

По сведениям ветеринарных стоматологов, образование налета у собак приблизительно происходит к 2-3 годам жизни в зависимости от породы животного. На зубах постепенно откладывается тонкий зубной налет из слюны и бактерий резидентной микрофлоры ротовой полости, частиц корма, эпителия, некоторых минеральных соединений. Если налет остается на эмали зуба в течение примерно 12 дней, то он постепенно пропитывается солями и затвердевает (процесс минерализации), прочно прикрепляется к поверхности зуба образуя зубной камень. Если не принять меры по удалению зубного камня животных, то постепенно он увеличивается в размерах, мешает правильному смыканию челюстей и пережевыванию пищи, вызывает воспаление десны и отхождение её края от корня зуба, вследствие чего инфекция проникает вглубь и вызывает воспаление окружающих зуб тканей, вплоть до вовлечения в процесс соседних зубов, костной ткани и разрушения костей челюсти.

Самым распространенным методом на сегодняшний день для удаления зубного камня, является механическая очистка с помощью ультразвукового скалера. Эти манипуляции неприятны, и животное не станет их терпеть, поэтому в обязательном порядке применяют общую анестезию.

В работе мы использовали общедоступный продукт питания – плоды томата, которые предупреждают образование и разрыхляют зубные отложения в полости рта животного вследствие наличия в них естественных действующих компонентов, которые обладают свойствами размягчать и разрушать зубные камни.

Анализ показал, что обработка 1% суспензией томатной пасты в течение 5 дней приводит к снижению объема камня в 1.2 раз, 10 дней приводит к снижению объема камня в 2,7 раз, 15 дней приводит к снижению объема камня в 5,2 раз и 20 дней обработки снижает объем камня в 7.7 раз. Обработка в течение 5 дней зубного камня на поверхности зуба приводит к разрыхлению камня и позволяет механически его удалить.

По результатам рентгенофлуоресцентного анализа (РФА) на 20 день происходит достоверное снижение содержания кальция (Ca), фосфора (P), поскольку Ca и P являются основными элементами, ответственными за минерализацию зубного камня, снижение их количества снижает прочность камня, тем самым происходит разрыхление и разрушение самого камня. Прочность зубного камня до и после обработки суспензией томата оценивали с помощью испытательной установки, которая показала, что разрушение обработанного образца происходило уже на первом уровне (при энергии 328 ± 4 мкДж). Разрушение происходило по поперечному сколу, при этом скол характеризовался плоской поверхностью образца. Зубной камень без обработки не разрушался на всех уровнях.

Таким образом, плоды томата обладают свойствами размягчать и разрушать зубные камни. Подход защищен заявкой на патент РФ (№ 2023122079).

Работа выполнена за счет средств субсидий, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности. Проект № FZSM-2022-0017.

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА «КОНФУМИН» НА РАЗВИТИЕ МЕХАНИЗМОВ ЗАЩИТЫ КЛЕТОК ПОЧЕК ОТ ПОВРЕЖДЕНИЙ, ОБУСЛОВЛЕННЫХ ГИПОКСИЕЙ

Закржевская В.Д.¹, Беляков Д.Ю.¹, Попов Д.Ю.¹, Давыдова Е.Ю.², Талызёнок А.Д.²,
Шестакова А.В.²

¹Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, Орел, Россия

²Детский технопарк «Кванториум» – структурное подразделение БУОДО «Дворец
пионеров и школьников имени Ю.А. Гагарина»

esenkovitalina@gmail.com

Препарат «Конфумин», разработанный НИИ гематологии и трансфузиологии, представляет собой инфузионный раствор фумарата натрия с антигипоксическим действием для внутривенного введения. Одной из областей его применения выступают операции частичной нефрэктомии по удалению небольших локализованных злокачественных новообразований почек. Весьма важным условием успешности таких операций является временное прекращение кровоснабжения резецируемого органа, которое достигается за счет тепловой ишемии. Однако, чем дольше продолжается развивающаяся при этом гипоксия, тем больше формируется недостаток АТФ в клетках почки, на фоне которой усиливается образование активных форм кислорода и другие патологические процессы, приводящие в зависимости от степени развития к обратимым или летальным повреждениям. Достижение максимальной эффективности снижения возможных отрицательных последствий тепловой ишемии при использовании препарата «Конфумин» возможно за счет оптимизации порядка его применения, что требует детального понимания механизмов антигипоксического действия фумарата натрия.

В соответствии с описанием, препарат активизирует адаптацию клетки к недостатку кислорода путем обеспечения синтеза митохондриями АТФ в отсутствие кислорода. Для проверки такой возможности нами была использована *in vitro* модель острой гипоксии, при которой клетки культуры эпителия почек MDCK инкубировали с дитионитом натрия, способным обеспечивать низкое содержание растворенного кислорода в среде. Методом конфокальной микроскопии с использованием флуоресцентного зонда TMRM было выявлено, что в условиях удаления кислорода дальнейшее внесение, блокирующего АТФ-синтазу олигомицина А приводит к деполяризации митохондрий, что говорит о работе фермента в инверсном режиме и исключает образование макроэрга. Таким образом, гипотеза о восстановлении АТФ-синтезирующей функции митохондрий не работает как минимум в экспериментах *in vitro*. Стоит отметить, что при этом фумарат натрия все-таки приводит к увеличению митохондриального мембранного потенциала, что в свою очередь обуславливает кратковременный рост скорости образования активных форм кислорода (АФК).

Последний факт наряду со способностью как фумарата, так и сукцината блокировать HIF-пролилгидроксилазы позволяет предположить, что механизм действия «Конфумина» может быть связан с накоплением фактора HIF1 α . С целью проверки данной гипотезы с применением зонда VEGF методом флуоресцентной микроскопии мы выяснили, что в условиях нормоксии фумарат натрия приводит к существенному закислению цитоплазмы клеток, что может выступать косвенным подтверждением усиления реакций гликолиза с накоплением лактата. А значительное увеличение скорости накопления клетками флуоресцентного аналога глюкозы 2-NBDG свидетельствует о повышенном уровне глюкозных транспортеров, положительная регуляция экспрессии генов которых, так же, как и генов ключевых ферментов гликолиза, характерна для фактора HIF1 α .

Таким образом, в условиях моделирования гипоксии *in vitro* фумарат натрия не восстанавливает функцию синтеза АТФ митохондриями, но за счет стимулирования образования АФК, а также ингибирования HIF-пролилгидроксилаз ведет к закислению цитоплазмы клеток и увеличению трансмембранного транспорта глюкозы, что говорит о возможной стабилизации HIF1 α и активации соответствующих клеточных механизмов защиты от гипоксии.

ПОСТИНСУЛЬТНЫЕ КОГНИТИВНЫЕ НАРУШЕНИЯ И ДЕПРЕССИВНЫЕ
РАССРОЙСТВА: СВЯЗЬ С МОРФОМЕТРИЧЕСКИМИ ПАРАМЕТРАМИ
СТРУКТУР ГОЛОВНОГО МОЗГА

Иерусалимский Н.В.^{1,2}, Самогаева И.С.^{1,2}, Каримова Е.Д.^{1,2}, Жанина М.Ю.^{1,2},
Дружкова Т.А.², Гуляева Н.В.^{1,2}

¹Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук,
Москва, Россия

²Научно-практический психоневрологический центр имени З.П. Соловьева Департамента
здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

ierusalimskii.nv14@physics.msu.ru

Последствиями ишемического инсульта (ИИ) могут быть постинсультные когнитивные нарушения (ПКН) и постинсультные депрессивные расстройства (ПДР). Причины их развития до сих пор остаются малоизученными, не выявлены однозначные связи с тяжестью и локализацией инфаркта мозга.

Гипотеза: предполагается, что предсуществующие изменения в определенных структурах головного мозга могут быть ассоциированы с развитием ПДР и ПКН, и в этом случае последствия ИИ можно рассматривать в рамках концепции «двух ударов», первым из которых являются предшествующие ИИ изменения мозга, а вторым – непосредственно ИИ. В этом случае объемы структур мозга в ранний период инсульта могли бы быть предикторами развития постинсультных когнитивных и депрессивных нарушений.

Цель исследования: проверить поставленную гипотезу и выявить структуры, ассоциированные с развитием каждого типа постинсультных нарушений. Также проанализировать связи объемов структур и психометрических шкал.

Методика: В исследовании приняли участие 23 пациента (18 мужчин, 5 женщин, средний возраст 57 ± 11 лет) с легким или умеренным ИИ, проходившие лечение в Государственном бюджетном учреждении здравоохранения им. Кончаловского. Оценка неврологических, психиатрических и когнитивных показателей состояния испытуемых проводилась на 1-е, 30-е, 180-е и 365-е сутки после ИИ. МРТ головного мозга проводили на сканере с индукцией магнитного поля 1,5 Тл («SIGNA» HDxt, GE Medical systems, США) в острый период ИИ. Для получения анатомического изображения использовали последовательность IR-FSPGR-3DT1 ax. Определение морфометрических характеристик структур головного мозга выполняли с помощью пакета программ FreeSurfer 7.2.0.

В ходе исследования пациенты были разделены на четыре подгруппы: пациенты без ПКН и с ним, пациенты без ПДР и с ним. Были рассмотрены структуры коры и подкорки. Значения объемов структур были нормированы на индивидуальные полные внутречерепные объемы. Для сравнения выборок использовали t-тест Стьюдента или тест Манна-Уитни (для несвязанных) и t-тест Стьюдента или тест Вилкоксона (для связанных). Корреляции считали при помощи теста Спирмена.

Результаты: в группе пациентов с ПДР по сравнению с пациентами без ПДР объем гиппокампа, энторинальной коры и височного полюса был достоверно меньше. У пациентов с ПКН по сравнению с пациентами без ПКН объем височного полюса и супрамаргинальной извилины был достоверно меньше.

Выводы: сниженные объемы гиппокампа, энторинальной коры, височного полюса и супрамаргинальной извилины в ранний период ИИ могут быть предикторами развития ПКН и ПДР. Полученные результаты не противоречат выдвинутой гипотезе, однако требуется ее дальнейшая валидизация.

ДИНАМИКА КОГНИТИВНЫХ НАРУШЕНИЙ И ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ-РЕГУЛЯТОРОВ НЕЙРОГЕНЕЗА И АПОПТОЗА В МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

**Инокентьева В.И., Грудень М.А., Соловьева О.А., Михайлова Н.П.,
Ратмиров А.М., Сторожева З.И.**

Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и
фармацевтических технологий, Москва, Россия

inokenteva_vi@academpharm.ru

Болезнь Паркинсона (БП) – хроническое нейродегенеративное заболевание, ключевым молекулярным механизмом развития которого является отложение различных амилоидогенных форм нейронального белка α -синуклеина (α -син), вызывающих гибель нервных и/или глиальных клеток различных структур мозга. При этом развиваются моторные, вегетативные и когнитивные нарушения, которые в свою очередь сопряжены с измененными процессами рождения и гибели клеток. До сих пор мало изучено, какие генетические перестройки модулируют процессы нейрогенеза и апоптоза при развитии БП.

Цель работы – изучение динамики отсроченных эффектов хронического интраназального введения амилоидогенных олигомеров α -син молодым половозрелым мышам C57BL/6J на ориентировочно-исследовательскую активность и кратковременную память, а также экспрессию генов-регуляторов нейрогенеза (*Ascl1*, *S100a6*) и апоптоза (*Cas9*, *Cas8*, *Cas3*) в гиппокампе, префронтальной коре и мозжечке мозга при старении.

Методы. Для исследования использовали две группы мышей: животным экспериментальной группы ежедневно в течение 14-ти дней интраназально вводили олигомеры α -син (0,48 мг/кг), а мышам контрольной группы в том же режиме – физиологический раствор. После окончания введения препарата животных тестировали в модели «Распознавания нового объекта» и проводили генетические исследования в возрасте 3, 6 и 12 месяцев. Для генетических экспериментов в качестве контроля использовали нативную группу животных того же возраста и пола, не подвергавшуюся поведенческим тестам. Для изучения экспрессии генов *Ascl1*, *S100a6*, *Cas9*, *Cas8*, *Cas3* в церебральных структурах применяли метод ПЦР в реальном времени.

Результаты. В возрасте 3-х месяцев статистически значимым было снижение скорости передвижения экспериментальных животных во время сеанса тестирования, при этом было выявлено повышение экспрессии генов *S100a6* и *Ascl1* в префронтальной коре и снижение активности *Ascl1* в мозжечке. Активность генов *Cas8* и *Cas9* повышалась в гиппокампе и префронтальной коре, увеличилась экспрессия *Cas8* в мозжечке, а также выявлено угнетение *Cas3* во всех исследуемых структурах. У 6-ти месячных мышей отмечено статистически значимое снижение скорости движения экспериментальных животных в сеансах адаптации и тестирования, снижение общего времени исследования объектов в сеансе адаптации, избирательное уменьшение длительности и повышение времени до начала исследования нового объекта в сеансе тестирования. В этом же возрасте наиболее значимым было только повышение экспрессии *Cas9* в префронтальной коре. В экспериментальной группе 12-ти месячных мышей выявлено снижение показателя инициации исследовательской активности, в сеансе тестирования отмечено снижение времени исследовательской активности в отношении знакомого объекта. Статистически значимое снижение экспрессии *Ascl1* выявлено в префронтальной коре и мозжечке, угнетение *Cas9* и *Cas3* в префронтальной коре и гиппокампе, а также повышение активности *Cas8* в мозжечке.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о том, что при воздействии амилоидогенных олигомеров α -син наблюдается не только их токсическое действие, но и выявляются компенсаторные процессы, специфичные для определенных возрастных периодов, что дополняет патогенетические механизмы БП и процессы развития когнитивных отклонений при данном заболевании, что в будущем может быть использовано для разработки новых методов лечения, диагностики и прогноза состояния.

ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ БЕТА-АМИЛОИДНОГО БЕЛКА НА МОДЕЛИ ЖИВОТНЫХ С ДИАБЕТОМ 3-ГО ТИПА

**Ишанходжаев Т.М., Артыкбаева Г.М., Мустафакулов М.А.,
Ибрагимова Э.А., Саатов Т.С.**

Институт биофизики и биохимии при Национальном Университете Узбекистана им. М.
Улугбека, Ташкент, Узбекистан

gulnoraar@rambler.ru

Недавно открытая форма сахарного диабета (СД) получила название сахарного диабета 3 типа (СД 3). Исследователи предложили рассматривать данное заболевание как метаболический синдром, который может привести к прогрессирующей инсулинорезистентности ткани головного мозга с последующим нарушением процессов передачи сигналов посредством инсулина, развитием нейронального стресса и, в итоге, нейродегенерации. Болезнь Альцгеймера (БА) – комплексное нейродегенеративное заболевание, в первую очередь характеризующееся когнитивным дефицитом, прогрессирующей гибелью нейронов и накоплением сенильных бляшек и нейрофибриллярных клубков в результате агрегации β -амилоида.

Целью нашей работы было изучение экспрессии маркера нейродегенерации бета-амилоидного белка (А β) в различных срезах мозга животных с моделью СДЗ.

Материалы и методы. Для воспроизведения спорадического нейродегенеративного состояния с симптомами БА крыс кормили специальной диетой, которая включала вместе со стандартной диетой, дополнительную высококалорийную. Мерказалол в объеме 0,04-0,06 мг на крысу вводили для снижения обмена веществ. После достижения среднего уровня глюкозы в крови 7-8 мМ экспериментальной группе животных интраназально в липосомах вводили нейротоксин. А β определяли методом иммунопреципитации поликлональными антителами. Белки разделяли электрофорезом с SDS-Page (Bio-Rad Laboratories), проводили иммуноблоттинг с использованием кроличьих антител, конъюгированных с пероксидазой хрена и результаты количественно оценивали с помощью Scion Image в единицах средней интенсивности сигнала.

Результаты и обсуждение. Экспрессию А β изучали в различных отделах мозга: гиппокампе, стриатуме и обонятельной луковице. В группе, содержащейся на высококалорийной диете, содержание А β увеличивается на 75% по сравнению с контролем, в отделах гиппокампа. В стриатуме отмечается незначительное увеличение экспрессии. В обонятельной луковице экспрессия А β повышена на 60%. В группе, в которой наряду с высококалорийной диетой вводили нейротоксин, наблюдается увеличение А β по сравнению с контролем на 150% в гиппокампе, на 45% в срезах стриатума и на 68 % в ткани обонятельной луковицы. Результаты исследования показывают, что во всех исследованных срезах мозга увеличивается уровень А β , причем наибольшее увеличение отмечается в гиппокампе, где, как известно, находятся центры памяти.

АТФ-ВЫЗВАННЫЕ КАЛЬЦИЕВЫЕ СИГНАЛЫ В НЕЙРОНАХ ТРОЙНИЧНОГО ГАНГЛИЯ КРЫСЫ ПРИ ДЕЙСТВИИ ГОМОЦИСТЕИНА

Кабирова А.А., Ермакова Е.В., Ситдикова Г.Ф.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

kaalai@bk.ru

Мигрень находится на седьмом месте в списке причин нетрудоспособности и затрагивает около 15% населения планеты. Местом начала мигренозной атаки являются окончания тройничного нерва. Интересно влияние гомоцистеина на тройничный нерв: клинические данные показывают, что повышение концентрации гомоцистеина в крови провоцирует приступы мигрени. К тому же известно, что в инициацию и распространение болевых ощущений вовлечен аденозинтрифосфат (АТФ). Он действует несколькими путями: вызывает изменения сосудистого тонуса, участвует в распространении корковой депрессии, вовлечен в дегрануляцию тучных клеток, которые, в свою очередь, выделяют провоспалительных соединения, и активирует нейрон-глиальный сигналинг. Кроме того, АТФ напрямую возбуждающе действует на нейроны, повышая способность афферентов к ноцицепции. Поэтому для определения потенциальных механизмов сенситизации тройничного нерва при высоком уровне гомоцистеина была проанализирована АТФ-зависимая ноцицепция посредством кальциевого имиджинга с применением маркера Fluo-3 и -4 АМ (2 мкМ). В эксперименте производились аппликации АТФ (100 мкМ, 2 с), АДФ (100 мкМ, 2 с), капсаицина (1 мкМ, 2 с) и КС1 (50 мМ, 2 с).

В условиях пренатальной гипергомоцистеинемии (гГЦ) в нейронах тройничного ганглия крысы происходит повышение параметров Ca^{2+} -сигналов в ответ на АТФ: амплитуда увеличивается с 0,53 о.е. ($(gv-gv_0)/gv_0$, где gv – средняя яркость пикселя (grey value) измеряемого сигнала, gv_0 – средняя яркость пикселя фона) в контроле до 0,78 о.е. при гГЦ, площадь с 0,34 до 0,7 о.е., длительность с 0,85 до 1,01 с; но процент отвечающих клеток остался неизменен (52-53%). Напротив, амплитуда сигналов на АДФ снижается (с 0,54 до 0,16 о.е.), как и процент отвечающих клеток (с 20 до 16%). Кратковременная аппликация гомоцистеина (100 мкМ) в течение 5 минут на нейроны здорового животного приводит к снижению амплитуды (с 1,1 до 0,87 о.е.) и площади (с 1,27 до 0,99 о.е.) Ca^{2+} -сигналов в ответ на АТФ, а также процента отвечающих клеток (57-37% на АТФ, 27-8% на АДФ). Повышение концентрации гомоцистеина до 300 мкМ оказывало дальнейшее угнетение Ca^{2+} -ответов. 5-минутная инкубация гомоцистеиновой кислоты, метаболита гомоцистеина, также приводит к снижению амплитуды (с 0,1 до 0,72 о.е.), площади (с 1,37 до 0,56 о.е.) и длительности (с 1,91 до 1,27 с) Ca^{2+} -сигналов в ответ на АТФ. Напротив, длительная инкубация нейронов в гомоцистеине (100 мкМ) в течение 24 часов приводит к повышению процента клеток, отвечающих на АТФ (с 53 до 69%) и АДФ (с 20 до 30%), с увеличением длительности (с 0,85 до 1,16 с) и площади (с 0,34 до 0,89 о.е.) сигналов на АТФ.

Таким образом, в условиях пренатальной гГЦ было выявлено увеличение Ca^{2+} -сигналинга при действии АТФ, что может быть связано как с изменением свойств пуриновых рецепторов, так и с увеличением их экспрессии. Краткосрочный эффект гомоцистеина был прямо противоположен: 5-минутная инкубация снижает активность рецепторов и уменьшает Ca^{2+} -ответы на АТФ. Трехкратное увеличение концентрации гомоцистеина не приводило к повышению возбудимости нейронов, как это наблюдалось при гГЦ. Это может свидетельствовать о том, что механизм модуляции рецепторов АТФ гомоцистеином зависит от продолжительности его действия. Эффект 24-часовой инкубации сходен с таковым в условиях пренатальной гГЦ.

Работа поддержана грантом РФФ 20-15-00100.

СВЯЗЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ В ГЕНАХ CYP3A4 И CYP2D6 С ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ АНТИПСИХОТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

**Козлова А.Д.¹, Сенина А.М.¹, Маркелова М.И.¹, Григорьева Т.В.¹,
Насырова Р.Ф.², Вайман Е.Э.², Шнайдер Н.А.², Незнанов Н.Г.²,
Лиманкин О.В.³, Торговцев А.А.³**

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

²Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и неврологии
им. В.М. Бехтерева, Санкт-Петербург, Россия

³Санкт-Петербургская городская психиатрическая больница № 1 им. П.П. Кащенко,
Санкт-Петербург, Россия

nastia7.08.2002@mail.ru

Антипсихотики – основные лекарственные препараты, применяемые для лечения шизофрении. Все нейролептики подразделяются на антипсихотические препараты 1 и 2-го поколения (АП I и II генерации). АП I реализуют свое действие за счет блокады рецепторов дофамина 2-го типа. АП II оказывают более избирательное действие на молекулярные мишени и вызывают значительно меньше нежелательных реакций.

Система ферментов цитохромов печени P450 играет ключевую роль в метаболизме лекарственных средств, а также является фармакокинетическим фактором, влияющим на эффективность действия множества препаратов.

Цель работы – оценить влияние однонуклеотидных полиморфизмов в генах цитохрома P450 (CYP3A4, CYP2D6) на восприимчивость к терапии галоперидолом (АП I), оланзапином и рисперидоном (АП II).

Исследуемую когорту составили пациенты (мужчины и женщины) в возрасте от 18 до 55 лет в количестве 75 человек, с диагнозом психического расстройства МКБ-10 (код F20.0), требующего назначения антипсихотиков. Все испытуемые были на монотерапии: 34 человека на галоперидоле, 21 на оланзапине, 20 на рисперидоне. Эффективность действия терапии оценивалась в двух точках по шкале позитивных и негативных синдромов (Positive and Negative Syndrome Scale – PANSS) – до начала терапии и после её окончания. Если наблюдалось снижение значения по PANSS на 30% и более, то исследуемый считался восприимчивым к терапии. Для выявления значимых отличий частоты встречаемости аллельных вариантов в группах сравнения (восприимчивые к терапии/не восприимчивые) был применен точный тест Фишера.

Результаты генотипирования по гену CYP3A4 (rs2740574) не выявили связи генотипа с эффективностью действия препаратов. Вероятно, это свидетельствует о том, что данный полиморфизм не является маркером восприимчивости к терапии данными антипсихотиками для российской популяции.

Что касается полиморфизма 254delA гена CYP2D6 (rs4986774), частота встречаемости гетерозигот среди пациентов, не ответивших на терапию, была достоверно выше (p-value = 0,09) по сравнению с группой пациентов, ответивших на терапию. Разница в частоте встречаемости составила 19,9%. Полученные данные соотносятся с литературой в отношении эффективности лечения галоперидолом при других видах расстройств.

Таким образом, дальнейший поиск информативных генетических маркеров и анализ известных полиморфизмов в отношении эффективности новых препаратов будет способствовать совершенствованию алгоритмов персонализированного подбора антипсихотических препаратов.

Работа выполнена в рамках государственного задания КФУ (№ FZSM-2023-0013) и государственного задания ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.М. Бехтерева» Минздрава России 2024-2026 гг. (XSOZ 2024 0012).

АГОНИСТ-ИНДУЦИРОВАННЫЕ Ca^{2+} -СИГНАЛЫ В КЛЕТКАХ НЕК293 С
ЕДИНСТВЕННОЙ ИЗОФОРМОЙ IP_3 -РЕЦЕПТОРА. СИНХРОННЫЙ МОНИТОРИНГ
ЦИТОЗОЛЬНОГО И РЕТИКУЛЯРНОГО Ca^{2+}

Кочкина Е.Н., Копылова Е.Е., Рогачевская О.А.

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

kate-kochkina@yandex.ru

В генерации внутриклеточных Ca^{2+} -сигналов, индуцированных агонистами, ключевую роль играет выброс Ca^{2+} из депо при участии IP_3 -рецепторов (IP_3R). Последние являются IP_3 -активируемыми Ca^{2+} -каналами, локализованными в основном на мембране эндоплазматического ретикулума (ЭР, Ca^{2+} -депо). Три гена кодируют субъединицы IP_3R1 , IP_3R2 и IP_3R3 , обычно формирующие гомотетраммерные Ca^{2+} -каналы. Изоформы IP_3R характеризуются разной чувствительностью к IP_3 и Ca^{2+} и специфическими механизмами регуляции. Для исследования роли каждой изоформы в агонист-индуцированной Ca^{2+} -сигнализации, нами были последовательно инактивированы два из трех генов, кодирующих IP_3R изоформы, с использованием CRISPR/Cas9 технологии. Были получены клеточные моноклоны – IP_3R1 -НЕК, IP_3R2 -НЕК, IP_3R3 -НЕК – с единственной функциональной изоформой, IP_3R1 , IP_3R2 и IP_3R3 , соответственно.

Проводился классический тапсигаргиновый тест. Тапсигаргин является ингибитором Ca^{2+} -АТФазы SERCA, которая закачивает Ca^{2+} в ЭР. Полученные данные позволили оценить уровень Ca^{2+} в ЭР и начальную скорость его выхода из депо. Оказалось, что по уровню Ca^{2+} утечки в покое клетки ранжируются как IP_3R2 -НЕК > IP_3R1 -НЕК > IP_3R3 -НЕК. Это означает, что при одинаковой активности SERCA по уровню депонированного Ca^{2+} клетки соответствуют ряду IP_3R3 -НЕК > IP_3R1 -НЕК > IP_3R2 -НЕК.

В клетках каждой линии дополнительно экспрессировался генетически-кодируемый Ca^{2+} -сенсор RCERIA1er с ретикулярной локализацией. Будучи загруженными флуоресцентным Ca^{2+} -зондом Fluo-8, RCERIA1er-положительные клетки обеспечивали одновременный мониторинг цитозольного и ретикулярного Ca^{2+} . Клетки стимулировались ацетилхолином (ACh) при стандартной концентрации внеклеточного Ca^{2+} (2 мМ), что инициировало повышение уровня цитозольного и понижение уровня ретикулярного Ca^{2+} , которые возвращались практически к уровню покоя, несмотря на присутствие агониста в растворе. Затем при пониженном внеклеточном Ca^{2+} (260 нМ) добавлялся иономицин, который так же вызывал повышение цитозольного и понижение ретикулярного Ca^{2+} , предположительно, проникая через плазмалемму и увеличивая проницаемость Ca^{2+} через мембрану ЭР. Сравнение сигналов ретикулярного сенсора RCERIA1er, наблюдавшихся при добавлении ACh и иономицина, показало, что в случае клеток IP_3R1 и IP_3R3 иономицин опустошал Ca^{2+} -депо в гораздо большей степени, чем это делал ACh. При этом в клетках IP_3R2 ACh и иономицин снижали концентрацию ретикулярного Ca^{2+} до сопоставимых уровней. Разницу в Ca^{2+} -ответах клеток IP_3R1 -НЕК, IP_3R2 -НЕК, IP_3R3 -НЕК на ACh и иономицин можно объяснить участием Ca^{2+} -связывающего белка аннексина A1 в регуляции активности IP_3R .

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 22-14-00031.

ИЗМЕНЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БАРОРЕФЛЕКСА ПОД ВЛИЯНИЕМ КРОВОПОТЕРИ

Крючкова О.А.^{1,2}, Туманова Т.С.^{1,2}

¹Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

kriuchkovaoa@infran.ru

Артериальный барорефлекс (БР) представляет собой базовый механизм, обеспечивающий поддержание постоянного уровня системного артериального давления (АД). Известно, что чувствительность барорефлекса (БРЧ) может изменяться под влиянием экстремальных факторов, которые изменяют состояние внутренней среды организма и провоцируют запуск адаптивных и патологических реакций автономных систем. Установлено, в частности, что БРЧ меняется в условиях эндотоксинемии и гипоксии.

Целью настоящего исследования стала экспериментальная проверка гипотезы, согласно которой кровопотеря является экстремальным фактором, влияющим на БРЧ.

Эксперименты выполнены на самцах крыс Wistar массой 250-300 г., из ЦКП «Биоколлекция» Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Проведены контрольная (n=8) и экспериментальная (n=5) серии опытов. В условиях общей анестезии (уретан, 1,6 г/кг, в/б) проводили катетеризацию обеих бедренных артерий и правой бедренной вены. Регистрировали АД; рассчитывали среднее АД (АДср) и частоту сердечных сокращений (ЧСС). Длительность эксперимента составляла 120 минут. Каждые 10 минут тестировали БРЧ посредством введения фенилэфрина (135 мкл; 0,05% мг/мл). Отбор крови производили с 30 по 50 минуту эксперимента в количестве 30% объёма циркулирующей крови (ОЦК), что соответствовало 3 степени кровопотери.

Установлено, что в контрольной серии АДср, ЧСС и БРЧ не претерпевали достоверных изменений на протяжении эксперимента. В экспериментальной серии через 20 минут после начала отбора крови АДср снижалось на $42\pm 12\%$ ($p=0,0079$) и оставалось на достигнутом уровне до конца эксперимента, а ЧСС не претерпевала достоверных изменений. На 50-й минуте эксперимента БРЧ снижалась на $77\pm 9\%$ по сравнению с фоновыми показателями ($p=0,0292$) и на 76% в сравнении с контрольными показателями ($p=0,0086$). В дальнейшем БРЧ несколько увеличивалась, но оставалась достоверно ниже фоновых значений.

Таким образом, было экспериментально установлено, что снижение ОЦК вследствие кровопотери у анестезированной крысы не только приводит к падению АДср, но и ослабляет БРЧ. Полученные результаты указывают на то, что ослабление БР может быть фактором, ухудшающим состояние функции кровообращения в условиях кровопотери.

Работа поддержана средствами федерального бюджета в рамках государственного задания ФГБУН Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (№ 1021062411787 0-3.1.8).

МАРГАНЕЦ-ИНДУЦИРОВАННОЕ НАРУШЕНИЕ МЕТАБОЛИЗМА СЕРОТОНИНА

Кудринская В.М., Назаров И.Р., Обухова Д.А.

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

v.kudrinskaja2011@yandex.ru

Марганец (Mn) необходим для нормального функционирования организма. Однако его избыточное поступление может привести к развитию марганцевой энцефалопатии, которая имеет фенотипические особенности, аналогичные идиопатической болезни Паркинсона. Один из механизмов токсического действия марганца заключается в его влиянии на синтез нейромедиаторов. Хроническое воздействие Mn приводит к снижению уровней серотонина, что в свою очередь приводит к развитию аффективных расстройств, таких как депрессия и тревожность. В связи с этим, целью данной работы было: оценить влияние избыточного хронического поступления Mn на метаболизм серотонина у крыс.

Работа выполнена на взрослых самцах крыс Вистар, 220–250 г. Животные были разделены на две группы (n=10): первой группе интраназально вводили раствор $MnCl_2$ (1 мг/жив в объеме 20 мкл в день), а второй группе – 20 мкл физиологического раствора в течение 30 дней. Концентрацию серотонина и его метаболита 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-ГИУК) измеряли с помощью метода ВЭЖХ с электрохимической детекцией в клетках стриатума, гиппокампа, лобной коры и гипоталамуса лабораторных животных. Методом ОТ-ПЦР в реальном времени были измерены уровни мРНК основных ферментов и рецепторов серотонина в клетках стриатума, гиппокампа и лобной коры.

Было показано, что в клетках стриатума животных, получавших $MnCl_2$, наблюдается снижение уровней серотонина в 1,7 ($p=0,04$) раз, по сравнению с контрольной группой. При этом было показано, что хроническое интраназальное введение $MnCl_2$ приводит к повышению уровней серотонина и 5-ГИУК в 2,2 ($p=0,003$) и 2,5 ($p=0,02$) раз соответственно в клетках гиппокампа и повышению уровней 5-ГИУК в 1,8 ($p=0,05$) раз в клетках гипоталамуса крыс, по сравнению с контролем. В связи с этим, нами была проведена оценка уровней мРНК основных ферментов метаболизма и рецепторов серотонина в клетках стриатума, гиппокампа и лобной коры крыс после хронического введения $MnCl_2$. Оказалось, что хроническое интраназальное введение $MnCl_2$ приводит к увеличению уровней мРНК в клетках гиппокампа триптофангидроксилазы-2 и 5-НТ₃-рецептора в 1,5 ($p=0,04$) и 1,3 ($p=0,05$) раз соответственно и к уменьшению уровней мРНК моноаминоксидазы-В (но не MAO-A!) и 5-НТ_{2A}-рецептора в 1,6 ($p=0,04$) и 3 ($p=0,001$) раз соответственно, по сравнению с контрольной группой. Однако у крыс, получавших $MnCl_2$, в клетках стриатума отмечается снижение уровней мРНК триптофангидроксилазы-2 в 3,1 ($p=0,002$), по сравнению с контрольной группой. В клетках лобной коры крыс, получавших $MnCl_2$, наблюдается снижение уровней мРНК моноаминоксидазы-В, SERT, 5-НТ_{1A}-рецептора и 5-НТ_{2A}-рецептора в 2,4 ($p=0,02$), 3,1 ($p=0,03$), 3,5 ($p=0,04$) и 4,2 ($p=0,04$) раз соответственно, по сравнению с контролем.

Исходя из полученных данных можно заключить, что хроническое интраназальное введение $MnCl_2$ приводит не только к нарушению метаболизма дофамина, что было ранее показано нами, но и серотонина, в том числе за счет подавления его синтеза.

ВЛИЯНИЕ НАПРАВЛЕННОЙ ПОЛЯРИЗАЦИИ МИКРОГЛИИ С ПОМОЩЬЮ
МАЛЫХ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ РНК НА РАЗВИТИЕ БОКОВОГО
АМИОТРОФИЧЕСКОГО СКЛЕРОЗА

Кудряшова Н.И.¹, Шашковская В.С.^{1,2}, Микаелян А.С.³,
Дейкин А.В.⁴, Котелевцев Ю.В.¹

¹Центр нейробиологии и реабилитации мозга им. В.Л. Зельмана. Сколковский институт наук
и технологий, Москва, Россия

²Российский научно-исследовательский медицинский институт им. Н.И. Пирогова,
Москва, Россия

³Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова, Москва, Россия

⁴Белгородский государственный национальный исследовательский университет,
Белгород, Россия

Natalia.Kudriashova@skoltech.ru

Боковой амиотрофический склероз (БАС) является нейродегенеративным заболеванием, характеризующимся поражением двигательных нейронов головного и спинного мозга. Микроглия представляет собой резидентные макрофаги центральной нервной системы (ЦНС), которые действуют как первая и основная форма активной иммунной защиты. Активация микроглии играет ключевую роль в нейровоспалении, участвующем в патогенезе БАС. Активированная микроглия существует в двух фенотипах: М1 (провоспалительный) и М2 (антивоспалительный). Регуляторный фактор интерферона 5 (ИРФ5) и толл-подобный рецептор 4 (ТЛР4) отвечают за формирование воспаления в ЦНС и являются терапевтическими мишенями в развитии БАС. Малые интерферирующие РНК (миРНК) представляют собой короткие двухцепочечные РНК, способные подавлять экспрессию выбранных генов.

Целью данной работы является оценка влияния миРНК к генам ИРФ5 и ТЛР4 на направленную поляризацию микроглии из М1 в М2 фенотип.

В данной работе использовались миРНК к следующим генам: ИРФ5 и ТЛР4. Первичная культура микроглии, выделенная из новорожденных мышей, была трансфицирована миРНК, затем поляризована в М1 фенотип липополисахаридом (ЛПС) (100 нг/мл) и интерлейкином-4 (ИЛ-4) (20 нг/мл) в М2 фенотип. Через 72 часа после трансфекции было оценено изменение фенотипа микроглии с помощью полимеразной цепной реакцией в реальном времени. Для проведения экспериментов *in vivo* было осуществлено внутрижелудочковое введение липидных наночастиц, содержащих миРНК к ИРФ5 и к люциферазе светлячка, в течение 5 дней трансгенной линии мышей FUS (1-359). Для оценки терапевтического эффекта проводилась гистологическая окраска срезов спинного мозга гематоксилином/эозином.

В ходе работы было показано подавление генов ИРФ-5 и ТЛР4 через 72 часа после трансфекции на 75% в М0, М1 и М2 микроглие. Результаты показали, что трансфекция с помощью миРНК к ИРФ-5 снижает экспрессию маркеров М1 поляризации TNF-а и IFN-g в М1 фенотипе микроглии на 95% и 50% соответственно и повышает экспрессию маркера М2 поляризации Arg в М2 фенотипе на 90%. Подавление ТЛР4 с помощью миРНК способствует снижению экспрессии маркеров М1 поляризации TNF-а и IL6 на 90% в М1 фенотипе. Внутрижелудочковое введение липидных наночастиц, содержащих миРНК к ИРФ5 способствовало снижению нейровоспаления у трансгенной линии мышей по сравнению с контролем.

Таким образом, нами было показано, что миРНК к генам ИРФ5 и ТЛР4 способны влиять на поляризацию микроглии, изменяя ее фенотип и снижая тем самым выраженность воспаления.

PRDX 6 СНИЖАЕТ ИНДУЦИРОВАННУЮ СТРЕПТОЗОТОЦИНОМ СЕНЕСЦЕНЦИЮ ПАНКРЕАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

Кузекова А.А., Глушкова О.В., Новоселова Е.Г.

Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение
Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный
исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований
Российской академии наук», Пушкино, Россия

akkuzekova@mail.ru

Известно, что в конце 2021 года около 537 миллионов человек страдали диабетом 1 и 2 типов. Эпидемиология сахарного диабета строго контролируется Всемирной Организацией Здравоохранения (ВОЗ) и Международной диабетической федерацией, но проблема поиска новых подходов к лечению этого тяжелого системного заболевания все еще остается открытым. Известно, что среди общего числа диагностируемых случаев сахарного диабета, более 90% пациентов страдают именно диабетом 2-го типа (СД2), являющимся заболеванием, ассоциированным с возрастом. СД2 характеризуется снижением функциональной активности β -клеток поджелудочной железы, выражающимся в утрате их секреторной функции и уменьшении общего количества. Помимо этого, β -клетки уязвимы к окислительному стрессу, они имеют высокую активность митохондрий, что приводит к повышенной продукции свободных радикалов и увеличенной чувствительности к окислительному стрессу, что может приводить к сенесценции клеток. Нами была создана *in vitro* модель Д2Т, при которой β -клетки инсулиномы крысы RIN-m5F, культивировались в присутствии стрептозотоцина (STZ), избирательно поражающего панкреатические β -клетки через транспортер глюкозы GLUT2 и запускающего генотоксический стресс, сопровождающийся генерацией активных форм кислорода и азота. Этот процесс приводит к ингибированию синтеза и секреции инсулина и провоцирует гибель и сенесценцию β -клеток. Предполагая, что за счет своей пероксидазной активности PRDX6 может защитить β -клетки от окислительного стресса, и, следовательно, от преждевременного старения (сенесценции), целью настоящей работы было изучить механизмы действия PRDX6 на старение клеток путем оценки накопления маркеров сенесценции (SA- β -Gal, H2AX, p21) в контрольных и обработанных STZ клетках RIN-m5F.

Были получены доказательства сенотерапевтического потенциала пероксиредоксина 6 (PRDX6). Воздействие низких доз стрептозотоцина (STZ) приводило к сенесценции панкреатических β -клеток RIN-m5F. Профилактическое добавление PRDX6 в среду культивирования β -клеток RIN-m5F до обработки стрептозотоцином приводило к снижению уровня маркеров сенесценции: процента SA- β -Gal –положительных клеток, фосфорилированной формы гистона H2AX и белка p21, вызывало уменьшение секреции про-воспалительного цитокина IL-6, но не анти-воспалительного цитокина IL-10, и сопровождалось снижением продукции активных форм кислорода (АФК) и активации белка NF- κ B.

Таким образом, защитное сеноморфное действие PRDX6, показанное на β -клетках RIN-m5F, свидетельствует о способности этого белка снижать патологические процессы при СД2 и может быть использовано при сенотерапевтической терапии этого заболевания, ассоциированного с возрастом.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 23-24-00041.

СРАВНЕНИЕ РЕГЕНЕРАЦИИ МЫШЕЧНОЙ И НЕРВНОЙ ТКАНЕЙ У ПЛАНАРИЙ *GIRARDIA TIGRINA*

Кузнецов Г.В., Крещенко Н.Д.

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

Mansurg999@yandex.ru

Плоские черви (Platyhelminthes) – эволюционно первый тип многоклеточных животных, у которых появляются высокоспециализированные системы тканей и органов. Планарии характеризуются высокой способностью к регенерации, у них могут регенерировать любые ткани и органы. Работа направлена на изучение характерных особенностей процесса регенерации мышечной и нервной ткани у планарий *Girardia tigrina*, а также сравнение скорости регенерации этих систем.

Пулу животных проводили резекцию головного отдела и оставляли регенерировать при температуре 20°C. После чего, на 2, 3, 5, 7, 10 и 13 дни регенерации отбирали по 8 особей на каждую временную точку. Отобранных планарий фиксировали, затем проводили иммуноцитохимическую обработку антителами против серотонина и гистохимическую окраску флуоресцентно-меченым красителем фаллоидином. Исследования проводили с помощью микроскопа Leica DM6000B. Результатом исследования стали серии изображений динамического процесса регенерации участка раневой поверхности головного конца тела планарий.

Регенерация мышечной системы у *G. tigrina* занимает 10-13 дней. В течение первых трех дней после декапитации происходит образование регенерационной бластемы, состоящей из необластов (особых стволовых клеток планарий). Активация интенсивного процесса регенерации наблюдается на 5 день регенерации: на препаратах видна интенсивная окраска клеток регенерирующей мышечной ткани и вспомогательных структур. В процессе регенерации планарий интенсивность окраски миобластов (клеток-предшественниц мышечных клеток, образующихся при дифференциации необластов) уменьшается и становится аналогичной окраске клеток мышечной ткани на неповрежденном участке планарии. К 13 дню регенерации препараты регенерирующих планарий практически не отличаются от препаратов интактных особей.

Регенерация нервной системы в головном конце тела планарий *G. tigrina* занимает 7-10 дней. Активный процесс регенерации нервной системы наблюдается уже на 2 день. В процессе регенерации происходит увеличение количества серотониновых нейронов с их последующей кластеризацией и образованием нового головного ганглия и нейронов нервной сети. В процессе регенерации нервные стволы в неповрежденном участке тела червя начинают нарастать в область регенерационной бластемы, постепенно сближаясь друг с другом, утолщаясь за счет кластеризации нейронов и увеличения числа межнейронных связей, и формируя характерную «подковообразную» форму.

Сравнение тотальных препаратов планарий в разные дни регенерации показало, что процесс регенерации нервных структур у *G. tigrina* протекает более интенсивно, чем процесс регенерации мышечных элементов. Нервная система у планарий, вероятно, имеет больший потенциал и приоритет регенерации по сравнению с мышечной системой. Результаты выполненной работы могут быть использованы для углубления познаний в области особенностей регенерации отдельных систем планарий, как частей единого организма.

ФАРМАКОДИНАМИЧЕСКАЯ И ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
ЭФФЕКТОВ ДЕКСМЕДЕТОМИДИНА ГИДРОХЛОРИДА НА ЦЕНТРАЛЬНУЮ
НЕРВНУЮ СИСТЕМУ НОВОРОЖДЕННЫХ ГРЫЗУНОВ *IN VIVO*

Логашкин А.Е.¹, Силаева В.М.¹, Мамлеев А.Р.¹, Ситдикова В.Р.¹, Минлебаев М.Г.^{1,2}

¹Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия

²Средиземноморский институт нейробиологии при Национальном институте здоровья и
медицинских исследований, Марсель, Франция

anatolijlogaskin@gmail.com

Введение. Уретан является широко используемым анестезирующим веществом при проведении нейробиологических исследований *in vivo*. В последнее время появляются ограничения в использовании уретана из-за ряда негативных эффектов, связанных с его применением. Вследствие этого появляется необходимость в поиске эффективной замены уретану. Кандидатом для этого может стать агонист α_2 -адренергических рецепторов дексмедетомидин гидрохлорид (Декс). Обычно он используется в комбинации с NMDA-антагонистом кетаминном, но его индивидуальное влияние на функционирование центральной нервной системы остается практически неизвестным.

Материалы и методы. Для ответа на данный вопрос мы провели серию экспериментов, в которых дали оценку влиянию Декса на функционирование мозга новорожденных крысят. В процессе проведения исследования было охарактеризовано влияние Декса на параметры спонтанной кортикальной активности, болевую чувствительность и седацию. У новорожденных крысят в естественных условиях в контроле и после введения Декса (33 мкг/кг) или уретана (1 г/кг) проводили регистрацию кортикальной и двигательной активности и тест на анальгезию.

Результаты. Инъекция Декса оказала меньшее влияния на параметры кортикальной активности по сравнению с уретаном. При этом эффект Декса полностью нивелировался через 25.5±5.08 минуты. В пределах его влияния мощность кортикальной активности в альфа-бета диапазоне (8-29 Гц) уменьшилась на 17±28%, в гамма-диапазоне (30-70 Гц) на 31±24%, а непрерывность активности уменьшилась на 48±36%. При этом уретан оказывал значительное влияния на все три параметра с уменьшением их, соответственно, на 42±12%, 45±12% и 71±15%. Регистрация двигательной активности животного показала, что после администрации Декса происходит уменьшение количества движений на 58±19%, с длительностью данного эффекта в 20±5 минуты. После инъекции уретана количество движений уменьшилось на 96±6%. Администрации Декса и уретана оказывали примерно равный анальгетический эффект, увеличивая время теста на отдергивание хвоста в 1.9 (с 0.92±0.33 сек до 1.66±0.62 сек) и 2.1 (с 0.92±0.33 сек до 1.88±0.55 сек) раз соответственно.

Выводы. Мы продемонстрировали, что Декс меньше упраздня кортикальную активность оказывает сопоставимый с уретаном анальгетический эффекты, при этом сохраняя двигательную активность. Это делает Декс отличным кандидатом на замену уретана для проведения ряда электрофизиологических экспериментов *in vivo*.

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

**ВЛИЯНИЕ АНТИХОЛИНЭСТЕРАЗНОГО ПРЕПАРАТА НА АКТИВНОСТЬ
Na,K-АТФазы В ЦЕЛЫХ ЭРИТРОЦИТАХ И ТЕНЯХ ЭРИТРОЦИТОВ КРЫС,
ПОДВЕРГНУТЫХ ДЕЙСТВИЮ ИНТЕНСИВНОЙ ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ**

Макарова К.А., Дерягина Е.В.

Тюменский государственный университет, Тюмень, Россия

k.a.makarova@outlook.com

Na,K-АТФаза является интегральным трансмембранным белком, располагающимся в плазматической мембране клеток животных и человека, где обеспечивает формирование мембранного потенциала клетки. В настоящее время представлено множество исследований, посвященных проблеме стресса и оценке вовлеченности в его развитие различных медиаторных и регуляторных систем. Среди прочих, значительное внимание уделяется холинергическим структурам, которые реализуют свое влияние на развитие общего адаптационного синдрома выступая в качестве компонентов гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы. Отмечается наличие как в гипоталамо-гипофизарной системе, так и в надпочечниках ацетилхолина, ацетилхолинэстеразы, а также холинорецепторов. Антихолинэстеразные препараты вызывают повышение концентрации внеклеточного ацетилхолина обуславливая стимуляцию холинорецепторов оказывающих регуляторное влияние на производство ключевых гормонов стресса и активность ферментов эритроцитарной мембраны.

Цель работы – исследовать активность транспортных АТФаз в целых эритроцитах и мембранных препаратах (тенях) эритроцитов крыс, подвергнутых действию интенсивной физической нагрузки и обработанных антихолинэстеразным препаратом.

В качестве маркера развития стресс-реакции у животных использовали определение в надпочечниках концентрации аскорбиновой кислоты, поскольку данное соединение в качестве кофактора участвует в ферментативных реакциях биосинтеза катехоламинов. Было установлено, что в группе крыс, подвергнутых действию физической нагрузки, происходит достоверное снижение уровня аскорбиновой кислоты по сравнению с контролем, в тоже время концентрация аскорбиновой кислоты у групп животных, обработанных прозеринном достоверно не отличалась от контроля.

При изучении активности Na,K-АТФазы в целых эритроцитах было установлено, что в группе крыс, подвергнутых физической нагрузке, происходит достоверное снижение активности фермента. Активность фермента у животных, подвергнутых стрессу после введения прозерина, достоверно не отличалась от контроля. Известно, что активность Na,K-АТФазы в условиях действия стрессов может снижаться, в следствие изменения свойств эритроцитарной мембраны или из-за присутствия в плазме крови специфических ингибиторов. Для установления причин снижения активности фермента, была определена активность фермента в тенях эритроцитов. Установлено, что достоверного снижения активности Na,K-АТФазы в мембранных препаратах эритроцитов (тенях) в обеих опытных группах крыс по сравнению с контролем не наблюдалось.

Таким образом, можно предположить, что специфическая активация холинергической структур прозеринном может оказывать влияние на интенсивность синтеза либо секреции эндогенных дигоксин-подобных ингибиторов Na,K-АТФазы действие которых реализуется в условиях стресса. По совокупности полученных данных можно заключить, что введение антихолинэстеразного препарата снижает проявление всех исследованных нами характерных для стресса биохимических показателей, что может указывать на формирование в третьей группе животных стресс-реакции, протекающей по гипозергическому типу.

ХИРУРГИЧЕСКИЙ СТОЛ С САМОРЕГУЛИРУЕМЫМ ПОДОГРЕВОМ И СИСТЕМОЙ ФИКСАЦИИ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НА МЕЛКИХ ЖИВОТНЫХ

Мамлеев А.Р.¹, Силаева В.М.¹, Логашкин А.Е.¹, Ситдикова В.Р.¹, Минлебаев М.Г.^{1,2}

¹Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия

²Средиземноморский институт нейробиологии при Национальном институте здоровья и
медицинских исследований, Марсель, Франция

arsenmamleev2002@gmail.com

Длительные манипуляции с животными в научных, лечебных или образовательных целях, связанные с иммобилизацией животного всегда сопровождаются изменением его температуры тела. Переохлаждение животного приводит к увеличению риска его смерти. Поэтому возникает необходимость в оборудовании, способном стабильно поддерживать температуру тела животного на уровне физиологических значений, в течение всей манипуляции. На данный момент на рынке РФ отсутствует отечественное оборудование, способное решить данную проблему. При этом зарубежные аналоги на сегодняшний день не доступны к приобретению. Ранее доступное оборудование иностранного производства отличалось высокой стоимостью, что ограничивало их использование в ветеринарных клиниках и научно-исследовательских лабораториях. В настоящей работе нами предпринята попытка по созданию хирургического стола с системой подогрева и фиксации для проведения хирургических операций на животных.

Хирургический стол функционально состоит из нескольких частей: столешница, нагревательный компонент, система фиксации конечностей, система управления устройством и система саморегуляции нагрева.

Разработанное устройство хирургический стол с саморегулируемым подогревом и системой фиксации поддерживает температуру тела животного в диапазоне от комнатной температуры до 50°C и надежно фиксирует животное в распятом положении. При использовании устройства смертность животных при проведении хирургии снижается на 20-30%, а время хирургии сокращается на 60% (с 50 мин до 20 мин). Все электронные компоненты и расходные материалы, используемые для создания устройства, доступны к приобретению в России.

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

ЛАДАСТЕН СНИЖАЕТ ВЫРАЖЕННОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ ПРОЯВЛЕНИЙ ПАРКИНСОНИЧЕСКОГО СИНДРОМА *IN VIVO*

Мариевский В.Е., Зайнуллина Л.Ф., Кадников И.А., Середенин С.Б.

ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Россия

marievskii_ve@academpharm.ru

Болезнь Паркинсона (БП) – нейродегенеративное заболевание, проявляющееся двигательными нарушениями, среди которых можно отметить тремор покоя, брадикинезию, постуральную неустойчивость и мышечную ригидность. В основе развития заболевания лежит гибель дофаминергических нейронов экстрапирамидной системы головного мозга, что в дальнейшем приводит к выраженному снижению уровня дофамина. Современное лечение БП сосредоточено на компенсации дефицита дофамина, посредством назначения лекарственных препаратов, являющихся средствами симптоматической терапии (леводопа, агонисты дофаминовых рецепторов и др.). Несмотря на устранение основных проявлений БП, наблюдаются выраженные побочные эффекты, в связи с чем актуальным остается поиск новых противопаркинсонических лекарственных средств с высокой эффективностью и хорошей переносимостью. Производное адамантана – препарат ладастен, используемый в качестве антиастенического средства, способен модулировать Ca^{2+} -зависимые процессы высвобождения дофамина и синтез нейромедиатора *de novo*. Дофаминпозитивные свойства ладастена позволяют предположить наличие у него антипаркинсонической активности, в связи с чем целью работы являлось изучение противопаркинсонического действия данного лекарственного средства при моделировании паркинсонического синдрома (ПС) унилатеральным интратриатным введением 6-гидроксидофамина (6-ГОДА).

Исследование выполнено на мышах-самцах линии С57В1/6. ПС моделировали унилатеральным введением раствора, содержащего 6-ГОДА (5 мкг в 2 мкл), 0,9% NaCl и 0,02% аскорбиновую кислоту в правый стриатум. Ложно-оперированным животным вводили раствор, содержащий 0,9% NaCl и 0,02% аскорбиновую кислоту. На следующий день после операции животным вводили (перорально на протяжении 14 дней, ежедневно) ладастен в дозах 10 мг/кг, 50 мг/кг, 100 мг/кг, леводопу в дозе 50 мг/кг или твин-80 в качестве плацебо (группа активного контроля). Ложно-оперированные животные аналогичным образом получали плацебо (группа пассивного контроля). На 14-й день после стереотаксической операции оценивали наличие противопаркинсонической активности в тестах «вертикальный стержень» и «цилиндр».

Пероральное введение ладастена в течение 14 дней привело к снижению выраженности брадикинезии, фиксируемой в тесте «вертикальный стержень», при этом наибольшая эффективность отмечалась при введении в дозах 50 и 100 мг/кг. Так, ладастен в дозе 50 достоверно сокращал время поворота в 2 раза ($p < 0.001$) и спуска в 2,5 ($p < 0.001$), а в дозе 100 мг/кг – в 2 ($p < 0.01$) и 2,45 раз ($p < 0.001$) соответственно по сравнению с активным контролем. Леводопа статистически значимо уменьшала время поворота и спуска в 1,9 ($p < 0.01$) и 2,35 ($p < 0.01$) раза по сравнению с группой активного контроля. Зафиксированное антиакинетическое действие ладастена в тесте «цилиндр» также наиболее отчетливо проявлялось при введении в дозах 50 и 100 мг/кг, при этом процент использования контрлатеральной конечности составил 42,8% ($p < 0.01$) и 44,8% ($p < 0.01$) соответственно от общего числа контактов по сравнению с активным контролем, в то же время на фоне введения леводопы – 51,1% ($p < 0.0001$).

Таким образом, полученные результаты указывают на наличие антипаркинсонической активности ладастена, проявившейся в снижении выраженности различных двигательных нарушений при ПС, моделируемого интратриатным унилатеральным введением 6-ГОДА.

РОЛЬ ЦЕРАМИДОВ В РАЗВИТИИ СИНДРОМА ПОВЫШЕННОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ КИШЕЧНИКА

Медведева С.С.¹, Ачасова К.М.^{1,2}, Болдырева Л.В.³, Огиенко А.А.¹, Кожевникова Е.Н.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН», Новосибирск, Россия

²Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины СО РАН», Новосибирск, Россия

custodian.of.midnight@gmail.com

Повышенная проницаемость кишечного барьера, также известная как «синдром дырявой кишки» («leaky gut syndrome») – частое функциональное нарушение в целом ряде заболеваний желудочно-кишечного тракта: воспалительных заболеваниях кишечника (ВЗК), целиакии, кишечных инфекциях. При повышенной проницаемости происходит перемещение микробных антигенов, а иногда и целых микроорганизмов в кровь, что приводит к гиперактивации иммунного ответа и аллергическим реакциям.

Основа синдрома дырявой кишки лежит в нарушении структуры и функции межклеточных контактов в эпителии. Множество работ, сосредоточенных на изучении острой формы заболеваний с повышенной проницаемостью кишки, свидетельствует о том, что дисбаланс между про- и противовоспалительными факторами приводит к нарушению экспрессии белков плотных и адгезивных контактов.

В данной работе использовали модель хронической формы воспаления на мышцах с нокаутом гена *Muc2*. Мы показали, что в отличие от острого воспаления, в хронической модели колита экспрессия белков плотных и адгезивных контактов не изменяется. При этом локализация белков Claudin 7, JAM-A, E-cadherin и β -catenin на латеральных мембранах энтероцитов отличается от контроля. Также нарушена структура и скорость полимеризации микрофиламентов актина, на которых заякорены комплексы плотных и адгезивных контактов. Эти данные подтвердились на двух альтернативных моделях хронического воспаления: колит, индуцированный натриевой солью сульфата декстрана (DSS) и воспаление, вызванное переносом CD45Rb^{High}-позитивных клеток мышам линии Nude.

Мы показали на органоидах кишки, что нарушения в структуре и скорости полимеризации F-актина достаточно для делокализации белков Claudin 7 и β -catenin с латеральной мембраны и развития повышенной проницаемости кишечного эпителия. Связь между актином и белками семейства Claudin подтверждается и биохимическим анализом белковых комплексов плотных контактов.

Сопряжение метаболомного и транскриптомного анализов выявило нарушение метаболизма глицерофосфолипидов и сфинголипидов. Транскриптомный анализ показал, что экспрессия гена, ответственного за синтез церамида, *cerS3* повышена у *Muc2*-дефицитных животных, что может приводить к накоплению длинноцепочечных церамидов. Эти результаты согласуются с литературными данными, которые говорят об избыточном количестве церамида в образцах кишки от пациентов с ВЗК.

Ректальное введение мицелл церамида 6 животным дикого типа способствует ухудшению структуры F-актина в энтероцитах. С другой стороны, введение ингибитора церамидсинтазы Fumonisin B1 мышам с нокаутом *Muc2* улучшает структуру F-актина и способствует смещению локализации β -catenin в область межклеточных контактов. Такой же эффект Fumonisin B1 вызывает на модели DSS-индуцированного хронического колита.

Полученные данные позволяют сделать вывод, что нарушение структуры и полимеризации актина, вызванное избытком церамидов, может быть общей чертой хронического воспаления в кишке. В перспективе эти результаты могут быть использованы для поиска новых терапевтических стратегий при лечении хронического воспаления у пациентов с повышенной проницаемостью кишечного барьера.

Работа поддержана грантом РФФ №20-74-10022-П.

ГЕМАТИН И ГЕМИН ИНДУЦИРУЮТ КАЛЬЦИЙ-НЕЗАВИСИМУЮ СФЕРИЗАЦИЮ И ГЕМОЛИЗ ЭРИТРОЦИТОВ

Михайлова Д.М.^{1,2}, Ковган П.Е.³, Судницына Ю.С.¹, Скверчинская Е.А.¹,
Гамбарян С.П.^{1,2}, Миндукшев И.В.¹

¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия

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

³Санкт-Петербургский политехнический университет, Санкт-Петербург, Россия

mikhailowa.dm@gmail.com

Введение. Гем (Fe(II) – протопорфирин IX), являющийся структурной частью гемоглобина, служит незаменимым переносчиком кислорода в крови. Дегградация гемоглобина или его окисление, наблюдающееся при малярии, геморрагическом инсульте, язве желудка или гемоглобинопатиях приводит к высвобождению в кровоток окисленных производных гема (Fe(III)) – гематина и гемина. Роль производных гема при развитии данных патологий еще не до конца изучена, однако известно, что высокие концентрации токсических производных гема осложняют течение вышеперечисленных заболеваний, вызывая окклюзию сосудов, повреждение почек и печени, а также вторичное повреждение мозга. Известно, что данные соединения вызывают специфическую трансформацию эритроцитов – эхиноцитоз и дальнейшую сферизацию, однако механизм действия данных соединений остается не до конца изученным.

Цель. Исследование гематин/гемин-индуцированной трансформации эритроцитов: определение концентраций и кинетики действия гематина/гемина (а), контроль внутриклеточного уровня кальция (б), оценка жизнеспособности эритроцитов (в) и выхода фосфатидилсерина на поверхность эритроцитов (г).

Материалы и методы. Исследование проводилось на отмытых эритроцитах человека (10^6 клеток/мл). Для оценки трансформации эритроцитов использовались методы конфокальной микроскопии, лазерной дифракции и проточной цитометрии. Уровень внутриклеточной концентрации кальция оценивался с помощью Fluo-3. Аннексин-APC и Лактадегрин-FITC были использованы для оценки выхода фосфатидилсерина на поверхность эритроцитов. Статистический анализ полученных данных был проведен в Graphpad Prism v.9.

Результаты. Гематин и гемин индуцировали доза-зависимую сферизацию эритроцитов в наномолярных концентрациях и последующий гемолиз с образованием теней при более высоких концентрациях. Сферизация эритроцитов сопровождалась увеличением $[Ca^{2+}]_i$ и выходом фосфатидилсерина на поверхность эритроцитов. Сферизация и гемолиз эритроцитов проходили независимо от уровня внеклеточного кальция. Спустя час инкубации с гематином/геминем уровень фосфатидилсерина возвращался к исходному уровню и эритроциты принимали дисковидную форму. Альбумин предотвращал гематин/гемин-индуцированную трансформацию эритроцитов и восстанавливал их нативную форму.

Вывод. Гематин/гемин увеличивал $[Ca^{2+}]_i$ в эритроцитах, однако сферизация и гемолиз происходили как в присутствии, так и в отсутствии кальция, что указывает на независимость обоих процессов от $[Ca^{2+}]_i$. Также впервые было выявлено, что гематин является более реактивным соединением, чем гемин.

Работа поддержана грантом РФ №23-15-00142.

ВЛИЯНИЕ ИНТРАНАЗАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ОЛИГОМЕРНЫХ ФОРМ БЕЛКА S100A9 НА КРАТКОВРЕМЕННУЮ ПАМЯТЬ И УРОВЕНЬ НЕЙРОТРАНСМИТТЕРОВ

Михайлова Н.П., Соловьева О.А., **Кудрин В.С.**, Наркевич В.Б.,
Грудень М.А., Сторожева З.И.

«Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и
фармацевтических технологий», Москва, Россия

mikhajlova_np@academpharm.ru

Введение. Накопление в тканях мозга кальций-связывающих белков из семейства S100 может вызывать развитие нарушений в его работе при старении и нейродегенеративных заболеваниях. Провоспалительный белок S100a9 считается одним из триггеров амилоидно-нейродегенеративного каскада, приводящего к развитию болезни Альцгеймера. Однако остается открытым вопрос о механизмах данного процесса и влиянии агрегированных форм белка на когнитивные процессы. Цель работы – оценка иммунных, нейрохимических и поведенческих эффектов хронического интраназального введения олигомеров S100a9 старым мышам линии C57Bl6.

Методы. Самцам линии C57Bl/6 24-месячного возраста вводили раствор олигомеров S100a9 интраназально в течение 14 дней (8 мкл, 0.48 мг/кг, n=14) или физиологический раствор того же объема (n=14). Через сутки после окончания введения животных тестировали в Открытом поле (ОП), затем – в тесте распознавания новых объектов (РНО), после чего декапитировали с получением образцов фронтальной коры, гиппокампа и мозжечка, а также образцов крови. Определяли активность классического пути комплемента в сыворотках крови, содержание нейротрансмиттеров и их метаболитов в лобной коре, гиппокампе и мозжечке. В работе применен дисперсионный анализ после z-преобразования и корреляционный анализ Спирмена; уровень значимости $p < 0.05$.

Результаты. У мышей, получавших олигомеры S100a9, в сравнении с контролем наблюдалось повышение активности системы комплемента, свидетельствующее об активации воспалительных процессов, а также изменения активности нейромедиаторных систем мозга: повышение уровня ГАМК и показателя деградации норадреналина (соотношения МНPG/NA) в коре одновременно со снижением активности дофаминергической системы в гиппокампе и мозжечке. Были выявлены как общие, так и специфичные для каждой из групп корреляции между показателями активности комплемента и нейротрансмиттерных систем в различных отделах мозга. Положительная корреляция между соотношением МНPG/NA в лобной коре и активностью комплемента обнаружена в обеих группах, а положительная ассоциация активности комплемента с уровнем ГАМК в лобной коре и отрицательная – с уровнем дофамина в гиппокампе наблюдалась только в опытной группе. Кроме того, были выявлены межгрупповые различия профилей внутривидовых соотношений между активностью различных нейротрансмиттерных. В лобной коре после введения олигомеров S100a9 наблюдалась дезорганизация положительных соотношений DA – 5-HT и отрицательных 5-HT – GABA, а в гиппокампе, напротив, данный паттерн корреляций выявлен только в опытной группе, но не в контрольной. В модели РНО у экспериментальных мышей в сравнении с контролем на уровне тенденции выявлено снижение общей исследовательской активности и статистически значимое снижение индекса дискриминации при тестировании через 1 час после экспозиции, свидетельствующее о нарушении кратковременной памяти. Результаты корреляционного анализа свидетельствуют о снижении вклада фронтальной коры и возрастании роли гиппокампа в механизмах кратковременной эпизодической памяти после введения олигомеров S100a9.

Заключение. Таким образом, было показано, что хроническое интраназальное введение олигомеров S100a9 запускает воспалительный процесс, оказывает комплексное дезорганизующее влияние на работу нейротрансмиттерных систем мозга и вызывает ухудшение кратковременной памяти.

ИНГИБИРОВАНИЕ НАДФН-ОКСИДАЗЫ 2 В КЛЕТКАХ МИКРОГЛИИ ПОДАВЛЯЕТ ПАТОГЕННЫЕ ЭФФЕКТЫ БЕТА-АМИЛОИДА В МОДЕЛИ ИНДУЦИРОВАННОЙ АМИЛОИДНОЙ ТОКСИЧНОСТИ

Мухина К.А.¹, Попова И.Ю.^{1,2}, Кечко О.И.¹, Митькевич В.А.¹

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

²Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушино, Россия

kristina.mukhina@gmail.com

Последние исследования показывают важную роль активации микроглии, индуцированную бета-амилоидом (A β), в развитии окислительного стресса при патогенезе болезни Альцгеймера (БА). Основным источником активных форм кислорода (АФК) в мозге является НАДФН-оксидаза 2 (NOX2), находящаяся на мембране микроглиальных клеток. Мы предположили, что ингибирование NOX2 позволит предотвратить провоспалительную активацию клеток микроглии и снизить окислительный стресс под действием A β .

В качестве ингибитора NOX2 был использован GSK2795039 (GSK). Эксперименты *in vitro* проводили на клеточной линии микроглии человека НМС-3, которую обрабатывали A β , GSK или их комбинацией. Уровень провоспалительных цитокинов, противовоспалительных факторов, маркеров окислительного стресса, а также NOX2 оценивали методами ртПЦР, Вестерн блоттинга и проточной цитометрии. Эксперименты *in vivo* были выполнены на мышах BALB/c, которым через канюли вводили препараты A β и GSK в желудочки мозга. На 14-ый день после первоначального введения препаратов были проведены поведенческие тесты, а затем декапитация. Был проведен иммуногистохимический анализ срезов мозга с оценкой количества и размера клеток микроглии в зонах СА1 и зубчатой фасции (DG) гиппокампа. Гомогенат головного мозга анализировали на биохимические маркеры окислительного стресса.

Результаты *in vitro* показали, что GSK снижает экспрессию провоспалительных факторов IL8 и iNOS и увеличивает экспрессию I κ B α . GSK уменьшает количество мертвых клеток и значительно снижает уровень АФК в клетках микроглии, обработанных A β . При этом GSK не только ингибирует NOX2, но и уменьшает ее уровень в клетках. У экспериментальных животных, получавших GSK, снижается агрессия и увеличивается про-социальная активность. Результаты иммуногистохимии показали, что GSK предотвращал увеличение числа и размера клеток микроглии, индуцированных инъекцией A β . Терапия GSK снижала уровень перекисных липидов и АФК, а также увеличивала уровень восстановленного глутатиона в мозге животных.

Полученные результаты показывают, что GSK значительно снижает патогенные эффекты A β как в культуре клеток микроглии, так и в животной модели индуцированной амилоидной токсичности.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда (грант #19-74-30007).

СОЦИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ DAT-КО КРЫС С ИНДУЦИРОВАННЫМ ВАЛЬПРОАТНЫМ СИНДРОМОМ

Назаров И.Р.¹, Кудринская В.М.², Обухова Д.А.^{1,2}

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

²Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт
экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

inazarovgm@gmail.com

Расстройство аутистического спектра (РАС) – группа заболеваний, проявляющихся в детском возрасте, которые характеризуются дефицитом социального взаимодействия и стереотипией поведения. Все чаще обсуждается нарушение работы дофаминергической системы в качестве одного из потенциальных факторов развития РАС. Предполагается, что социальный дефицит у пациентов с РАС связан с дисфункцией мезокортиколимбического пути, в то время как стереотипное поведение может быть обусловлено дисфункцией нигростриатального пути. Транспортёр обратного захвата дофамина (DAT) играет важную роль, контролируя вне-/внутриклеточный уровень дофамина, следовательно, нарушения в его работе могут стать причиной развития РАС или увеличить вероятность развитие РАС при сочетании нескольких повреждающих факторов.

Целью этого исследования является оценка социального взаимодействия у крыс с индуцированным вальпроатным синдромом и нарушенным обратным захватом дофамина.

Эксперименты проводились на четырех группах крысят возрастом 35 дней: (DAT:Salt), (DAT:VPA), (WT:VPA) и (WT:Salt), где DAT/WT – наличие или отсутствие генетического фактора (нокаута гена DAT), VPA/Salt – наличие или отсутствие токсического фактора (индуцированный вальпроатный синдром). Вальпроатный синдром индуцировали пренатальным введением вальпроата натрия 600 мг/кг на 12,5 день беременности самок крыс. Для оценки социального взаимодействия использовался тест «Трехкамерный социальный тест», проводящийся в два непрерывных этапа. На первом этапе исследуемый крысенок имеет возможность взаимодействовать с несоциальным объектом (пустой клеткой) или с знакомым социальным – сиблингом. Во втором – со своим сиблингом или же с незнакомцем (крысенком того же пола и возраста из другого помета). Для статистической обработки данных использовали двухфакторный дисперсионный анализ с поправкой Тьюки на множественное сравнение, проверка на нормальность осуществлялась с помощью критерия Шапиро-Уилка.

Пренатальное введение VPA приводило к увеличению доли времени взаимодействия крысенок с несоциальным объектом, и уменьшению доли времени взаимодействия с социальным объектом (крысенок из того же помета) (токсический фактор $F(1,22) = 12.0$, $p = 0.02$). Таким образом у крысят из групп (WT:VPA) и (DAT:VPA) наблюдается сниженное социальное взаимодействие.

Кроме того, крысята из групп (DAT:Salt), (DAT:VPA), (WT:VPA) меньше взаимодействовали с незнакомцами по сравнению с контрольной группой, и лишь генетический фактор приводил к снижению времени взаимодействия с сиблингом. Однако, несмотря на это, оба фактора влияли на предпочтение новизны – взаимодействие с незнакомцем относительно взаимодействия с знакомым сиблингом (генетический фактор $F(1,22) = 0.46$, $p = 0.5$, токсический фактор $F(1,22) = 0.5$, $p = 0.4$, взаимодействие $F(1,22) = 4.7$, $p = 0.04$).

Таким образом нарушение обмена дофамина и воздействие вальпроевой кислоты совместно вызывают изменения в социальном поведении крыс.

АГЛИКОНЫ ФЛАВОНОИДОВ ИНГИБИРУЮТ АКТИВАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ

Найда Л.В.¹, Балыкина А.М.^{2,4}, Беляков М.В.³, Рукояткина Н.И.⁴, Гамбарян С.П.⁴

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

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

³НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека, Санкт-Петербург, Россия

⁴Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия

nayda.lidiya@mail.ru

Тромбоциты, безъядерные клеточные фрагменты, формируются из цитоплазмы мегакариоцитов. Способность к активации и агрегации обуславливает роль тромбоцитов в поддержании гемостаза. Нарушение нормального функционирования тромбоцитов ведёт к развитию таких патологических состояний, как тромбозы или кровотечения. Антитромбоцитарные препараты широко применяются среди пациентов кардиологического профиля и действуют на различные механизмы активации тромбоцитов. Однако, их действие сопряжено с возникновением серьёзных побочных эффектов, развитием гиперчувствительности и резистентности у пациентов. В связи с этим, актуальным остаётся поиск более безопасных препаратов с противотромбозным эффектом. Агликоны флавоноидов являются растительными соединениями полифенольного происхождения. Они имеют низкую цитотоксичность и широкий спектр благоприятных фармакологических, в том числе антитромбоцитарных, свойств. Однако молекулярные механизмы их действия остаются не до конца изученными.

Целью нашей работы стало исследование молекулярных механизмов ингибирования активации тромбоцитов при воздействии ряда агликонов: лютеолина, мирицетина, кверцетина, эриодиктиола, кемпферола и апигенина.

В экспериментах были использованы тромбоциты здоровых доноров. Тромбоциты инкубировались с тестируемыми агликонами в течение 30 минут при температуре 37°C. Для определения активации тромбоцитов, их жизнеспособности, индукции апоптоза и образования активных форм кислорода (АФК) использовалась проточная цитометрия. Определение степени фосфорилирования белка vasodilator stimulated phosphoprotein (VASP) проводилось с помощью Western blot анализа. В качестве ингибиторов аденилат- (AC) и гуанилатциклазы (GC) использовались SQ22536 и ODQ. Для ингибирования протеинкиназ A (PKA) и G (PKG) использовался H89. Уровень циклических нуклеотидов (сAMP и сGMP) оценивали с помощью жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (LC-MS). Оценка активности фосфодиэстераз в живых клетках линии HEK293 (Human Embryonic Kidney 293) проводилась с использованием биосенсоров, специфических к PDE2A и PDE5A, и основывалась на Фёрстеровском переносе энергии (Förster resonance energy transfer, FRET).

Активация тромбоцитов оценивалась степенью связывания фибриногена, меченного флуоресцентным красителем, с интегринами α IIb β 3. Было установлено существенное ингибирование активации тромбоцитов агликонами, сопоставимое с эффектом sodium nitroprusside (SNP, донор NO-групп). Также, эти соединения не индуцировали апоптоз и не снижали жизнеспособность тромбоцитов. Антиоксидантный эффект агликонов связан со снижением образования АФК, индуцированного тромбином.

Основные механизмы ингибирования активации тромбоцитов связаны с активацией АС/сАМР/РКА и GC/сGMP/PKG сигнальных систем. Мы показали, что агликоны вызывают фосфорилирование белка VASP, субстрата РКА и PKG, что свидетельствует о РКА/PKG-зависимом механизме их действия. Ингибиторы АС и GC не влияли на фосфорилирование VASP агликонами. Следовательно, их действие может быть связано с ингибированием PDE. Измерение активности фосфодиэстераз показало, что агликоны снижают активность PDE. Было установлено, что все исследуемые соединения повышают уровень сGMP. Мирицетин, кверцетин, лютеолин и апигенин также увеличивали концентрацию сАМР. Следовательно, антитромбоцитарный эффект исследуемых агликонов определяется увеличением концентрации циклических нуклеотидов посредством ингибирования PDE.

Работа поддержана грантом РФФ №23-15-00142.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ДОБАВЛЕНИЯ ДОПОЛНИТЕЛЬНОЙ НЕЙРОНАЛЬНОЙ
АКТИВНОСТИ В СРЕЗАХ ГИППОКАМПА МЫШЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
АППАРАТНОЙ ПЛАТФОРМЫ И ТЕХНОЛОГИЙ ИСКУССТВЕННОГО ИНТЕЛЛЕКТА**

**Наумов А.В., Кипелкин И.М., Самбунова М.И., Разин В.В., Бельтюкова А.В.,
Громов Н.В., Мальков А.Е., Смирнов Л.А., Леванова Т.А.,
Герасимова С.А., Лебедева А.В.**

Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет
им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

al.naumov05@gmail.com

Гиппокамп – это ключевая структура лимбической системы, отвечающая за обработку информации, связанная с формированием новых памятных следов и играет жизненно важную роль в когнитивных процессах [1]. Даже незначительные нарушения в связях между нейронами гиппокампа могут существенно повлиять на функционирование системы в целом [2]. Поэтому разработка методов восстановления функций нейронов в гиппокампе является актуальной задачей современной биофизики.

Целью данного исследования является изучение процесса добавления дополнительной нейрональной активности в виде предсказанного сигнала, сгенерированного нейросетью, для проверки возможности формирования ответа в срезах гиппокампа

Экспериментальное исследование включало в себя регистрацию локальных полевых потенциалов в апикальных дендритах пирамидных нейронов и регистрацию популяционных спайков в телах пирамидных нейронов в двух областях гиппокампа (CA3 и CA1) лабораторных мышей, подвергнутых различной амплитуде электрической стимуляции зубчатой фасции. Сигналы были получены с помощью сети LSTM и переданы через аппаратную платформу Arduino UNO. Для качественной демонстрации ответа было проведено математическое вычитание из получаемого сигнала подаваемого.

В процессе эксперимента было обнаружено, что при амплитуде подаваемого сигнала ~1.2 В, наблюдался локальный потенциал с амплитудой 0.4 мВ в области CA1, свидетельствующий о реакции пирамидальных нейронов на дополнительную нейрональную активность, закодированную на плате Arduino с использованием аналого-цифровых методов.

Заключение. Таким образом, проведение исследования с подачей предсказанной нейрональной активности при использовании междисциплинарного подхода показало, что данный подход позволяет создать нейрогибридную технологию для восстановления активности в гиппокампе с широким практическим применением: от разработки «умных» роботизированных систем и технологий мозг-компьютер до нейропротезирования.

Работа была поддержана грантом РФФ № 23-75-10099

Литература

1. Mu Y., Gage F. H. Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease // Molecular Neurodegeneration. 2011. Т. 6. № 1. С. 85.
2. Krugers H. и др. Chronic Stress Effects on Hippocampal Structure and Synaptic Function: Relevance for Depression and Normalization by Anti-Glucocorticoid Treatment // Frontiers in synaptic neuroscience. 2010. Т. 2. С. 24.

ЭФФЕКТ ПОДКОЖНЫХ ИНЪЕКЦИЙ β -ГИДРОКСИБУТИРАТА НА ЦЕЛОСТНОСТЬ МТДНК ОРГАНОВ КРЫС В РАЗНОМ ВОЗРАСТЕ

Нестерова В.В.¹, Гуреев А.П.^{1,2}, Плотников Е.Ю.³

¹Кафедра генетики, цитологии и биоинженерии, Воронежский государственный университет,
Воронеж, Россия

²Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

³НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского (Московский государственный
университет имени Ломоносова), Москва, Россия

n3sterova.vero@yandex.ru

Старение — это дегенеративный процесс, который сопровождается митохондриальными дисфункциями, в том числе нарушениями целостности в митохондриальной ДНК (мтДНК). Кроме того, с возрастом может непосредственно изменяться и количество митохондрий, что может напрямую влиять на энергетическую обеспеченность клеток. На данный момент рассматривается несколько подходов к терапии митохондриальных дисфункций с целью увеличения продолжительности здорового долголетия. Один из них кетогенная диета. Данная диета вызывает образование в печени специфических соединений – кетоновых тел, например, β -гидроксибутирата (БХБ).

В своем исследовании мы рассматривали насколько подкожные инъекции БХБ старым крысам способны влиять на целостность структуры митохондриального генома, процессы регуляции уровня митохондриальной массы, а также маркеры окислительного стресса и антиоксидантной защиты в основных метаболически активных органах. В эксперименте были использованы крысы возраста 4 и 27 месяцев.

Мы показали, что в почках имелась тенденция к возрастному увеличению количества делеций мтДНК, что в целом совпадает с данными, которые были получены при оценке количества окислительных повреждений. Почки — это орган, который оказался наиболее подвержен возрастным окислительным повреждениям и накоплению делеций мтДНК. При этом введение БХБ не оказывало сколько-либо значимого эффекта на уровень повреждений мтДНК у старых крыс. В сердце число делеций значительно возросло у старых крыс, но статистически достоверного увеличения числа делеций у крыс, которые получали подкожные инъекции БХБ, не было. Адаптация митохондриального метаболизма сердца к новому субстрату, видимо, способствует ускорению обновления митохондриального пула и элиминации митохондрий с накопленными делециями. Эти предположения подкрепляются тем фактом, что у 27-месячных крыс, получавших БХБ, была увеличена экспрессия нескольких генов *Nfe2l2*, *Pparg1a*, *Nrf1*, которые являются маркером митохондриального биогенеза.

В мозге и легких происходит возрастное снижение количества копий мтДНК, что сопровождается уменьшением экспрессии некоторых маркеров митохондриального биогенеза. В некоторых органах в таких, как почки и сердце напротив наблюдалось увеличение копий мтДНК у 27-месячных крыс по сравнению с 4-месячными. Вероятно, это может являться компенсаторным эффектом в ответ на возрастное увеличение количества повреждений делеций мтДНК.

В целом, наши исследования показывают, что подкожные инъекции БХБ принципиально не влияли на количество и качество мтДНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (грант РНФ 21–75-30009).

МЕХАНИЗМЫ ИНГИБИРОВАНИЯ NMDA РЕЦЕПТОРОВ БИГУАНИДНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ.

Новикова А.О.^{1,2}, Жигулин А.С.¹, Барыгин О.И.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

²Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого (СПбПУ), Санкт-Петербург, Россия

novikovaanastasia@gmail.com

Многие фармакологические агенты ингибируют NMDA рецепторы, как дополнительную мишень. Ранее нами был описан класс амидин- и гуанидин-содержащих соединений, таких как пентамидин, диминазен и нафамостат, демонстрирующих активность по отношению к NMDA рецепторам в субмикромольных и микромольных концентрациях. Бигуанидные препараты – это широкий класс соединений, в которых две гуанидиновые группы слиты в единую сопряжённую систему. К ним относятся, в частности, препарат против вирусных инфекций мороксидин, противомаларийные препараты циклогуанил и прогуанил, гипогликемические метформин и фенформин. Ранее механизмы действия данных соединений на NMDA рецепторы не исследовались. Структурное сходство с исследованными ранее соединениями подтолкнуло нас к скринингу бигуанидных препаратов на активность по отношению к NMDA рецепторам.

Эксперименты проводились на изолированных пирамидных нейронах зоны CA1 гиппокампа крыс линии Вистар (13-18 дней). Нейроны из срезов были изолированы методом вибродиссоциации. NMDA рецепторы активировались с помощью NMDA (100 μ M) в присутствии глицина (10 μ M). Для аппликации применяли систему быстрой замены растворов. Для регистрации трансмембранных токов, вызванных аппликацией агониста, использовали метод локальной фиксации потенциала в конфигурации «целая клетка» при фиксированном потенциале -80 мВ.

При скрининге данных веществ в концентрации 10 мкМ, выяснилось, что метформин и мороксидин являются неактивными по отношению к NMDA рецепторам (блок <math><10\%</math>). Циклогуанил, прогуанил и фенформин демонстрировали блок $76 \pm 5\%$, $51 \pm 6\%$ и $44 \pm 2\%$, соответственно. Исследуя концентрационные зависимости действия циклогуанила, прогуанила и фенформина, получили IC_{50} , равные 3.4 ± 0.6 , 9.0 ± 2.2 и 13 ± 1 мкМ, соответственно. При исследовании потенциал-зависимости действия веществ, оказалось, что фенформин и прогуанил демонстрируют незначительную потенциал-зависимую и доминирующую потенциал-независимую компоненты, тогда как действие циклогуанила было строго потенциал-зависимым. С помощью уравнения Вудхолл были рассчитаны значения $\alpha\delta$ для циклогуанила, прогуанила и фенформина, равные $0,72 \pm 0,06$, $0,79 \pm 0,12$ и $0,75 \pm 0,32$, соответственно. Значение δ для фенформина было в 2 раза меньше, так как заряд этого соединения при физиологическом pH составляет +2. Циклогуанил не проявлял признаков «foot-in-the-door» механизма, но проявлял способность оставаться в «ловушке» закрытого канала. Прогуанил и фенформин, напротив, не проявляли ни признаков «foot-in-the-door», ни «ловушки», что объясняется слабо выраженным действием по каналному сайту. Также было выявлено, что ни один из исследуемых препаратов не конкурирует с агонистом за сайт связывания.

Таким образом, циклогуанил действует как каналоблокатор NMDA рецепторов, способный оставаться в поре закрытого канала, тогда как прогуанил и фенформин, помимо незначительного действия по каналному сайту, в основном действуют как неконкурентные аллостерические антагонисты NMDA рецепторов.

Исследования бигуанидных соединений, таких как циклогуанил, прогуанил и фенформин, являются полезными для создания и модернизации лекарственных препаратов от нейродегенеративных заболеваний. Исследование поддержано Минобрнауки РФ (Соглашение № 075-15-2022-296 на создание и развитие НЦМУ «Павловский центр»).

БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОДУКТОВ РАСПАДА ТИОСУЛЬФАТНОГО НИТРОЗИЛЬНОГО КОМПЛЕКСА ЖЕЛЕЗА

Новикова В.О.¹, Покидова О.В.¹, Куликов А.В.¹, Санина Н.А.^{1,2,3}

¹Институт проблем химической физики, РАН, Черноголовка, Россия

²Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³Научно-образовательный центр «Медицинская химия» Московского государственного
областного университета, Мытищи, Россия

veronika@icp.ac.ru

Нитрозильные комплексы железа (НКЖ) по сравнению с органическими нитратами, широко используемыми в медицинской практике в качестве вазодилаторов, имеют важное преимущество, заключающееся в самопроизвольной генерации монооксида азота (NO). Следовательно, эту особенность необходимо учитывать при дальнейшем использовании данного перспективного класса соединений.

В настоящей работе был исследован комплекс 1 состава $\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ [1], который представляет собой биядерный анионный тетранитрозильный тиосульфатный комплекс, перспективный вазодилатор [2], также обладающий антимагистатической, антидиабетической активностью и ингибирующий функции Ca^{2+} -АТФазы. Комплекс 1 на воздухе генерирует NO в течение первых пары минут и его предварительное растворение при внутривенном введении приведет к потерям NO, так как NO в воде сразу окисляется до нитритов. Применение комплекса перорально, без растворения решило бы данную проблему.

Исходя из этого, целью данной работы явилось исследование биораспределения железодинитрозильных фрагментов *in vivo* при пероральном введении (модельные животные – гибридные мыши линии BDF1). Комплекс 1 был введен экспериментальным животным внутрижелудочно и через определенные интервалы времени оценивали концентрацию парамагнитных центров методом ЭПР-спектроскопии. До попадания в кровяное русло, комплекс 1 всасывается через желудочно-кишечный тракт, в котором немаловажную роль играет муцин (Muc) – основной белок слизистой оболочки желудка-кишечного тракта. Он содержит богатый цистеином домен, который является потенциальной мишенью действия для продуктов распада комплексов. Кроме того, Muc может адсорбировать НКЖ на поверхности за счет слабых межмолекулярных взаимодействий. Об успешном прохождении железодинитрозильных фрагментов через защитный слой муцина в ЖКТ свидетельствует наличие стандартного для нитрозильных ЭПР сигнала в крови и органах с $g=2.03$ спустя час после введения комплекса 1. Через 3 ч концентрация парамагнитных центров уменьшается. Кроме того, сигнал наблюдается в мозге, что свидетельствует о прохождении гематоэнцефалического барьера. Концентрация парамагнитных центров в мозге и сердце ниже, чем в других органах.

Таким образом, можно заключить, что при внутрижелудочном способе доставки комплекс 1 и его продукты сохраняет свои NO-донорные свойства, успешно всасываются в кровяное русло и распределяются по органам. Сигнал, наблюдаемый в желудке и кишечнике, вероятно, дают комплексы, связанные с муцином слизи.

Работа выполнена по теме Государственного задания № 124020500019-2.

1. Sanina N.A., Aldoshin S.M., Rudneva T.N., Golovina N.I., Shilov G. V, Shul'ga Y.M., Martynenko V.M., Ovanesyan N.S. Synthesis, Structure and Solid-Phase Transformations of Fe-Nitrosyl Complex $\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ // Russ. J. Coord. Chem. 2005. Vol. 31. № 5. P. 301-306

2. Санина, Н. А., Серебрякова, Л. И., Шульженко, В. С., Писаренко, О. И., Руднева, Т. Н., Алдошин, С. М. Применение биядерного сера-нитрозильного комплекса железа анионного типа в качестве вазодилаторного лекарственного средства. Патент РФ 2437667 С1, 2010.

НЕЙРОПРОТЕКТИВНЫЕ СВОЙСТВА САХАРОСНИЖАЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ

Обухова Д.А.^{1,2}, Кудринская В.М.^{1,3}, Тютюнник Т.В.¹

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

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

³ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

obuhowadaria@gmail.com

Одним из основных факторов риска развития когнитивных нарушений является сахарный диабет второго типа. Когнитивная дисфункция при сахарном диабете проявляется снижением внимания, скорости и обработки освоения двигательных навыков, нарушением вербальной памяти. Существует несколько стратегий лечения сахарного диабета. На практике применяют бигуаниды, препараты сульфонилмочевины, тиазолидиндионы, инсулин, а также комбинации данных препаратов. Метформин – лекарственный препарат класса бигуанидов, наиболее часто назначаемый при лечении сахарного диабета второго типа. За счет активации АМФК (АМФ – активируемая протеинкиназа) метформин регулирует многие метаболические пути и клеточный гомеостаз. Глибенкламид (ГД) является представителем второго поколения производных сульфонилмочевины, вызывает закрытие калиевых аденозинтрифосфатзависимых (КАТФ) каналов в цитоплазматической мембране β -клеток поджелудочной железы, стимулируя высвобождение инсулина. В нейронах, астроцитах, олигодендроцитах, клетках эндотелия и в микроглиальных клетках экспрессируются каналы, аналогичные каналам β -клеток поджелудочной железы. Предполагается, что глибенкламид стимулирует высвобождение нейромедиаторов из клеток нейронов (аналогично высвобождению инсулина в β -клетках поджелудочной железы). Исходя из влияния данных препаратов на метаболизм моноаминов, мы можем предположить наличие у них нейропротективных свойств.

Целью данной работы была оценка нейропротективного действия метформина и глибенкламида на когнитивные функции крыс в скополаминовой модели когнитивных нарушений.

Исследование проводилось на 54 самцах крыс линии Вистар, которые методом блочной рандомизации были разделены на шесть групп: группа 1 (контроль), группа 2 (скополамин), группа 3 (метформин), группа 4 (метформин+скополамин), группа 5 (ГД) и группа 6 (ГД+скополамин). Группа 1 получала внутрибрюшинно физиологический раствор в дозе 1мл/кг, группы 2, 4 и 6 – скополамин в дозе 1 мг/кг, ежедневно в течение 30 дней. Группы 3 и 4 получали метформин в дозе 100мг/кг перорально ежедневно в течение 30 дней. Группы 5 и 6 получали ГД в дозе 50мкг/кг внутрибрюшинно ежедневно в течение 30 дней. Влияние препаратов на пространственную и рабочую память крыс оценивали при помощи поведенческих тестов: «Водный лабиринт Морриса» и «Y-образный лабиринт». Влияние препаратов на тревожность животных проверяли при помощи поведенческого теста «Приподнятый крестообразный лабиринт». Данные представляли как среднее \pm ошибка среднего; для статистической обработки данных использовали двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA, проверку на нормальность осуществляли с помощью критерия Шапиро–Уилка.

Хроническое введение скополамина приводило к увеличению времени нахождения крыс в целевом квадранте в поведенческом тесте «Водный лабиринт Морриса» ($p=0,03$). При хроническом введении сахароснижающих препаратов, как метформина ($p=0,04$), так и глибенкламида ($p=0,04$), наблюдалось увеличение данного показателя. Параллельное введение скополамина и метформина не приводило к нарушениям пространственной памяти животных. Поведенческие тесты «Y-образный лабиринт» и «Приподнятый крестообразный лабиринт» не показали статистически значимых результатов. Из полученных данных мы можем сделать вывод, что метформин и глибенкламид имеют нейропротективный потенциал.

ВЛИЯНИЕ АЛИМЕНТАРНОЙ ГИПО- И ГИПЕРГИДРАТАЦИИ НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ КРЫС ПРИ ОХЛАЖДЕНИИ

Орлов И.В.^{1,2}, Мейта Е.С.¹, Козырева Т.В.^{1,2}

¹Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины, Новосибирск, Россия

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

igor-orlow-2199@mail.ru

Взаимодействие систем температурного и водного гомеостаза представляет важную проблему современной физиологической науки. Механизмы взаимодействия этих систем в условиях нарушения водного баланса и охлаждения организма остаются до сих пор мало изученными. Цель данной работы – выявление влияния гипо- и гипергидратации организма крыс при охлаждении на физиологические параметры организма.

Исследование проводилось на крысах-самцах линии Wistar. Крысы были разделены на три группы: контроль, гипогидратация и гипергидратация. Все животные содержались в одиночных клетках в течение 6 дней. Крысы группы гипергидратации лишались сухой пищи и им предоставлялся в неограниченном объеме 4% раствор сахарозы. Крысы группы гипогидратации подвергались полной водной депривации в течение 3 дней и питались лишь сухим кормом. В конце эксперимента перед декапитацией животные охлаждались при помощи термоды, длительность охлаждения составляла 10-15 минут.

Нами установлено, что изменение водного режима приводит к значительным сдвигам температурного гомеостаза без дополнительной температурной нагрузки. У животных с гипергидратацией инициируется констрикторная реакция ($p=0.023$), однако, недостаточная для поддержания нормальной температуры тела ($p=0.0021$). У животных с сухоядением кроме констрикторной реакции кожных сосудов ($p=0.028$) повышается терморегуляторный тонус мышц ($p < 0.05$), и они поддерживают нормальную температуру тела.

Ранее нами было показано, что для быстрого глубокого охлаждения характерна определенная последовательность терморегуляторных реакций: вначале развивается первая срочная фаза повышения метаболизма, характеризующаяся повышением дыхательного коэффициента, затем инициируется вазоконстрикторная реакция сосудов кожи, после которой развивается вторая фаза повышения метаболизма, характеризующаяся снижением дыхательного коэффициента, и сопровождающаяся увеличением терморегуляторной мышечной активности.

При холодом воздействии как у животных с сухоядением, так и у животных с гипергидратацией наблюдались отклонения в терморегуляторной реакции организма. Эти отклонения были более выражены у животных с гипергидратацией. Первая срочная фаза повышения потребления кислорода у животных с гипо- и гипергидратацией, начиналась при более низкой ректальной температуре ($p=0.0397$ и $p=0.0394$, соответственно). Животные с гипергидратацией снижали также и величину метаболического ответа в первой фазе на 25% $p=0.001$. Снижение пороговых температур и уменьшение метаболического ответа во второй фазе на 28% ($p=0.015$) происходило только у животных с гипергидратацией. Это находило свое выражение в большем (на 1.5° , $p=0.019$) падении глубокой температуры тела у этих животных.

Таким образом, изменение потребления жидкости приводит к нарушению температурного гомеостаза в термонейтральных условиях и ослаблению компенсаторных реакций при холодом воздействии на организм. В наибольшей степени это выражено при гипергидратации.

**МОЗГОВОЕ ВЕЩЕСТВО НАДПОЧЕЧНИКОВ И ОРГАНЫ ЦУКЕРКАНДЛЯ:
МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ В РАЗЛИЧНЫЕ ПЕРИОДЫ
ОНТОГЕНЕЗА ЧЕЛОВЕКА**

Отлыга Е.Г., Отлыга Д.А., Кривова Ю.С., Юнеман О.А., Прощина А.Е., Савельев С.В.

Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика
А.П. Авцына Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

Tsvetkovakaty@mail.ru

Мозговое вещество надпочечников и структуры симпатической нервной системы образуют единую симпатoadреналовую систему организма. Помимо мозгового вещества надпочечников в неё включены венадпочечниковые параганглии, к которым относятся органы Цукеркандля (далее – «ОЦ»), расположенные вплотную к боковым стенкам брюшной части аорты в области её бифуркации. Несмотря на значительное уменьшение размеров ОЦ уже к 3 годам постнатального развития и практически полную их инволюцию у взрослого человека, в эмбриональном и плодном периодах развития ОЦ имеют значительные размеры и играют роль провизорных эндокринных органов, продуцирующих преимущественно норадреналин в то время, пока мозговое вещество надпочечников не сформировано. Помимо провизорной функции у некоторых животных (например, у кроликов) ОЦ играют роль «поставщика» зрелой хромаффинной ткани для мозгового вещества надпочечников, окружаясь в процессе развития корковым веществом надпочечников. Однако у человека морфофункциональное взаимодействие между данными органами практически не изучено. Также слабо исследованными остаются механизмы и последовательность стадий миграции хромаффинных клеток и их предшественников в мозговое вещество и их последующей дифференцировки в зрелые клетки, которые синтезируют помимо норадреналина также адреналин. Таким образом, целью нашего исследования является изучение взаимодействия ОЦ с формирующимися надпочечниками на различных этапах внутриутробного развития человека.

Исследование проводилось на 3-х эмбрионах, двое из которых бихориальная биамниотическая двойня 8-9 недели постменструального срока (п.м.), и один эмбрион 9 недели п.м., 3-х предлодах сроками от 9-ой недели после оплодотворения (п.о.) до 12 недели п.м. и 7-ми плодах человека сроками с 20 по 22 недели п.м. Мы использовали классические гистологические методы окраски и иммуногистохимический метод с антителами к β Ш-тубулину, тирозингидроксилазе (ТН) и S100. Было показано, что на изученных этапах развития человека мозговое вещество надпочечников представлено небольшими скоплениями ТН-позитивных клеток, тогда как органы Цукеркандля представляют собой четко ограниченные инкапсулированные образования, располагающиеся в непосредственной близости к вегетативным ганглиям, состоящие из гнездовых скоплений ТН-позитивных клеток, окруженных поддерживающими S100-позитивными клетками. Также в мозговом веществе надпочечника было обнаружено наличие количественного градиента окрашенных клеток: по мере удаления от ОЦ количество хромаффинных ТН-позитивных клеток резко снижалось. При этом ТН-позитивные клетки в надпочечнике располагались группами или единичными клетками вблизи кровеносных сосудов или непосредственно между клетками коры надпочечника. Данные результаты поднимают вопросы о механизмах миграции хромаффинных клеток. Изучение процесса эмбрионального развития мозгового вещества надпочечников является ключом к пониманию особенностей локальной прогрессии опухолей из хромаффинных клеток и их метастазирования.

Работа поддержана государственным заданием (тема № 122030200535-1).

ПРИМЕНЕНИЕ КИСЛОРОДНО-ГЕЛИЕВОЙ СМЕСИ ПРИ АРТЕРИАЛЬНОЙ ВОЗДУШНОЙ ЭМБОЛИИ

Паликов В.А.¹, Павлов Н.Б.^{2,3}, Исмаилова А.М.¹, Логунов А.Т.^{2,3}, Мурашев А.Н.¹

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

²ЗАО «Специальное конструкторское бюро экспериментального оборудования при
институте медико-биологических проблем РАН», Химки, Россия

³Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических
проблем РАН (ГНЦ РФ – ИМБП РАН), Москва, Россия

vpalikov@bibch.ru

Внутрисосудистая воздушная эмболия является тяжело дифференцируемой болезнью, требующая незамедлительной терапии. Одним из самых эффективных способов лечения является применение гипербарии. Однако барокамерами оснащены далеко не все больницы и поликлиники. Основным последствием эмболии является ишемия тканей и органов, что приводит к гипоксии. Поэтому применение 100% кислорода наиболее популярный подход временной симптоматической терапии, пока больного не доставят к барокамере. Обладая нейропротективными и антигипоксическими эффектами гипероксические кислородно-гелиевые смеси (КГС) могут стать перспективным методом терапии воздушной эмболии.

Газовая смесь для ингаляционного применения, содержащая 68±2% гелия и 32±2% кислорода, была изучена нами на экспериментальной модели артериальной церебральной воздушной эмболии на бодрствующих животных. Крысам SD через сосудистый катетер вводили атмосферный воздух во внутреннюю сонную артерию со скоростью 10 мкл/мин общим объемом 100 мкл. Данная модель позволяет вызвать мультифокальный инфаркт правой коры головного мозга. Ингаляционный 30-ти минутный сеанс подогретой дыхательной КГС сразу после эмболизации позволяет избежать последствий, связанных с ишемическим инсультом. Окрасивание головного мозга спустя 24 часа при помощи стандартной методики с применением трифенил-тетразолия хлористого (ТТХ) подтверждает отсутствие очагов поражения у животных, прошедших ингаляционный сеанс КГС.

ДИНАМИКА ФОРМИРОВАНИЯ ПЕРИНЕЙРОНАЛЬНЫХ СЕТЕЙ В МИНДАЛИНЕ И ГИППОКАМПЕ КРЫС ВИСТАР В ПРОЦЕССЕ НОРМАЛЬНОГО ОНТОГЕНЕЗА

Парамонова А.Э.^{1,2}, Манолова А.О.², Гуляева Н.В.²

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра высшей нервной деятельности, Москва, Россия

²Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН, Лаборатория функциональной биохимии нервной системы, Москва, Россия

anna_paramonova555@yahoo.com

Перинейрональные сети (ПНС) – специализированные структуры внеклеточного матрикса, которые обеспечивают стабилизацию синапсов во взрослом мозге. ПНС формируются преимущественно вокруг парвальбумин-позитивных тормозных нейронов. Состояние ПНС может служить маркером созревания структуры мозга, которое наступает после завершения критического периода развития. Целью работы было исследование динамики формирования ПНС в процессе нормального онтогенеза в структурах лимбической системы (гиппокампе и миндалине).

В исследовании были использованы самцы и самки крыс Вистар в постнатальные дни (ПД) 18 (n=15), 30 (n=19) и 90 дней (n=12). Под хлоралгидратным наркозом проводили кардиоперфузию 4%-ным раствором параформальдегида. Через неделю изготавливали 50-микронные срезы мозга, которые затем окрашивали лектином *Wisteria Floribunda*, который специфично связывается с протеогликанами ПНС. Подсчёт числа морфологически оформленных сетей проводили в поле СА1 гиппокампа (по-отдельности на границе пирамидного слоя и в *stratum oriens*), поле СА3 гиппокампа (по-отдельности в *stratum lucidum*, и в *stratum radiatum*), хилусе зубчатой фасции гиппокампа и в базолатеральном ядре миндаины. Статистический анализ проводили с использованием непараметрических тестов (тест Манна-Уитни использовали для выявления различий по полу, тест Крускала-Уоллиса – для выявления возрастных различий). Для снижения вероятности ложноположительного результата использовали поправку Бенджамини-Хохберга для множественных сравнений.

Проведенный анализ не выявил зависимости от пола животных числа перинейрональных сетей на единицу площади (плотность ПНС) ни в одной из исследованных структур; это позволило для последующего анализа использовать объединенные группы, состоящие из самцов и самок. Во всех исследованных структурах, кроме *stratum oriens* поля СА1 гиппокампа, были обнаружены возрастные изменения плотности ПНС: $p < 0.01$ – для границы *stratum pyramidale* поля СА1, *stratum lucidum* и *stratum radiatum* поля СА3 гиппокампа и базолатерального ядра миндаины; $p = 0.042$ – для хилуса зубчатой фасции гиппокампа. Апостериорный анализ показал, что во всех исследованных областях плотность ПНС в возрасте ПД18 меньше, чем в возрасте ПД30. Для поля СА3 гиппокампа дополнительно было обнаружено, что плотность ПНС достоверно меньше в возрасте ПД90 по сравнению с ПД30 ($p = 0.011$). Для других исследованных структур плотность ПНС не различалась между ПД30 и ПД90.

Таким образом, в ходе нормального онтогенеза у крыс Вистар число ПНС на единицу площади увеличивается от ювенильного (ПД18) к подростковому возрасту (ПД30) в полях СА1, СА3 и хилусе зубчатой фасции гиппокампа, а также в базолатеральном ядре миндаины. В поле СА3 гиппокампа обнаружено снижение числа ПНС на единицу площади при переходе от подросткового ко взрослому возрасту. Не выявлено половых различий в возрастной динамике формирования ПНС в гиппокампе и миндалине.

Работа поддержана грантом РФФ № 23-25-00463.

ВЛИЯНИЕ ТАКСИФОЛИНА НА АРТЕРИАЛЬНОЕ ДАВЛЕНИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ САМЦОВ КРЫС С НОРМАЛЬНЫМ И ПОВЫШЕННЫМ ДАВЛЕНИЕМ В ВОЗРАСТЕ 3 И 18 МЕСЯЦЕВ

**Перепеченова Н.А.^{1,2}, Туховская Е.А.², Исмаилова А.М.², Шайхутдинова Э.Р.²,
Слащева Г.А.², Садовникова Е.С.², Дьяченко И.А.², Мурашев А.Н.²**

¹Пушчинский филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)», Пушино, Россия

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушино, Россия

natka_1511@mail.ru

Артериальная гипертензия – синдром, которым по оценкам Всемирной Организации Здравоохранения, страдают не менее 1,28 млрд взрослых людей старше 30, является одним из ведущих причин смертности и часто проявляется вместе с другими возрастными заболеваниями. Следовательно, возникает необходимость в лекарствах и биологически активных добавках (БАД), способных точно влиять на физиологические параметры и обладающих минимумом побочных эффектов. Одним из таких БАД является Таксифолин, для которого было показано положительное влияние при повышении давления.

Проверка влияния Таксифолина на артериальное давление и биохимические параметры самцов крыс была выполнена на животных линии Wistar в возрастных группах 3 и 18 месяцев. У всех животных было измерено давление, затем они были поделены по значению систолического давления на нормальных и гипертензивных. У животных возрасте 3 месяца соотношение гипертензивных животных к животным с нормальным давлением было 33% и 67% соответственно, в то время как у животных в возрасте 18 месяцев уже 52% животных были с гипертензией. Затем каждая группа была еще раз поделена пополам. Половина животных получала препарат Таксифолин в дозе 100 мг/кг внутривентриально, вторая половина – контрольные животные – получали физраствор. После 7 дней введения у животных снова измерили давление, и животные были эвтаназированы с забором крови для измерения биохимических параметров.

У животных с гипертензией в возрасте 18 месяцев было показано достоверно значимое снижение давления после курса Таксифолина, у животных с повышенным давлением в возрасте 3 месяца – тенденция к снижению давления, сравнение показателей давления животных контрольных групп и животных с нормальным давлением, получавших таксифолин, обоих возрастов не показали достоверных отличий.

Анализ биохимических параметров ожидаемо показал значимые возрастные отличия при сравнении аналогичных групп: повышение холестерина и триглицеридов, повышение креатинина, и снижение уровней мочевины и щелочной фосфатазы (ЩФ), однако без значимых изменений аланинаминотрансферазы и аспаратаминотрансферазы.

Сравнение биохимических показателей между группами животных, получавших таксифолин, и контрольными животными в соответствии с возрастом и показателями давления, выявило несколько отличий. У нормотензивных животных, получавших препарат, по сравнению с контрольными животными обоих возрастов было показано падение уровня ЩФ. У гипертензивных животных в возрасте 3 месяца было обнаружено падение уровня глюкозы и повышение билирубина. У гипертензивных животных в возрасте 18 месяцев, получавших таксифолин, по сравнению с контрольными животными, был обнаружен повышенный уровень креатинина, что может указывать на нарушение работы почек, однако повышение уровней мочевины и ЩФ, учитывая возрастное снижение этих параметров, следует считать терапевтическим эффектом и тенденцией к нормализации показателей.

РОЛЬ СТРЕССА МАТЕРИ В ФОРМИРОВАНИИ СКЛОННОСТИ К НИКОТИНОВОЙ ЗАВИСИМОСТИ У ВЗРОСЛЫХ КРЫС, ПЕРЕЖИВШИХ ПРЕНАТАЛЬНУЮ ГИПОКСИЮ

Потапова С.С.^{1,2}, Стратилев В.А.¹, Сафарова Д.Н.^{1,2}, Ветровой О.В.^{1,2}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт Физиологии им. И.П. Павлова» Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

st091608@student.spbu.ru

Известно, что гипоксия плода в анамнезе известна как фактор риска прасположенности к развитию аддиктивных расстройств, включая склонность к потреблению никотина, во взрослом возрасте. Целью данного исследования было изучение вклада стрессорного ответа матери на гипоксию в формировании склонности к никотиновой зависимости у взрослого потомства.

Работы проведены на крысах линии Вистар. Чтобы разделить эффекты гипоксии и стресса матери на плод мы использовали модель гипобарической пренатальной гипоксии (ПГ), сопровождающейся выраженным глюкокортикоидным ответом матери, и модель хронической ишемии плода (ИП), заключающуюся в четырехсосудистой окклюзии плацентарных артерий и не сопровождающуюся материнским выбросом глюкокортикоидов.

Для оценки склонности к никотиновой зависимости определяли выраженность авersive поведения в тесте избегания места после хронического двухнедельного введения никотина при помощи осмотических помп. У животных, переживших ПГ (но не ИП) были выявлены признаки никотиновой зависимости и синдрома отмены. Мы также наблюдали повышение доли фосфорилированного белка DARPP-32 в прилежащем ядре ПГ крыс, что указывает на нарушение глутаматергической эфферентной передачи сигналов. Кроме того, в гиппокампе и префронтальной коре ПГ (но не ИП) крыс наблюдалось снижение экспрессии альфа-7 субъединицы никотинового ацетилхолинового рецептора, модулирующего высвобождение глутамата, коррелирующее со снижением экспрессии глюкокортикоидных рецепторов, для которых показана роль в транскрипционной регуляции транскрипции $\alpha 7$ -nAChR.

Таким образом, нарушения глюкокортикоидной нейроэндокринной системы и глюкокортикоид-зависимой экспрессии альфа-7 субъединицы никотинового ацетилхолинового рецептора в мозге потомства крыс связаны со стрессорной реакцией матери на гипоксию во время беременности и вызывают склонность к развитию никотиновой зависимости во взрослом возрасте.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 22-75-00003.

ПОЛИФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ВОДЯНИКИ ЧЁРНОЙ (*EMPETRUM NIGRUM L.*) ИНГИБИРУЮТ ТРОМБИН-ИНДУЦИРОВАННУЮ АКТИВАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ

Пронин Н.А.¹, Уэйли А.О.^{1,2}, Уэйли А.К.¹, Рукояткина Н.И.²

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

²Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия

nikita-pronin-2016@mail.ru

Введение. Известно, что многие представители класса растительных полифенольных соединений обладают разнообразными видами биологической активности, в том числе антитромботической. В связи с этим, достаточно перспективным является использование некоторых из них для профилактики тромботических осложнений сердечно-сосудистых заболеваний. Водяника чёрная (*Empetrum nigrum L.*) – вечнозелёный кустарничек семейства Вересковые (*Ericaceae*), широко распространённый в северной части России и богатый полифенолами нескольких групп: халконы, дигидрохалконы и 9,10-дигидрофенантрены. Эффект этих соединений на тромбоциты не описан, поэтому актуально их исследование в качестве потенциальных фармакологических агентов.

Цель. Изучить влияние полифенолов водяники чёрной на активацию тромбоцитов.

Материалы и методы. На кафедре фармакогнозии Санкт-Петербургского химико-фармацевтического университета из надземной части водяники чёрной были выделены соединения: 9,10-дигидрофенантрены – EN17 (4,7-dihydroxy-2,3-dimethoxy-9,10-dihydrophenanthrene), EN20 (6-hydroxy-2,3,4-trimethoxy-9,10-dihydrophenanthrene), EN53 (2,3,4,7-tetramethoxy-9,10-dihydrophenanthrene), EN55 (2,3,4-trimethoxy-5-hydroxy-9,10-dihydrophenanthrene); дигидрохалконы – EN23 (4'-hydroxy-2'-methoxydihydrochalcone), EN59 (2',4'-dihydroxydihydrochalcone); халконы – EN51 (2'-hydroxy-4'-methoxychalcone), EN58 (2',4'-dihydroxychalcone). Исследование проводилось на тромбоцитах здоровых доноров. Для оценки влияния веществ на тромбин-индуцированную активацию тромбоцитов, уровень активных форм кислорода (АФК), уровень фосфатидилсерина на мембране (маркер апоптоза), жизнеспособность тромбоцитов (активность внутриклеточных эстераз) применялся метод проточной цитометрии с использованием флюорохромов Alexa-Fluor 647, H₂DCFDA, Annexin V-PE, Calcein-AM соответственно. Влияние на активность тромбосан-А₂-синтазы оценивалось спектрофлуориметрически по реакции побочного продукта синтеза тромбосана-А₂, малонового диальдегида, с тиобарбитуровой кислотой. Степень фосфорилирования субстратного белка VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein), как маркера работы цАМФ и цГМФ-зависимых ингибиторных систем тромбоцитов, определялась методом Western-Blot анализа.

Результаты. Из всех соединений в концентрации 30 мМ EN58 (халкон) и EN59 (дигидрохалкон) значимо ингибируют тромбин-индуцированную активацию тромбоцитов, причем эффект первого в два раза выше (до 35,5±11,7% против 74,6±6,7%). Их воздействие не снижает жизнеспособность тромбоцитов, поскольку оно не приводит к увеличению экстернализации фосфатидилсерина на мембране и не снижает, а напротив, немного повышает активность внутриклеточных эстераз. По результатам Western-Blot анализа фосфорилирования белка VASP можно сказать, что эффекты веществ не связаны с системами

циклических нуклеотидов. При этом соединения вызывают снижение уровня АФК и подавляют активность тромбоксан-А₂-синтазы – в обоих случаях в 4-5 раз.

Выводы. Антитромботическую активность среди полифенолов водяники чёрной проявляют EN58 (халкон) и EN59 (дигидрохалкон). Соединения не снижают жизнеспособность тромбоцитов, а механизм их действия связан со значительным снижением уровня АФК и ингибированием активности тромбоксан-А₂-синтазы, что позволяет рассматривать их в качестве потенциальных фармакологических агентов.

Работа поддержана грантом РФФИ №23-15-00142.

ЦЕРЕБРАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *NAPA* ПРИ ФОРМИРОВАНИИ
ДОЛГОВРЕМЕННОЙ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ПАМЯТИ В УСЛОВИЯХ ФИЗИЧЕСКОЙ
АКТИВНОСТИ И СТРЕССА У КРЫС ЛИНИИ WISTAR

Ратмиров А.М., Грудень М.А., Сторожева З.И.

Федеральный Исследовательский Центр Оригинальных и Перспективных Биомедицинских и
Фармацевтических технологий, Москва, Россия

ratmirov_am@academpharm.ru

Введение. Пространственная память – это сложный когнитивный процесс, лежащий в основе навигации в пространстве и взаимодействия организма с внешним миром. Нейробиологической основой этого процесса являются множественные пластические перестройки в различных областях мозга. Одним из ключевых механизмов нейрональной пластичности является модуляция активности генома, при этом, особая роль отводится генам, регулирующим эффективность синаптической передачи. Ген *NAPA*, кодирующий растворимый белок α -SNAP, является одним из основных генов, участвующих в этих процессах. Однако активность гена в различных структурах мозга во время обучения и формирования долговременной пространственной памяти остаются в значительной степени невыясненной. Более того, в исследованиях на грызунах с использованием модели водного лабиринта Морриса ранее не оценивали влияние двигательной нагрузки или эмоционального стресса в условиях формирования навигационного навыка. В настоящее время сохраняется интерес к изучению молекулярных событий, лежащих в основе формирования пространственного памятного следа у человека и животных, в частности, везикулярного транспорта. Это связано с пониманием механизмов развития амнезий при нарушениях памяти, например, при нейродегенеративных заболеваниях или травмах головного мозга. Целью: данного исследования было изучение относительной экспрессии гена *NAPA* в структурах мозга, релевантных для пространственной памяти, а именно в гиппокампе, префронтальной коре мозга и мозжечке у половозрелых крыс линии Wistar, при формировании долговременной пространственной памяти, а также у животных, подвергшихся принудительному плаванию в том же временном режиме.

Методы. Поведение животных изучалось с использованием водного лабиринта Морриса. Крысы, предназначенные для поведенческих и генетических экспериментов, были разделены на 3 группы (36 животных; $n=12$): **Группа 1:** животные, подвергнутые принудительному плаванию без платформы (Активный контроль). **Группа 2:** животные, обученные в водном лабиринте Морриса навигационному навыку. **Группа 3:** наивные животные были использованы в качестве контроля в генетических исследованиях. Исследование относительной экспрессии гена *NAPA* проводили по методу ПЦР в реальном времени.

Результаты. Анализ поведенческих данных, показал достоверное снижение среднего нахождения платформы в водном лабиринте Морриса со 2-го дня обучения. Снижение времени нахождения платформы достигло плато до 4-го дня обучения и составило 10 с, что указывает на формирование долговременной пространственной памяти. Анализ транскрипционной активности *NAPA* выявил значимые различия в ее уровне в церебральных структурах у животных «Активного контроля» и «Обученных» животных, а также обеих экспериментальных по сравнению с группой нативного контроля. Также были изучены корреляционные взаимодействия между поведенческими показателями и данные по относительной церебральной экспрессией гена *NAPA*. Полученные данные расширяют понимание генетической регуляции нейропластичности при формировании долговременной пространственной памяти у крыс. Дальнейшее изучение механизмов, обеспечивающих структурно-функциональную динамику экспрессии гена *NAPA* во время обучения и физической активности, вызванной стрессом, представляет собой перспективное направление исследований для понимания и разработки потенциальных методов коррекции с расстройств памяти при различных заболеваниях.

ОСОБЕННОСТИ СОЦИАЛЬНОГО ПОВЕДЕНИЯ КРЫС ЛИНИИ ВИСТАР РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП

Ребик А.А., Мидзяновская И.С.

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

rebik_anastasiya@mail.ru

Исследования социального поведения интактных здоровых крыс важны для изучения фенотипа животных, используемых в группах сравнения в экспериментах в области нейрофизиологии, изучения возрастных изменений и фармакологии. Крысы являются стайными животными и демонстрируют спектр сложного социального поведения. Изучение социальной мотивации крыс может дать представление о нейронных, генетических факторах и факторах окружающей среды, влияющих на социальность животных. Проведя поведенческие тестирования у множества разновозрастных крыс, мы заметили, что параметры социального поведения обладают выраженной вариативностью и разным выбором приоритетных поведенческих актов во время прохождения тестов. Было решено провести исследование, которое позволило бы создать динамическую кривую изменений социального поведения у нормальных крыс в период от 2 до 8 месяцев. В этих возрастных пределах животных чаще всего используют в экспериментах, поэтому полученные данные помогут соотносить собственные данные с литературными. Целью исследования является изучение и описание параметров социального поведения у здоровых, интактных крыс линии Вистар, разных возрастных групп.

В исследование включались интактные самцы линии Вистар: 8 крыс в возрасте от 2 до 3 месяцев, 16 крыс от 4 до 5 месяцев и, 10 крыс от 7 до 8 месяцев. Все животные, включенные в эксперимент, тестировались однократно, без повторов в старшем возрасте. Для оценки социального поведения выбраны «3-камерный тест на социальное предпочтение/социальную новизну» и «социально обогащенное открытое поле». Для описания общей активности и тревожности использовался тест «приподнятый крестообразный лабиринт». Для трекинга использовалось программное обеспечение ToxTrac 2.98. Основным статистическим методом оценки достоверности между группами был U-критерий Манна-Уитни. Тест: «Приподнятый крестообразный лабиринт». С увеличением возраста крыс, наблюдается снижение уровня тревожности и двигательной активности. Наблюдалось снижение горизонтальной ($p=0,02$) и вертикальной активности ($p=0,01$) у 8-месячных крыс по сравнению с остальными возрастными группами; увеличение числа эпизодов короткого груминга ($p=0,02$), и эпизодов замирания ($p=0,005$) при укороченном среднем времени замирания ($p<0,001$) у 2-месячных крыс. Время нахождения в закрытых рукавах ($p=0,008$) существенно не отличалось между 2- и 5-месячными крысами. Тест: «Социально обогащенное открытое поле». Основным объектом анализа в тестах на социальность является контактное взаимодействие, выраженное в форме приближения морды свободноподвижной крысы к перфорированной клетке стимульного животного. 2-месячные крысы чаще вступали в контакт со стимульным животным ($p=0,011$). Однако суммарное время контакта для всех возрастных групп значимо не отличается. В тесте на социальное предпочтение, число подходов к клетке со стимульным животным достоверно не различалось между возрастными группами. Однако у 5-месячных крыс суммарное время контакта ($p=0,023$) значимо меньше по сравнению с другими группами. В тесте на социальную новизну, 2-месячные животные чаще всего контактировали ($p=0,02$) с незнакомым стимулом, чем остальные крысы, но различия в длительности контактов с незнакомым стимулом нет. Количество контактов со знакомым животным-стимулом существенно не отличалось.

Полученные данные свидетельствуют о том, что параметры социального поведения нормальных крыс обладают выраженной вариативностью, обусловленной разнонаправленной динамикой локомоторной и социальной активности.

Работа выполнялась при поддержке РНФ, грант номер 23-25-00484.

ВЛИЯНИЕ СПОСОБА АППЛИКАЦИИ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ НА СИНАПТИЧЕСКУЮ ПЕРЕДАЧУ В СИНАПСАХ СА3-СА1 ГИППОКАМПА КРЫС

Рогозин П.Д., Кондратенко Р.В.

Научный центр неврологии, Институт мозга, Москва, Россия

parogozin@yandex.ru

Один из наиболее распространенных способов изучения воздействия фармпрепаратов на активность нейронов использует технику переживающих срезов мозга, в частности гиппокампа. Тонкие срезы 300-400 мкм толщиной, изготовленные в день эксперимента, находятся в перфузирующем растворе, имитирующем внеклеточную среду мозга, при фиксированных условиях среды – температуре, рН, парциальном давлении кислорода и т.д. на протяжении всего эксперимента. Чаще всего в научной литературе не детализируют, каким именно способом происходит аппликация веществ. Личный опыт взаимодействия с коллегами и лаборатории функциональной синаптологии Института мозга указывают как на наиболее распространенное переключение потока с основного резервуара с перфузатом на резервуар с заранее подготовленным раствором с субстанцией. После аппликации переключают обратно на основной раствор, с целью увидеть т.н. «отмыв» эффекта препарата, если таковой имеется. Несмотря на указание методических сложностей при таком способе аппликации в специальной литературе, посвященной этой технике (например, методическое пособие Отмахова 1987 года), данному аспекту работы авторы посвящают удивительно мало информации в экспериментальных статьях, ограничиваясь указанием лишь времени аппликации препаратов.

Нами был разработан способ прямой аппликации препаратов в перфузирующий раствор (без переключения резервуаров), сохраняющий постоянство условий среды для среза. Микродозы препарата из шприца вводились с помощью катетера в перфузирующий раствор, имеющий постоянную скорость. Постоянство введения микродоз препарата из шприца обеспечивалось с помощью микрометрического винта, соединенного с шаговым двигателем, скорость вращения которого обеспечивалась управляемым программируемым контроллером. Необходимая конечная концентрация вещества при аппликации достигалась постоянным уровнем разведения вводимого в проток вещества на протяжении всего времени аппликации.

На примере аппликации Mn^{2+} , имеющего быстрый и значительный подавляющий эффект на электрофизиологическую активность, было показано преимущество такого метода перед стандартным способом аппликации. Регистрировали популяционные возбуждающие постсинаптические потенциалы СА1 нейронов (пВПСП) и потенциалы действия (пПД), вызванные стимуляцией коллатерали Шаффера. Так, было показано, что при переключении со сменой резервуара скорость нарастания пВПСП увеличивалась до $121 \pm 8\%$ ($n=6$) относительно значений до аппликации и сохранялась такой до конца записи независимо от дальнейшего переключения раствора. Затем, при 10-минутной аппликации 100 мкМ Mn^{2+} эффект «отмыва» с переключением раствора и без был наглядно продемонстрирован: в «отмыве» без переключения раствора оказывалось, что восстановление амплитуды пПД и скорости пВПСП после подавления его марганцем происходило только до 90 от фонового уровня, тогда как с переключением наблюдалась даже некоторая потенциация ответа до 120.

В заключение мы хотели бы акцентировать внимание авторов на данном аспекте методики работы со срезами *ex vivo*.

ОСТРАЯ ТОКСИЧНОСТЬ МЕДНОГО ХЛОРОФИЛЛИНА И ТРОЛОКСА ПРИ ВНУТРИБРЮШИННОМ ВВЕДЕНИИ МЫШАМ

Родионова Е.Д.^{1,2}, Ромодин Л.А.¹, Никитенко О.В.¹, Бычкова Т.М.¹,
Зрилова Ю.А.¹, Бочаров Д.А.^{1,2}

¹Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский
биофизический центр имени А.И. Бурназяна, Москва, Россия

²Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ), Москва, Россия

lizabeth13132@gmail.com

Введение. Несмотря на встречающиеся в литературе данные о возможных радиозащитных свойствах медного хлорофиллина [1] и тролокса [2], проведение исследований в этой области будет разумным лишь в том случае, если химическая токсичность этих веществ ниже, чем у уже признанных радиопротекторов, например, у индралина. Из этого следует необходимость изучения токсичности вышеуказанных препаратов, что и является целью настоящего исследования.

Методы и материалы. Эксперимент был проведен с использованием 90 аутбредных самцов мышей линии ICR (CD-1) SPF-категории (питомник лабораторных животных РАН, г. Пушино). Масса животных на момент эксперимента – $37,6 \pm 0,3$ г. До начала эксперимента животных выдержали на карантине в течение 14 суток.

Препараты вводились внутривбрюшинно, средой для их растворения выступал водный 0,2% раствор уротропина (производство АО «Мосагроген», Россия). Тролокс (Aldrich, Merck, США) мы вводили в объеме 0,5 мл для достижения дозировки 675 мкг/г массы тела. Большую дозировку получить не удалось по причине плохой растворимости тролокса в воде. Медный хлорофиллин (Macklin, Китай) мы вводили в объеме 0,2 мл для достижения дозровок: 200, 400, 600 или 800 мкг/г массы тела.

Критерии оценки острой токсичности: число павших животных, сроки их гибели, картина интоксикации. Учет гибели и общего состояния животных мы проводили один раз в день ежедневно на протяжении всего опыта. Выживаемость оценена в течение 30 суток после введения препаратов. Расчет кумулятивной доли выживших животных производился по E.L. Kaplan и P. Mayer [3].

Результаты исследования. Тролокс технически нетоксичен при внутривбрюшинном введении мышам: максимальная дозировка тролокса, 675 мкг/г, не только не убила животных, но и не вызвала никаких изменений в их самочувствии по сравнению с животными из контрольной группы. Относительно летальных дозровок (LD) медного хлорофиллина при внутривбрюшинном введении мышам получены следующие данные: LD₈₀ хлорофиллина составляет 800 мкг/г, LD₅₀ – $633 \pm 37,2$ мкг/г, LD₁₆ – 467 мкг/г.

Заключение. Поскольку химическая токсичность хлорофиллина и тролокса гораздо ниже, чем у известных радиопротекторов, изучение радиозащитных свойств этих веществ можно считать актуальным направлением исследований.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-00383, <https://rscf.ru/project/23-24-00383/>.

Литература

1. Ромодин Л.А., Лысенко Н.П. Радиопротекторное действие препаратов на основе хлорофилла // Биофизика. 2022. Т. 67, № 1. – С.: 96–104. doi: 10.31857/S0006302922010094
2. McClain D.E., Kalinich J.F., Ramakrishnan N. Trolox inhibits apoptosis in irradiated MOLT-4 lymphocytes // FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 1995. Vol. 9, № 13. – P.: 1345–1354. doi: 10.1096/fasebj.9.13.7557025
3. Kaplan E.L., Meier P. Nonparametric Estimation from Incomplete Observations // Journal of the American Statistical Association. 1958. Vol. 53, № 282. – P.: 457–481. doi: 10.1080/01621459.1958.10501452

СРАВНЕНИЕ РАДИОЗАЩИТНЫХ СВОЙСТВ ХЛОРОФИЛЛИНА, ТРОЛОКСА И ИНДРАЛИНА ПРИ ПРОФИЛАКТИЧЕСКОМ ВНУТРИБРЮШИННОМ ВВЕДЕНИИ МЫШАМ

Ромодин Л.А., Никитенко О.В., Бычкова Т.М., Зрилова Ю.А.

Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский
биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, Россия

rla2904@mail.ru

Поиск новых радиозащитных препаратов среди малотоксичных соединений представляется актуальным направлением исследований.

В литературе имеются сообщения о радиозащитных свойствах тролокса (водорастворимой формы витамина Е) [1] и препаратов на основе хлорофилла [2].

Целью нашего исследования было сравнение радиопротекторных свойств хлорофиллина (водорастворимой формы хлорофилла), тролокса и табельного российского радиопротектора индралина по тесту 30-суточной выживаемости самцов мышей линии ICR (CD-1), подвергнутых внешнему воздействию рентгеновским излучением. Радиопротектор – радиозащитный препарат, действующий в момент облучения и способный защитить организм при облучении в сверхлетальной дозе радиации.

Препараты вводились мышам внутрибрюшинно перед облучением. В роли среды для их растворения выступал водный 0,2% раствор уротропина. Тролокс мы вводили в дозировках 100 и 200 мкг/г массы тела, хлорофиллин и индралин – 100 и 150 мкг/г. Индралин, ввиду нерастворимости чистой субстанции в воде, при растворении мы смешивали с винной кислотой в соотношении, близком к эквимольному.

Индралин и хлорофиллин во всех экспериментах показали статистически значимое повышение выживаемости мышей по сравнению с группой облучённого контроля. Тролокс не продемонстрировал подобного эффекта.

Для препаратов в дозировках 100 мкг/г мы рассчитали значения фактора изменения дозы (ФИД) – отношения дозы ионизирующего излучения, вызывающей гибель половины облучённых животных, получивших препарат, к дозе, вызывающей гибель половины не получавших его животных. ФИД для хлорофиллина составил 1,1, для тролокса – 1, т.е. тролокс не показал радиопротекторных свойств. Значение ФИД для вводимого внутрибрюшинно индралина в дозировке 100 мкг/г составило 1,8.

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 23-24-00383, <https://rscf.ru/project/23-24-00383/>.

Литература

1. McClain D.E., Kalinich J.F., Ramakrishnan N. Trolox inhibits apoptosis in irradiated MOLT-4 lymphocytes // FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 1995. Vol. 9, № 13. – P.: 1345–1354. doi: 10.1096/fasebj.9.13.7557025
2. Поздеев А.В., Лысенко Н.П. Повышение радиационной устойчивости организма млекопитающих при применении препаратов хлорофилла в условиях радиоактивного загрязнения окружающей среды // Известия Международной академии аграрного образования. 2018. Выпуск 42, Т. 2. – С.: 60–62.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ЛИТИЯ ТАУРАТА И ЛИТИЯ КАРБОНАТА НА 12-, 24-, 48- ЧАСОВЫЕ БИОРИТМЫ ДВИГАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ В ТЕСТЕ АКТОМЕТРИИ

Саванец О.Н.¹, Кравченко Е.В.¹, Ольгомец Л.М.¹, Бухлицкая И.В.¹, Зильберман Р.Д.¹,
Каранкевич Е.Г.², Куваева З.И.²

¹Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

²Институт физико-органической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

savanets@iboch.by

Актуальность. В настоящее время при лечении такого психического заболевания как биполярное аффективное расстройство (БАР) активно используются соли лития. При разработке отечественного препарата на основе органической соли лития актуальным является его максимально полное фармакологическое исследование, в том числе – с использованием новых методических подходов. В связи с чередованием депрессивной и маниакальной фазы целесообразно изучить не только 48-часовые более длинные (инфраниантные), но и короткие 6-, 12-часовые, и циркадные 24-часовые ритмы, для более полной оценки эффектов солей лития с использованием данных актометрии.

Цель. Изучение влияния готовой лекарственной формы (ГЛФ) лития таурата (ЛТ) и ГЛФ лития карбоната (ЛК) на 6-, 12-, 24-, 48-часовые биоритмы двигательной активности в тесте актометрии.

Материалы и методы исследования. Определение двигательной активности (ДА) (горизонтальная двигательная активность – ГДА; вертикальная двигательная активность – ВДА) животных проводили в течение 72 часов с помощью многоканального регистратора «Activity Cages» «Ugo Basile» (Италия). Крыс размещали поодиночке в камерах размером 41 см × 44 см × 32 см. Крысам контрольной группы (КГ) интрагастрально (и/г) вводили 1 % раствор крахмала в воде для инъекций; животным основных групп назначали лития таурат – ЛТ (капсульная масса на основе лития таурата, ИФОХ НАН Беларуси, РБ, с. 170823) в дозе 2,0 мЭкв/кг соответственно; лития карбонат – ЛК («Седалит», таблетки 300 мг, ОАО «Фармстандарт-Лексредства», Россия, с. 501121) в дозе 2,0 мЭкв/кг соответственно. Введение образцов осуществлялось 7-кратно. Интактным животным процедура введения не проводилась. Обработка данных, представленных за 36 интервалов наблюдения продолжительностью 2 часа каждый, осуществлялась методом косинор-анализа. Определяли параметры, необходимые для построения эллипсов ошибок, а также амплитуду ритма (A), акрофазу (ϕ), и мезор (h). Наличие или отсутствие статистически достоверных 6-, 12-, 24-, 48-часовых ритмов ($p < 0,05$) определялось графически: существование ритмов считали доказанным, если эллипс не перекрывал начало системы координат. Обработку результатов осуществляли с помощью программного обеспечения Biostat 4.03, Cosinor 2.4 для Excel, Cosinor Ellipse 2006.

Результаты и обсуждение. У интактных животных и у крыс группы КГ были отмечены статистически значимые 24-часовые ритмы ГДА и ВДА. Вместе с тем в группе интактного контроля присутствовали «патологические» 6- и 12-часовые ритмы. Отсутствие их в группе «контроль» может объясняться мобилизирующим действием «инъекционного» стресса. Слабый стресс оказывал позитивное действие на 6- и 12-часовые ритмы (устранял), модифицировал 24-часовые ритмы (смещал акрофазу ГДА на вечерние часы), а также элиминировал 48-часовые ритмы. Обе соли лития устраняли последствия стресса в отношении ультрадианных, циркадных и инфраниантных биоритмов. Выводы. Использование нового подхода к оценке изменений параметров 48-часовых ритмов ДА на фоне применения солей лития в тесте актометрии позволяет более полно оценить хронотропные эффекты, неизменно сопровождающие основное фармакологическое действие указанных соединений. Соли лития устраняли стресс-индуцированную модификацию ритмов 12- и 24-часовой ДА. В практической медицине при планировании повседневной активности пациентов следует учесть, что применение солей лития вызывает выраженную модификацию биологических ритмов (это связано с антистрессорным действием).

ОЦЕНКА ВОЗДЕЙСТВИЯ РАЗНЫХ ТЕМПЕРАТУРНЫХ РЕЖИМОВ НА СПЕРМАТОГЕНЕЗ И ТУЧНЫЕ КЛЕТКИ РЕПРОДУКТИВНЫХ ОРГАНОВ У САМЦОВ КРЫС

Садек А.^{1,3}, Храмцова Ю.С.^{2,3}, Измestьева О.В.³, Юшков Б.Г.^{1,2,3}

¹Государственное автономное учреждение здравоохранения Свердловской области, Центр специализированных видов медицинской помощи «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург, Россия

²Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия

³Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия

sadek1996@mail.ru

Введение. Тучные клетки (ТК) могут влиять на процесс сперматогенеза, выделяя различные медиаторы. Учитывая, что оптимальный температурный режим имеет решающее значение для сперматогенеза, и некоторые виды мужского бесплодия (например, варикоцеле и крипторхизм) сопровождаются отклонениями от этого режима, использование высокой температуры в качестве метода индуцирования нарушений сперматогенеза представляет собой целесообразный подход для исследования ТК органов репродуктивной системы и их роли в вызванных отклонениях.

Цель: оценить взаимосвязь сперматогенеза и ТК при воздействии высокой температуры.

Материалы и методы. Эксперимент проведен на 30 крыс-самцах линии Вистар, разделенных на 4 группы: 1) интактная, 2) группа однократного локального воздействия высокой температуры, 3) опытная группа при многократном воздействии высокой температуры, и 4) контрольная группа (условия аналогичные 3-ой группе, но без температурного воздействия). Оценивали параметры ТК в разных репродуктивных органах, спермограмму и уровень тестостерона. Морфометрические исследования проводились с помощью ImageJ 1.53t и Qupath. Все собранные данные были статистически проанализированы с использованием IBM SPSS 26.

Результаты. При однократном воздействии высокой температуры не происходит значительных изменений в сперматогенезе, а также в количестве ТК во всех исследуемых органах, но отмечается повышение их дегрануляционной активности. После многократного же воздействия высокой температуры происходит постепенное снижение концентрации и подвижности сперматозоидов крыс, увеличение процента их дефектных форм как в нативном эякуляте, так и в придатках. Эти данные свидетельствуют о нарушении формирования и созревания клеток на каждом этапе образования нормальных сперматозоидов. При этом в исследованных органах наблюдается значительное увеличение количества ТК, сопровождаемое повышением их дегрануляции и снижением синтетической активности, что свидетельствует об активации ТК и их миграции в репродуктивные органы. Уровень тестостерона снижается вне зависимости от температурного режима.

Выводы. Высокая температура активирует ТК даже при ее однократном влиянии, но их миграция отмечается только при многократном воздействии. Результаты расчета корреляционных коэффициентов показывают наличие взаимосвязи между параметрами ТК и сперматозоидов. Таким образом, ТК играют важную роль в функционировании репродуктивных органов и их адаптации к действию высокой температуры за счет высвобождения широкого спектра медиаторов.

ИЗУЧЕНИЕ АНТИДЕПРЕССИВНЫХ СВОЙСТВ ЛИГАНДА TSPO НА МОДЕЛЯХ ВЫНУЖДЕННОГО ПЛАВАНИЯ ПО ПОРСОЛТУ И ПОДВЕШИВАНИЯ ЗА ХВОСТ

Садовский М.С., Котельникова С.О., Вахитова Ю.В.

Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных
биомедицинских и фармацевтических технологий, Москва, Российская Федерация

sadovskii_ms@academpharm.ru

Транслокаторный белок 18 кДа TSPO вовлечен в патогенез нейropsychиатрических заболеваний и рассматривается в качестве мишени для разработки средств фармакотерапии. В различных экспериментальных моделях *in vivo* было продемонстрировано, что лиганды TSPO обладают нейропротективной, анксиолитической, антидепрессивной активностью, а также противовоспалительными свойствами. В ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» была разработана группа оригинальных лигандов TSPO на основе пирроло[1,2- α] пиразина, среди которых для дальнейшей разработки было отобрано соединение ГМЛ-3 (*N*-бутил-*N*-метил-1-фенилпирроло[1,2- α] пиразин-3-карбоксамид). Радиолигандные исследования подтвердили аффинность ГМЛ-3 по отношению к TSPO ($K_i=5.3 \times 10^{-7}$ М).

Целью данной работой является изучение антидепрессивных свойств субстанции ГМЛ-3 в разных дозах в тесте Порсолта и в тесте «Подвешивание за хвост» при однократном пероральном введении, а также поиск оптимального растворителя для исследуемого соединения.

Исследование выполнено на беспородных крысах-самцах, случайным образом разделенных на группы. Животным за 60 мин до тестирования перорально вводили контрольным группам раствор твин-80, 1% раствор крахмала, 10% раствор диметилацетонида и препарат сравнения amitriptilin в дозе 10 мг/кг. Исследуемым группам – ГМЛ-3 в дозах 0.1 мг/кг, 0.5 мг/кг, 1 мг/кг, 5 мг/кг, приготовленных с соответствующим растворителем. Установка Порсолта у крыс представляет собой сосуд цилиндрической формы диаметром 20 см и высотой 45 см. Цилиндр наполняют на 2/3 водой, температура которой поддерживается на уровне $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. Регистрацию поведения осуществляли в течение 6 мин. Оценивали суммарное время иммобильности животного в течение этого времени. Тест «подвешивание за хвост» основан на наблюдении за мышами, подвешенными за хвост, которые чередуют периоды неподвижности и активности. Мышей подвешивали за хвост на клейкий пластырь за перекладину, находившуюся в 35 см от поверхности стола. Пластырь закреплялся в 1 см от кончика хвоста. Животные были подвешены в течение 6 минут, в течение которых отмечалось время иммобильности. Мышей считали неподвижными, только когда они висели абсолютно неподвижно. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы GraphPad Prism 8.01.

Показано, что при однократном введении субстанции ГМЛ-3, растворенной при помощи твин-80 в дозах 0,1; 0,5; 1,0 и 5,0 мг/кг у крыс наблюдалось достоверно значимое снижение времени иммобильности в тесте Порсолта по сравнению с контрольной группой животных, которым вводили воду. При растворении субстанции с использованием 1% раствора крахмала антидепрессивная активность установлена в дозах 0,1 и 0,5 мг/кг, а с использованием 10% раствора диметилацетонида – лишь в дозе 0,1 мг/кг. В дополнении к полученным результатам, в тесте подвешивание за хвост была подтверждена антидепрессивная активность ГМЛ-3 в диапазоне изученных доз, с использованием растворителя твин-80.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что субстанция ГМЛ-3 при однократном пероральном введении проявляет антидепрессивную активность, достоверно уменьшая время иммобильности у крыс в тесте вынужденного плавания по Порсолту и у мышей в тесте «подвешивание за хвост». При этом показано, что в качестве растворителя лучшим из исследуемых соединений является твин-80.

ТРАЕКТОРИИ БИНАУРАЛЬНЫХ БИЕНИЙ: ВЛИЯНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОГО ПОЛОЖЕНИЯ И СКОРОСТИ

Саликова Д.А., Шестопалова Л.Б., Петропавловская Е.А., Летягин П.И.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

Бинауральные биения (ББ) – это феномен, возникающий в мозге при одновременном восприятии двух подаваемых дихотически чистых тонов, почти одинаковых по амплитуде, но с разными частотами. Возникающее биение имеет частоту, равную разнице частот двух чистых тонов; например, если левое ухо воспринимает чистый тон 250 Гц, а правое ухо – 290 Гц, в мозге воспринимается бинауральное биение 40 Гц. Таким образом, возникает иллюзия тона промежуточной частоты и пульсирующей громкости.

В общем случае бинауральные биения возникают в области низких частот основного тона (около 1000 Гц или ниже) при разнице частот обоих тонов не более 35 Гц. Важно отметить, что необходимым условием возникновения бинауральных биений является бинауральная интеграция. Несмотря на то, что частотный диапазон не входит в область частот, воспринимаемых человеческим ухом, тем не менее он совпадает с диапазоном основных осцилляторных ритмов мозга (дельта-, тета-, альфа-, бета- и гамма-ритмы).

Основные задачи данного исследования заключались в следующем: во-первых, демонстрация возможности создания эффекта бинауральных биений при использовании шумового сигнала, который воспринимается как циклическое перемещение по различным зонам акустического пространства; во-вторых, анализ того, как изменение пространственного расположения и скорости этого движения влияет на величину размаха воспринимаемых биений.

Исследование проводилось с использованием звукоизлучателей для подачи стимулов, создающих ощущение движения за счет изменений междушумной задержки. Участники оценивали воспринимаемые траектории движения и положение неподвижных сигналов, используя графический планшет.

Участники испытания смогли воспринимать траектории как медленного, так и быстрого движения. Было выявлено, что медленное движение стимулов воспринимается как более короткое по сравнению с быстрым движением стимулов, что подтверждает влияние скорости движения на восприятие длины траектории.

Воспринимаемые траектории такого движения могут быть размещены в различных сегментах субъективно воспринимаемого пространства, что определяется диапазоном изменений междушумной задержки.

Обнаружена зависимость между положением траекторий в субъективном пространстве и величиной их размаха: в центральной части пространства размах биений оказывается больше по сравнению с боковыми положениями при одинаковом диапазоне изменения междушумных задержек.

Работа поддержана грантом РФФИ № 24-25-00106.

СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТОВ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ГИПОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ И ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ ПЛОДА НА АКТИВНОСТЬ ГЛЮКОКОРТИКОИДНОЙ СИСТЕМЫ И ЭКСПРЕССИЮ NIF1A В МОЗГЕ ВЗРОСЛЫХ КРЫС

Сафарова Д.Н.^{1,2}, Стратиллов В.А.¹, Потапова С.С.^{1,2}, Ветровой О.В.^{1,2}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт Физиологии им. И.П. Павлова» Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

st085668@student.spbu.ru

Настоящее исследование было направлено на сравнение эффектов пренатальной гипобарической гипоксии и хронической ишемии плода на экспрессию NIF1 α и активность глюкокортикоидной системы в мозге взрослых крыс.

Работы проведены на крысах линии Вистар. Проводили сравнение пренатальной гипобарической гипоксии (ПГ, 5% O₂, 3 сеанса по 3 часа с интервалом в сутки), предъявляемой беременным самкам крыс линии Вистар на 14-16 сутки гестации, и хронической ишемии плода (ИП), заключающейся в четырехсосудистой окклюзии плацентарных артерий начиная с 14 суток гестации. Для оценки содержания маркера гипоксии NIF1 α и глюкокортикоидных рецепторов (ГР) в структурах мозга взрослых крыс использовали методы ПЦР РВ и вестерн блот. Анализ циркадианной динамики концентрации кортикостерона в плазме крови провели с использованием иммуноферментного анализа.

У взрослых крыс, подвергшихся воздействию ПГ и ИП, мы наблюдали повышение содержания NIF1 α в гиппокампе (но не префронтальной коре и амигдале) по сравнению с контрольными животными. Однако только в группе ПГ происходило снижение экспрессии ГР и нарушение циркадианной динамики кортикостерона относительно контроля.

Таким образом, модель пренатальной гипобарической гипоксии пригодна для исследований сочетанного влияния кислородной недостаточности и стресса матери на развитие плода, в то время как модель хронической ишемии плода позволяет отслеживать непосредственный вклад дефицита кислорода.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 22-75-00003.

СИНТЕТИЧЕСКИЕ ПЕПТИДНЫЕ ФРАГМЕНТЫ ТОКСИНА WTX ВЛИЯЮТ НА ГЕМОДИНАМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ КРЫС SD

Северюхина М.С.^{1,2}, Исмаилова А.М.²

¹Пушинский филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)», Пушкино, Россия

²Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Пушкино, Россия

SeveryuchinaMS@yandex.ru

Из результатов ранее проведенных исследований следует, что слабый токсин WTX из яда *Naja kaouthia* обладает свойствами α -нейротоксинов и мускариновых токсинов. WTX блокирует мышечный ($\alpha\beta\gamma\delta$) и $\alpha 7$ -тип никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (nAChR), а также может аллостерически взаимодействовать с разными типами мускариновых ацетилхолиновых рецепторов.

Цель. Изучить гемодинамические эффекты синтетических аналогов петли II WTX (WTXf1, WTXf2) на бодрствующих крысах SD.

Методика. Исследование выполнялось на самцах крыс линии SD с массой тела 250-300 грамм. Животных случайным образом делили на 3 основные группы (n=6): 1 группа – контроль с введением физиологического раствора, 2 группа – экспериментальная, с введением WTXf1 в дозе 0,3 мг/кг, 3 группа – экспериментальная, с введением WTXf2 в дозе 0,3 мг/кг.

Животные под наркозом (Телазол 200мкл/кг + Ксилазин 600 мкл/кг) подвергались операции по катетеризации общей сонной артерии и яремной вены. После периода восстановления (24 часа) животные подключались к установке «PowerLab» для регистрации артериального давления (АД) и частоты сердечных сокращений (ЧСС) прямым способом через артериальный катетер. Параметры АД и ЧСС регистрировались непрерывно на протяжении всего эксперимента не менее 90 минут с записью базовых значений в течение 15 минут до введения экспериментальных веществ.

Результаты. Достоверных изменений давления и частоты сердечных сокращений у бодрствующих животных в контрольной группе не наблюдалось.

В группе 1 наблюдалось статистически значимое падение АД в течение первых 10 минут после введения относительно контрольной группы. АД падает до 35% относительно первоначальных значений. С 15 минуты АД восстановилось до первоначальных значений и не изменялось до конца записи. ЧСС статистически значимо повышалось в первые минуты после введения в сравнении с контрольной группой. В последующем ЧСС не имеет статистически значимых различий от контрольной группы.

В группе 2 наблюдалось статистически значимое падение АД в 1-ю минуту после введения относительно контрольной группы. АД падало на 22% относительно первоначальных значений. На 5-ой минут АД было на 12% ниже исходных значений. С 10 минуты АД восстановилось до первоначальных значений и не изменялось до конца записи. Статистически значимые различия ЧСС наблюдалось на протяжении всей записи от момента введения вещества относительно контрольной группы.

Вывод. Исследования двух аналогов центральной петли II токсина WTX на крысах, выявили гипотензивное действие с первой минуты введения, что указывает на способность каждого из фрагментов оказывать прямое миотропное действие на сосуды, наблюдавшееся ранее для целого токсина. Интенсивность и длительность эффекта различалась у животных, получавших WTXf1 или WTXf2.

ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ РЕГИСТРАЦИЯ ВО ВРЕМЯ ЭПИЛЕПТИФОРМНОЙ АКТИВНОСТИ В СОМАТОСЕНСОРНОЙ КОРЕ КРЫСЫ *IN VIVO*

Силаева В.М.¹, Ситдикова В.Р.¹, Логашкин А.Е.¹, Мамлеев А.Р.¹, Минлебаев М.Г.^{1,2}

¹Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия

²Средиземноморский институт нейробиологии при Национальном институте здоровья и медицинских исследований, Марсель, Франция

valentisilaeva@gmail.com

Введение. Эпилепсия является хроническим заболеванием, характеризующимся повторяющимися непровоцируемыми приступами нарушений различной природы, с заболеваемостью 50 млн человек во всем мире. В основе разработки стратегии лечения лежит понимание механизмов генерации электрических потенциалов в головном мозге. В большинстве исследований используют экспериментальные модели, в которых используется системное введение проэпилептогенов. Но само присутствие вещества в головном мозге может влиять на исследуемые параметры и на электрическую активность, что может затруднить интерпретацию полученных результатов. Поэтому наряду с определением природы и механизмов эпилептической активности, актуальным вопросом является создание адекватной модели эпилептиформной активности *in vivo*. Целью нашего исследования является поиск и создание такой модели.

Материалы и методы. Экспериментальная серия была проведена на крысах линии Wistar (p13-p28, где p0 соответствует дню рождению крысенка). Во время эксперимента проводилась регистрация внеклеточной и внутриклеточной активности в области представительства соматосенсорной коры. Фокальная эпилептиформная активность, индуцировалась интракорткальной инъекцией 4-аминопиридина (4-АП, (200 нл, 50 ммоль) через углеродную трубку с внутренним диаметром 70 мкм в соматосенсорную кору крыс. Для оценки распространения 4-АП проводилась регистрация внутриклеточной активности в режиме постоянной фиксации тока.

Результаты. Инъекция 4-АП сопровождалась повторяющимися множественными эпизодами эпилептиформной активности во время внеклеточной регистрации. Результаты наших регистраций в контрольных условиях и во время эпилептиформной активности на отдельных нейронах соматосенсорной коры показали, что на расстоянии менее 1.0 мм от места введения 4-АП наблюдалось увеличение полуширины потенциала действия, в то время как на расстоянии более 1.0 мм достоверного изменения не наблюдалось.

Заключение. Таким образом, локальная интракорткальная инъекция 4-АП ограничена областью, имеющей радиус в 1 мм, и вызванные иктальные разряды могут использоваться в качестве модели для изучения эпилептиформной активности в области, не подверженной влиянию 4-АП.

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

ИССЛЕДОВАНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ИОНОВ ХЛОРА В РАЗВИВАЮЩЕЙСЯ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ

Ситдикова В.Р.¹, Силаева В.М.¹, Логашкин А.Е.¹, Мамлеев А.Р.¹, Минлебаев М.Г.^{1,2}

¹Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия

²Средиземноморский институт нейробиологии при Национальном институте здоровья и
медицинских исследований, Марсель, Франция

sitdikovavita@gmail.com

Гамма-аминомасляная кислота (ГАМК) является основным медиатором, обеспечивающим торможение в нервной системе. Механизм действия ГАМК связан с током ионов хлора через мембрану нейрона, изменяющим его мембранный потенциал. В зависимости от направления тока ионов хлора, ГАМК может выполнять как возбуждающую, так и тормозную функцию. Направление тока напрямую связано с концентрацией ионов хлора в клетке. В случае небольшого количества ионов хлора внутри нейрона, хлорные токи направлены внутрь клетки и ГАМК приобретает ингибирующую функцию, что наблюдается во взрослом мозге в физиологических условиях. Однако в *in vitro* исследованиях было продемонстрировано, что во время эпилептиформной активности наблюдается увеличение внутриклеточной концентрации ионов хлора, что может привести к изменению полярности функции ГАМК с тормозной на возбуждающую. Но остается вопрос, будет ли данный феномен повторяться в *in vivo* условиях. Нашей целью было исследовать этот вопрос.

Исследование внутриклеточной концентрации хлора проводилось путем оценки функции ГАМКергической передачи, как в контроле, так и во время эпилептиформной активности. Для этого была проведена одновременная внеклеточная и внутриклеточная регистрация в конфигурации присоединенной клетки (*cell-attached*), позволяющей регистрировать открытие/закрытие ионных каналов без изменения внутриклеточного ионного состава клетки. Регистрируя хлорные каналы на разных фиксирующих потенциалах, удалось получить вольтамперную зависимость анионного тока, протекающего через открытые каналы на разных потенциалах, подаваемых на регистрирующую пипетку. Используя данные значения и уравнение Ходжкина-Хаксли, были рассчитаны потенциал реверсии для хлора и мембранный потенциал для клетки.

Наши предварительные результаты показали, что во время эпилептиформной активности мембранный потенциал покоя нейронов сдвигался в сторону деполяризации (-19.79 (-35.90; -11.86) мВ (n=5 клеток, n=3 животных p24-p25) по сравнению с -60.26 (-72.84; -41.28) мВ (n=10 клеток, n=5 животных p18-p25) в контроле). Также был отмечен деполяризующий сдвиг для ГАМК-активируемого тока (потенциал реверсии сместился с -63.81 (-85.74; -49.61) мВ (n=10 клеток, n=5 животных p18-p25) в контроле до -32.39 (-33.05; -20.38) мВ, (n=5 клеток, n=3 животных p24-p25) во время эпилептиформной активности).

Итак, наши результаты показывают, что, несмотря на значительный сдвиг потенциала реверсии для хлора в сторону деполяризующих значений во время эпилептической активности, он остается более негативным по отношению к мембранному потенциалу. Согласно нашим данным, ГАМК продолжает выполнять роль основного тормозного медиатора, что связано с наблюдаемым смещением мембранного потенциала покоя в сторону еще более деполяризующих значений.

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

ОПТИМИЗАЦИОННЫЙ ПОДХОД В МОДЕЛИРОВАНИИ ОБЛАСТЕЙ ГИППОКАМПА

Скороход С.Н.¹, Мысин И.Е.²

¹Санкт-Петербургский Политехнический Университет им. Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия

²Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушино, Россия

skorohod.sn@edu.spbstu.ru

В работе создана модель нейронной сети участка мозга. Активность каждого нейрона описывается системой дифференциальных уравнений. Структура связей в сети приближена к физиологической. Исследуется частота разрядов популяции пирамидных нейронов области CA1 в ответ на сложную структуру входов:

Сеть состоит из клеток 10 разных типов – пирамидных области CA1, CA3, EC3, и тормозных интернейронов: PVBAS, ССК, AAC, BIS, IVY, NGF, OLM. Типы отличаются многими параметрами:

- фазой и частотой разрядов относительно тета-ритма;
- мерой когерентности с тета-ритмом;
- центром и дисперсией распределения активности относительно центра поля места;
- и связями – на сому или дендрит пирамидного или тормозного нейрона.

Интернейроны регулируют активность пирамидных клеток, кодирующих информацию.

Пирамидные клетки области CA1 разделены на две подгруппы:

- активность первой подгруппы пирамид CA1 генерирует тета-ритм и моделируется как функция фон-Мизиса;
- активность второй группы – целевая, и определяется входами с остальной сети.

Пирамиды области CA3, интернейроны PVBAS, ССК, AAC, BIS – генерируют тета-ритм с пространственной модуляцией и входом на сомы пирамид.

Пирамиды области EC3, интернейроны IVY, NGF, OLM – дают сигнал на дендриты пирамид CA1. В отличие от остальных нейронов, моделируемых функцией фон-Мизиса, модель пирамидных нейронов CA1 – двух-компарментная (сома и дендрит), физиологичная. Неизвестные характеристики активности нейронов подобраны оптимизацией генетическим алгоритмом так, чтобы итоговая активность пирамидных клеток наилучшим образом соответствовала экспериментальным данным. Например, модель воспроизводит одно из главных свойств активности пирамидных клеток – эффект фазовой прецессии. Он заключается в изменении фазы разрядов клеток места (относительно тета-ритма) по ходу пробегания животным поля места. Достоверно известные параметры не оптимизируются, и взяты из открытых источников.

В первой части работы оптимизированы частоты разрядов в центре поля места, дисперсии, центры (относительно центра поля места) распределения активности перечисленных нейронов и максимальные синаптические проводимости – всего 43 параметра. Эти результаты позволяют сделать выводы о роли конкретных характеристик нейронов многих типов в формировании общей нейронной активности в гиппокампе. Мы получили параметры популяционной активности, воспроизводящей эффект фазовой прецессии.

Во второй части работы сеть дополнена связями с пирамидных клеток на интернейроны, формируя относительно полную модель большей части гиппокампа.

ИССЛЕДОВАНИЕ УРОВНЯ СУЛЬФИДОВ И ЭКСПРЕССИИ ФЕРМЕНТОВ CBS В ТОЩЕЙ КИШКИ КРЫСЫ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ СИНДРОМА РАЗДРАЖЕННОГО КИШЕЧНИКА

Сорокина Д.М., Шайдуллов И.Ф., Яковлева О.В., Яковлев А.В., Ситдикова Г.Ф.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

dinagabita@mail.ru

Синдром раздраженного кишечника (СРК), распространенное заболевание желудочно-кишечного тракта, характеризующиеся болью в животе и нарушением функции кишечника, а также может быть вызван стрессом, желудочно-кишечными инфекциями и сопровождается висцеральной гиперчувствительностью. Патофизиологию СРК традиционно связывают с дисфункцией толстой кишки, однако, существуют и предположения о вовлеченности отделов тонкой кишки в развитие данного заболевания. Сероводород оказывает расслабляющее действие на сократимость гладкомышечных клеток тонкой кишки. Недавно было продемонстрировано, что сигнальные пути CBS и H₂S могут играть значительную роль в висцеральной гиперчувствительности. При этом снижение концентрации H₂S может усиливать воспалительную реакцию. Целью нашей работы является исследование уровня сульфидов и экспрессии ферментов CBS при моделировании синдрома раздраженного кишечника.

В опытной группе, СРК индуцировали неонатальной материнской депривацией, который вызывает висцеральную гиперчувствительность у взрослых животных. В возрасте 6 недель оценивали гиперчувствительность толстой кишки путем измерения пороговой интенсивности брюшного сгибательного рефлекса (БСР), возникающего в ответ на колоректальное растяжение. Определяли уровень сульфидов и скорость продукции H₂S в образцах тощей кишки весом 1 г, а также экспрессию CBS методом вестерн-блоттинга и использованием антител CBS.

Для верификации модели СРК оценивали висцеральную чувствительность крыс. Ответ на растяжение толстой кишки объемами 0.1 и 0.25 мл отличий в реакции животных ни в контрольной, ни в группе СРК не наблюдалось ($p > 0.05$). При использовании объема 0.35 мл и 0.5 мл показатели БСР в опытной группе были значительно выше, чем в контрольной группе, что указывает на висцеральную гиперчувствительность в модели СРК у крыс.

Уровень H₂S, вырабатываемый тканью тощей кишки у крыс с СРК был снижен по сравнению с контрольной группой (0.24 ± 0.07 мкМ/г по сравнению с 7.04 ± 2.88 мкМ/г в контроле; $n=6$, $p < 0.05$). Активность ферментов синтеза сульфидов в тощей кишки крысы СРК группы (0.79 ± 0.12 мкМ/г/мин) также была достоверно ниже контрольных значений (1.28 ± 0.22 мкМ/г/мин; $n=6$, $p < 0.05$). Кроме того, мы показали снижение экспрессии ферментов CBS у крыс с СРК, по сравнению с контрольной группой ($p < 0.05$).

Таким образом, было показано снижение уровня сульфидов, активности ферментов синтеза H₂S и экспрессии CBS у животных с моделью СРК. Полученные данные говорят о снижении выработки H₂S в условиях стресса, вызванного неонатальной материнской депривацией, что может приводить к нарушению моторики тощей кишки и обуславливать симптомы усиления перистальтики при СРК.

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета («ПРИОРИТЕТ-2030»).

ВЛИЯНИЕ МЕТОТРЕКСАТА НА КИШЕЧНИК МЫШЕЙ

Стафеева К.С., Самойлова Н.А., Кокина А.В.

Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

anastasia.kokina@mail.ru

Метотрексат – структурный аналог фолиевой кислоты, блокирующий метаболизм фолатов путем конкурентного ингибирования дигидрофолатредуктазы (ДФР), что приводит к подавлению синтеза *de novo* пуринов и пиримидинов. В последние несколько десятилетий метотрексат эффективно применялся в лечении различных форм рака и аутоиммунных заболеваний, как в монотерапии, так и в комбинации с другими препаратами. Однако его воздействие на желудочно-кишечный тракт может усугубить состояние больного и привести к множеству побочных эффектов.

Цель нашей работы заключалась в изучении токсичности метотрексата по отношению к кишечнику, а также в оценке нивелирования этого действия пробиотиками.

Объектом исследования служили самцы лабораторных мышей линии C57BL/6. Мыши были разделены на 3 группы: Контроль (инъекции физиологического раствора и стандартный корм), Метотрексат (инъекции метотрексата), Метотрексат+пробиотик (инъекции метотрексата и пробиотики в качестве добавки к корму). На 18 день эксперимента мышей умерщвляли. Тонкий кишечник был отобран для дальнейшей экстракции ДНК и оценки ее повреждения.

Нами была измерена активность повреждений мтДНК в тонком кишечнике мышей. Статистический анализ проводился с помощью программного пакета Statistica. Полученные результаты анализировались с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Для определения уровня значимости использовался дисперсионный анализ Крускала-Уоллиса.

Внутрибрюшинные инъекции метотрексата вызвали существенные изменения в мтДНК тонкого кишечника. Уровень повреждений мтДНК увеличился на 82% ($p < 0,001$) по сравнению с контрольной группой. Прием пробиотиков оказал положительный эффект в тонком кишечнике. Уровень повреждений в этом органе снизился на 26% ($p < 0,05$).

Таким образом, эпителиальные клетки кишечника, а также быстро пролиферирующие стволовые клетки кишечника, значительно истощаемые химиотерапией, могут получить дополнительное цитопротекторное действие благодаря пробиотикам. Это поможет снизить риск повреждения кишечника, вызванного воспалением и значительно минимизировать вероятность развития таких осложнений, как разрушение кишечного барьера, нарушение пищеварения, атрофия ворсинок кишечника.

5-НТ1А РЕЦЕПТОР-ЗАВИСИМЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВОВЛЕЧЕНИЯ БОЛЬШОГО ЯДРА ШВА В ПАТОГЕНЕЗ ХРОНИЧЕСКОЙ АБДОМИНАЛЬНОЙ БОЛИ

Сушкевич Б.М.¹, Сиваченко И.Б.¹, Любашина О.А.^{1,2}

¹Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

²Институт фармакологии им. А.В. Вальдмана, «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова»
Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия

bob-jn@mail.ru

Патогенез хронической абдоминальной боли связывают с дисфункцией серотонинергической системы головного мозга. Одной из её структур, играющих ключевую роль в контроле болевой чувствительности, является большое ядро шва (БЯШ), активность которого регулируется серотониновыми 5-НТ1А рецепторами. Показано, что кишечное воспаление (колит) вызывает молекулярные и нейрохимические перестройки в БЯШ. Последствия таких перестроек для функционирования БЯШ как болевого центра и вклад в них 5-НТ1А рецепторов остаются неясными, сдерживая разработку методов лечения болевых синдромов, развивающихся после перенесенной органической патологии.

Целью исследования являлось выяснение развивающихся после колита изменений в нейрональных механизмах контроля БЯШ висцеральной и соматической ноцицепции с оценкой роли в них 5-НТ1А рецепторов.

Работа выполнена на анестезированных (уретан 800 мг/кг, α -хлоралоза 60 мг/кг, в/б) взрослых самцах крыс линии Вистар, здоровых и перенесших колит, индуцированный внутрикишечным введением пикрилсульфониевой кислоты (TNBS, Sigma-Aldrich, USA; 20 мг в 0.25 мл 50% этанола). В обеих группах с помощью вольфрамовых микроэлектродов (1 мкм, 1 МОм, WPI, USA) изучали реакции нейронов БЯШ на висцеральное (колоректальное растяжение) и соматическое (сдавливание хвоста) болевые раздражения, а также эффекты электростимуляции БЯШ (0.5–2.0 В, 0.2 мс, 50 Гц, 3 с) на вызываемые этими стимулами ответы нейронов продолговатого мозга. В отдельных опытах нейрональную активность регистрировали после системного или центрального введения 5-НТ1А агониста буспирона. Данные сохраняли и обрабатывали в программе Spike 2 (CED, GB). Статистический анализ выполняли при помощи Origin 2017 (USA) с использованием непараметрических тестов.

Нейроны БЯШ демонстрировали возбуждение или торможение в ответ на висцеральный и соматический болевые стимулы, которые могли быть дифференцированными по отношению к действующему раздражению, либо неселективными. По сравнению с нормой в БЯШ животных, перенесших колит, было отмечено увеличение доли тормозящихся при разных стимулах ноцицептивных нейронов и усиление их тормозных ответов на растяжение кишки. Внутривенное введение 5-НТ1А агониста буспирона (2 и 4 мг/кг), в норме усиливающее ноцицептивное возбуждение нейронов БЯШ, в постколитный период приводило к еще большему усугублению тормозных процессов в ядре. У здоровых крыс эффектами электростимуляции БЯШ были подавление возбуждающих и усиление тормозных ответов нейронов продолговатого мозга на висцеральное болевое раздражение при подавлении обоих типов реакций на соматический стимул. Эти влияния усиливались после интрацеребровентрикулярной инъекции 1 мкг буспирона. После колита наблюдался дефицит тормозных влияний БЯШ на бульбарные висцеральную и соматическую ноцицептивные трансмиссии, который сохранялся после внутримозгового введения 5-НТ1А агониста.

Постколитное нарастание 5-НТ1А-опосредуемого торможения ноцицептивной активности в БЯШ в совокупности с ослаблением его 5-НТ1А-зависимых нисходящих тормозных влияний могут нарушать его функции в системе эндогенной анальгезии, способствуя патогенезу поствоспалительного абдоминального и сочетанного с ним соматического болевых синдромов.

Работа поддержана грантом РФФИ 23-25-00151, <https://rscf.ru/project/23-25-00151/>.

ПОВЕДЕНИЕ И КОГНИТИВНЫЕ ФУНКЦИИ ДВУХ ЛИНИЙ КРЫС С РАЗЛИЧНОЙ ВОЗБУДИМОСТЬЮ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

Тишкова Е.А.^{1,2}, Лебедева-Георгиевская К.Б.¹, Перевезенцев А.А.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем РАН Российской академии наук, Москва, Россия

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева», Москва, Россия

tishkova-e.a@yandex.ru

От индивидуальных типологических особенностей нервной системы (НС) зависит адаптивность и реактивность животных по отношению к различным внешним воздействиям. Известно, что соотношение процессов возбуждения и торможения в головном мозге определяется генетически и модулируется факторами среды. Возбудимость, как важнейший показатель функционального состояния НС, играет значительную роль в процессах нейропластичности, обучения и формирования поведения животных. Использование линий крыс, выведенных селекционными методами и различающихся по возбудимости НС (реакции на действие электрического тока), позволяет изучать влияние генетически детерминированных характеристик высшей нервной деятельности на функционирование мозга и изменчивость поведения.

Исследовали 35 взрослых, клинически здоровых самцов крыс высоковозбудимой линии (Wistar/НП, n=17) и низковозбудимой линии (Wistar/ВП, n=18) – с низким и высоким порогом возбудимости НС соответственно. Определяли ориентировочно-исследовательскую активность, тревожность и эмоциональность животных в тестах «открытое поле» (ОП), «приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) и с помощью хэндлинга. Тестировали крыс в камере Симонова по методике «эмоциональный резонанс». Память и способность решать пространственные задачи оценивали в тестах «водный лабиринт Морриса» (ВЛМ) и при обучении УРАИ в Y-лабиринте. Статистический анализ проводили, используя пакет программ R: проверяли достоверность различий с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни и теста ANOVA.

В результате по ПКЛ и камере Симонова значимых отличий между линиями не выявлено ($p > 0.05$). В ОП для крыс линии ВП характерны более высокие показатели вертикальной активности (стойки), эмоциональности (болюсы), норкового рефлекса, горизонтальной и двигательной активности в центре. У крыс линии НП время и число актов груминга больше, чем у линии ВП. Межлинейные различия достоверны ($p < 0.05$). В Y-лабиринте больше правильных попыток совершали высоковозбудимые крысы, также число межсигнальных реакций у них было выше. Время избавления от негативного стимула ниже у крыс линии ВП ($p < 0.05$). В ВЛМ обе линии успешно обучались поиску скрытой платформы, но при ее перемещении в новое место крысы линии НП дольше находились в месте предыдущего расположения платформы.

Таким образом, крысы с высоким порогом возбудимости демонстрировали больший уровень эмоциональности и исследовательского поведения по сравнению с крысами с низким порогом возбудимости, которые показывали большую тревожность. Крысы линии НП в Y-лабиринте показали положительную динамику формирования условного рефлекса, а у крыс линии ВП этот рефлекс не формировался вовсе, что может объясняться различиями в функционировании головного мозга. Успешность обучения в ВЛМ была ниже у высоковозбудимой линии (НП), что возможно связано с нарушениями пространственной ориентации и меньшей пластичностью нервных процессов. Эти различия дают возможность использовать данные линии в качестве моделей для определения резистентности НС к экстремальным факторам и для изучения патофизиологии поведенческих расстройств.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ НЕГАТИВНОГО ВЛИЯНИЯ ФЛУОКСЕТИНА НА СОЗРЕВАНИЕ ООЦИТОВ МЫШИ

Ткаченко М.Д.¹, Никишин Д.А.^{1,2}

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет, кафедра Эмбриологии, Москва, Россия

²Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

tkmadm@yandex.ru

Серотонин (5-НТ) является регулятором созревания ооцитов у большого числа видов животных. В созревающих ооцитах млекопитающих накопление материнского 5-НТ происходит за счет активности мембранного транспортера SERT, активность которого возрастает по мере созревания ооцитов. Изучение SERT вызывает особый интерес ввиду того, что он является мишенью для препаратов, называемых селективными ингибиторами обратного захвата серотонина (СИОЗС), которые считаются наиболее эффективными и безопасными антидепрессантами. Ранее нами было показано, что использование СИОЗС снижает количество 5-НТ в яйцеклетках.

В данной работе мы исследовали влияние флуоксетина на качество зрелых постовуляторных МП-ооцитов. С целью снижения стресса у животных, мы давали им флуоксетин (20 мг/мл), растворенный в питьевой воде и наблюдали такое же снижение 5-НТ в сыворотке крови, как и в ранних экспериментах с применением инъекций препарата. При получении постовуляторных ооцитов, нами не было обнаружено значительной разницы в количестве МП-ооцитов на самку между контрольной и экспериментальной группой мышей. Для оценки качества постовуляторных ооцитов после воздействия флуоксетина *in vivo* мы провели эксперименты по оценке их морфологии. Процент фрагментированных ооцитов в опытной группе был выше, чем в контрольной. Однако, при анализе формы и размера мейотического веретена, которое является одним из показателей качества ооцитов, статистической разницы между двумя группами не было обнаружено. Для изучения влияния флуоксетина на молекулярные механизмы созревания ооцитов мы провели вестерн-блот анализ количества активной формы МАРК в ооцитах контрольной и опытной групп. МАРК путь представляет собой консервативный механизм, участвующий в созревании ооцитов у различных животных. Наши результаты показали, что количество анализируемого белка в МП-ооцитах мышей, подвергшихся воздействию флуоксетина и контрольной группы, не имеет различий. Еще одним показателем качества является активность теломеразы и длина теломер ооцита. Для изучения теломеразной активности был проведен TRAP ПЦР анализ, в результате которого было обнаружено снижение теломеразной активности в ооцитах экспериментальных мышей на 40% в сравнении с контрольной группой. Это свидетельствует о том, что ооциты, полученные от мышей принимающих флуоксетин, имеют худшее качество, чем яйцеклетки контрольных животных.

Полученные данные свидетельствуют о том, что применение СИОЗС, способно оказывать негативное влияние на качество ооцитов и может иметь долгосрочные последствия в последующем развитии.

Работа поддержана грантами РФФИ № 22-74-10009, Программы развития МГУ № 23-Ш04-20.

НАРУШЕНИЕ МИЕЛИНИЗАЦИИ КАК ОДНА ИЗ ПРИЧИН ОСОБЕННОСТЕЙ РАЗВИТИЯ КРЫС С ГЕНЕТИЧЕСКИ ДЕТЕРМИНИРОВАННЫМ НАРУШЕНИЕМ ОБМЕНА ДОФАМИНА

Трактиров Д.С.¹, Куликова Е.Д.^{1,2}, Назаров И.Р.^{1,3}, Пестерева Н.С.¹

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт
экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

²Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого

³Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

ds.traktirov@gmail.com

Среди нервно-психических заболеваний у детей одним из самых распространенных является синдром дефицита внимания/гиперактивности (СДВГ). Такие дети испытывают отставания в созревании психической, речевой, моторной и эмоциональной сфер, имеют трудности при социальных взаимодействиях и адаптации в обществе. Несмотря на большую социальную значимость СДВГ, этиология заболевания не установлена. Крыс линии DAT-KO (с нокаутом гена белка транспортера дофамина – DAT) являются одной из моделей, широко используемых для изучения СДВГ. Для таких животных характерны повышенная двигательная активность, когнитивные нарушения, компульсивное поведение – симптомы сходные таковым у детей с СДВГ. Кроме того, для детей с СДВГ было показано снижение активности ДА-системы в целом, что может быть следствием выявленного методом ПЭТ снижения содержания транспортера дофамина DAT в базальных ганглиях и таламусе.

Целью данной работы являлось изучение процессов миелинизации и динамики созревания нервной системы у потомства крыс линии DAT-KO при их естественном развитии. Исследование было проведено на потомстве, полученном в результате скрещивания DAT-НЕТ крыс, – DAT-WT (дикий тип, n = 31), DAT-НЕТ (гетерозиготы, n = 59) и DAT-KO (полный нокаут гена, n = 27) крысятах. На 7, 15 и 21 дни ПНР (постнатального развития) животных декапитировали. Далее извлекались гиппокамп, стриатум, лобная кора, а также шейный и поясничные отделы спинного мозга. Оценку содержания мРНК маркеров миелинизации, – Sox10, Olig2, Mbp, Mog, Mag, Plp1 и Cspg4, – проводили с использованием RT-PCR. Статистический анализ полученных результатов проводился при помощи двухфакторного дисперсионного анализа (2-way ANOVA), где факторами служили генотип и возраст группы, с post-hoc тестом Тьюки.

Было обнаружено, что продукция мРНК гена Cspg4 в стриатуме значимо отличалась (F (2, 46) = 3,828, p = 0,0017) на 7 (WT vs НЕТ: 0,968 vs 3,035, p = 0,035; WT vs КО: 0,968 vs 7,721, p = 0,002) день развития. Также были обнаружены значимые отличия в продукции мРНК гена Mag в стриатуме (F (2, 46) = 23,72, p = 0,0136), гиппокампе (F (2, 46) = 17,37, p = 0,0020), коре (F (2, 46) = 10,35, p = 0,0333), шейном (F (2, 46) = 34,36, p = 0,0056) и поясничном (F (2, 46) = 7,748, p = 0,0193) отделах спинного мозга на 7 день. В стриатуме продукция мРНК гена отличалась на 15 (WT vs НЕТ: 1,90 vs 25,85, p = 0,0053; WT vs КО: 1,90 vs 46,12, p = 0,0017; НЕТ vs КО: 25,85 vs 46,12, p = 0,0412) и 18 (WT vs НЕТ: 1,45 vs 57,37, p = 0,0072; WT vs КО: 1,45 vs 34,13, p = 0,0022) ПНР; в гиппокампе – на 7 (WT vs НЕТ: 1,342 vs 4,012, p = 0,0156; WT vs КО: 1,342 vs 6,215, p = 0,0091), 15 (WT vs НЕТ: 3,90 vs 49,23, p = 0,0064; WT vs КО: 3,90 vs 50,12, p = 0,0401) и 21 (WT vs НЕТ: 0,88 vs 2,68, p = 0,0055; WT vs КО: 0,88 vs 6,94, p = 0,0002; НЕТ vs КО: 2,68 vs 6,94, p = 0,0119) ПНР. В шейном отделе спинного мозга отличия обнаруживались на 15 (WT vs КО: 1,36 vs 7,48, p = 0,0090) и 18 (WT vs КО: 1,493 vs 133,8, p = 0,0072) пнд. В поясничном отделе спинного мозга отличия наблюдались на 18 (WT vs КО: 1,130 vs 87,13, p = 0,0163) ПНР.

Полученные результаты позволяют предположить, что задержка в формировании рефлексов у DAT-KO и DAT-НЕТ крыс, выявленная ранее, может быть связана с нарушениями процессов миелинизации этих крыс.

УЧАСТИЕ HDAC3 И КИНАЗ АКТ/GSK-3 β В ГИБЕЛИ КЛЕТОК СПИННОМОЗГОВЫХ ГАНГЛИЕВ КРЫС В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ АКСОТОМИИ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ НЕРВОВ

Трегубова О.В., Лебедева А.А.

Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

olyatregubova03@gmail.com

Эпигенетическая регуляция повреждений периферических нервов в последние годы привлекает пристальное внимание исследователей. Но роль эпигенетических процессов в регуляции гибели и выживаемости клеток в первые часы после повреждения нервов пока не изучена. Ряд работ продемонстрировали нейротоксическое действие гистондеацетилазы HDAC3, однако ее участие в индукции гибели нейронов исследована не до конца. Поэтому, целью работы явилось исследование уровня содержания и внутриклеточной локализации гистондеацетилазы HDAC3, а также киназ Akt/GSK-3 β , участвующих в её фосфорилировании, в нейронах и клетках глии ганглиев дорсальных корешков (dorsal root ganglia, DRG) после аксотомии седалищного нерва методами иммунофлуоресцентной микроскопии и вестерн блот анализа, а также оценка участия HDAC3 в апоптозе клеток аксотомированных ганглиев методом TUNEL.

Результаты. Метод двойного иммунофлуоресцентного окрашивания показал, что уровень HDAC3 в цитоплазме поврежденных DRG значительно сверхэкспрессируется уже через 1 час после аксотомии ($p < 0,01$), но снижается через 4 часа по сравнению с контрольными ганглиями ($p < 0,05$) и уровнем, определяемым через 1 час ($p < 0,01$). Через 24 часа после повреждения разницы не наблюдалось. В ядре аксотомированных DRG уровень HDAC3 увеличивался через 4 часа после перерезки седалищного нерва по сравнению с неповрежденными ганглиями крыс ($p < 0,01$), что происходило на фоне снижения уровня ацетилирования гистонов H3 (AcH3K9) и H4 (AcH4). Это свидетельствует о перераспределении HDAC3 из цитоплазмы в ядро через 4 часа после аксотомии седалищного нерва крысы, что также подтверждается коэффициентом M1 ($p < 0,05$). Отмечалась повышенная колокализация HDAC3 и клеточных ядер, окрашенных TUNEL через 4 и 24 ч после повреждения. Это позволяет предположить, что в аксотомированных спинномозговых ганглиях крысы апоптоз был связан со сверхэкспрессией HDAC3. Согласно полученным данным, аксотомия седалищного нерва крыс вызывала достоверное снижение уровня Akt через 24 часа в цитоплазме клеток ганглиев (в 2 раза относительно контрольных ганглиев ($p < 0,01$) и в 1,5 раза относительно четырехчасовой группы ($p < 0,01$)). Уровень Akt в ядре при этом не изменялся и был низким. Уровень GSK3бета был низким и не изменялся на всем протяжении исследования, как в ядре, так и цитоплазме нейронов спинномозговых ганглиев крыс. Однако, по данным иммунофлуоресцентного анализа уровень phospho-GSK-3 β (Ser9) достоверно увеличивался через 24 часа в цитоплазме клеток аксотомированных спинномозговых ганглиев крыс ($p < 0,01$).

Таким образом, данные свидетельствуют о вовлеченности HDAC3 и сигнального пути Akt/GSK3бета в вызванное аксотомией повреждение клеток DRG. Перерезка нерва вызывает транслокацию HDAC3 из цитоплазмы в ядро в первые 24 часа после аксотомии. Результаты иммунофлуоресцентной микроскопии с использованием антитела к фосфо-GSK-3 β (Ser9) указывают на активацию нисходящего пути при сниженной экспрессии самого Akt. Полученные результаты об изменении экспрессии исследуемых белков могут лечь в основу теоретической базы о механизмах нейродегенерации при аксотомии периферических нервов, а исследуемые белки служить потенциальными маркерами повреждения и мишенями при разработке нейропротекторных препаратов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания в сфере научной деятельности № FENW-2023-0018.

ДЕКСАМЕТАЗОН КАК МОДУЛЯТОР НЕЙРОМЕДИАТОРНОГО ОБМЕНА

Тютюнник Т.В., Карпенко М.Н.

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

t.tanjon11@yandex.ru

Патологический процесс нейродегенерации, который наблюдается при болезни Альцгеймера (АД) и Паркинсона (ПД), а также при любом повреждении центральной нервной системы, сопровождается воспалительной реакцией, которая, как считается, способствует патогенезу этих заболеваний.

В соответствии с этим предполагается, что противовоспалительные препараты могут быть эффективны в замедлении или подавлении дегенеративных процессов. Таким потенциальным вспомогательным препаратом могут выступать синтетические глюкокортикоиды. Глюкокортикоиды (ГК) – это класс стероидных гормонов, синтезирующихся в коре надпочечников и проявляющих свое биологическое действие через глюкокортикоидные рецепторы (ГР). Известно, что дексаметазон в дозе 1 мг/кг уменьшает распад содержания дофамина в стриатуме примерно на 20%, в то время как доза 0,1 мг/кг была неэффективной, а доза 10 мг/кг даже усугубила снижение содержания дофамина в черной субстанции (Kurkowska-Jastrzębska I. et al. Dexamethasone protects against dopaminergic neurons damage in a mouse model of Parkinson's disease //International immunopharmacology. – 2004. – Т. 4. – №. 10-11. – С. 1307-1318). Так, изменение уровня нейромедиаторов при различных дозах дексаметазона может быть следствием изменения функционирования ферментов их синтеза и катаболизма (тирозингидроксилазы, моноаминоксидазы-б, моноаминоксидазы-а, катехол-О-метилтрансферазы).

Поэтому целью нашей работы было определить содержание нейромедиаторов и уровня тирозингидроксилазы, моноаминоксидазы-б, моноаминоксидазы-а, катехол-О-метилтрансферазы у крыс в центральной нервной системе (ЦНС) после однократного введения дексаметазона в дозе 8 мг/кг.

В эксперименте использовались 28 половозрелых самцов крыс Wistar, которых случайным образом распределили на 2 группы по 14 голов в каждой. Животным опытной группы вводили дексаметазон в дозе 8 мг/кг, а контрольной – физ. раствор в объеме 1 мл, декапитация производилась через 18 часов. Использовался метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) для определения уровня нейромедиаторов в ЦНС, а также количественная ПЦР с обратной транскрипцией для определения количества мРНК тирозингидроксилазы, моноаминоксидазы-б, моноаминоксидазы-а, катехол-О-метилтрансферазы. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего, сравнение проводилось с помощью непараметрического теста Манна-Уитни.

Так, при введении дексаметазона в дозе 8 мг/кг уровень дофамина в стриатуме был выше в 1,3 раза относительно контрольной группы ($p=0,03$), что может быть следствием повышения экспрессии мРНК тирозингидроксилазы в 1,5 раза ($p=0,03$) и уменьшением мРНК катехол-О-метилтрансферазы в 0,4 раза в опытной группе относительно контрольной ($p=0,03$). Однако уровень моноаминоксидазы-б не отличался в группе с введением дексаметазона относительно контроля. При этом уровень серотонина в данной структуре снижался в опытной группе в 0,4 раза относительно контрольной ($p=0,03$).

При этом уровень серотонина в гиппокампе увеличивался в опытной группе в 4,2 раза относительно контрольной ($p=0,01$). Количество мРНК моноаминоксидазы-а не менялось.

Таким образом, при введении дексаметазона в дозе 8 мг/кг уровень дофамина увеличивался, как и уровень серотонина в гиппокампе, что может свидетельствовать о том, что такая доза является терапевтической.

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТОВ МЕТОПРОЛОЛ И АТЕНОЛОЛ НА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ И СТРЕССОУСТОЙЧИВОСТЬ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Уляшева Н.С.¹, Прошкина Е.Н.¹, Коваль Л.А.¹, Шапошников М.В.¹, Москалев А.А.^{1,2}

¹Институт биологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар, Россия

²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, г. Москва, Россия

ulyasheva-1309@yandex.ru

Метопролол и атенолол являются селективными агонистами β 1-адренорецепторов, которые используются в лечении гипертонии, стенокардии, и других сердечно-сосудистых заболеваний. Данные препараты могут оказывать положительное влияние на процессы старения и улучшать связанные с ним молекулярные биомаркеры. В нашей работе изучено влияние атенолола (1-100 мкмоль/л) и метопролола (1-5000 мкмоль/л) на продолжительность жизни (ПЖ) и устойчивость к стрессорам (20 мМ параквату и γ -облучению в дозах 120 и 800 Гр) на модели *Drosophila melanogaster*.

Метопролол в концентрациях 1-5000 мкмоль/л увеличивал медианную ПЖ и возраст 90 % смертности у самок на 3-9% ($p < 0.0001$), но не вызывал статистически значимого влияния на эти показатели у самцов. Атенолол в концентрации 1 мкмоль/л увеличил медианную и максимальную ПЖ дрозофил на 1-3% ($p < 0.01$). В то же время в больших концентрациях он оказывал отрицательное воздействие на изучаемые параметры. Изменение длительности жизни дрозофил сопровождалось как снижением, так и повышением экспрессии ряда генов, связанных с долгожительством и ответом на стрессоры.

В стрессовых условиях наблюдали снижение выживаемости у особей *D. melanogaster*, потреблявших β -блокаторы, по сравнению с контролем на 3-33% ($p < 0.01$). Однако метопролол и атенолол увеличили медианную и максимальную выживаемость особей на 4-13% ($p < 0.001$) после воздействия γ -облучения в дозе 120 Гр.

Исследования выполнены в рамках государственного задания по теме «Генетические и функциональные исследования эффектов геропротекторных интервенций на модели *Drosophila melanogaster*» N 122040600022-1.

ИЗУЧЕНИЕ АНКСИОЛИТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЭКСТРАКТА *SCUTELLARIA BAICALENSIS* НА МОДЕЛИ «СОЦИАЛЬНОГО» СТРЕССА

Уранова В.В.¹, Ломтева Н.А.²

¹ Астраханский ГМУ Минздрава России, Астрахань, Россия

² Астраханский государственный университет им. В. Н. Татищева, Астрахань, Россия

fibi_cool@list.ru

На сегодняшний день применение лекарственных средств растительного происхождения, проявляющих нейродегенеративный эффект, представляет большую значимость при возникновении состояния «социального» стресса, как результата взаимодействия человека с социумом. Принимая во внимание более высокую степень безопасности растительных лекарственных средств (РЛС), как результата меньшего числа побочных эффектов, вызываемых ими, обоснованной является необходимость изучения их фармакологической активности с целью разработки терапевтической стратегии при лечении последствий воздействия стресса на организм. Разнообразие химического состава шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis*) обуславливает повышенный интерес со стороны представителей фармацевтической науки. Установление способности проявлять седативную активность сделало его объектом изучения при разработке способов лечения последствий «социального» стресса.

Целью исследования явилось изучение анксиолитического действия экстракта *Scutellaria baicalensis*, полученного методом мацерации из подземной части культивированного на территории Астраханской области сырья, на модели «социального» стресса при использовании тестов «Вынужденное плавание» (Порсолт) и «Подвешивание за хвост». Эксперимент предполагал изучение действия экстракта *Scutellaria baicalensis* (100 мг/кг/сут) и препарата сравнения (тетраметилтетраазобициклооктандион – 25 мг/кг/сут), вводимых лабораторным животным (160 нелинейных самцов белых крыс в возрасте 7-9 месяцев), в отсутствие стресса и при формировании межсамцовых конфронтаций в условиях парного сенсорного контакта.

Данные теста «Вынужденное плавание» свидетельствуют о статистически значимом увеличении латентных периодов до первой иммобильности и количества подныриваний, увеличении времени активного плавания и количества болюсов, а также уменьшении периодов иммобильности в группе у особей, получавших экстракт и препарат сравнения (тетраметилтетраазобициклооктандион), относительно интактных животных в отсутствие патологического воздействия при достоверном снижении времени иммобильности и пассивного плавания. Показано увеличение латентного времени до первого движения, времени фризинга и пассивного плавания, количества периодов неподвижности и дефекаций, уменьшение латентного периода до первой неподвижности, времени активного плавания и количества подныриваний при патологическом состоянии, вызванном межсамцовыми конфронтациями. Нормализация показателей, отвечающих за мотивацию, реактивность и адаптацию в новой среде при введении экспериментальным животным экстракта и противотревожного препарата свидетельствует о проявлении анксиолитического действия изучаемого экстракта. Увеличение времени физической активности, латентного периода до первого замирания и сокращения фризинга и количества актов дефекаций при проведении теста «Подвешивание за хвост» статистически значимо доказывает нейродегенеративное действие экстракта *Scutellaria baicalensis* и препарата сравнения в условиях «социального» стресса, что объясняет ликвидацию психоэмоционального статуса экспериментальных особей. Уменьшение выраженности стресс-индуцированных изменений при введении лабораторным животным экстракта *Scutellaria baicalensis* и препарата сравнения в норме и в условиях «социального» стресса при использовании тестов «Вынужденное плавание» и «Подвешивание за хвост» свидетельствует о проявлении ими анксиолитической активности.

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРА РЕЦЕПТОРОВ TGFβ1 НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ
ИЗМЕНЕНИЯ ГИППОКАМПА МОЗГА КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ХЛОРИДОМ ТРИМЕТИЛОЛОВА.

Федорова Е.В., Черноморец И.Ю., Федоров Д.А., Архипов В.И.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики, Пушино, Россия

pershina-ev@mail.ru

Высокую актуальность имеют исследования, посвященные механизмам нейродегенерации и поиску новых подходов для нейропротекции. Трансформирующий фактор роста бета (TGFβ) – плеотропный цитокин, который известен своими защитными свойствами, его экспрессия увеличивается в мозге при ишемии и некоторых нейродегенеративных заболеваниях. Так, с одной стороны, он имеет нейропротекторные свойства, с другой стороны, хронически высокие уровни TGFβ могут способствовать повреждению нейронов. Это указывает на необходимость дальнейшего исследования механизмов действия TGFβ и его рецепторов на мозг с целью возможного терапевтического использования.

Данная работа была направлена на исследование роли TGFβ1 в механизмах нейродегенерации, а также оценку защитного потенциала ингибитора его рецептора первого типа на модели нейродегенерации гиппокампа *in vivo*.

Все эксперименты были проведены на половозрелых самцах крыс линии Вистар. Животных (n=21) случайным образом разделили на три группы: первую – контрольную группу, которым вводили изотонический раствор NaCl в/б (гр. «Контроль»); второй группе крыс для индукции нейродегенерации делали однократную инъекцию хлорида тиметилолова (ТМТ) в дозе 7,5 мг/кг, в/б (гр. «ТМТ»); крысам третьей группы для подавления сигнального пути TGFβ1 вводили SB431542 (Tocris), селективный ингибитор киназной активности рецептора первого типа TGFβ1 в дозе 2 мг/кг, в/б через 7 дней после инъекции ТМТ (гр. «ТМТ+SB»). Исследование поведения крыс проводили в установке «Шелтер» (Нейроботикс). Через 21 день после введения ТМТ у всех животных извлекали мозг и проводили морфологические исследования гиппокампа методом окраски по Нисслю и методом иммуногистохимического мечения микроглии с помощью антител к IBA1. Уровень экспрессии генов в гиппокампе, вовлекающихся в нейровоспаление (*Aif*, *GFAP*, *Il1b* и *TGFb1*) определяли с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени, в качестве референсного гена был выбран *Actb*.

Результаты подсчета нейронов выявили их гибель в пирамидных слоях CA4, CA3 и CA1 полей гиппокампа как в группе «ТМТ», так и в группе «ТМТ+SB» по сравнению с контролем, тогда как в поле CA2 не было обнаружено достоверных различий между группами животных. Результаты оценки IBA1- позитивных клеток показали, что в хилусе гиппокампа как плотность микроглии, так и размер микроглиальных клеток, в среднем, были достоверно выше в подопытных подгруппах животных «ТМТ» и «ТМТ+SB» по сравнению с контрольной группой, что свидетельствует о выраженном нейровоспалении. В поле CA1 не было выявлено достоверных отличий в состоянии микроглии между группами. Результаты ОТ-ПЦР в реальном времени показали, что в группе «ТМТ» произошло увеличение уровня мРНК генов, вовлеченных в нейровоспаление, тогда как применение SB431542 приблизило значения экспрессии этих генов к контрольному уровню. Результаты оценки поведения животных показали, что вертикальная активность (количество грумингов и подъемов на задние лапы) была достоверно выше у животных группы «ТМТ», чем в контроле и в группе «ТМТ+SB». Тест пассивного избегания выявил, что латентный период нахождения животных в светлом отсеке у животных группы «ТМТ» был достоверно ниже, чем в группе «контроль» и «ТМТ+SB», что указывает на дефицит долговременной памяти у крыс группы «ТМТ» и улучшение когнитивных функций при применении SB431542.

ОЦЕНКА РЕПАРАЦИИ ДЕФЕКТА ПЕРИФЕРИЧЕСКОГО НЕРВА ПРИ ЗАМЕЩЕНИИ ЗАПОЛНЕННЫМ ДЕРМАЛЬНЫМ ГИДРОГЕЛЕМ КОЛЛАГЕНОВЫМ КОНДУИТОМ

Фоменко А.А., Мелконян К.И., Русинова Т.В.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Краснодар, Россия

fomenkoa@ksma.ru

Травматические повреждения периферических нервов являются серьезной социальной проблемой за счет высокой инвалидизации и серьезных экономических потерь. Ежегодно в Российской Федерации до 7 тыс. пациентов нуждаются в хирургическом лечении травм периферических нервов. Однако традиционное хирургическое лечение имеет ряд серьезных ограничений: сложность подбора нерва необходимых размеров, дополнительная травматизация, болевой синдром донорского участка и продолжительный реабилитационный период. В связи с этим ведется поиск альтернативных вариантов нервных кондуитов, содержащих внутреннюю среду, стимулирующую восстановительные процессы нервных волокон. Такой внутренней средой может выступать гидрогель на основе внеклеточного матрикса дермы, который содержит поверхностные лиганды, способные обеспечивать топографические и биологические сигналы для регенерации нервов.

В исследовании оценивалась эффективность коллагенового кондуита NeuraGen[®], заполненного дермальным гидрогелем (группа 1), в сравнении с полым коллагеновым кондуитом NeuraGen[®] (группа 2) и аутографтом (группа 3) при экспериментальном лечении дефекта седалищного нерва крысы. Резекция седалищного нерва ($1 \pm 0,2$ см) проводилась на крысах-самцах линии Wistar под общим изофлурановым наркозом, после которой проводили ортотопическую имплантацию кондуитов с помощью эпинеуральных швов с каждой стороны разреза. В группе 1 полость кондуита NeuraGen[®] заполнялась непосредственно во время имплантации дермальным гидрогелем, полученным путем гелирования 5% раствором NaOH дермы свиньи породы Ландрас.

На 90-е сут. эксперимента проводили эксплантацию образцов для гистологического исследования. Для каждого образца выполняли по 3 поперечных среза: один проксимальный (до места имплантации), один дистальный (после места имплантации) и один медиальный по отношению к замещаемому фрагменту нерва. Проводили окрашивание гематоксилином Гarrisа и эозином.

При анализе биопсийных образцов животных группы 1 была отмечена слабо выраженная дегенерация нервных волокон, воспалительной реакции выявлено не было. В дистальной части материала были обнаружены участки разрастания глии. Морфогистологический анализ биоптатов группы 2 продемонстрировал отсутствие воспалительной реакции и дегенерации нервных волокон, однако в медиальной и дистальной частях имплантированного кондуита были отмечены выраженные оксифильные массы, чередующиеся с обильным глиозом тканей. Гистологический анализ образцов группы 3 продемонстрировал слабо выраженную дегенерацию нервных волокон, отсутствие воспаления и глиоза тканей, что свидетельствовало о полноценной морфофункциональной интеграции аутографта и регенерации нерва.

При проведении оценки эффективности восстановления дефекта седалищного нерва крысы было выявлено, что имплантация коллагенового кондуита NeuraGen[®], заполненного дермальным гидрогелем, приводит к морфологическому восстановлению нерва сопоставимому с результатами имплантации аутографта. Данные, полученные в ходе исследования, могут быть использованы для модификации уже существующих нервных кондуитов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Кубанского научного фонда, ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России в рамках научного проекта № МФИ-П-20.1/47.

УЧАСТИЕ NO-cGMP ПУТИ И ПРОДУКТОВ МЕТАБОЛИЗМА АРАХИДОНОВОЙ КИСЛОТЫ В РЕАЛИЗАЦИИ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ПАЛЬМИТОИЛКАРНИТИНА

Цай А.А., Бережнов А.В.

Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение
Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный
исследовательский центр «Пушчинский научный центр биологических исследований
Российской академии наук», Пушино, Россия

annatsay2001@mail.ru

Известно, что хроническое повышение уровня жирных кислот (ЖК) в крови, может приводить к развитию патологических состояний, в том числе к ожирению, диабету 2 типа, сердечно-сосудистым заболеваниям. Причиной гибели клеток является резкое накопление ЖК и их производных – ацил-КоА и ацилкарнитинов. Ранее было показано, что пальмитоилкарнитин (PC) приводит к гибели клеток посредством активации кальциевых каналов саркоэндоплазматического ретикулума (СР/ЭР) и повышения проницаемости мембраны для ионов кальция. Однако сигнальные пути, участвующие в реализации токсического действия пальмитоилкарнитина, до конца не изучены.

Один из возможных путей гибели клеток – накопление токсических метаболитов – арахидоновой кислоты и эйкозаноидов. Второй путь – накопление оксида азота NO, который образуется из L-аргинина (L-Arg) под действием NO-синтазы (NOS). Окись азота активирует гуанилатциклазу (GC), которая в свою очередь инициирует образование cGMP.

Кардиомиоциты крысы окрашивали кальций-чувствительным зондом Fura-2 AM (5 мкМ) в течение 45 минут. Затем клетки инкубировали в растворе Хенкса в течение 10 минут, затем дважды промывали средой Хенкса, монтировали в специальную камеру для круглых покровных стекол для инвертированного микроскопа и проводили ингибиторный анализ. Для этого в контрольной группе водили PC (20 мкМ), в опытной группе за 3 минуты до введения PC вводили ингибиторы ферментов превращения арахидоновой кислоты и NO-cGMP-каскада. Жизнеспособность клеток оценивали по времени от введения PC до наступления гиперконтрактуры (сек). Эксперименты проводили с использованием флуоресцентной станции Zeiss Cell observer на базе инвертированного микроскопа Axiovert 200M. В эксперименте получали серии изображений кардиомиоцитов с интервалом 5 секунд.

Установлено, что применение ингибиторов Ca²⁺-независимой формы фосфолипазы A₂ (iPLA₂γ) – PACOCF3 (25 мкМ) и BEL (25 мкМ), вызывало увеличение времени жизни клеток после введения PC. Известно, что при накоплении кальция в клетке за счет активности PLA₂ осуществляется гидролиз фосфатидилхолина до лизофосфолипида и арахидоновой кислоты. Также защитный эффект оказали ингибиторы липоксигеназы (LOG) – NDGA (2 мкМ) и ML 355 (3 мкМ). LOG участвует в превращении арахидоновой кислоты в эйкозаноиды. Эффективность применения указанных ингибиторов может говорить об участии данных сигнальных путей в гибели клеток как при остром токсическом действии ЖК, так и при хроническом их накоплении при ожирении и диабете II типа. Ингибитор GC – ODQ (100 мкМ), но не ингибитор NO-синтазы 7-NI (100 мкМ), также увеличивал жизнеспособность кардиомиоцитов.

Работа выполнена в рамках Госзадания ФИЦ ПНЦБИ РАН 075-01512-22-02 (№ 1022080100047-5-1.6.4. Нейропротекторные препараты нового поколения).

ВЛИЯНИЕ ТРЕВОЖНО-ПОДОБНОГО СОСТОЯНИЯ НА ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КОМАНДНЫХ НЕЙРОНОВ ОБОРОНИТЕЛЬНОГО ПОВЕДЕНИЯ ВИНОГРАДНЫХ УЛИТОК

Чумарина А.И.

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

chumarinaadilya@yandex.ru

Тревожность представляет собой сложную форму поведения, которая запускается в ожидании воображаемых или непредсказуемых угроз и приводит к длительному стрессу. Состояние тревожности высших позвоночных имеет глубокие корни в их эволюционном прошлом и может проявляться у беспозвоночных животных. За последние несколько лет были тщательно изучены клеточные и молекулярные механизмы, лежащие в основе тревожности у высших позвоночных. Вместе с тем вопрос об изучении механизмов, лежащих в основе тревожно-подобного состояния у беспозвоночных животных, до сих пор остается открытым. В связи с этим, целью данного исследования являлось изучение изменений мембранных характеристик премоторных интернейронов оборонительного поведения виноградных улиток после формирования тревожно-подобного состояния.

Эксперименты были проведены на брюхоногих моллюсках вида *Helix pomatia*. Тревожно-подобное состояние вырабатывали путем предъявления 4 электрических стимулов в область головы с произвольными интервалами в течение 4 дней. Затем, через 10 была проведена вторая сессия предъявлений электрических стимулов. Формирование тревожно-подобного состояния определялось по поведенческим тестам. Исследование мембранных характеристик премоторных интернейронов проводили на препаратах изолированной центральной нервной системы животных. Исследовались такие параметры электрической активности нейронов как мембранный потенциал покоя (V_m), амплитуда ВПСП, длительность ВПСП, также был проведен анализ частоты возникновения ВПСП различной амплитуды. Контролем служила регистрация электрофизиологических характеристик у улиток, не подвергшихся тревожно-подобному состоянию.

Исследование мембранных характеристик премоторных интернейронов выявило достоверное снижение мембранного потенциала ($-52,95 \pm 1,7$) мВ по сравнению с мембранным потенциалом интернейронов интактной группы ($-59,2 \pm 2$) мВ. Анализ ВПСП, возникающих на интернейронах животных, находящихся в тревожно-подобном состоянии, показал снижение средней амплитуды ВПСП по сравнению со средней амплитудой ВПСП в группе контроля. Также было найдено, что частота появления возникающих на интернейронах ВПСП в экспериментальной группе ниже, по сравнению с частотой появления ВПСП группы контроля.

Таким образом, при формировании тревожно-подобного состояния происходит деполяризационное смещение мембранного потенциала премоторных интернейронов. Вместе с тем снижается амплитуда и частота появления ВПСП, возникающих на мембране данных интернейронов. Также было найдено, что при формировании тревожно-подобного состояния на премоторных интернейронах париетального ганглия увеличивается количество низкоамплитудных ВПСП и отсутствуют высокоамплитудные ВПСП регистрируемые в премоторных интернейронах интактных улиток.

Работа поддержана Программой стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА В ПРИСУТСТВИИ РЕСВЕРАТРОЛА

Чурсанова Е.Н., Корпусова Е.И., Деенкова А.Ю., Шестых В.А., Наквасина М.А.

Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Eka.bio@mail.ru

В работе исследовано возможное защитное действие ресвератрола в концентрациях 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} моль/л по отношению к лимфоцитам человека в условиях инициации клеточной гибели после воздействия УФ-света (254 нм, 1510 Дж/м²) и пероксида водорода (10^{-5} моль/л).

Уровень повреждений ДНК лимфоцитов оценивали с помощью метода ДНК-комет. После УФ-облучения лимфоцитов в образцах преобладали кометы типа C2, характерные для предапоптотических клеток с фрагментами ДНК менее 50 т.п.н. Обработка лимфоцитарной суспензии H₂O₂ индуцировала формирование комет C1/C2 класса. В присутствии ресвератрола в использованных концентрациях уровень поврежденности ДНК в УФ-облученных и обработанных пероксидом водорода клетках, оцениваемый по изменению процентного содержания ДНК в хвосте кометы, статистически достоверно снижался по отношению к таковому для модифицированных свободных клеток. Процентное содержание ДНК в «хвосте» комет характеризует уровень однонитевых разрывов в ДНК исследуемых клеток, наличие которых можно рассматривать как сигнал к инициации апоптоза.

При исследовании методом флуоресцентной микроскопии с окрашиванием клеточных ядер пропидия йодидом количества некротических клеток установлено, что ресвератрол в использованных концентрациях не вызывал процессы некроза клеток. УФ-облучение и пероксид водорода индуцировали статистически значимое повышение количества некротических клеток по сравнению с таковым для нативных лимфоцитов. В присутствии ресвератрола в условиях воздействия УФ-света и пероксида водорода наблюдалось уменьшение количества погибших клеток по отношению к таковому для модифицированных иммуноцитов в отсутствие ресвератрола.

Следовательно, ресвератрол в концентрациях 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} моль/л снижает количество погибающих и погибших лимфоцитов соответственно по механизмам апоптоза и некроза в условиях УФ-облучения и воздействия пероксида водорода.

ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ *IN VITRO* КОМБИНАЦИЙ PG1 И ТЕМОЗОЛОМИДА НА КЛЕТКИ ГЛИОБЛАСТОМЫ

Чутко А.Л.¹, Чернов А.Н.¹, Ландыня С.С.², Шарапов Я.А.², Галимова Э.С.^{1,3}

¹Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

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

³Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова,
Санкт-Петербург, Россия

chutko2401@gmail.com

Глиобластома (ГБМ) – одна из самых злокачественных опухолей центральной нервной системы. Несмотря на достижения в методах лечения, она остается в значительной степени неизлечимой. Таким образом, возникает острая необходимость в разработке новых препаратов и эффективных подходов лечения ГБМ. Многочисленные исследования продемонстрировали, что антимикробные пептиды (АМП) могут проявлять разный противоопухолевый потенциал в отношении опухолевых клеток. В том числе были проведены исследования, демонстрирующие способность АМП протегрина-1 (PG-1) оказывать цитотоксическое действие на опухолевые клетки человека. Цель данного исследования – изучить цитотоксическое действие PG-1 и его комбинации с темозоломидом в отношении первичных клеток глиомы человека.

Клетки опухоли мозга получены от пациентов, проходящих лечение в нейрохирургическом отделении Нейрохирургического института им. проф. А.Л. Поленова НМИЦ В.А. Алмазова (Санкт-Петербург). Биопсионный материал получен с информированного согласия пациентов. Исследование одобрено локальным этическим комитетом при Институте экспериментальной медицины. Клетки опухоли мозга были выделены согласно протоколу, предложенному Cheng F. и соавтр. с небольшими модификация

Оценку цитотоксического действия PG-1 и темозоломида (ТМЗ) на клетки ГБМ проводили с помощью клеточного анализатора Xcelligence. Цитотоксическая активность PG-1 и ТМЗ на клетки ГБМ оценивалась по ИК50 – дозе, вызывающей 50%-ное ингибирование жизнеспособности клеток. Клетки ГБМ были обработаны PG-1 в концентрациях 16 и 24 мкМ и ТМЗ в концентрациях 30, 75, 150, 300, 1000, 2500 мкМ.

Результаты эксперимента продемонстрировали, что клетки ГБМ были чувствительны к воздействию исследуемых комбинаций дозозависимым образом. Установлено, что комбинации PG-1 с ТМЗ обладают выраженным цитотоксическим действием на клетки ГБМ (ИК50=425.8 мкМ для комбинации PG-1 16 мкМ+ТМЗ и ИК50=172.2 мкМ для комбинации с PG-1 24 мкМ+ТМЗ). Кроме того, комбинации PG-1 с ТМЗ более эффективны чем монотерапия ТМЗ, обладающая ИК50=790.7 мкМ. Таким образом, по нашим предварительным результатам комбинации PG-1 и ТМЗ оказывают противоопухолевый эффект в отношении клеток ГБМ *in vitro*, что можно рассматривать в качестве потенциального подхода в терапии ГБМ.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, грант No 075-15-2022-302 (20 апреля 2022 г.) НЦМУ Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» (ФГБНУ «ИЭМ»).

ВЛИЯНИЕ ЛИГАНДОВ Sigma1R BD-1047 И PRE-084 НА ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ, ОПОСРЕДУЕМЫЕ ГАМК_A – РЕЦЕПТОРАМИ

Шангин С.В., Вахитова Ю.В., Литвинова С.А., Середенин С.Б.

ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Россия

shangin_sv@academpharm.ru

Нарушения регуляции ГАМК_A-рецепторов являются основой патогенеза тревожных состояний, расстройств сна, эпилепсии и когнитивных дисфункций. Возможностью связываться с рецептором обладают различные аллостерические модуляторы, регулирующие ГАМК-индуцированные ионные токи, и имеющие специфические сайты связывания на рецепторе. Бензодиазепиновые, барбитуровые, а также нейростероидные и этаноловые аллостерические сайты связывания ГАМК_A рецепторов опосредуют влияние многих фармакологических препаратов с анксиолитическими, седативными, снотворными, противосудорожными свойствами. Sigma1R является внутриклеточным шапероном, который играет важную роль в модуляции кальциевого гомеостаза, регуляции активности различных ионных каналов и ионотропных мембранных рецепторов. Известно, что соединения с различной химической структурой и фармакологической активностью обладают сродством к Sigma1R, в частности, антидепрессанты, психостимуляторы, нейролептики, противосудорожные средства.

В связи с этим, целью работы стала оценка влияния лигандов Sigma1R на противосудорожное действие диазепама в модели судорог, индуцированных пентилентетразолом (PTZ), и на параметры сна, вызванного пентобарбиталом, у мышей.

В модели судорог, вызванных PTZ, мышам ICR внутрибрюшинно (в/б) вводили PRE-084 (5, 20 мг/кг); BD-1047 (1, 10, 20 мг/кг) или растворитель, с последующей инъекцией диазепама (1 мг/кг) или его растворителя через 60 минут. Через 30 минут после этого в внутривенно (в/в) вводили PTZ (10 мг/кг, 6 мкл/с). Минимальные дозы PTZ, необходимые для возникновения судорожного припадка, рассматривались как пороговые значения. В ходе данного эксперимента регистрировались клонические подергивания (КП), генерализованные клонические судороги (ГКС) и генерализованные тонические судороги (ГТС). В модели пентобарбиталового сна началом отсчета времени являлось в/б введение BD-1047 (1, 10 мг/кг), PRE-084 (1, 5 мг/кг) или их растворителя. Пентобарбитал (50 мг/кг) вводили в/б через 60 минут после первого введения. Время засыпания (ВЗ) регистрировали по исчезновению рефлекса выпрямления, время (ВС) фиксировалось с момента засыпания до момента возвращения рефлекса выпрямления.

Введение BD-1047 и PRE-084 не влияло на судороги, вызванные PTZ, у животных контрольной группы. Предварительное введение мышам BD-1047 в дозе 20 мг/кг ослабляло противосудорожное действие диазепама, что оценивалось по снижению порога регистрируемых параметров ($p < 0,0001$ для КП; $p = 0,0057$ для ГКС; $p = 0,0068$ для ГТС). Введение животным PRE-084 и диазепама значительно усиливало противосудорожный эффект диазепама. В модели пентобарбиталового сна BD-1047 в дозе 1 мг/кг препятствовал гипнотическому действию пентобарбитала, статистически значимо увеличивая ВЗ и снижая ВС. PRE-084 в дозе 1 мг/кг усиливал эффекты пентобарбитала, статистически значимо увеличивая ВС, но, не изменяя ВЗ. При увеличении дозы PRE-084 до 5 мг/кг выявлено статистически значимое снижение ВЗ и увеличение ВС.

Полученные данные указывают на то, что антагонист Sigma1R BD-1047 в высоких дозах препятствует противосудорожному действию диазепама, в то время как агонист Sigma1R PRE-084 в дозах 5 и 20 мг/кг усиливает противосудорожное действие диазепама в модели PTZ-индуцированных судорог у мышей. Полученные результаты на модели пентобарбиталового сна свидетельствуют о разнонаправленном влиянии антагонистов и агонистов Sigma1R на гипнотические свойства пентобарбитала.

ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ У ПАЦИЕНТОВ С ГЛИОМОЙ

Шарапов Я.А.¹, Чернов А.Н.², Ландыня С.С.¹, Галимова Э.С.^{2,3}

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

²Институт экспериментальной медицины РАН, Санкт-Петербург, Россия

³Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия

yarostloff@yandex.ru

Мультиформная глиобластома (GBM) – наиболее агрессивная и фатальная злокачественная первичная опухоль головного мозга. Повышение выживаемости пациентов с GBM остается ограниченным даже при использовании комбинированного подхода к лечению, включающего хирургическое вмешательство, лучевую терапию и химиотерапию. Современные генетические и геномные исследования позволили идентифицировать ключевые молекулярно-генетические и цитогенетические маркеры, позволяющие определить классификацию глиом. Кроме того, надежных молекулярных маркеров для прогнозирования ответа на терапию и выживаемости недостаточно, и их рутинное использование в клинической практике ограничено. Соответственно, существует острая необходимость идентифицировать молекулярные маркеры для прогнозирования ответа на терапию и клинических результатов для улучшения лечения и выживаемости при GBM.

Цель. Мы анализировали прогностическую ценность ряда тканевых биомаркеров, включая IDH1, TP53, EGFR, Ki-67, GFAP, H3K27M, MGMT, VEGF, NOS, CD99 и ATRX, в отношении общей выживаемости пациентов с глиобластомой GBM и при воздействии фактора роста нервов (NGF) и химиопрепаратов темозоломида (TMZ), доксорубицина (DOX), карбоплатина (CB), цисплатина (CPL) и этопозида (ETO) на первичные клетки GBM *in vitro*.

Материалы и методы. клетки GBM были выделены из биоптата опухоли, полученного в ходе хирургической резекции у 23 пациентов GBM, проходящих лечение в педиатрическом и взрослом отделениях нейрохирургии НМИЦ им. В.А. Алмазова Минздрава России. Экспрессия молекулярных маркеров была оценена иммуногистохимически в образцах GBM в парафиновых срезах биоптата опухоли. Метод МТТ использовали для анализа жизнеспособности клеток и определения цитотоксических эффектов NGF и его комбинаций с химиотерапией на первичные клетки GBM. Синергизм или антагонизм определяли с использованием метода индекса комбинации (CI).

Результаты. NGF продемонстрировал сильное цитотоксическое действие на первичные клетки GBM в тесте МТТ (IC₅₀ 0.3–16 nM) по сравнению с химиотерапией. Комбинации препаратов NGF+DOX, NGF+CB, NGF+TMZ и NGF+CIS показали синергизм в первичных клетках GBM (CI<1). Была обнаружена положительная корреляция между экспрессией p53, ATRX, GFAP и пониженной экспрессией EGFR с общей выживаемостью пациентов (p<0.05), а также между экспрессией GFAP и Ki-67 и чувствительностью к воздействию химиопрепаратов TMZ, CB, CPL, ETO и NGF на клетки GBM *in vitro*.

Заключение. Таким образом, комбинация NGF и химических препаратов усиливает цитотоксичность химиотерапии и оказывает синергический противоопухолевый эффект на первичные клетки GBM. Экспрессия p53, ATRX, GFAP и пониженная экспрессия EGFR является значимым положительным прогностическим фактором для общей выживаемости пациентов с GBM. Кроме того, экспрессия GFAP и Ki-67 является индикатором чувствительности к воздействию химиопрепаратов TMZ, CB, CPL, ETO и NGF на клетки GBM *in vitro*.

Работа выполнена в рамках государственного задания № 122020300189-6.

ИЗУЧЕНИЕ МЕТАБОЛОМНЫХ МАРКЕРОВ ИШЕМИЧЕСКИ-ГИПОКСИЧЕСКОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КРЫСИНОЙ НЕОНАТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ

**Шевцова Ю.А., Эльдаров Ч.М., Горюнов К.В., Чаговец В.В., Стародубцева Н.Л.,
Ионов О.В., Силачев Д.Н.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

yulshevtsova@yandex.ru

Гипоксически-ишемическая энцефалопатия (ГИЭ) — это состояние, возникающее при снижении поступления кислорода и притока крови к мозгу новорожденного, которое может быть вызвано множеством факторов, включая осложнения во время родов, проблемы с пуповиной, аномалии развития плаценты или состояния здоровья матери. ГИЭ является частой причиной неонатальной смертности и инвалидности новорожденных. В прошлом варианты лечения были ограничены медикаментозной терапией для поддержания сердечно-легочной функции и уменьшения судорожной активности. Однако в последние годы терапевтическая гипотермия (ТГ) стала общепринятым и эффективным подходом к лечению ГИЭ. Для достижения оптимальных результатов ТГ в идеале следует начинать в течение первых 6 часов жизни. Раннее вмешательство имеет решающее значение для максимизации потенциальных преимуществ ТГ, однако данный метод также имеет ряд ограничений, и его использование может быть опасным, если диагноз неверен. Таким образом, правильная диагностика ГИЭ у новорожденных является ключевым фактором для принятия решения о начале применения ТГ.

Нами было проведено исследование по определению ранних метаболомных маркеров ГИЭ с использованием модели Райса-Ваннуччи для новорожденных крыс. Пятна засохшей крови 7-дневных самцов и самок крысят были проанализированы методом жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС) в режимах регистрации положительных и отрицательных ионов. Многомерный статистический анализ выявил два различных кластера метаболитов в обоих режимах ВЭЖХ-МС. Последующий однофакторный статистический анализ выявил 120 положительных и 54 отрицательных молекулярных иона, у которых наблюдалось статистически значимое изменение концентрации, с разницей более чем в 1,5 раза после НИЕ. В группе ГИЭ концентрации стероидных гормонов, насыщенных моно- и триглицеридов и фосфатидилхолинов были значительно снижены в положительном режиме. Напротив, концентрация ненасыщенных фосфатидилхолинов была увеличена в группе ГИЭ. Среди отрицательно заряженных молекулярных ионов наибольшие различия были обнаружены в категориях фосфатидилхолинов, фосфатидилинозитолов и триглицеридов. Основные метаболические пути, связанные с измененными метаболитами, были проанализированы для обоих режимов. Метаболические пути, такие как биосинтез стероидов и метаболизм жирных кислот, были затронуты в наибольшей степени. Эти результаты подчеркнули центральную роль метаболизма глицерофосфолипидов в запуске системных реакций при ГИЭ.

Таким образом, оценка липидных биомаркеров с помощью целевого исследования ВЭЖХ-МС может быть многообещающим подходом для ранней диагностики ГИЭ.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-15-00454, <https://rscf.ru/project/22-15-00454/>

ВЛИЯНИЕ ПТСР НА ПОЛОВОЗРЕЛЫХ САМЦОВ КРЫС, РОДИВШИХСЯ ОТ СТРЕССИРОВАННЫХ ВО ВРЕМЯ БЕРЕМЕННОСТИ МАТЕРЕЙ, НАРУШАЕТ ПАМЯТЬ И ГОРМОНАЛЬНЫЕ ФУНКЦИИ ИХ ПОТОМКОВ

Шигалугова Е.Д., Холова Г.И.

Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук,
Санкт-Петербург, Российская Федерация

yshigalugova@bk.ru

В последнее время наблюдается повышенный интерес к пренатальному стрессу (ПС), обусловленному стрессом матерей в течение беременности, который имеет различные неврологические и физиологические признаки в последующей жизни.

Показано, что ПС самцы характеризуются повышенной чувствительностью к стрессорным воздействиям. Ранее нами было показано, что стрессирование самцов-отцов в парадигме «стресс-рестресс» (модель ПТСР) проявляется у их потомков преимущественно самцов в виде различных нарушений поведения, памяти и гормональных функций. Мы предположили, что при наблюдении за изменениями аналогичное стрессирование ПС самцов до спаривания с самками может привести к более значительным нарушениям поведения и гормональных функций у их потомков.

Цель настоящего исследования состояла в выявлении эффекта ПТСР-подобного состояния взрослых ПС самцов на память и гормональные функции их потомков обоего пола, а также экспрессию гена инсулиноподобного фактора роста 2 (*Igf2*) в мозге потомков.

Нами проводились работы на взрослых самцах Вистар, родившихся от самок, подвергнутых ежедневной иммобилизации в течение 1 ч с 15-19 день беременности (ПС самцы). В период сперматогенеза ПС самцов подвергали травматическому стрессу с последующим рестрессом на 7 сут. Через 48 сут самцов спаривали с интактными самками, дальнейшие эксперименты выполнены на их потомстве обоего пола. Память самцов изучали в тесте реакция пассивного избегания (РПИ). У взрослых потомков оценивали экспрессию гена *Igf2* в гиппокампе и неокортексе методом ПЦР в режиме реального времени. Уровень тестостерона и эстрадиола определяли методом ИФА.

Известно, что пренатальный стресс у самцов активизирует ухудшение памяти и снижению экспрессии *Igf2* в мозге потомков обоего пола, если таких самцов дополнительно стрессировали до спаривания. У потомков мужского пола обнаружено снижение уровня тестостерона, а у потомков женского пола – уровня эстрадиола.

Таким образом, в нашей работе было показано, что выявленные изменения памяти и экспрессии гена инсулиноподобного фактора роста 2 в мозге потомков ПС самцов с ПТСР-подобным состоянием во время сперматогенеза, могут быть причиной снижения уровня половых гормонов в их крови.

Секция 5

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ И ФОТОБИОЛОГИЯ

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ СНИЖЕНИЯ ТОКСИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА
ЦИПЕРМЕТРИНА В ОТНОШЕНИИ ПШЕНИЦЫ МЯГКОЙ (*TRITICUM AESTIVUM* L.) ПРИ
ИНОКУЛЯЦИИ СЕМЯН БАКТЕРИЯМИ *AZOSPIRILLUM THIOPHILUM*

Алимова А.А.¹, Гуреева М.В.², Гуреев А.П.^{1,3}

¹Кафедра генетики, цитологии и биоинженерии, Воронежский государственный университет,
Воронеж, Россия

²Кафедра биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет,
Воронеж, Россия

³Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

aa10022607@gmail.com

На данный момент пшеница (*Triticum aestivum* L.) является одной из главных сельскохозяйственных культур во всем мире. Для решения задач, связанных с увеличением производительности, а также повышением качества посевного материала, проводится большое количество исследований. Помимо этого, производителями активно используются пестициды, относящиеся к разнообразным классам соединений, в том числе и инсектициды. Несмотря на то, что пестициды применяются повсеместно, многие из них все же обладают рядом существенных недостатков, к которым можно отнести воздействие на нецелевые организмы. В данной работе мы оценивали эффективность использования ризосферных бактерий для снижения токсических эффектов от применения пестицида циперметрина. Известно, что некоторые бактерии способны активировать систему детоксификации ксенобиотиков, а также стимулировать рост растений.

В ходе работы в качестве объекта исследования мы использовали пшеницу, а также инсектицид циперметрин, являющийся ксенобиотиком, и штамм бактерий *Azospirillum thiophilum* BV-S^T, которыми обрабатывали посевной материал перед посадкой. Для подтверждения успешности инокуляции мы провели ПЦР с пробами контроля и пробами, обработанными суспензией бактерий. После чего осуществлялась постановка электрофореза в агарозном геле с ампликонами для оценки их размера. Длина ампликонов соответствовала ожидаемым значениям, что подтверждает успешность инокуляции. Помимо этого, мы оценили количество повреждений мтДНК в побегах пшеницы и выяснили, что количество повреждений в группе, обрабатываемой циперметрином, на 1-й и 2-й неделе эксперимента было выше по сравнению с контролем на 21% и 41% соответственно. В группе, обработанной циперметрином и бактериями, количество повреждений на 1-й неделе соответствовало количеству повреждений в контрольной группе, а на 2-й неделе было в 1,5 раза ниже по сравнению с контролем. На 3 и 4 неделе эксперимента достоверных различий в количестве повреждений между группами обнаружено не было. Помимо повреждения мтДНК мы также оценили уровень экспрессии генов *ndor-1* и *gst*, отвечающих за детоксификацию ксенобиотиков в организме растений. На 1-й неделе эксперимента в группе, обработанной циперметрином и бактериями, экспрессия гена *ndor-1* была почти в 3 раза выше по сравнению с группой, обработанной только циперметрином. Такие же данные получены на 2-й неделе для гена *gst*. С возрастом у растения наблюдается тенденция общего повышения уровня экспрессии этих генов.

Таким образом, применение циперметрина оказывает токсическое действие на пшеницу на ранних стадиях развития, проявляющееся в увеличении повреждений мтДНК. Однако к третьей-четвертой неделе активизируются системы детоксикации ксенобиотиков, а предпосевная инокуляция семян *A. thiophilum* ускоряет активацию адаптивных механизмов. Исходя из этого, мы можем сказать, что предпосевная обработка семян *A. thiophilum* может рассматриваться как эффективный подход к снижению токсичности пестицидов на сельскохозяйственных культурах.

Работа поддержана грантом РФФИ №23-24-00277.

РЕГУЛЯЦИЯ СВЕТОСБОРА У РАСТЕНИЙ ЯЧМЕНЯ В УСЛОВИЯХ ЗАСОЛЕНИЯ И УМЕРЕННОЙ ЗАСУХИ

**Балашов Н.В., Маркин Р.В., Ветошкина Д.В.,
Борисова-Мубаракшина М.М., Иванов Б.Н.**

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

kbalashov@mail.ru

Фотосинтез является основой жизни фотосинтезирующих организмов, что определяет важность быстрой адаптации фотосинтетического аппарата к изменяющимся условиям окружающей среды. При этом, регулирование светосбора растениями в стрессовых условиях представляет собой один из важнейших адаптационных путей, обеспечивающих устойчивость фотосинтезирующих организмов в новых условиях. Регуляции светосбора на уровне светособирающей антенны фотосистемы II (ФС II) включают в себя краткосрочные и долгосрочные ответы. К быстро развивающимся, краткосрочным ответам, относят диссипацию энергии в тепло и *state transitions*. Долговременный механизм адаптации реализуется за счет уменьшения размера светособирающей антенны ФС II, что защищает растения от фотоингибирования. Фотоингибирующие условия могут возникнуть не только при непосредственном возрастании освещенности, но и при действии любых стрессовых условий, которые приводят к тому, что поглощение энергии преобладает над возможностью фотосинтетического аппарата использовать эту энергию в фотохимических реакциях.

В настоящей работе исследовалась способность растений ячменя (*Hordeum vulgare*) регулировать количество поглощаемой световой энергии в условиях умеренной засухи и засоления почвы при освещении растений светом низкой интенсивности. Выявлена связь между изменением процесса диссипации энергии в тепло, измеряемого с помощью нефотохимического тушения (НФТ) флуоресценции хлорофилла *a* ФСII при комнатной температуре, в частности энергозависимой составляющей, и изменением размера светособирающей антенны ФС II, а именно с изменением количества белков Lhcb1 и Lhcb2 и параметра ABS/Rc, оцененного с помощью измерения быстрой флуоресценции хлорофилла *a*. Кроме того, было оценено влияние обоих стрессовых факторов на *state transitions* путем измерения параметра Fr, косвенно отражающего процесс протекания *state transitions*, а также путем оценки уровня фосфорилированных белков Lhcb1-P и Lhcb2-P. Выявленные закономерности показали, что засуха и засоление при низкой освещенности инициируют не только уменьшение размера антенны ФСII (уменьшение количества белков Lhcb1 и Lhcb2), но и увеличение НФТ, имитируя действие высокой интенсивности света.

Работа поддержана грантом РФФИ №22-74-10088.

АДАПТАЦИЯ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ К ПОНИЖЕННОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ:
РОЛЬ АЛЬТЕРНАТИВНОЙ ОКСИДАЗЫ МИТОХОНДРИЙ В ПОДДЕРЖАНИИ
ЭФФЕКТИВНОСТИ ФОТОСИНТЕЗА

Бразжникова А.В.^{1,2}, Балашов Н.В.¹, Найдов И.А.¹, Борисова-Мубаракшина М.М.¹

¹Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук – обособленное
подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушино, Россия

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

brazhnikovanastasia@yandex.ru

В стрессовых условиях устойчивость растений определяется многими факторами, в том числе активацией альтернативных путей транспорта электронов как в фотосинтетическом, так и в дыхательном аппарате. На сегодняшний день в недостаточной степени изученными остаются вопросы влияния изменений в активности митохондриальных альтернативных путей на протекание фотосинтеза. Известно, что митохондрии многих организмов, в частности высших растений, содержат нечувствительную к действию цианида альтернативную оксидазу (АОХ), активность которой усиливается в условиях стресса, что предотвращает генерацию активных форм кислорода в митохондриальной электрон-транспортной цепи и, следовательно, развитие окислительного стресса. К настоящему времени доказана роль АОХ в термогенезе у ряда растений, однако роль АОХ при пониженной температуре до конца не изучена.

В настоящей работе, используя растения *Arabidopsis thaliana* дикого типа и мутантные растения с гиперэкспрессией, подавлением экспрессии (antisense растения) и нокаутом гена АОХ (SALK-084897), оценивали влияние изменений содержания АОХ митохондрий на протекание фотосинтеза при пониженной температуре (6°C). Через 10 дней при 6°C наблюдали небольшое, но статистически значимое снижение квантового выхода ФС 2 в растениях дикого типа и растениях с нокаутом АОХ. Однако эффективный квантовый выход ФС 2 в мутантных растениях с измененным содержанием АОХ, наоборот, даже немного возрастал, особенно у AS12 растений с пониженным содержанием АОХ. При 6°C у всех генотипов увеличивалась скорость циклического транспорта электронов вокруг ФС 1 по сравнению со скоростью, измеренной при 21°C. Коэффициент нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла *a* (qN) у мутантных линий XX2 и AS12 оставался на том же уровне в условиях пониженной температуры, что и при контрольной температуре, в то время как показатель qN у дикого типа и растений с нокаутом АОХ достоверно снижался. Это означает, что растения дикого типа и растения без АОХ частично теряли способность к диссипации энергии в тепло при пониженной температуре, в то время как мутантные линии с измененным содержанием АОХ – нет. Кроме того, к 10 дню эксперимента было обнаружено увеличение содержания H₂O₂ только в листьях растений дикого типа и растений с нокаутом АОХ.

Таким образом, интенсивность фотосинтеза не изменяется при понижении температуры как в растениях с гиперэкспрессией, так и с подавленной экспрессией этого фермента, в то время как снижается в растениях дикого типа и в растениях с заблокированным синтезом АОХ. Высказано предположение, что изменения содержания АОХ представляет собой сигнал, необходимый для поддержания фотосинтеза при пониженной температуре.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 23-14-00396); <https://rscf.ru/project/23-14-00396/>

НОВЫЙ ПОДХОД К ИЗУЧЕНИЮ РОЛИ ЦИТОХРОМНОГО *b₆f*-КОМПЛЕКСА В РЕГУЛЯЦИИ ПОТОКОВ ЭЛЕКТРОНОВ И ПРОТОНОВ В ХЛОРОПЛАСТАХ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

Вильянен Д.В., Найдов И.А., Козулева М.А.

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

vilyadar@gmail.com

Цитохромный *b₆f*-комплекс – важнейшее звено в регуляции фотосинтетического электронного транспорта. Он участвует в линейном и циклическом электронном транспорте (ЦЭТ), причем функционирование последнего обеспечивает дополнительный перенос протонов в люмен тилакоидов. В высших растениях существует два пути ЦЭТ вокруг фотосистемы I: опосредованный NDH-комплексом и так называемый антимицин-чувствительный, ключевым элементом которого является белковый комплекс PGR5:PGRL1. В литературе для него предположена как регуляторная роль, так и роль непосредственного переносчика электронов от ферредоксина (Фд) к молекулам пластохинона. Однако точный механизм реализации данного пути ЦЭТ, как и механизм его активации, до сих пор является предметом дискуссий. Учитывая, что одним из предполагаемых состояний PGR5:PGRL1 в тилакоидной мембране является его ассоциированное состояние с цит. *b₆f*-комплексом, возможно, в основе регуляции линейного электронного транспорта и антимицин-чувствительного пути ЦЭТ лежит влияние PGR5:PGRL1 на функционирование цит. *b₆f*-комплекса.

В данной работе для исследования возможной функциональной связи между PGR5:PGRL1 и цит. *b₆f*-комплексом мы использовали разработанный нами подход, основанный на различии в сродстве хинол-окисляющего (Qo) сайта цит. *b₆f*-комплекса к конкурентным ингибиторам окисления пластохинола, DNP-INT и DBMIB, в зависимости от условий, влияющих на скорость линейного электронного транспорта, таких как интенсивность света и pH люмена. Эксперименты проводили на изолированных тилакоидах гороха посевного, а также *Arabidopsis thaliana* дикого типа и растений мутантной линии *pgr1* с нарушением фотосинтетического контроля, а также *pgr11* и *pgr5*, в которых отсутствовал PGR5:PGRL1 комплекс. Согласно полученным данным, различия в сродстве Qo-сайта к ингибиторам обусловлены особенностями их связывания с ключевыми для связывания и депротонирования молекулы пластохинола АК-остатками: Glu78 (субъединица IV) и His128 (железо-серный белок Риске). Депротонирование данных АК-остатков напрямую зависит от функционирования двух протон-выводящих каналов цит. *b₆f*-комплекса, на основе чего мы предположили, что сродство Qo-сайта к DNP-INT и DBMIB изменяется в зависимости от эффективности отвода протонов от Qo-сайта в процессе освещения. Нами было показано, что не только в присутствии Фд и NADP, но и при использовании метилвиологена в качестве акцептора электронов от фотосистемы I, когда ЦЭТ не происходит, сродство Qo-сайта к DNP-INT изменяется в зависимости от наличия или отсутствия PGR5:PGRL1 комплекса. При этом наличие или отсутствие PGR5:PGRL1 не влияло на сродство Qo-сайта к DBMIB. Кроме того, в присутствии антимицина А, ингибирующего данный путь ЦЭТ, сродство Qo-сайта так же изменялась только к DNP-INT, но не к DBMIB. Этот эффект может указывать на функциональную связь между PGR5:PGRL1 комплексом и работой протон-выводящего канала цит. *b₆f*-комплекса, участвующего в депротонировании Glu78. Мы предполагаем, что наличие PGR5:PGRL1 комплекса или его активность приводят к конформационным изменениям в цит. *b₆f*-комплексе и Qo-сайте, которые могут влиять на связывание ингибиторов и, соответственно, связывание и окисление молекул пластохинола в ходе линейного электронного транспорта. Данный механизм может играть роль связующего регуляторного звена между циклическим антимицин-чувствительным и линейным электронным транспортом в хлоропластах высших растений.

ИССЛЕДОВАНИЕ СЕЗОННОЙ АКТИВНОСТИ КОРТИКУЛЯРНОГО
ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА ВЕТВЕЙ
ЯБЛОНИ ДОМАШНЕЙ *MALUS DOMESTICA*

Грязнова У.В.^{1,2}, Савченко Т.В.², Тихонов К.Г.²

¹Пушкинский филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)», Пушкино, Россия

²Институт фундаментальных проблем биологии РАН – обособленное подразделение ФИЦ Пушкинский научный центр биологических исследований РАН, Пушкино, Россия

ulyana.gr@yandex.ru

Изучение фотосинтетических процессов, протекающих в нелистовых органах растений, за последние годы не потеряло своей актуальности. Для данной работы в качестве объекта исследования было взято культурное древесное растение яблоня домашняя *Malus domestica*. Целью данной работы стало исследование особенностей функционирования кортикулярного фотосинтетического аппарата ветвей *M. domestica* в разные сезоны.

В период с конца сентября 2022 года до конца февраля 2024 года был проведен мониторинг фотосинтетической активности хлоренхимных тканей внутренней коры (кортекса) ветвей *M. domestica* на экспериментальном участке, находящемся на территории Московской области, г. Пушкино, в ходе которого в было замечено, что показатели эффективного квантового выхода в течение года снижаются с максимальных значений в июле (0,61) до минимальных в январе (вплоть до 0). Интересно, что инкубация при комнатной температуре ветвей *M. domestica*, собранных в зимний период, приводит к быстрому – в течение 30 минут – повышению значений эффективного квантового выхода до 0,20. Далее происходит постепенное увеличение этих значений, и через три дня было отмечено их повышение до 0,39. Таким образом, температура является главным фактором, определяющим активность кортикулярного фотосинтетического аппарата.

Ранее нами было показано, что кортикулярный фотосинтетический аппарат винограда *Vitis vinifera* крайне устойчив к промораживанию. Было проведено сравнение чувствительности кортикулярного фотосинтетического аппарата ветвей *M. domestica* к повышенной температуре в зависимости от сезона. Значительной устойчивостью к обработке высокими температурами (45°C) отличается кортикулярный фотосинтетический аппарат ветвей, собранных в летнее время, – значения их максимального и эффективного квантового выхода снизились с 0,67 и 0,61 до 0,46 и 0,43, соответственно, даже после часового воздействия повышенной температурой. Образцы, собранные в другие сезоны, более чувствительны к аналогичному воздействию. На кортикулярный фотосинтетический аппарат зимних ветвей оказывает значительное влияние даже получасовая обработка повышенной температурой. Данные говорят о том, что в процессе подготовки к зиме кортикулярный фотосинтетический аппарат теряет способность выдерживать высокие температуры.

ВЛИЯНИЕ ТЯЖЁЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА ЦЕЛОСТНОСТЬ МТДНК ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ *TRITICUM AESTIVUM* L.

Еремина А.А.¹, Гуреев А.П.^{1,2}, Гуреева М.В.¹

¹Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

²Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

anya.kryuy@gmail.com

Тяжёлые металлы – это класс химических элементов, отличающихся высокой токсичностью. По данным Всемирной организации здравоохранения тяжёлые металлы занимают второе место, уступая лишь пестицидам, в списке самых опасных загрязнителей окружающей среды. С каждым годом содержание тяжёлых металлов в воздухе, воде и почве непрерывно растёт, что связано с увеличением антропогенного воздействия на окружающую среду.

Проблема загрязнения окружающей среды, в частности почв, для России стоит не менее остро. Пшеница является основной зерновой культурой, поставляемой на экспорт. Поэтому загрязнение почвы становится серьёзной угрозой для экономики страны. Накопление тяжёлых металлов в почве неминуемо приводит к их накоплению в различных органах растения.

Тяжёлые металлы могут воздействовать на любые клеточные органеллы, в том числе и на митохондрии. Токсичность тяжёлых металлов реализуется через развитие окислительного стресса, в результате которого образуются АФК (активные формы кислорода), отличающиеся высокой реакционной способностью. В своём эксперименте для инкубации семян *Triticum aestivum* L. мы использовали растворы солей меди, цинка, никеля и свинца. Ионы данных металлов индуцировали наиболее активную генерацию АФК в органеллах растительной клетки. В качестве маркера окислительного стресса у проростков пшеницы использовали показатели количества повреждений мтДНК. Количество повреждений оценивалось с помощью ПЦР в реальном времени у недельных проростков пшеницы. Молекулы АФК в клетках могут взаимодействовать как с белками, так и с нуклеиновыми кислотами, нарушая структуру биополимеров, что непосредственно сказывается на их функциональной активности. Однако мтДНК более чувствительна к такого рода повреждениям. В первую очередь это связано с прокариотической организацией мтДНК, а также с отсутствием гистоновых белков. Во вторую — с локализацией неядерной ДНК в непосредственной близости от мест производства реактивных форм кислорода. Образовавшиеся после обработки семян растворами тяжёлых металлов молекулы АФК начинали взаимодействовать с различными компонентами митохондрий, что приводило к повреждению дыхательной цепи, нарушению цикла Кребса, ингибированию ферментов электронно-транспортной цепи. Нарушения в электронно-транспортной цепи приводили к ещё большей генерации АФК, которые начинали атаковать мтДНК, в результате чего мтДНК повреждалась. Хорошо установлено, что основной мишенью пестицидов являются митохондрии и, в частности, мтДНК. При этом тяжёлые металлы стоят на втором месте после пестицидов в списке самых опасных и токсичных загрязнителей, но изучению их воздействия на целостность мтДНК по-прежнему не уделяют достаточного внимания, в то время как влияние пестицидов на мтДНК активно изучается.

Работа поддержана грантом РНФ № 23-24-00277.

ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ РЕСУРСНЫХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ *EX SITU*

Козлова М.В.

Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия

margaretta23@inbox.ru

В условиях континентального климата лесостепи Западной Сибири в Центральном сибирском ботаническом саду СО РАН (ЦСБС СО РАН, г. Новосибирск) гистохимические исследования направлены на изучение адаптивных и хозяйственно-ценных свойств ресурсных видов растений. Основными модельными объектами являются представители родовых комплексов *Rosa* L. и *Miscanthus* Anderss., входящими в биоресурсную коллекцию USU_440534. На базе Центра коллективного пользования ЦСБС, с использованием микротомы MC-2 с ТОС-II и светового микроскопа Carl Zeiss Axioscop-40 (видеокамера AxioCam MRc-5 с программой для получения и обработки изображений AxioVision 4.8) наиболее детально изучается сезонная динамика крахмала и лигнификация побегов.

У шиповников данные исследования проводятся в связи с биоморфологическими исследованиями надземных побеговых систем, оценкой характера их повреждений и выявлением адаптивного потенциала видов и форм. Различия в сезонной динамике крахмала в тканях побегов наиболее характерны в предзимье: у *Rosa glauca* Poir. среднее количество крахмала содержится в перимедуллярной зоне и низкое – в однорядных сердцевинных лучах. У *R. canina* L. низкое количество крахмала отмечается в перимедуллярной зоне и в единичных клетках однорядных сердцевинных лучей, а у представителя местной флоры *R. majalis* Herrm. происходит практически полный гидролиз крахмала, он отмечается лишь в единичных клетках перимедуллярной зоны.

Веерники характеризуются высокой скоростью нарастания надземной вегетативной массы, обусловленной, в том числе, C4-типом фотосинтеза. Виды *Miscanthus sacchariflorus* (Maxim.) Hack. и *M. sinensis* Anderss. имеют практическое применение в качестве источников биоэтанола и целлюлозы, считаются перспективными для создания карбоновых полигонов. Накопление большого количества лигнина в побегах затрудняет промышленную переработку и получение биоцеллюлозы.

На основании гистологического анализа побегов у видов и форм веерников возможен отбор особей, накапливающих меньше лигнина (с наименее развитой склеренхимой). Гистохимические исследования позволяют без использования дополнительного дорогостоящего оборудования и реактивов описать особенности лигнификации и кранц-анатомии, выявить локализацию первичного и транзитного крахмала у представителей рода *Mischantus* Ilyeva.

РОЛЬ РИЗОСФЕРНЫХ БАКТЕРИЙ В РЕГУЛЯЦИИ РОСТА ПШЕНИЦЫ МЯГКОЙ
(*TRITICUM AESTIVUM* L.) И СНИЖЕНИИ ТОКСИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА РАЗЛИЧНЫХ
КЛАССОВ ПЕСТИЦИДОВ

Крюкова В.А.¹, Гуреева М.В.¹, Гуреев А.П.^{1,2}

¹Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

²Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

vera.kryukova2017@yandex.ru

Пшеница *Triticum aestivum* L. – одна из самых распространенных зерновых культур в сельском хозяйстве. При ее культивировании и хранении используется большое количество пестицидов. Поэтому стоит учитывать их негативный эффект на сельскохозяйственные растения. Они могут воздействовать на растения на биохимическом уровне, а также физиологическом уровне это проявляется в угнетении роста, снижения сырой массы и сокращения урожайности. Известно, что они могут повреждать структуру геномной ДНК, и мтДНК. На основе микробиологических препаратов создаются биопестициды-инокулянты, которые способны также оказывать стимулирующий эффект на сельскохозяйственные культуры, но при этом не обладать таким негативным действием на само растение. Считается, что бактерии из рода *Azospirillum* является одним из наиболее перспективных инокулянтов для увеличения продуктивности пшеницы и увеличение ее устойчивости к различным стрессовым факторам. Поэтому целью нашего исследования было показать совместное действие пестицидов и бактерий на пшеницу для дальнейшей разработки таких препаратов.

Нами было изучено насколько совместная инокуляция пестицидов с устойчивыми бактериями может снижать пестицид-индуцированное снижение скорости роста, окислительные повреждения в горшечном эксперименте. В полевом эксперименте было изучено влияние совместной инокуляции пестицидов и *Azospirillum* на сырую массы пшеницы. Нами были обработаны семена пшеницы растворами тиометоксама, пропиконазола, дикамбой, дифенокназола, клопирамида, лямбда-цигалотрина, а также проводилась дополнительная инокуляция бактериями рода *Azospirillum* и *Niveispirillum* такими как *A. thiophilum*, *A. brasilense*, *A. picis*, *A. baldaniorum*, *N. irakense*. Все исследованные пестициды в выбранных нами концентрациях замедляли скорость роста пшеницы. В тех группах, где семена пшеницы инокулировались одновременно с пестицидами и *N. irakense*, скорость роста не снижалась относительно контроля. Инокуляция семян с *A. brasilense* препятствовала снижению роста, вызванного тиметоксамом и лямбда-цигалотрином. В связи с этим нами было показано, что при одновременной инокуляции *Azospirillum* и пестицидов предотвращалось вызванное пестицидами снижение скорости роста проростков пшеницы в горшечных опытах и способствовала увеличению биомассы пшеницы в полевых опытах. Также при проведении оценки количества повреждений мтДНК было обнаружено, что *A. picis* и *N. irakense* снижали количество повреждений мтДНК, вызванных дифеноканозолом и клопиралидом. При исследовании окислительного стресса методом железо-индуцированной хемилюминесценции мы выявили, что наибольший окислительный стресс был у проростков, обработанных тиаметоксамом, дикамбой и дифеноканозолом. Использование *A. brasilense* оказывало антиоксидантное действие при совместном применении с тиаметоксамом, *A. baldaniorum* снижал уровень окислительных процессов, вызванных влиянием дикамбы.

Таким образом, мы показали, что многие штаммы *Azospirillum* обладают потенциалом для смягчения токсического действия пестицидов и повышения продуктивности пшеницы.

Работа поддержана грантом РФФ № 23-24-00277.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ФИТОГОРМОНОВ ЖАСМОНАТОВ НА
АНТИОКСИДАНТНУЮ СИСТЕМУ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ ПРИ ЗАРАЖЕНИИ
ФИТОПАТОГЕНОМ *BOTRYTIS CINEREA*

Лещенко Е.Ф.^{1,2}, Тихонов К.Г.², Савченко Т.В.²

¹Пушинский филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)», Пушино, Россия

²Институт фундаментальных проблем биологии РАН – обособленное подразделение ФИЦ Пушинский научный центр биологических исследований РАН, Пушино, Россия

lena.lenojk@ya.ru

Фитогормоны жасмонаты, являющиеся по своей природе оксипипинами, вовлечены в формирование защитных ответов на действие стрессоров как биотической, так и абиотической природы. В основном, знания о путях биосинтеза и передачи сигналов жасмонатов получены благодаря исследованию модельного двудольного растения *Arabidopsis thaliana*, однако их функции и молекулярные механизмы действия у однодольных растений, а именно у пшеницы, до сих пор остаются малоизученными.

В данной работе мы исследовали роль антиоксидантной системы в устойчивости к заражению некротрофным грибом *Botrytis cinerea* мягкой пшеницы сорта Саратовская-60 и созданной на ее основе трансгенной линии (Tr-3) со сверхэкспрессией гена биосинтеза жасмонатов, *12-оксофитодиеноатредуктазы AtOPR3 (12-OXOPHYTODIENOATE REDUCTASE 3)* из *Arabidopsis thaliana*. Растения культивировали до стадии четырех-пяти листьев (25-30 сут. после посева), для исследований использовали срезанный третий лист. Нами было изучено развитие инфекции некротрофного фитопатогенного гриба, проанализирована активность некоторых ключевых водорастворимых ферментов антиоксидантной системы (каталазы, пероксидазы и супероксиддисмутазы), а также определено содержание малонового диальдегида (МДА) – продукта перекисного окисления липидов.

Трансгенные растения пшеницы проявили повышенную устойчивость к заражению некротрофным грибом *Botrytis cinerea*. Рост *B. cinerea* сопровождается образованием на листе желтой (хлоротической) и бурой (некротической) зон. У трансгенной пшеницы величина хлоротической зоны была значительно меньше, чем у контрольной пшеницы Саратовская-60. При этом листья Tr-3 сохраняли более яркую зеленую окраску.

Данные по содержанию МДА указывают на отсутствие выраженного окислительного стресса в срезанных листьях пшеницы как в отсутствие, так и в присутствии *B. cinerea*. В кинетике изменения активности антиоксидантных ферментов наблюдаются значительные сходства между зараженными и незараженными листьями. Вероятно, основной причиной таких изменений служит старение листа. Развитие грибка, в основном, не приводит к дополнительному увеличению или уменьшению ферментных активностей, а лишь ускоряет эти изменения на одни-два суток. Достоверные различия между генотипами зараженных листьев обнаружены лишь для пероксидазной и каталазной активностей: пероксидазная активность выше в трансгенной линии Tr-3 по сравнению с Саратовской-60 на пятые сутки после заражения, а каталазная – с 1 по 5 дни, что свидетельствует о возможной роли каталазы в повышенной устойчивости Tr-3 к фитопатогену.

Работа поддержана грантом РФФИ №22-16-00047.

ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБИНАНТНОЙ БЕТА КАРБОАНГИДРАЗЫ 5 *ARABIDOPSIS THALIANA*

Маркин Р.В.¹, Трубицина Л.И.², Трубицин И.В.², Руденко Н.Н.¹,
Абдуллатыпов А.В.¹, Хорошаева Т.П.¹

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

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

romanmarkin998@gmail.ru

В высших растениях выключение синтеза большинства карбоангидраз (КА), ферментов, катализирующих реакцию взаимопревращения форм неорганического углерода, не приводит к существенному подавлению роста растений. Исследования различных лет демонстрируют, что это может объясняться адаптацией мутантных растений к отсутствию той или иной КА посредством изменения функционирования других КА, что может влиять на протекание целого ряда биохимических и физиологических процессов, по сравнению растениями дикого типа. В растениях *Arabidopsis thaliana* выключение гена, кодирующего одну из хлоропластных КА, принадлежащих к бета-семейству (бета-КА5), приводит к тому, что растения могут расти только при высокой концентрации CO₂ в воздухе. Это свидетельствует о том, что бета-КА5 играет важную роль в метаболизме растения. Значимость бета-КА5 делает ее изучение перспективным для понимания физиологических механизмов функционирования растительной клетки. С практической точки зрения бета-КА5 представляет собой удобную мишень для управления метаболизмом растений.

В ходе проведенной работы был клонирован ген, кодирующий бета-КА5 *Arabidopsis thaliana*, в плазмиду pET-19mod и экспрессирован в клетках *Escherichia coli* линии CodonPlus. После его наработки в клетке, рекомбинантный белок был очищен на никелевой колонке и охарактеризован. Было экспериментально получено значение константы Михаэлиса, равное $24,5 \pm 0,1$ мМ субстрата (CO₂). Рекомбинантный белок почти полностью терял активность после 1 часа инкубации при 40°C. Восстановитель дисульфидных связей дитиотреитол оказывал стимулирующее действие на рекомбинантный белок, что характерно для КА, принадлежащих к бета-семейству. Установлен рН-оптимум, равный 8,75, что близко к значению рН 9,0, предсказанному при помощи программы Prot-pi на основании аминокислотной последовательности. Определены константы ингибирования гидрофильным ингибитором КА мафенидом и липофильным ингибитором КА этоксизоламидом, равные 119,0 мкМ и 40,1 мкМ, соответственно. Полученные значения констант ингибирования коррелируют с предсказанными на основании компьютерного моделирования связывания фермент-лиганд в программе Autodock Vina. Относительно высокое значение константы Михаэлиса указывает на важность реакции, катализируемой бета-КА5, для метаболизма растений. Вероятно, функционирование бета-КА5 поддерживает необходимый для эффективного фотосинтеза уровень протонов и бикарбонат-ионов. Данное предположение подтверждается тем, что в отсутствие бета-КА5 растения жизнеспособны только при повышенной концентрации CO₂, при которой спонтанная конверсия, по-видимому, может компенсировать недостаток протонов и бикарбонат ионов.

СИСТЕМНОЕ ПОДАВЛЕНИЕ РАЗВИТИЯ СИМБИОТИЧЕСКИХ КЛУБЕНЬКОВ У
БОБОВЫХ РАСТЕНИЙ СОПРОВОЖДАЕТСЯ АКТИВАЦИЕЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ,
ОПОСРЕДУЮЩИХ ПРОТЕКАНИЕ ЗАЩИТНЫХ РЕАКЦИЙ В КОРНЯХ ЛЮЦЕРНЫ
MEDICAGO TRUNCATULA

Петренко В.А., Лебедева М.А., Лутова Л.А.

ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

drpetrenko@yandex.ru

Симбиоз растений семейства Fabaceae с азотофиксирующими бактериями – исключительное явление, позволяющее растениям за счёт эндогенных микросимбионтов усваивать атмосферный азот. У растений выработался регуляторный механизм, позволяющий контролировать численность образующихся клубеньков, так как азотофиксация посредством симбионтов – энергозатратный процесс. Ключевую роль в контроле развития клубеньков играют регуляторные пептиды семейства CLE. Экспрессия генов, кодирующих пептиды CLE, активируется на ранних этапах развития симбиотических клубеньков в инокулированных ризобиями корнях бобовых растений. Синтезируемые в корнях пептиды CLE транспортируются по ксилеме в побег, где они, связываясь со своими рецепторами, рецепторными киназами с лейцин-богатыми повторами, активируют выработку ответного сигнала, приводящего к подавлению дальнейшей закладке симбиотических клубеньков на корнях, таким образом, опосредуя системную регуляцию численности клубеньков по механизму отрицательной обратной связи (Reid et al., 2011). Ранее нами было показано, что сверхэкспрессия гена *MtCLE35*, кодирующего один из таких регуляторных пептидов, подавляет развитие симбиотических клубеньков (Lebedeva et al. 2020). Для выявления механизмов, лежащих в основе системного подавления симбиоза, опосредованного *MtCLE35*, нами был проведен транскриптомный анализ корней со сверхэкспрессией гена *MtCLE35* (35S:*MtCLE35*) (на таких корнях полностью подавлялось развитие симбиотических клубеньков), а также контрольных корней со сверхэкспрессией гена бета-глюкуронидазы (*GUS*) при инокуляции ризобиями, а также в несимбиотических условиях (Lebedeva et al., 2023). С помощью транскриптомного анализа мы показали, что у в корнях 35S:*MtCLE35* не происходит активации генов, ответственных за развитие симбиоза, что свидетельствует о блоке развития симбиотических клубеньков на самых ранних этапах программы симбиоза. При этом среди дифференциально экспрессирующихся генов, экспрессия которых была повышена в корнях 35S:*MtCLE35*, по сравнению с контролем (35S:*GUS*), в ответ на инокуляцию ризобиями, были выявлены гены, кодирующие компоненты антиоксидантной системы, в частности, тиоредоксин, гены, кодирующие пероксидазы, а также гены, кодирующие белки и пептиды, участвующие в формировании защитных реакций. Повышение экспрессии генов, опосредующих протекание защитных реакций, в ответ на инокуляцию ризобиями также было показано нами с помощью метода ПЦР в реальном времени в образцах корней трансгенных растений люцерны со сверхэкспрессией гена *MtCLE35*. Полученные данные позволяют предположить, что один из возможных механизмов подавления симбиоза при сверхэкспрессии гена *MtCLE35* может быть связан с активацией защитных реакций в корнях люцерны, препятствующих установлению симбиотических отношений между ризобиями и бобовыми растениями.

Исследования проведены при поддержке гранта Министерства образования РФ на создание научного центра мирового класса «Агротехнологии будущего» (соглашение № 075-15-2022-322 от 22.04.2022).

ВЛИЯНИЕ ОКИСЛЕННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПЛАСТОХИНОНА НА АКТИВНОСТЬ ФОТОСИСТЕМЫ 2 ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

Пыхова Е.С.^{1,2}, Вильянен Д.В.¹, Ашихмин А.А.¹, Борисова-Мубаракшина М.М.¹

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

²Пушчинский филиал федерального государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего образования «Российский биотехнологический университет
(РОСБИОТЕХ)», Пушино, Россия

katkapw@yandex.ru

Пластохинон является подвижным мембранным переносчиком электронов между фотосистемой 2 (ФС2) и цитохромным-b6f-комплексом. В растениях основная часть пластохинона представлена пластохиноном А (ПХ-А), который содержит нонапрениловую изопреноидную боковую цепь. Кроме того, в растениях обнаруживаются окисленные производные ПХ-А: гидроксипластохинон или пластохинон С (ПХ-С), имеющий одну или несколько гидроксильных групп в боковой цепи пренила; и пластохинон В (ПХ-В), являющийся сложным эфиром ПХ-С с жирными кислотами. ПХ-С может накапливаться в листьях *in vivo* даже после непродолжительного воздействия света высокой интенсивности, 2-х и более часов. Однако до сих пор в литературе не установлено, как появление окисленных производных пластохинона в тилакоидной мембране влияет на активность фотосинтетической электрон-транспортной цепи, в частности ФС2.

Целью данного исследования было провести оценку влияния ПХ-А и ПХ-С на активность изолированной ФС2. Объектом исследования служили мембранные частицы, обогащенные ФС2, выделенные из шпината обыкновенного (*Spinacia oleracea*) и пластохинон, выделенный из листьев высших растений (шпинат, амарант и свекла). Пластохинон экстрагировали из листовой биомассы с помощью ацетон-гексановой смеси с последующей очисткой на оксиде алюминия и выделением фракции с помощью ВЭЖХ. На первом этапе были установлены условия для проведения экспериментов: было проведено сравнение эффективности ПХ-А как акцептора электронов от ФС2 при его внесении в суспензию ФС2-содержащих мембран в этаноле или в составе липосом. Показано, что в составе липосом ПХ-А обеспечивает более высокую скорость светоиндуцированного выделения кислорода, поэтому дальнейшие эксперименты проводили с инкапсулированными в липосомы ПХ-А и ПХ-С. Липосомы создавали из соевого лецитина и холестерина методом гидратации тонких пленок с помощью роторного испарителя, ПХ-А и ПХ-С были встроены методом пассивной загрузки. ПХ-С получали путем инкубации ПХ-А с фотосенсибилизатором бенгальским розовым в 96% этаноле при освещении белым светом с последующей экстракцией и очисткой с помощью ВЭЖХ.

С помощью кислородного электрода Кларка получены концентрационные зависимости светоиндуцированного выделения кислорода в ФС2 в присутствии в качестве акцепторов электронов или ПХ-А, или ПХ-С и феррицианида калия в отсутствие и в присутствии каталазы. Показано, что при низких концентрациях ПХ-С более эффективен в качестве медиатора между Q_B сайтом ФС2 и феррицианидом калия, чем ПХ-А, а при высоких – наоборот. Высказано предположение, что ПХ-А и ПХ-С обладают разным сродством к ФС2, причем изменение концентрации этих хинонов существенным образом сказывается на активности ФС2, что указывает на разную роль ПХ-А и ПХ-С в регуляции фотосинтеза.

Работа поддержана Российским научным фондом (грант №23-14-00396),
<https://rscf.ru/project/23-14-00396/>

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ *BETULA PENDULA* ROTH VAR. *CARELICA*, *B. PENDULA* VAR.
DALECARLICA И *B. PUBESCENS* EHRH. С ПРИМЕНЕНИЕМ
МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ

Ржевский С.Г., Табацкая Т.М., Бушуева А.С.

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

slavaosin@yandex.ru

Береза является хозяйственно-ценным представителем древесных растений. В европейской части России наиболее часто встречаются такие виды как береза повислая *Betula pendula* Roth. и береза пушистая *B. pubescens* Ehrh. Особый интерес представляют декоративные формы – береза Карельская *B. pendula* var. *Carelica*, обладающая узорчатой древесиной и береза Далекарлийская *B. pendula* var. *Dalecarlica*, отличающаяся рассеченностью листьев.

В настоящее время для идентификации древесных растений успешно применяется генотипирование с использованием различных молекулярных маркеров, в том числе – микросателлитных (SSR).

Целью данной работы служило генотипирование образцов березы *B. pendula* var. *Carelica*, *B. pendula* var. *Dalecarlica* и *B. pubescens*, с помощью набора из 10 микросателлитных маркеров, материалом которого служили полученные микроклональным размножением и культивируемые *in vitro* растения-регенеранты.

ДНК из исследуемых образцов выделялась модифицированным СТАВ-методом. В исследовании анализировались следующие микросателлитные локусы: AF310856, AF310851, AF310852, AF310858, AF310862, AF310854, AF310864, AF310855, AF310871, AF310877. ПЦР-амплификации проводилась в режиме реального времени, после завершения процесса был выполнен анализ кривых плавления для всех исследуемых образцов. Также продукты амплификации детектировались путем электрофореза в 2,5% агарозном геле с окрашиванием интеркалирующим красителем SYBR Safe. Статистический анализ данных был выполнен в программе PAST 3.24.

Результат проведенного анализа показал наличие продуктов амплификации по задействованным локусам у всех исследуемых видов и разновидностей березы. В некоторых случаях наблюдались двойные продукты, отражающие гетерозиготность. В целом же отмечен полиморфизм продуктов амплификации, как внутри видов и разновидностей березы, так и между ними (а также, между некоторыми потомками одного генотипа). Статистический анализ, проведенный методом принципиальных координат, показал обособление образцов березы Далекарлийской в отдельный кластер. Следует учесть, что в анализе были задействованы образцы, длительное время хранившиеся в культуре *in vitro*, чем может быть обусловлено проявление полиморфизма среди потомства одного генотипа.

Проведенный анализ показал успешность применения задействованного набора микросателлитных маркеров для генотипирования различных видов березы. В дальнейшем он может быть применен для контроля сохранности генотипов в ходе микроклонального размножения.

Работа выполнена в рамках темы госзадания «Разработка технологии выращивания посадочного материала лиственных древесных растений с улучшенными наследственными свойствами для создания лесных культур целевого назначения».

РЕГУЛЯЦИЯ STATE TRANSITIONS У МИКРОВОДОРОСЛЕЙ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* ПРИ ДЕЙСТВИИ ПОВЫШЕННОЙ ОСВЕЩЕННОСТИ

Рыжих Ю.С., Ветошкина Д.В.

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

ryzhikh.yuliya@bk.ru

Фотосинтезирующие организмы постоянно сталкиваются с изменениями интенсивности и спектрального состава света. Необходимость поддержания фотосинтеза на оптимальном уровне привела к формированию целого ряда адаптационных механизмов. У зеленых водорослей одним из таких механизмов является процесс state transitions, который представляет собой перераспределение части светособирающих комплексов фотосистемы 2 (ССК2) между двумя фотосистемами (ФС1 и ФС2). При состоянии 1 все ССК2 связаны с ФС2, при состоянии 2 часть ССК2 мигрирует к ФС1. Необходимым этапом протекания state transitions является активация Stt7-киназы и фосфорилирование белков ССК2, что в свою очередь приводит к миграции этих комплексов от ФС2 к ФС1. Механизм активации/ингибирования Stt7-киназы в настоящее время до конца не изучен. Известно, что в активации этого фермента участвуют цистеиновые остатки, однако компоненты, которые приводят к их окислению/восстановлению до сих пор обсуждаются. Цистеиновые остатки целого ряда других ферментов являются мишенью для пероксида водорода. В связи с этим, нами было предположено, что пероксид водорода, образующийся в клетках зеленых водорослей, может участвовать в регуляции активности Stt7-киназы при изменении освещенности.

Основной целью данной работы было выяснение влияния повышенной освещенности на протекание state transitions, а также исследование участия пероксида водорода в регуляции данного процесса.

В работе использовали штамм дикого типа *Chlamydomonas reinhardtii* CC124 и мутантный штамм с заблокированным синтезом Stt7-киназы. Культуры микроводорослей выращивали в автотрофных условиях при постоянном освещении белым светом интенсивностью 85-100 мкмоль квантов $m^{-2}c^{-1}$, продувании 2% CO_2 , температуре 25°C. Перевод клеток в состояние 2 осуществляли освещением красным светом, в течение 2-10 мин, перевод в состояние 1 – добавкой 10 мкМ диурона (3-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевина) и инкубацией на дальнем красном свете в течение 10 минут. Для оценки протекания state transitions проводили измерение низкотемпературной флуоресценции и определение соотношения флуоресценции ФС1 к флуоресценции ФС2 (F_{715}/F_{685}). Для оценки влияния пероксида водорода на state transitions к культуре микроводорослей во время освещения светом низкой интенсивности добавляли H_2O_2 в разных концентрациях.

Показано, что повышение освещенности приводит к возрастанию F_{715}/F_{685} , что свидетельствует о возрастании перехода клеток в состояние 2. State transitions при возрастании освещенности, по-видимому, служит в качестве фотопротекторного механизма. Также повышение освещенности приводило к значительному возрастанию содержания H_2O_2 в клетках микроводоросли на высоком свете (1000 мкмоль квантов $m^{-2}c^{-1}$) по сравнению с содержанием H_2O_2 после освещения низким светом (100 мкмоль квантов $m^{-2}c^{-1}$). Экзогенная добавка H_2O_2 в концентрации 5 и 10 мМ к культуре клеток дикого типа также вызывала увеличение соотношения F_{715}/F_{685} . Таким образом, нами показано возрастание перехода клеток в состояние 2, как при повышении освещенности, так и при добавке пероксида водорода при освещении светом низкой интенсивности. Полученные в работе результаты подтверждают участие пероксида водорода в процессе state transitions при возрастании освещенности в клетках *Chlamydomonas reinhardtii*.

ГЕНОТИПИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РАСТЕНИЙ БЕРЕЗЫ В УСЛОВИЯХ ЗАСУХИ И ДЕФИЦИТА АЗОТА

Селиванова Е.В.^{1,2}, Шмарев А.Н.³, Карунас А.С.¹, Лебедев В.Г.¹, Шестибратов К.А.¹

¹Филиал ГНЦ ФГБУН Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Пушино, Россия

²Пушинский филиал ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет»,
Пушино, Россия

³Институт фундаментальных проблем биологии РАН – обособленное подразделение ФИЦ
Пушинский научный центр биологических исследований РАН, Пушино, Россия

Ellesmera.alagesia@gmail.com

Повышение температуры и сокращение количества осадков, вызванные глобальным изменением климата, увеличивают важность признака засухоустойчивости для лесных древесных пород. Эти факторы также могут приводить к снижению доступности азота в почве. Целью данной работы являлось изучение реакций растений березы, основной лиственной породой в России, в ответ на раздельное и комбинированное воздействие недостатка воды и азота.

В пятимесячном эксперименте использовали по две генотипа березы пушистой (*B. pubescens*) и березы повислой (*B. pendula*), а также трансгенный генотип березы пушистой с геном глутаминсинтетазы сосны *GSI*. Микроразмноженные растения березы высадили в теплицу, где выращивали с подкормкой, содержащей азот (15 мМ) или без азота. В течение 30 дней растения подвергали умеренной (45-50% ППВ) или сильной засухе (25-30% ППВ) по сравнению с контрольным вариантом (85-90% ППВ). До и после периода засухи у растений оценивали флуоресценцию хлорофилла и содержание листовых пигментов, а в конце сезона – измеряли биометрические параметры (высоту и диаметр основания ствола, количество листьев и силлептических ветвей).

Содержание хлорофилла в листьях березы повислой было значительно выше по сравнению с березой пушистой (1,4 и 0,8-0,9 мг/г сырого веса), а у трансгенной линии – несколько выше по сравнению с исходной формой (1,0 и 0,9 мг/г). Недостаток азота снизил содержание хлорофилла на 13-21%, причем у трансгенной линии – в наименьшей степени. Засуха способствовала повышению содержания пигментов в листовой ткани. Измерение флуоресценции хлорофилла не выявило существенного влияния абиотических стрессов на анализируемые параметры, за исключением соотношения ABS/RC, которое снижалось при засухе. Недостаток азота в большей степени замедлял рост растений березы, чем недостаток воды. По параметру высоты растения березы повислой были более устойчивыми к дефициту воды, но более чувствительными к дефициту азота, по сравнению с березой пушистой. Трансгенный растения во всех вариантах эксперимента был выше исходного генотипа, причем это различие было максимальным в условиях недостатка азота (на 13-14%). Полученные результаты могут быть использованы при отборе устойчивых генотипов березы с целью лесовосстановления.

Работа была поддержана Российским научным фондом (грант № 22-64-00036).

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ BASE EDITING ДЛЯ ГЕНОМНОЙ МОДИФИКАЦИИ *NICOTIANA TABACUM*

Сущенко А.С.^{1,2}, Лебедева М.В.¹, Ражина О.А.¹, Никаноркина В.В.¹, Таранов В.В.¹

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

²Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

andreysusch2000@mail.ru

На данный момент одним из самых используемых методов геномного редактирования является система CRISPR-Cas9, позволяющая вносить двуцепочечные разрывы ДНК и нокаутировать гены интереса. Но подход имеет недостаток – неконтролируемость вносимых мутаций: инсерций и делеций. Также существуют задачи, где есть необходимость сохранить функцию белка, заменив в нем аминокислоту. Поэтому использование Cas9 в данном случае нецелесообразно. Более современный метод – base editing (редактирование отдельных оснований) на основе CRISPR-Cas9 – позволяет модифицировать интересующее азотистое основание в окне редактирования, что приведет к появлению другой аминокислоты, которая может изменить свойства белка и привести к желаемым изменениям фенотипа растения, например, увеличение устойчивости к патогенам.

Геном-мишенью для редактирования в данной работе являлся фактор инициации трансляции eIF4E1, модификация которого может привести к устойчивости *Nicotiana tabacum* к экономически значимому вирусу картофеля Y. Ранее, коллективом лаборатории с помощью дрожжевого двугибридного анализа было найдено несколько мутаций, влияющих на связывание вирусных белков и факторов растения.

В ходе работы были подобраны гидовые РНК и спроектированы векторные конструкции для редактирования азотистых оснований ДНК. После агробактериальной трансформации растения-регенеранты проверялись на вставку T-ДНК, контаминацию агробактериями и наличие редактирования методом ПЦР и секвенированием по Сэнгеру. В качестве контроля трансформации и оценки эффективности нуклеотидных замен с помощью используемого генетического инструментария был выбран ген PDS модельного объекта *N. tabacum*. Гидовые РНК спроектированных плазмид с цитидиндеаминазой направлены на внесение стоп-кодона в трех разных экзонах для нокаута фитоендесатуразы. У регенерированных растений отсутствовал хлорофилл, что подтвердило успешность трансформации. Данную технологию планируется перенести на важные сельскохозяйственные культуры.

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ И ИНТЕНСИВНОСТИ СВЕТА НА СОСТАВ ПОЛЯРНЫХ ЛИПИДОВ БУРЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ *IN VITRO*

Чадова К.А., Веланский П.В.

Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН,
Владивосток, Россия

chadova_9595@mail.ru

Температура и уровень освещенности являются главными абиотическими факторами среды, влияющими на рост и развитие морских водорослей. Регуляция состава липидов – основных компонентов клеточных мембран, является одним из ключевых механизмов адаптации к внешним условиям. В данной работе для определения влияния температуры на липидный состав, образцы бурых нитчатых водорослей *Streblonema corymbiferum* и *Streblonema* sp. (пор. Ectocarpales) культивировали в течение трех недель при температурах 5°C, 10°C, 15°C, 20°C и 25°C в среде ES при интенсивности света 200 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹ в режиме 12 ч. свет: 12 ч. темнота. Для определения влияния интенсивности света образцы культивировали в среде ES, в течение трех недель при температуре 15°C, интенсивностях света 0, 5, 12, 20, 50, 100, 150 и 200 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹ и фотопериоде 12 часов свет : 12 часов темнота. Липиды экстрагировали смесью хлороформ: метанол (1: 1, объем). Количественный анализ классов липидов выполняли при помощи гидрофильной высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

С повышением температуры среды увеличивалось относительное содержание сульфохинозилдиацилглицерина, который является наиболее насыщенным липидом пластидных мембран. Известно, что липиды с насыщенными ацильными группами упаковываются с более высокой плотностью и склонны к образованию гелевых фаз. Таким образом, при высокой температуре среды повышенное количество сульфохинозилдиацилглицерина может компенсировать высокую долю галактолипидов моно- и дигалактозилдиацилглицерина, содержащих высоконенасыщенные жирные кислоты. Наблюдающееся при низкой температуре среды увеличение доли другого анионного липида пластидных мембран – фосфатидилглицерина, содержащего ненасыщенные жирные кислоты, снижает плотность упаковки гидрофобной части мембран и обеспечивает необходимый уровень структурной гибкости, при этом сохраняется необходимое количество анионных липидов, что является важным для функционирования фотосинтетического аппарата. При низкой температуре среды также наблюдалось увеличение содержания главного экстрапластидного липида – фосфатидилхолина, который является основным субстратом для липид-связанных десатураз и, следовательно, играет важную роль в регуляции вязкости мембран при адаптации к низким температурам.

При низкой интенсивности света увеличивалось содержание моногалактозилдиацилглицерина, липида, ответственного за стэкинг тилакоидов и димеризацию фотосистем. Аналогичная тенденция наблюдалась у диатомовых водорослей, акклиматизированных к низкому уровню освещения; при этом было показано, что повышение соотношения моногалактозилдиацилглицерин/дигалактозилдиацилглицерин сопровождается накоплением хлорофилла *a* и увеличением скорости потока электронов между пластохинонами, что в совокупности приводило к усилению фотосинтетической активности. Повышенное содержание фосфатидилглицерина при низкой интенсивности света также

обусловлено его ролью в сборке фотосистем и поддержании скорости электронного транспорта. При высокой освещенности увеличивалось содержание дигалактозилдиацилглицерина, который играет важную роль в цикле репарации фотосистемы II при повышенной инсоляции и ответственен за стабилизацию белков марганцевого кластера и контактов между тримерами светособирающего комплекса II. Таким образом, наблюдаемые изменения липидного состава являлись адаптивными реакциями, обеспечивающими протекание фотосинтеза на оптимальном уровне.

ОПОСРЕДОВАННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ В
ЭКЗОКАРПИИ ПЛОДОВ У СОРТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ С УЧАСТИЕМ *MALUS VASSATA*,
ПО ДЛИНЕ ИХ ЛИСТОВЫХ ПЛАСТИНОК

Шишпарёнок А.А.¹, Рогожин Е.А.²

¹Главный ботанический сад имени Н.В. Цицина РАН, Москва, Россия

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

sansanich90@inbox.ru

Длительный срок до начала плодоношения замедляет селекционные работы по увеличению содержания аскорбиновой кислоты, флавоноидов и других веществ в плодах яблоки. В среднем культурные сорта начинают плодоносить через 5-12 лет. Одним из решений данной проблемы является не прямое определение содержания нужных веществ через измерение качественных и количественных морфологических признаков листьев, которые находятся в сопряжении с содержанием данных веществ.

В проведенном нами исследовании было найдено пять опосредованных корреляций между содержанием таких соединений как кверцетин, антоцианы, фенолы, аскорбиновая кислота (в экзокарпии), аскорбиновая кислота (целый плод) и таким морфологическим признаком как длина листовой пластинки. Однако наибольшей отрицательной корреляцией обладает связь содержания аскорбиновой кислоты в экзокарпии и длины листовой пластинки $R = -0,85$ при $P = 0,01$; $D = 0,72$.

Сформулировать объяснение корреляционной связи между содержанием аскорбиновой кислоты и длиной листовой пластинки возможно при помощи различий в морфологии листа дикой яблони и культурных сортов. Известно, что аскорбиновая кислота синтезируется преимущественно в клетках листьев растений и затем она частично транспортируется из листьев в плоды. Размер листьев у диких растений меньше, чем у культурных и генетически модифицированных растений. Однако, рост листьев культурных и генетически модифицированных растений происходит дополнительно за счёт роста клеток в размере. Такой рост приводит к тому, что общее количество клеток на лист (индекс количества клеток) у культурных сортов остается на одном уровне, а у диких представителей увеличивается.

Секция 6

ЭКОЛОГИЯ И ПОЧВОВЕДЕНИЕ

ОЦЕНКА ДИНАМИКИ УГЛЕРОДА И АЗОТА МИКРОБНОЙ БИОМАССЫ В ПОЧВЕ
СУБАЛЬПИЙСКИХ ЛУГОВ: РЕЗУЛЬТАТЫ ИНКУБАЦИОННОГО ЭКСПЕРИМЕНТА С
ВНЕСЕНИЕМ РАСТИТЕЛЬНЫХ ОСТАТКОВ РАЗЛИЧНОГО КАЧЕСТВА

Бабенко Е.Л., Иващенко К.В.

Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН – обособленное
подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушино, Россия

elenasheppard@mail.ru

В горных районах изменение режима землепользования наряду с глобальным потеплением климата приводит к смещению горно-лесного пояса на луга. В настоящее время недостаточно сведений о последствиях таких изменений для почвенного углеродного и азотного циклов. Цель нашего исследования – оценить динамику углерода и азота микробной биомассы почвы ($C_{\text{мик}}$ и $N_{\text{мик}}$) субальпийских лугов при внесении в нее несвойственного листового опада в годовом инкубационном эксперименте. Основная задача эксперимента – имитация начальной стадии зарастания субальпийских лугов древесной растительностью. Отбор почвенных образцов из поверхностных горизонтов (слой 0-10 см) бурозема темногумусового проведен в субальпийских лугах трех естественных и трех пастбищных горных склонов северо-восточной экспозиции (Северо-Западный Кавказ, Карачаево-Черкесская Республика). Естественные луга расположены на территории Кавказского государственного природного биосферного заповедника. В ~40 км от них локализованы пастбищные луга, для которых характерен интенсивный и длительный выпас. Образцы наземной биомассы растений были также отобраны на лугах каждого горного склона, а образцы листьев березы – на верхней границе леса. Далее, в лаборатории свежесобранные образцы были просеяны, помещены в экспериментальные сосуды и увлажнены до 70% наименьшей влагоемкости. В сосуды с почвой были внесены измельченные растительные остатки в двух вариантах: 1) луговое разнотравье (контроль) и 2) смесь лугового разнотравья и березовых листьев (1:1). Инкубацию образцов проводили при температуре 15°C в течение года. Анализ $C_{\text{мик}}$ и $N_{\text{мик}}$ выполнен методом фумигации-экстракции в трех временных точках: начало эксперимента, полгода и год.

Через год после инкубации по мере разложения растительных остатков в почве естественных и пастбищных лугов содержание $C_{\text{мик}}$ увеличилось в 2,9 и 1,8 раза соответственно. Значительные различия содержания $C_{\text{мик}}$ между вариантами эксперимента в динамике наблюдали только для почвы естественных лугов: в образцах без добавления листового опада содержание $C_{\text{мик}}$ было больше в 1,2-1,5 раза через полгода и год инкубации. В целом величина $C_{\text{мик}}$ в образцах почвы заповедных лугов была выше в 1,6-2,0 раза, чем пастбищных и, особенно, на последней стадии эксперимента. Содержание $N_{\text{мик}}$ в течение инкубационного эксперимента также увеличилось в 3,0 и 4,0 раза для почв заповедных и пастбищных лугов соответственно. В образцах почвы двух типов землепользования внесение более сложного для микробного разложения растительного материала (смесь лугового разнотравья и березовых листьев) приводило к снижению содержания $N_{\text{мик}}$ после года инкубации. В отличие от $C_{\text{мик}}$, содержание $N_{\text{мик}}$ в динамике было в 1,4-1,7 больше в образцах почвы пастбищных лугов, чем в естественных.

Таким образом, инкубационный эксперимент показал, что на начальной стадии зарастания лугов лесами будет происходить снижение содержания $C_{\text{мик}}$ (только для естественных лугов) и $N_{\text{мик}}$, что будет связано с изменением качества поступающих растительных остатков в почву.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФ № 22-74-10124.

ДАТИРОВКА И АНАЛИЗ КЛИМАТИЧЕСКИХ ПОСЛЕДСТВИЙ ТРЕХ КРУПНЕЙШИХ ВУЛКАНИЧЕСКИХ ИЗВЕРЖЕНИЙ ГОЛОЦЕНА

Бессонова В.А.^{1,2}, Горланова Л.А.², Хантемиров Р.М.^{1,2}

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

²Институт экологии растений и животных УрО РАН, Екатеринбург, Россия

bessonova-varechka@mail.ru

Для оценки изменения климата и других природных характеристик в течение последних тысячелетий отличным методом считается анализ ледовых слоев полярных регионов. Но слабым местом метода является не вполне точная датировка ледовых слоев. Причем чем глубже анализируются ледовые слои, тем больше ошибка датировки.

Для точной датировки необходимы надежные маркеры, такие как извержения крупных вулканов. Отражения которых мы видим в избыточном накоплении сульфатов в ледовых слоях. Имеются две современные версии датировки всплесков сульфатов: Greenland Ice Core Chronology 2005 (GICC05) и Ice-core volcanic eruption catalogue (HolVol). Крупные извержения могут приводить к кратковременным похолоданиям в глобальном масштабе, которые оставляют свои следы в древесных кольцах в виде большого количества аномальных анатомических структур. Таким образом извержения помогают исследователям синхронизировать хронологии ледовых слоев и древесных колец.

Основной целью нашего исследования было уточнить датировку ледовых колонок используя данные полученные в ходе анализа колец полуископаемой древесины. Нами было выбрано 3 самых крупных извержения голоцена: вулкана Кикаи, Маунт Мазама и Ильинского. Мы решали следующие задачи: 1) определить периоды в течение которых произошли извержения крупных вулканов (VEI=7); 2) качественно и количественно проанализировать аномальные структуры колец полуископаемой древесины с полуострова Ямал для выбранных периодов; 3) сравнить датировки извержений вулканов полученные при помощи анализа ледовых колонок и полуископаемой древесины.

Для решения данных задач мы провели анализ аномальных колец в течение трех 200-летних периодов в течение которых могли быть извержения крупных вулканов (по данным изотопного анализа тефры). Было просмотрено 10360 годичных колец у 67 образцов полуископаемых лиственниц. Отмечались такие структуры, как: морозобойные, светлые, ложные кольца, патологические смоляные ходы. Для тех же периодов были получены данные изменений ширины колец. Нами было выявлено 2450 колец с теми или иными аномалиями для всех трех периодов.

В период с 5380 по 5180 г. до н.э., в рамках которого предполагалось извержение вулкана Кикаи, отчетливо выделяется 5281 г. до н.э. как по очень низкому приросту ширины годичного кольца, так и по высокой частоте встречаемости аномальных анатомических структур. Эта дата хорошо соотносится с радиоуглеродной датировкой вулканической тефры 5284±69 г. до н.э. Но отличается от датировки по ледовым слоям, в связи с чем предложен сдвиг гляциологических датировок для систем HolVol на 54±1 и GICC05 на 67±1.

Для периодов, в рамках которых могли быть обнаружены следы извержений вулканов Маунт Мазама и Ильинский, нами не было зафиксировано каких-либо доказательств необычно сильного ухудшения условий в период вегетации.

Работа поддержана грантом РФФИ №23-27-00158.

ВЛИЯНИЕ ГИДРОГЕЛЕВЫХ КОМПОЗИТОВ НА CO₂-ГАЗООБМЕН ПОЧВЕННЫХ КОНСТРУКЦИЙ С САЖЕНЦАМИ ЕЛИ ГОЛУБОЙ (*PICEA PUNGENS* ENGELM.)

Богдан Е.В., Кривцова В.Н., Смагин А.В.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

evebogdan@yandex.ru

Актуальным течением в сельском хозяйстве и городском озеленении является применение композитных гидрогелей – акриловых полимеров с наполнителями из природных биополимеров и отходов (крахмал, лигнин, гуматы, торф, биоуголь, рисовая шелуха и т.д.) для модификации их свойств. Добавление гидрогелей в почву улучшает ее физические свойства. Также гидрогели используют в качестве удобрений пролонгированного действия путем добавления в полимерную матрицу микроэлементов и стимуляторов роста растений.

Ель голубая (*Picea pungens* Engelm.) является часто используемым растением в городском озеленении. Это растение крайне требовательно к почвенным условиям – определенный водный режим, почвы легкого гранулометрического состава. Также ель голубая подвержена различным инфекционным заболеваниям и вредителям, поэтому требует применения различных пестицидов. Гидрогелевые препараты потенциально удовлетворяют требованиям ели голубой – они регулируют водный режим почв, используются в качестве локальных фунгицидов, а также удобрений пролонгированного действия.

В условиях роста углекислого газа в атмосфере и изменением климата актуально изучение биогенного цикла углерода. И поскольку растения являются основным поглотителем углекислого газа (за счет своей способности к фотосинтезу), поднимается вопрос о том, могут ли растения полностью компенсировать выбросы углекислого газа в атмосферу. Этот вопрос особенно важен в отношении хвойных растений, в особенности, ели голубой, как повсеместно используемого вида в городском ландшафтном дизайне.

Целью данной работы является изучение газообмена почвы и растительности с атмосферой. Для оценки углеродного баланса использовался газометрический метод на базе вентилируемых камер и логгера PASCO Wireless CO₂ Sensor (США). Измерения проводились раз в неделю с июля по октябрь 2023 года. Затем с использованием метеопказателей и морфологических показателей прироста елей проводился расчет углеродного баланса в процессах фотосинтеза и дыхания ели, а также дыхания почвы.

Объектом исследования являлись саженцы ели голубой на полевом объекте в Серебряноборском опытном лесничестве ИЛАН РАН (ЗАО г. Москвы) с почвенными конструкциями на основе композитных гидрогелей с посадками голубой ели (*Picea pungens* Engelm.) сорта Glauka.

Исходя из проведенных исследований, статистически значимых различий в газометрическом обмене между саженцами, выращенными на субстратах с использованием гидрогелей, и контрольными не обнаружено. Также во всех случаях углеродный баланс процессов в системе почва-растение-атмосфера является отрицательным, что говорит о способности хвойных растений, в частности ели голубой (*Picea pungens* Engelm.), компенсировать выбросы углекислого газа в атмосферу в условиях антропогенной нагрузки.

ПАЛЕОГЕОГРАФИЧЕСКИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ
ЛЁССОВО-ПОЧВЕННОЙ СЕРИИ РАЗРЕЗА «ЛИХВИН» В ПОСЛЕДНИЙ
МЕЖЛЕДНИКОВО-ЛЕДНИКОВЫЙ ЦИКЛ

Буланова Е.А.¹, Калинин П.И.²

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

²Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушино, Россия

elis.bulanova@gmail.com

Хронозона МИС 5 включает переход к ранневалдайскому оледенению и Микулинское межледниковье (МИС 5e), которое считается наиболее близким аналогом голоцена. Её изучение позволяет моделировать тренды развития природной обстановки на фоне глобальных климатических изменений. Лёссовые отложения Русской равнины являются одними из наиболее полных природных архивов четвертичного периода на Евразийском континенте, но вопрос их происхождения продолжает оставаться крайне дискуссионным. Климат – один из основных факторов, определяющих гранулометрический, минеральный и химический состав этих отложений. Поэтому свойства лёссов и палеопочв отражают естественный тренд эволюции природной среды и почвообразования.

В данной работе путём определения литологических и почвенных свойств были реконструированы палеогеографические условия формирования лёссово-почвенной серии разреза «Лихвин» (Тульская область) в позднем плейстоцене. Отдельное внимание уделено почвам Мезинского комплекса возраста MIS 5. Подробно описана морфология этих слоёв, проведён детальный анализ магнитной восприимчивости (МВ), изучено микроморфологическое строение.

Данные гранулометрического состава показывают, что вверх по разрезу увеличивается среднее содержание пылеватых фракций (5-50 мкм) и уменьшается содержание илистой (<5 мкм). Такое распределение указывает на накопление более грубого эолового материала в течении плейстоцена. Палеопочвы характеризуются повышенным содержанием илистой фракции, что является характерной чертой палеопочв, сформированных на лёссах. Результаты анализа МВ показали, что в позднеплейстоценовых степных почвах складываются оптимальные условия для формирования магнитных минералов, тогда как в почвах лесного типа обычно не отмечается прироста показателя в гумусовых горизонтах. В целом, показатель хорошо разделяет почвы лесного и степного типа.

Полученные данные указывают на то, что ледниковые периоды в течение среднего и позднего плейстоцена становились более холодными. При этом усиливалась скорость ветра и интенсивность осадконакопления, что приводило к поступлению в регион все более грубого материала. Климатический тренд в межледниковых периодах менее однозначный. Увеличение показателя МВ в почвах степного типа на переходе к ранней стадии валдайского оледенения может быть связано также с фазовыми переходами в минералах железа в следствие пожаров. В лесных почвах МВ имеет более сложное распределение из-за текстурной дифференциации.

Исходя из результатов анализа морфологического и микроморфологического строения, впервые в составе Мезинского комплекса (MIS 5) разреза «Лихвин» выделяются три палеопочвы, сопоставимые стадиям MIS 5e, MIS 5c и MIS 5a, что соответствует полным лёссово-почвенным разрезам северного полушария и согласуется с изотопно-кислородной шкалой. Изучение слоев лёссов и палеопочв раскрывает динамику природных условий при переходе от оптимума последнего межледниковья (МИС 5e) к началу Валдайского криохрона и вплоть до последнего ледникового максимума (МИС 2).

Работа поддержана грантом РФФ №23-27-00145.

ЭМБРИОНАЛЬНЫЕ ФОРМЫ РАЗВИТИЯ БРЮХОНОГИХ МОЛЛЮСКОВ КАК ИСТОЧНИК ПОЛЕЗНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

**Власова А.А., Моргунова М.М., Тельнова Т.Ю., Малыгина Е.В.,
Вавилина Т.Н., Аксёнов-Грибанов Д.В.**

Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

anfi98@bk.ru

Брюхоногие моллюски (*Gastropoda*) – являются самым крупным классом в составе типа *Mollusca*. Гастроподы обитают в водных и наземных экосистемах и характеризуются высоким морфологическим разнообразием. На протяжении сотен лет их использовали не только в качестве источника пищи, но и в качестве средств народной медицины.

Объектом данного исследования являлись гастроподы рода *Achatina*. Они обладают мощной иммунной защитой врожденного типа для противодействия инфекциям, которая включает в себя фагоцитарные гемоциты, лектины, антимикробные белки и др. Было показано, что экстракты слизи африканской улитки *Achatina fulica* способны снижать жизнеспособность клеток рака молочной железы. При этом различными биологическими активностями могут обладать не только вещества, выделенные из тканей и слизи взрослых особей, но и природные соединения, содержащиеся в период эмбрионального развития животного. Моллюски, как и другие беспозвоночные, передают иммунитет своему потомству. Поэтому, их яйца могут представлять большой интерес в качестве источника полезных биологических соединений.

Целью данного исследования являлось определение и выявление биологически активных веществ в яйцах моллюсков рода *Achatina*.

С использованием методов газовой хроматографии и масс-спектрометрии была проведена оценка состава природных соединений, содержащихся в яйцах моллюсков рода *Achatina*. Анализ выполнен на газовом хромато-масс-спектрометре GCMS-QP2010 Ultra («Shimadzu», Япония) с электронной ионизацией. Выявлено, что метанольные экстракты яиц содержат метиловый эфир пальмитиновой кислоты и метиловый эфир стеариновой кислоты. Метанольные экстракты с добавлением трихлоруксусной кислоты содержат метиловый эфир пальмитиновой кислоты, метиловый эфир стеариновой кислоты, метиловый эфир миристиновой кислоты и метиловый эфир лауриновой кислоты. Ацетоновые экстракты, перерастворенные в гексане, содержат метиловый эфир пальмитиновой кислоты и гексакозан. Метанольные экстракты, перерастворенные в гексане, содержат метиловый эфир пальмитиновой кислоты, генийкозан, гексакозан и октакозан.

Также, была проведена количественная оценка содержания каротиноидов и полифенолов в экстрактах яиц брюхоногих моллюсков с помощью спектрофотометра ПЭ-5300В (ПромЭкоЛаб, Россия). Было установлено, что в среднем одна высушенная кладка яиц моллюсков весом 1,5 г содержит 0,91 ppm каротиноидов и 15 ppm полифенолов.

Идентифицированные лауриновая и миристиновая жирные кислоты обладают бактерицидной, вируцидной и фунгицидной активностью. Также, данные кислоты могут выступать в роли иммунологического стимулятора при взаимодействии с бактериальными или вирусными антигенами. В свою очередь, выявленный октакозан обладает антиоксидантной активностью и способен оказывать ранозаживляющее действие.

Таким образом, в рамках данного исследования были выявлены полезные биологически активные соединения в яйцах брюхоногих моллюсков *Achatina*.

Работа выполнена при финансовой поддержке проекта Фонда содействия инновациям, Минобрнауки России FZZE 2024-0003 и FZZE 2024-0011.

ИЗМЕНЕНИЕ МИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ СЕРЫХ ПОЧВ В ХОДЕ ЕСТЕСТВЕННОГО ЛЕСОВОССТАНОВЛЕНИЯ В ЗОНЕ ШИРОКОЛИСТВЕННЫХ ЛЕСОВ

Волкова Т.Ю., Митрохина Е.С., Курганова И.Н.

Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН – обособленное
подразделение ФИЦ Пушкинский научный центр биологических исследований РАН,
Пушино, Россия

Volktanya@yandex.ru

Процессы естественного лесовосстановления на постагрогенных почвах широко распространены во всех биоклиматических зонах севернее степной. Они сопровождаются изменениями в количестве и качественном составе почвенного органического вещества (ПОВ), что влияет на активность и структуру микробного почвенного сообщества. Цель работы – оценить изменение микробной активности серых почв в процессе естественного лесовосстановления на бывших сельскохозяйственных угодьях – залежах.

Исследования проводились в зоне широколиственных лесов (Пушино, Московская область), на серых, агросерых и серых постагрогенных почвах, сформированных под залежами разного возраста и выведенными из сельскохозяйственного использования в 2008 г. (З-2008), в 2004 г. (З-2004), в 2002 г. (З-2002) и в 1979 (З-1979) годах. Растительный покров на З-2008 представлен вейнико-золотарниковым лугом с подростом осины, березы, сосны, ивы, на З-2004 – березняком мертвопокровным (9Б1Ив), на З-2002 – березняком злаково-золотарниковым с примесью сосны, ивы, осины (8Б1С1Ос+Ив), на З-1979 – купырно-дудниково-злаковым лугом с отдельно стоящими березами 30-летнего возраста. Объектом сравнения, позволяющим оценить постагрогенные изменения микробной активности почв после снятия сельскохозяйственной нагрузки, являлась неудобряемая пашня (Пашня), а вторичный лиственный лес (Лес), представленный осинником медуницево-снытевым (7Ос2Л1Кл+Б), служил контрольным вариантом, к которому в своем развитии будут приближаться залежные экосистемы. На каждом из 6 объектов была выбрана площадка (~100 м²) с наиболее типичной растительностью, на которой в 4-х пространственно-удаленных точках отбирали смешанные образцы почв из 3-х прикопок с различных глубин (0-5, 5-10, 10-20 и 20-30 см). В лаборатории определяли: наименьшую влагоемкость (НВ), величину рН (1М КСl вытяжка), содержание общего углерода и азота, скорость базального дыхания (V_{basal}) и содержание микробного углерода (C_{mic}) методом субстрат-индуцированного дыхания. Анализы были выполнены в 3-х аналитических повторностях. Статистическую обработку проводили в MS Excel.

Изученные почвы характеризуются слабокислой реакцией среды: значения рН (КСl) в слое 0-5 см варьируют от 5,4 до 4,0, снижаясь с глубиной. Содержание С в верхнем 0-5 см слое варьирует от 13 до 28 г/кг почвы, постепенно уменьшаясь до 8-13 г/кг почвы на глубине 20-30 см. Количество N в слое 0-5 см изменяется от 1,2 до 2,3 г/кг почвы, а на глубине 20-30 см оно в 2 раза ниже (0,7-1,1 г/кг почвы). Соотношение C/N варьирует от 9 до 18, показывая наибольшие значения в верхнем слое на залежах. Значения V_{basal} в изученных почвах максимальны в слое 0-10 см и варьируют от 0,7 до 1,4 мкг С/г*час в зависимости от вида ценоза и возраста залежи, заметно убывая с глубиной до 0,19-0,36 мкг С/г*час. Самая низкая дыхательная активность – 0,75 мкг С/г*час в верхнем 0-5 см слое была характерна для пахотных почв, а самая высокая – 1,1-1,4 мкг С/г*час для почв под З-1979 и лесом. Выявлены значимые корреляции между V_{basal} и C_{mic} в слоях 0-5 и 5-10 см ($R^2 = 0.27$, $p = 0.02$) и между

V_{basal} и N ($R^2=0.18$, $p=0.03$). Проведенные исследования показали, что в ходе естественного лесовосстановления наблюдается изменение всех анализируемых почвенных свойств, наиболее выраженное в слое 0-5 см. Микробные почвенные характеристики являются весьма чувствительными индикаторами постагрогенных изменений.

Работа выполнена в рамках реализации ВИП ГЗ «Разработка системы наземного и дистанционного мониторинга пулов углерода и потоков парниковых газов на территории Российской Федерации, рег. № 123030300031-6)» и государственного задания ФИЦ ПНЦБИ РАН (рег. № 123030300031-6).

ОБЗОР ГЕОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МЕРЗЛОТНЫХ ПОЧВ И ПОДСТИЛАЮЩИХ МНОГОЛЕТНЕМЕРЗЛЫХ ПОРОД ТУНДР ЯМАЛА

Гинзбург А.П.^{1,2}, Лупачев А.В.¹

¹Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушино, Россия

²Государственное автономное учреждение Ямало-Ненецкого автономного округа «Научный центр изучения Арктики», Салехард, Россия

alexandrginzburg13154@yandex.ru

Имеющиеся данные о почвенном покрове тундр севера Западной Сибири требуют актуализации и дополнений. Проанализированы материалы по геохимии четвертичных отложений, в т.ч. многолетнемерзлых (ММП) и почв Ямала. Применялись кларки химических элементов верхней части литосферы, почв и растений, вычислялись кларки концентрации и рассеивания (КК, КР) для выявления аномально высоких и низких содержаний, коэффициенты радиальной и латеральной дифференциации (R, L) – определения различий их содержаний по горизонтам и геохимическим ландшафтам. Отложения морские и аллювиально-морские различной засоленности. ММП сплошные. Типична чёткая субширотная зональность арктических, типичных и южных тундр с травяно-мохово-лишайниковыми, кустарничковыми и травяно-мохово-лишайниковыми, ерниковыми и ивняковыми кочкарными сообществами. Зональные почвы – арктотундровые, тундровые глеевые и элювиально-глеевые, почвенный покров отличает криогенная комплексность, широко развит мерзлотный микро- и нанорельеф.

Почвообразующие породы и почвы обеднены большей частью химических элементов. Характерны околочларковые значения (КК и КР=1-2) для Cd, Ba, Hg, Mn, Fe и др. В морских суглинках и глинах, аллювиальные и аллювиально-морские пески с супеси в среднем ещё беднее (КР Sc, Ni>12-13, КР Zn, Pb, Sr от 3 до 5-7 и т.п.), в них встречаются положительные аномалии содержаний Mn (в голоценовых песках КК=4) и Ba (в озёрно-аллювиальных супесях КК=1,9). В почвах также большая часть элементов рассеяна в сравнении с почвами мира, значения КР варьируют в околочларковом диапазоне (Sc, Pb, Ti, Mo, Hg и др.) или выше (>2 для P, Be, Sn, Zr и др.). Особенностью природного фона являются относительно высокие содержания в почвах Hg и Co (КК от 2 до 4-4,2). Органогенные горизонты содержат чрезвычайно большие количества техногенных веществ – As (КК=199), Zr (85,4), Sr (55), Mn (46,7), Co (61,3), Be (32,5). Повышения их концентраций в верхних горизонтах почв и практически нулевые содержания в нижних объясняются атмосферным приносом продуктов антропогенной деятельности, а высокие содержания K, Ca, P (КК=37,5; 62,5 и 16,4) – импульверизацией морских солей. Минеральные горизонты практически для всех элементов имеют значения КК и КР равные 1-1,5, а концентрации элементов в элювиальных горизонтах в анализируемых источниках зачастую были ниже предела детектирования (Al, Ni, Fe и мн. др.).

Монотонные профильные распределения характерны для большей части элементов (R=0,7-1,3). ММП содержат больше Si, Ti, V, Cr, Be, Yb, Co, Ni, Zr, чем профиль в среднем. Надмерзлотную аккумуляцию демонстрируют Al, Sc, Mn, Zn, As, Mo, Ga и Pb, R которых в надмерзлотной части почв достигает 4,9, в среднем составляя 2. Si в основном содержится в составе крупной фракции почв (до 40% в почве в целом и ниже 30% в илстой фракции), содержания K и Ca в почвах в целом и в иле сопоставимы (0,5-1,5%), а Al, Mg и Fe преимущественно концентрируются в илстой фракции. Содержание этих металлов в иле выше на 50-80%, чем в общем в почвах. В катенах приморских низменностей Ямала низменные аккумулятивные ландшафты приозёрных и пойменных понижений, а также маршей, обогащены Cr, Mn, Fe, Cu и Zn, в сравнении с элювиальными. Значения L для них равны от 1,6-1,7 (Mn и Zn) до 2,4 (Fe), 3,6 (Cu) и 2,1 (Cr). Эти элементы распределены в катене транзитно-аккумулятивно, Cd – с явным обеднением транзитных ландшафтов склонов террас до значений L=0,3-0,5, а распределение Hg близко к монотонному (диапазон варьирования 0,9-1,4).

ОЦЕНКА КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ НИТРИФИЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПОЧВ г. БАЛАКОВО

Голубев Д.М., Нестеркина Д.Д., Овечкина А.А., Глинская Е.В.

Саратовский национальный исследовательский государственный университет
имени Н. Г. Чернышевского, биологический факультет, Саратов, Россия

dimagolubev2018@yandex.ru

Антропогенная деятельность, такая как промышленное производство, сельское хозяйство и строительство, оказывает значительное влияние на состояние почв. Изменения в структуре почвенного покрова и загрязнение химическими веществами негативно сказываются на активности такой физиологической группы микроорганизмов, как нитрифицирующие бактерии. Нитрификаторы осуществляют аэробное окисление аммиака до нитритов и нитратов в процессе нитрификации, а изменение их численности влечет за собой нарушение всего азотного цикла. Изменение степени азотного обмена в почве критически сказывается на экосистемах, ведь азот является важным органоменом для роста живых организмов. Однако нитрифицирующие микроорганизмы имеют различную чувствительность к окружающей среде и реакцию на экологический стресс. Исследование численности нитрифицирующих бактерий необходимо для выявления потенциальных изменений в экосистемах, связанных с антропогенным воздействием, а также для разработки эффективных стратегий управления почвенными ресурсами и поддержания устойчивости природных экосистем.

Целью нашего исследования являлась оценка количественных показателей нитрифицирующих бактерий, выделенных из почв г. Балаково.

Объектом исследования являлись почвы, отобранные в черте г. Балаково в летний период 2023 г. Балаково – крупный промышленный центр Саратовской области с населением около 182 тысяч человек (2022 г.). В городе и его пригородах расположены крупные энергетические предприятия – Саратовская ГЭС, Балаковская АЭС, Балаковская ТЭЦ-4, предприятия машиностроительной отрасли – АО «Вагоностроительный завод», ЗАО «Завод электромонтажных конструкций «Гидроэлектромонтаж», АО «Волжский дизель имени Маминых», ООО «Фойт Гидро», ООО «Балаковский судоремонтный завод»; химической – АО «Балаковорезинотехника», ООО «Балаково Карбон Продакшн», завод «Аргон», Балаковский филиал АО «Апатит»; металлургической – металлургический завод «Балаково». Кроме того, функционирует ряд предприятий других профилей (транспортной, строительной, пищевой, легкой и пр.). Было отобрано 34 почвенные пробы.

Для выделения нитрифицирующих бактерий использовали метод последовательных разведений и поверхностного посева почвенной суспензии на плотную питательную среду Виноградского (KNO_3 – 10,0 г; K_2HPO_4 – 5,0 г; MgSO_4 – 2,5 г; NaCl – 2,5 г; FeSO_4 – 0,05 г; голодный агар – 20,0 г;). Через 24-72 часа культивирования в термостате при температуре +28 °С осуществляли подсчет выросших колоний и рассчитывали численные показатели микроорганизмов.

В ходе проведения исследований было выявлено, что численность бактерий-нитрификаторов варьировала от 5,0 до 6,3 lgКОЕ/г. Среди всех почвенных проб максимальная численность нитрифицирующих бактерий была зафиксирована в пробе, отобранной на пустыре около частного сектора. Пробы почв с территорий около ремонтно-технических предприятий, автостоянки, жилого сектора, инфраструктурных объектов и железнодорожных путей характеризовались самой низкой численностью нитрифицирующих бактерий.

Результаты анализа показали, что численность нитрифицирующих бактерий естественно сокращается при повышении антропогенного воздействия на экосистемы.

МЕДИЦИНСКИЕ ОТХОДЫ КАК ФАКТОР ВЛИЯНИЯ НА ОКРУЖАЮЩУЮ ПРИРОДНУЮ СРЕДУ И ЗДОРОВЬЕ ЧЕЛОВЕКА

Диоманде М.Х.Ж.

Российский государственный гидрометеорологический университет,
Санкт-Петербург, Россия

hass.diomande@yahoo.fr

Медицинские отходы (МО) следует рассматривать как прямой и косвенный фактор риска негативных последствий для здоровья человека и окружающей среды. Несоблюдение требований экологической безопасности при обращении с данным видом отходов может послужить причиной загрязнения воды, воздуха, почвы, инфицированию учреждений здравоохранения и прилегающих к ним территорий. Морфологический состав МО неоднороден, эпидемиологическая и химическая опасность его компонентов варьируется в широких пределах, ранжируется по классам опасности – от эпидемиологически безопасных до чрезвычайно опасных для человека и окружающей среды. Особенно актуальна проблема обращения с МО для развивающихся стран Африканского континента.

Основную опасность представляют опасные в эпидемиологическом отношении, токсикологически опасные и радиоактивные отходы. Опасные МО, как правило, составляют менее 1 % от общего количества образующихся в медицинских учреждениях. Однако их негативное воздействие может быть существенным при несовершенстве системы обезвреживания.

Можно выделить следующие негативные факторы воздействия МО:

- Факторы, влияющие на эпидемиологическую опасность отходов: медицинские отходы содержат большое количество микроорганизмов, в тысячу раз превышающее их количество в твердых коммунальных отходах. Известно, что более чем в 25% случаев МО, вывозимые на свалки, содержат возбудителей нозокомиальных (внутрибольничных) инфекций.
- Токсикологические факторы воздействия: многие химические и фармацевтические продукты, используемые в здравоохранении, являются опасными. Одним из показателей их опасности является уровень и степень токсичности, которая напрямую зависит от состава входящих в них лекарственных средств. К таким отходам относят, например, диагностические и лекарственные средства; утиль фармацевтических производств; предметы, оборудование и приборы, содержащие ртуть и др.
- Генотоксичные и цитотоксичные факторы обусловлены сочетанием токсичности веществ и продолжительностью их потенциального воздействия на человека при обращении с МО или их утилизации. Воздействие происходит при вдыхании пыли или аэрозолей, впитывании через кожу, при поступлении в организм с водой или продуктами питания, контактирующими с цитотоксическими препаратами, биологическими операционными отходами и т.п.
- Факторы радиационной опасности МО обусловлены образованием отходов, в которых концентрация радионуклидов превышает предельно допустимые нормативы, установленные нормами и правилами радиационной безопасности. К таким отходам относятся: отработанная аппаратура (для проведения рентгенодиагностики; гамма-томографии), препараты для радионуклидной диагностики и лучевой терапии; предметы, имевшие контакт с радиоактивными компонентами; расходные материалы для диагностического оборудования.

Совокупное действие указанных факторов определяет уровень экологического риска и риска здоровью населения при отсутствии регламентированной на законодательном уровне системы обращения с МО, что характерно для многих стран Африканского континента. Для решения данной проблемы необходимо принятие решений на государственном уровне, основанных на мировых научных и технических достижениях в сфере обращения с отходами.

ФАУНА РУКОКРЫЛЫХ КУРГАЛЬСКОГО ЗАКАЗНИКА (ЛЕНИНГРАДСКАЯ ОБЛАСТЬ)
ПО РЕЗУЛЬТАТАМ АКУСТИЧЕСКИХ УЧЕТОВ

Евдокимова А.И.¹, Шапкин О.А.^{2,3}

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

² Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург, Россия

³ Дарвинский государственный заповедник, Череповец, Россия

squamata.bio@gmail.com

Кургальский заказник расположен на одноименном полуострове в Кингисеппском районе на берегу Финского залива. На территории присутствует достаточное количество внутренних водоемов, преобладают лесные сообщества, местность частично заболочена. Такие условия являются благоприятными для обитания рукокрылых, однако описания их разнообразия проведено не было. Целью исследования стало первичное выявление видов рукокрылых территории и оценка их активности в зависимости от погодных условий.

Сбор материала проводился в конце апреля и начале мая 2023 года методом ультразвукового акустического мониторинга с помощью детектора полного спектра Audiomoth. Материал собирался на протяжении 17-ти дней с заката до восхода солнца. Детектор был установлен в сосновом лесу на берегу небольшой реки Выбья (59.675891, 28.247172). Полученные записи обрабатывались в программе Kaleidoscope Lite v. 5.6.6., определение видовой принадлежности проводилось вручную. Всего было сделано 2514 записей, содержащих сигналы рукокрылых, из них успешно определено 2460 записей (97,85%). Для анализа активности рукокрылых в зависимости от погодных условий были взяты открытые данные о ночных температуре, влажности, атмосферном давлении, скорости и направлении ветра в г. Усть-Луга. С помощью языка статистического программирования R построена множественная регрессионная модель. Активность рассчитывалась как количество записей в час от заката до восхода солнца. Нормальность распределения данных была проверена критерием Шапиро-Уилка. В качестве значимых предикторов модели были выявлены температура, влажность и скорость ветра. Модель была успешно протестирована на гомоскедастичность и нормальность распределения остатков.

Нами получены записи как минимум 6 видов летучих мышей: *Eptesicus nilssonii* (31%), *Vespertilio murinus* (<1%), *Pipistrellus nathusii* (1%), *Pipistrellus pygmaeus* (<1%), *Nyctalus noctula* (6%) и несколько видов рода *Myotis* (61%). Акустические сигналы ночниц сходны между собой, поэтому видовое определение является проблематичным, мы считаем, что большинство из них принадлежит *Myotis daubentonii*. Они визуально неоднократно отмечались охотящимися над поверхностью воды. Впервые на территории Ленинградской области отмечен малый нетопырь (*Pipistrellus pygmaeus*).

В результате анализа полученной модели была выявлена положительная корреляция активности рукокрылых с температурой воздуха (оценка коэффициента = 3.7, $p = 0.004$), скоростью ветра (17.1, $p = 0.003$) и влажностью (0.3, $p = 0.002$). Скорректированный коэффициент детерминации – 0.7, уровень значимости модели – 0.007, остаточная стандартная ошибка – 0.5. Таким образом, с повышением температуры на 1°C активность рукокрылых увеличивается на 3.7, с увеличением скорости ветра на 1 м/с – на 17.1, с повышением влажности – на 0.3. Неожиданным результатом является положительная связь скорости ветра и активности рукокрылых. Мы считаем, что в этом случае насекомые и летучие мыши снижают высоту полетов чтобы найти защиту от ветра среди элементов ландшафта (например леса) и чаще регистрируются детектором. Для более точной оценки необходимы параллельные учеты с несколькими детекторами на разной высоте.

ИЗМЕНЕНИЯ СОСТАВА, СТРУКТУРЫ БАКТЕРИАЛЬНЫХ СООБЩЕСТВ И
АКТИВНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ БЕНТОНИТОВ МЕСТОРОЖДЕНИЙ
ТАГАНСКОЕ, ЗЫРЯНСКОЕ И 10-Й ХУТОР ПОСЛЕ МОДЕЛЬНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА

Закусина А.В.¹, Чепцов В.С.¹, Толпешта И.И.¹, Крупская В.В.²

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

²Институт геологии рудных месторождений, петрографии, минералогии и геохимии
Российской академии наук, Москва, Россия

a.zakusina@gmail.com

Бентониты – это глины с высоким содержанием монтмориллонита. Такие глины имеют хорошие сорбционные и гидроизолирующие свойства, поэтому они рассматриваются в качестве перспективных буферных материалов при захоронении радиоактивных отходов. В России в данный момент на территории Красноярского края планируется создание пункта глубинного захоронения РАО (Сафонов и Болдырев, 2019), в котором в качестве буферных барьеров планируется использовать бентониты месторождений 10-й Хутор (Республика Хакасия), Таганское (Казахстан) и Зырянское (Курганская область). При этом необходимо подробное изучение того, как происходят изменения их свойств, химического, минералогического состава и других показателей, происходящих при захоронении под воздействием микробной деятельности. Это крайне важно для понимания того, бентониты каких месторождений лучше использовать, а также как уменьшить влияние того или иного фактора. Именно поэтому одной из важнейших задач исследований является изучение численности, активности микроорганизмов, состава и структуры микробных сообществ данных глин.

Для постановки модельного эксперимента в образцы глины месторождений 10-й Хутор, Таганское и Зырянское предварительно был добавлен раствор НКМ-7 (моделирующим воду в предполагаемом месте захоронения), и, дополнительно к раствору в некоторые образцы была добавлена глюкоза и ацетат натрия. Бентониты были уплотнены в пресс-форме до плотностей 1.2, 1.45 и 1.7 г/см³. Затем были помещены в шприцы, соединенные посредством иглы с пенициллиновыми флаконами и установлены в штатив. Штатив размещался в термостат на 60°C. Инкубация образцов с добавлением глюкозы и ацетата натрия проходила в течение 1 месяца, без добавления органического вещества – 3 месяца. Раз в месяц проводился отбор газовой фазы для оценки активности микроорганизмов методом газовой хроматографии. В конце эксперимента был выполнен посев на плотную питательную среду для определения микробной численности. Изменения, происходящие в структуре и составе бактериальных сообществ *in situ* исследовались методом высокопроизводительного секвенирования на платформе Illumina MiSeq.

В ходе эксперимента были получены данные, свидетельствующие об уменьшении микробной активности при увеличении плотности образцов и при увеличении времени инкубации. При этом наибольшая микробная активность наблюдалась в образце бентонита месторождения 10-й Хутор, а наименьшая – в образце месторождения Таганское. В исходных образцах бентонитов численность культивируемых бактерий существенно превышала значения в инкубированных в течение 3-х месяцев. Происходило уменьшение численности микроорганизмов при инкубации посевов при 45 °С в сравнении с инкубированными при 25 °С. Доминирующими филумами в образцах являлись: Actinobacteriota, Bacillota и Pseudomonadota, доминирующий род – *Pseudomonas*.

МЕХАНИЗМЫ АДсорбЦИИ МЕДИ ЧЕРНОЗОМОМ КВАЗИГЛЕЕВАТЫМ И ГУМУСОВО-КВАЗИГЛЕЕВОЙ СОЛОНЧАКОВОЙ ПОЧВОЙ

Иовчева А.Д.

Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН – обособленное
подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушкино, Россия

у nastia@mail.ru

Разнообразие механизмов поглощения (ионный обмен, хемосорбция, физико-химическая адсорбция) Cu определяется не только свойствами самого металла, но и важнейшими свойствами почв, такими как наличие CaCO₃, токсичных солей, содержание и состав органического вещества (C_{орг}, %), содержание физической глины (ФГ, %), pH и прочими. Целью работы было выявить предполагаемые механизмы поглощения Cu черноземом квазиглееватым и гумусово-квазиглеевой солончаковой почвой.

Объектами исследования служили гумусовые горизонты AU (чернозем) и HAU (солончаковая почва). AU имеет pH = 6,9, содержание в нем C_{орг} = 2,8%, ФГ – 50%. При полевом определении наличие CaCO₃ не выявлено. Во всем профиле чернозема засоление отсутствует. Гумусовый горизонт HAU солончаковой почвы характеризуется pH = 8,4, содержанием C_{орг} = 5,1%, вскипанием от 10% HCl (то есть присутствуют CaCO₃), хлоридно-сульфатно-натриевым химизмом засоления и суммой токсичных солей S_{токс} = 0,1-0,3.

Был проведен эксперимент по адсорбции Cu, в котором образцы HAU и AU в соотношении почва:раствор, равном 1:10, заливали растворами ацетата Cu с концентрацией от 2 до 200 мг/л (20-2000 мг/кг). Суспензии встряхивали в течение 4 ч и оставляли на 20 ч до достижения равновесия, затем центрифугировали и фильтровали. Содержание Cu, Ca и Mg в фильтрате (равновесном растворе) определялось методом атомной абсорбции. Количество поглощенной Cu (Cu_{ads}) рассчитывали по разности между ее содержанием в исходных и в равновесных растворах. Содержание Na, K в фильтрате определялось методом пламенной фотометрии.

В результате эксперимента выявлено, что несмотря на различие форм изотерм адсорбции Cu солончаковой почвой и черноземом, для обеих почв наблюдаются близкие уровни поглощения элемента (доля поглощенного количества Cu от внесенного). Определенное в равновесных растворах содержание Na, K, Ca и Mg показало, что в черноземе о наличии десорбции Ca, Mg можно утверждать лишь при Cu_{ads} ≥ 12,6 мг*экв/кг (≥ 400 мг/кг), при меньшем Cu_{ads} содержание Ca и Mg – ниже извлекаемого водной вытяжкой. Содержание Na, K, Ca и Mg в фильтрате солончаковой почвы превышает их содержание в водной вытяжке во всем диапазоне поглощенного количества Cu. Для обеих почв установлено увеличение концентрации вытесненных из ППК Ca и Mg по мере увеличения Cu_{ads} > 12 мг*экв/кг, что указывает на участие обменного механизма в поглощении Cu. Однако лишь для чернозема выявлена эквивалентность обмена при Cu_{ads} ≥ 12 мг*экв/кг (сумма десорбированных Ca, Mg, Na, K примерно равна количеству Cu_{ads}).

Предполагается, что при Cu_{ads} < 12 мг*экв/кг основной механизм поглощения металла в черноземе – это специфическая адсорбция органическим веществом, глинистыми минералами, гидроксидами Fe и Mn. В солончаковой почве наблюдаемые высокие концентрации десорбированных Ca, Mg, Na, K не позволяют однозначно выявить переход от преимущественно специфического к ионообменному механизму адсорбции. Кроме того, присутствие CaCO₃ и высокие концентрации токсичных солей могут способствовать такому типу поглощения, как осадкообразование, то есть выпадение солей Cu при Cu_{ads} ≥ 60 мг*экв/кг.

МИКРОБИОМОРФНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЦЕЛИННЫХ И АГРОГЕННЫХ ПОЧВ ТУЛЬСКОЙ ОБЛАСТИ В РАЙОНЕ г. ЧЕКАЛИН

Ковалева Н.А.

Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН – обособленное
подразделение ФИЦ Пушкинский научный центр биологических исследований РАН,
Пушино, Россия

bagiryannana@mail.ru

Почва, как природно-историческое тело, является природной летописью о факторах и особенностях ее формирования. Изучение сохранённых в почвенном профиле на протяжении длительного времени индикаторов функционирования почв позволяет восстанавливать историю развития окружающей среды времени существования почвы.

Район исследования расположен на северной окраине г. Чекалин, Тульской области вдоль левого берега р. Оки. Исследовали агросерую лесную почву на поле с севооборотом (2023г – посев пшеницы) и серую лесную почву под смешанным сосново-березовым лесом. Сравнительная характеристика морфологического описания разрезов показывает их близость по мощности гумусовых горизонтов А и Р. Почвы сравниваемых разрезов имеют одинаковую окраску, близкую структуру горизонтов и физико-химические показатели.

Вспашка – основной приём механической обработки почвы, способствующий повышению её плодородия и созданию лучших условий для роста и развития растений, который применяется несколько тысячелетий. Длительная интенсивная распашка земель при регулярном давлении сельскохозяйственной техники и вспашке на одинаковую глубину приводит к уплотнению почвенного слоя под пахотным горизонтом и образованию плужной подошвы. Плохая сохранность морфологических признаков бывлой распашки является основной проблемой в изучении почв, подвергшихся антропогенному воздействию.

Изучение микробиоморфных профилей антропогенно – преобразованных почв позволит выявить устойчивые характеристики и определить закономерности, отражающие процесс антропогенного преобразования почвы. Применяемый в исследовании микробиоморфный метод основан на комплексном изучении почвенных новообразований, имеющих биогенное происхождение (минеральные остатки или органические оболочки). Ранние исследования распаханых почв показали устойчивость и информативность микроиндикаторов позволяющих диагностировать агрогенные воздействия.

Микробиоморфный анализ выявил довольно высокое содержание фитоцитов в профилях исследованных почв. В горизонте Р агросерой почвы обнаружены формы, характерные для злаков рода *Triticum*. Необходимо отметить, что количественный максимум накопления фитоцитов характерный для плужной подошвы пахотного горизонта ярко выражен. Аккумуляция этих фитоцитов, вероятно, коррелирует с увеличением плотности почвы. При нисходящей миграции веществ и долгой распашке на одну и ту же глубину биогенные микроостатки накапливаются в плужной подошве. Выявленная повышенная концентрация фитоцитов над плужной подошвой позволяет говорить о том, что здесь имела место длительная распашка. Обнаруженное малое количество индикаторных для культурных злаков форм фитоцитов, вероятно, связано со сбором урожая и удалением соломы с поля.

Таким образом, количественное и качественное распределение микробиоморф по профилю позволяет диагностировать длительное антропогенное воздействие (распашку) на почвы, даже если морфологические признаки уже стёрлись, и визуальная диагностика затруднена.

МИКРОБНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ЭПИФИТНЫХ МХОВ ВЬЕТНАМА

Косенко Н.Р.

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

nrkosenko@gmail.com

В тропических вечнозеленых лесах одной из экосистемных особенностей является наличие разнообразных эпифитов, например, мхов. Мхи повсеместно распространены, а во многих экосистемах являются средообразующими элементами. В литературе можно встретить немногочисленные работы, посвященные изучению микробного разнообразия эпифитных мхов со стволов деревьев.

Целью нашей работы было изучение микробных комплексов эпифитных мхов со стволов деревьев Вьетнама и их сравнение с близлежащей дерновой почвой и листовым опадом. В ходе работы изучены грибные комплексы мхов особо охраняемой природной территории (ООПТ) Вьетнама. Образцы были отобраны летом 2023 года на территории Природного заповедника Батсат (провинция Лаокай).

Длина грибного мицелия в образцах мха характеризовалась более низкими значениями, чем в почвах и опаде, достигая 42,00 м/г. В почвах длина грибного мицелия варьировалась от 52,18 м/г до 72,55 м/г, а в листовом опаде от 46,46 м/г до 68,31 м/г.

Численность грибных спор в образцах мха также отличались меньшими значениями, чем в почвах и опаде, достигая 161,64 млн/г. Показатели численности грибных спор в почвах варьировались от 220,19 млн/г до 412,17 млн/г, а в опаде от 382,9 млн/г до 235,15 млн/г.

Распределение спор по размерам выявило преобладание во всех образцах мелких спор диаметром до 3 мкм, меньше было обнаружено средних спор диаметром от 3 до 6 мкм. В процентном соотношении в образцах мха обнаружено большее количество спор среднего размера (1,57%) по сравнению с образцами почв (0,23%) и опада (0,22%).

Полученные данные по численности культивируемых сапротрофных бактерий показали более низкую численность бактерий в образцах мха по сравнению с почвами и опадом. Численность СБК мха составила 0,52 млн КОЕ/г, когда в почвах показатель изменялся от 0,92 млн КОЕ/г до 1,66 млн КОЕ/г, а в опаде от 5,92 млн КОЕ/г до 10,46 млн КОЕ/г.

Эпифитный мох характеризовался более низким родовым разнообразием бактерий (4 рода), чем почвы и опад (по 5 родов). В таксономическом составе СБК мха доминантами являлись бактерии родов *Rhodococcus* и *Micrococcus*, субдоминантами – филум Proteobacteria, группа среднего обилия была представлена родом *Mucococcus*, а минорные компоненты – родом *Streptomyces*. В почвах доминировал род *Bacillus*, минорные компоненты представлены родами *Arthrobacter* и *Streptomyces*, в опаде доминировал род *Mucococcus*, а минорные компоненты образованы родом *Rhodococcus*.

Таким образом, микробные сообщества эпифитных мхов характеризуются более низкими показателями длины грибного мицелия, численности грибных спор, численности СБК и таксономическим разнообразием, чем близлежащая почва и опад.

ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ПОЧВ ФРАГМЕНТА ТЕРРИТОРИИ СЕВЕРО-ВОСТОЧНОЙ ЧАСТИ г. ГЕЛЕНДЖИКА И ИХ ВИНОГРАДОПРИГОДНОСТИ

Крицкий К.А., Стариков М.С., Власенко В.П.

Кубанский государственный аграрный университет им. И.Т. Трубилина, Краснодар, Россия

k.kritsky@yandex.ru

Почвенные факторы играют ключевую роль в росте и развитии виноградной лозы, влияя на качество и количество урожая, а также долговечность виноградников. Наше исследование было нацелено на оценку пригодности почв для возделывания винограда земельных участков общей площадью 21,0686 га в городе Геленджике Краснодарского края. Проведенное комплексное почвенное обследование включало подготовительный, полевой и лабораторный этапы. В ходе полевых работ были заложены почвенные разрезы, из которых отбирались образцы почв по генетическим горизонтам для последующего лабораторного анализа. Во время лабораторного этапа в отобранных образцах проведены анализы по следующим методикам: гумус по Тюрину; гигроскопическая влажность; гранулометрический (механический) состав по Качинскому; сумма поглощенных оснований по Тюрину; pH водной суспензии потенциометрически; подвижный кальций и закисное железо по Казариновой-Окниной.

Химический анализ отобранных образцов почв их морфологическое исследование в совокупности с обследованием данного массива в натуре позволили выделить на этой территории следующие почвы:

1. Дерново-карбонатные типичные малогумусные маломощные слабо-поверхностно-профильносыльнокаменистые сильносмытые легкоглинистые на элювии мергеля (6,50001 га), средняя мощность гумусового горизонта (А+В) составляет 28 см, содержание активных карбонатов по профилю находится в пределах от 34,9 до 43,7%;

2. Дерново-карбонатные типичные малогумусные маломощные средне-поверхностно-профильносыльнокаменистые сильносмытые легкоглинистые на элювии мергеля (13,5634 га), средняя мощность гумусового горизонта (А+В) составляет 24 см, содержание активных карбонатов по профилю находится в пределах от 38,5 до 45,7%;

3. Дерново-грунтово-глеевые малогумусные маломощные среднеглинистые на делювиальных мергелистых глинах (1,0051 га), средняя мощность гумусового горизонта (А+Вg) составляет 55 см, содержание активных карбонатов по профилю находится в пределах от 45,2 до 48,1%, а закисное и окисное железо варьируется по профилю соответственно: от 1,23 до 8,45 мг/кг (закисное железо) и от 0,42 до 1,24 мг/кг (окисное железо).

В результате исследования состава и свойств почв на земельных участках общей площадью 21,0686 га в г. Геленджике, Краснодарского края, установлено, что земельные участки непригодны под виноградники в следствии малой мощности рыхлой толщи, высокого содержания активных карбонатов и токсичных форм (закисных) железа (для дерново-грунтово-глеевых).

ДРОЖЖИ *BLASTOBOTRYS ADENINIVORANS* И НАНОКОМПОЗИТ НА ОСНОВЕ РЕДОКС-АКТИВНОГО ПОЛИМЕРА ПОЛИТИОНИНА И ОДНОСТЕННЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК ДЛЯ ЭКСПРЕСС-АНАЛИЗА БИОХИМИЧЕСКОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ КИСЛОРОДА

Медведева А.С., Харькова А.С.

Тульский государственный университет, Тула, Россия

ilyuhina.nastya@mail.ru

Электрополимеризованный тионин был использован для создания двухмедиаторного микробного биосенсора для экспресс-определения биохимического потребления кислорода взамен стандартному пятисуточному методу (БПК₅). Процессы передачи электронов на электрод в исследуемой системе изучены методом циклической вольтамперометрии. На основании анализа полученных электрохимических свойств, было выявлено, что система на основе политионина, одностенных углеродных нанотрубок (ОУНТ) и нейтрального красного является наиболее перспективной: константа скорости взаимодействия дрожжей *Blastobotrys adeninivorans* ВКМ У-2677 (*B. adeninivorans*) с медиатором нейтральным красным составляет 0,681 дм³/(г×с); константа скорости взаимодействия политионина и нейтрального красного равна 5280 дм³/(моль×с); гетерогенная константа скорости электронного переноса электронов от политионина на модифицированный ОУНТ графито-пастовый электрод – 0,130 см×с⁻¹. Биосенсор на основе указанных компонентов имеет стабильный отклик: относительное стандартное отклонение 15 последовательных аналитических сигналов составляет 3,2%. Нижняя граница определяемых значений БПК₅ биосенсора (0,4 мгО₂/дм³) потенциально позволяет проводить анализ природных вод с довольно низким индексом ~1 мгО₂/дм³.

Анализ восьми проб с помощью разработанной аналитической системы показал, что результаты стандартного метода определения БПК₅ и с использованием разработанного биосенсора различаются незначительно (коэффициент смешанной корреляции 0,9998). Таким образом, впервые показана принципиальная возможность эффективного использования нанокompозитных материалов на основе ОУНТ и редокс-активного полимера политионина в качестве одного из компонентов двухмедиаторных систем переноса электрона от дрожжей *B. adeninivorans* к электроду, что открывает перспективы создания стабильных и высокочувствительных электрохимических систем на основе эукариот.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-73-01220, <https://rscf.ru/project/23-73-01220/>

ЗАКОНОМЕРНОСТИ ДИНАМИКИ ТАКСОНОМИЧЕСКИХ ГРУПП ОЗЁРНОГО ПЛАНКТОНА НАРОЧАНСКИХ ОЗЁР

Минаев И.С., Минаев Н.С., Медвинский А.Б., Нуриева Н.И.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушино, Россия

maxtitors@gmail.com

Как известно, две трети всего кислорода на Земле производится озёрным и океаническим планктоном. Планктон является наиважнейшим начальным звеном в пищевой цепи. Без планктона жизнь в водных экосистемах, а вместе с ней и сухопутная, в том виде в котором мы её знаем, будет невозможна. Мониторинг популяций в реальной среде, а также математическое моделирование динамических характеристик планктона, позволяет установить и раскрыть ряд фундаментальных закономерностей функционирования водных экосистем и планктона, в частности.

В результате работы получена численная оценка изменения динамики таксономических групп фитопланктона Нарочанских озёр в результате антропогенных воздействий.

Исследованы статистические характеристики таксономических групп планктонного сообщества Нарочанских озёр.

1. На основании полученных результатов можно заключить, что произошла перестройка планктонного сообщества Нарочанских озёр в период с 1993 по 2018 года, а именно, доля цианобактерий увеличилась в Нарочи и уменьшилась в Баторино. Доля диатомовых выросла в Нарочь и уменьшилась в Мястро

2. В Нарочи и Мястро динамика синезеленых водорослей и диатомовых в большей мере зависит от размаха колебаний температуры, чем от динамики биогенов.

3. В Баторино, сравнительно небольшом и более мелком водоеме, динамика обеих таксономических групп более существенно, по сравнению с двумя другими водоемами, определяется изменением динамики общего фосфора.

Результаты дальнейших исследований позволят точнее выявить влияние антропогенных факторов и биологической инвазии на функционирование экосистемы Нарочанских озёр, приведут к лучшему пониманию механизмов, определяющих динамику популяций озёрных гидробионтов, помогут в создании новых подходов в согласовании полевых исследований, направленных на мониторинг системы Нарочанских озёр, и исследований, направленных на анализ полученных в результате мониторинга данных. Также, результаты работы могут использоваться для интерпретации данных мониторинга водных экосистем.

Данная работа проведена на основании анализа результатов мониторинга Нарочанских озёр, который проводился сотрудниками Белорусского Государственного Университета.

Работа была выполнена в рамках государственного задания № 075-00224-24-00.

КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ РАСТИТЕЛЬНОСТИ ВЫХОДОВ СУРЧИНЫХ НОР НА
ТЕРРИТОРИИ ПАМЯТНИКА ПРИРОДЫ «ПОДВАЛЬСКИЕ ТЕРРАСЫ» (ШИГОНСКИЙ
РАЙОН, САМАРСКАЯ ОБЛАСТЬ)

Никоноров М.М., Кузовенко О.А.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего
образования «Самарский национальный исследовательский университет
имени академика С.П. Королева», Самара, Россия

mishanikonorov2002@nextmail.ru

Роющая деятельность степного сурка (*Marmota bobak* Müll.) играет важную биоценотическую роль в образовании экзогенного растительного покрова степных ландшафтов и формировании микрорельефа. В связи с разновозрастными поселениями зверьков и вследствие неравномерного заселения ими географических территорий, результаты роющей активности сурков имеют определенные зональные особенности, влияющие на характер растительных сообществ.

Полевые исследования проводились в июле 2021 года на территории ООПТ «Подвальские террасы». Нами было описано 64 сурчины разного возраста, локализованных в ковыльно-разнотравной степи, на мергелисто-меловом склоне и заливных лугах. Флористический анализ проводили на 35 участках с закладкой пробной площади 1 м². Всего было зарегистрировано и описано 45 видов сосудистых растений.

На участке мергелисто-мелового склона было обнаружено и описано 14 сурчиных нор, представленных в основном средневозрастными и старыми поселениями. Курганчики на этих участках довольно крупные, полностью сформированные и обильные на выбросы свежего грунта, что в должной мере влияет на характер растительности данных участков. На сурчиных выходах исследуемой территории практически отсутствуют сорно-рудеральные растения, поскольку с течением времени они были вытеснены кальцефитной и степной флорой. Чаше всего здесь встречаются шалфей остепненный (*Salvia tesquicola* Klokov et Pobed.), полынь сантонская (*Artemisia santonica* L.), типчак (*Festuca valesiaca* Schleich. ex Gaudin), режа марь многолистная (*Chenopodium foliosum* Aschers), рогачка хреновидная (*Erucastrum armoracioides* (Czern. ex Turcz.) Cruchet), кохия простертая (*Kochia prostrata* (L.) Schrad.) и другие. Также отмечены краснокнижные виды – тимьян Дубянского (*Thymus dubjanskyi* Klokov et Shost) и копеечник крупноцветковый (*Hedysarum grandiflorum* Pallas).

На участке ковыльно-разнотравной степи были отмечены молодые поселения степного сурка, курганчики которых представлены небольшими выбросами (не более 1-1,5 м в диаметре и 5-12 см высоты), негусто покрытыми растительностью. Флора в таком случае представлена по большей части сорно-рудеральными видами, среди которых: люцерна серповидная (*Medicago falcata* L.), полынь австрийская (*Artemisia austriaca* Jacq.), бодяк обыкновенный (*Cirsium vulgare* (Savi) Ten.), репешок обыкновенный (*Agrimonia eupatoria* L.) и некоторые другие. Помимо рудералов на участках встречаются и степные виды: коровяк метельчатый (*Verbascum lychnitis* L.), осока светлая (*Carex diluta* Vieb.), ковыль-волосатик (*Stipa capillata* L.), типчак (*Festuca valesiaca* Schleich. ex Gaudin), мордовник курчавый (*Echinops crispus* S. Majorov), житняк гребневидный (*Agropyron pectinatum* Vieb.) и другие.

На заливном луге были обнаружены как молодые, так и старые поселения, что говорит о разобщенности растительного покрова. Здесь встречаются многие вышеперечисленные виды, а также мышиный горошек (*Vicia cracca* L.), земляника зеленая (*Fragaria viridis* (Duch.) Weston), вязель разноцветный (*Coronilla varia* L.) и другие.

Таким образом, наблюдается функциональная зависимость между возрастными и географическими особенностями сурчиных нор и структурой растительных сообществ, которые изменяются под действием активной деятельности сурков и других факторов.

СОДЕРЖАНИЕ РТУТИ В ШЕРСТИ РУКОКРЫЛЫХ (CHIROPTERA) ДАРВИНСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО ПРИРОДНОГО БИОСФЕРНОГО ЗАПОВЕДНИКА

Певцова Я.Н.¹, Шапкин О.А.², Иванова Е.С.¹

¹Череповецкий государственный университет, Череповец, Россия

²Дарвинский государственный природный биосферный заповедник, Череповец, Россия

yanka.ed@gmail.com

Высокая токсичность и широкое распространение ртути и ее соединений в окружающей среде представляет опасность для здоровья большинства животных. Летучие мыши могут являться удобными биоиндикаторами ртути в экосистемах, так как являются долгоживущими видами с высокой скоростью метаболизма. Кроме того, насекомые как объект питания рукокрылых чувствуют в биогенной миграции ртути из водных экосистем в наземные. Ранее исследований по оценке накопления ртути представителями рукокрылых на территории России не проводилось.

Исследование проводилось в окрестностях Дарвинского заповедника. Летучих мышей отлавливали ловчими паутинными сетями в различных биотопах: около водоемов, на полянах в лесу, на вылете из убежищ постройки. Шерсть состригали на вентральной и дорсальной поверхности туловища животных, упаковывая в индивидуальные zip-пакеты. Образцы шерсти отобраны у 188 особей, 6 видов летучих мышей: *Myotis daubentonii*, *M. dasycneme*, *Vespertillio murinus*, *Eptesicus nilssonii*, *Nyctalus noctula*, *Pipistrellus nathusii*. Содержание ртути определяли методом пиролиза на атомно-абсорбционном спектрометре РА-915М с приставкой ПИРО. Точность анализа определяли с помощью сертифицированного биологического материала DORM-4 и DOLT-5 (Институт химии окружающей среды, Оттава, Канада) и сертифицированный эталонного материала NIMD-1 (Национальный институт болезни Минамата, Япония).

Статистический анализ результатов выполнен с использованием программы Statistica 12 (version 12, StatSoft, USA, 2013). Для оценки различий между выборками использовали непараметрические критерии Н-критерий, критерий Краскела-Уоллиса для сравнения трех и более групп и U-критерий Манна – Уитни для сравнения двух статистически различающихся групп. Для определения корреляционных связей между количественными показателями использовали тест ранговой корреляции Спирмена.

Содержание ртути в шерсти исследованных видов летучих мышей варьирует от 0,721 до 43,005 мг/кг. Среднее значение содержания металла в шерсти рукокрылых – 7,485 мг/кг. Почти у 30% исследованных особей в шерсти отмечены концентрации ртути близкие или выше порог нейротоксического воздействия в 10 мг/кг [1]. Минимальные значения содержания металла отмечены для видов: *M. daubentonii* ($3,294 \pm 0,934$) и *M. dasycneme* ($3,909 \pm 0,543$), промежуточные для *V. murinus* и *N. noctula* ($8,011 \pm 1,136$); максимальные для *E. nilssonii* ($15,476 \pm 1,448$). У всех исследованных видов рукокрылых количество металла в шерсти у особей разного пола статистически не различается, при этом у взрослых особей по сравнению с молодыми содержание ртути в среднем в 3 раза больше. Корреляционной связи между накоплением металла в шерсти рукокрылых, массой и длиной предплечья животных не установлено.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23- 24-00385, <https://rscf.ru/project/23-24-00385/>

СУТОЧНЫЕ ИЗМЕРЕНИЯ ЭМИССИИ CO₂ С ПОВЕРХНОСТИ ОСУШЕННОЙ ТОРФЯНОЙ ПОЧВЫ В ЮЖНОЙ КАРЕЛИИ

Прокопюк В.М., Линкевич Е.В., Гуляева Е.Н., Ефимова Л.А.

Отдел комплексных научных исследований ФГБУН Федерального исследовательского
центра Карельский научный центр РАН, Петрозаводск, Россия

vi_kaaa@mail.ru

Осушение избыточно увлажненных торфяных болот на территории Южной Карелии проводилось в 70-х годах за счет открытой системы дренажных каналов. В дальнейшем после работ по осушению были выполнены комплексные исследования оценки последствий изменения структуры и динамики видового состава растительного покрова на некоторых объектах. По данным литературы показано, что осушение болот сопровождалось существенными изменениями сукцессионных процессов за 30-летний период. С потеплением климата актуальной становится проблема возрастания концентрации парниковых газов на осушенных болотах в связи с ускоренными процессами трансформации углерода. Поэтому цель работы – провести измерения эмиссии углекислого газа на осушенной территории за вегетационный период 2023г.

Исследование проводили на пробных площадях мелиорированного болота общей площадью 193,2 га (61°81'01" N, 34°14'84" E) в Прионежском районе Республики Карелия. Глубина торфяной залежи на мониторинговой площадке достигала 3,6 м. Из растительных сообществ преобладают виды рода *Roa* L., крапива двудомная (*Urtica dioica* L.), вероника дубравная (*Veronica chamaedrys* L.), хвощ полевой (*Equisetum arvense* L.).

Концентрацию диоксида углерода измеряли камерным методом в приземном слое. Одновременно применяли четыре автоматические камеры, подключенные к портативному газоанализатору с инфракрасным датчиком SF-9000 (LICA, Китай). Прибор также регистрировал объемную влажность торфяной залежи ($W_{об.}$, %), давление воздуха в камере ($P_{атм. кам.}$, Па), температуру торфяной почвы в месте измерения, (T_{soil} , °C). Камеры устанавливались на доминирующее растительное сообщество, а также на участки торфяной залежи с удаленным верхним слоем торфа 40 см. Суточные измерения проводились с мая по октябрь 2023г. Анализ микроклиматических показателей осуществляли с помощью переносной метеостанции Sokol M1, что позволило установить сезонные и суточные зависимости интенсивности эмиссии диоксида углерода и климатических параметров. Были получены следующие метеорологические показатели: температура атмосферного воздуха ($T_{атм.}$, °C), атмосферное давление ($P_{атм.}$, Па), относительная влажность воздуха ($W_{отн.}$, %), количество осадков (мм), освещенность (L, лк), видимое и ультрафиолетовое излучение (LI и UVI соответственно, Дж), фотосинтетическая активная радиация (ФАР, мкмоль/(м²с)), точка росы (T_p , °C). Средняя температура воздуха в сутки рассчитывалась как средняя величина за период измерения в течение суток ($T_{ср. атм.}$, °C).

В результате проведенных суточных измерений была определена интенсивность эмиссии с поверхности осушенного болота и характерный суточный ход процесса. Наибольшая эмиссия была зафиксирована в июле и составила 11 гC×м²×сут⁻¹. Средняя величина эмиссии за период измерения была 6,9 гC×м²×мес⁻¹.

Работа выполнена в рамках государственного задания №FMEN-2022-0018.

АЛЬТЕРНАТИВНАЯ ЭНЕРГЕТИКА – ЭНЕРГЕТИКА БУДУЩЕГО?

Резяпова А.К.

АНО средняя общеобразовательная школа «Академическая Гимназия»,
Московская обл., Люберцы, Россия

angelinareziapova@yandex.ru

В этом исследовательском проекте будут рассматриваться основные определения, связанные с альтернативной энергетикой и нетрадиционными источниками энергии, а также с помощью поискового метода, систематизации и анализа найденной информации будут рассмотрены основные направления альтернативной энергетике, их суть, принцип работы, плюсы и минусы.

Проблема, рассматриваемая в работе, заключается в поиске путей решения экологических проблем, которые возникли в результате длительных негативных антропогенных воздействий на окружающую среду, с помощью альтернативной энергетике.

Объект исследования: альтернативные источники энергии. Предмет исследования: актуальность альтернативной энергетике. В качестве продукта моего исследования служат итоги проведенного опроса среди различных слоёв населения, вопросы в котором были нацелены на выявление заинтересованности людей в сферу экологических проблем, способах их решения и развития альтернативной энергетике в целом, а также выводы на основе собранной информации и ответ на вопрос, будет ли альтернативная энергетике играть главную роль в будущем?

В исследовании рассматриваются основные виды нетрадиционной энергетике, а именно их определение, отражающее их основную суть, принцип работы энергетических установок, характерных для рассматриваемой энергетике и сравнительная таблица преимуществ и недостатков, такие как: солнечная энергетике (гелиоэнергетике), ветроэнергетике, гидроэнергетике (энергия волн, энергия приливов и отливов, малая гидроэнергетике), биоэнергетике (в том числе биотопливо). В связи с меньшей распространенностью кратко рассматриваются гидротермальная и геотермальная энергетике.

На основе итогов проведенного опроса, благодаря которым были выявлены не рассмотренные проблемы альтернативной энергетике, а именно проблема переработки, используемых для получения энергии, установок и проблема незаинтересованности и незнания простого населения об экологической обстановке в мире, были проведены дополнительные исследования и поиск информации о проблеме переработки и утилизации солнечных панелей, аккумуляторов и ветрогенераторов.

Исходя из всего проведенного исследования можно сделать главный вывод о том, что альтернативная энергетике будет ведущей энергетикой в будущем, однако на данном этапе она требует достаточное количество доработок.

ВЛИЯНИЕ ПОСТАГРОГЕННОГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПОЧВ НА АКТИВНОСТЬ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ФЕРМЕНТОВ

Самохина Н.П., Филимоненко Е.А.

Тюменский государственный университет, Тюмень, Россия

samokhina_np@mail.ru

Внеклеточные ферменты в почве регулируют окисление и гидролиз полимерных и олигомерных органических соединений, обеспечивая разложение поступающих в почву растительных остатков. Увеличение количества поступающих в почву органических веществ при постагрогенной эволюции почв влияет на активность их ферментативного пула. Цель работы состоит в оценке активности гидролитических ферментов – β -глюкозидазы и хитиназы, при конверсии пахотных почв в залежные и сравнение с почвами естественного лугового биогеоценоза.

Объекты исследования – действующая пашня, залежи возрастом 7 и 25 лет и суходольный луг, расположены на территории полевого стационара СИФИБР СО РАН в Заларинском районе Иркутской области. В почвах, отобранных с глубин 0-5 и 5-10 см, проанализированы содержание органического углерода (C_{org}), углерода микробной биомассы (C_{mic}), скорость базального дыхания (БД) и активности β -глюкозидазы и хитиназы.

При постагрогенной эволюции почв накопление C_{org} в верхних 10 см происходит со скоростью 89 гС м^{-2} в год, за период 25 лет после забрасывания пашни. Микробный пул возрастает с 1,1% до 1,7-3,3% при конверсии пахотных почв в залежные. В верхних 10 см почвы в ряду от пашни к 25-летней залежи активность β -глюкозидазы возрастает в 3 раза, а хитиназы в 2,5 раза. Средние значения активности β -глюкозидазы в верхних 10 см соответствуют $105 \text{ нМ МУФ г}^{-1} \text{ почвы ч}^{-1}$ для почвы под действующей пашней и $333 \text{ нМ МУФ г}^{-1} \text{ почвы ч}^{-1}$ для 25-летней залежи. В пахотной почве на глубине от 0 до 10 см активность хитиназы соответствует $33 \text{ нМ МУФ г}^{-1} \text{ почвы ч}^{-1}$, а в залежной почве возрастом 25 лет – $81 \text{ нМ МУФ г}^{-1} \text{ почвы ч}^{-1}$. Значения ферментативной активности залежных почв не достигли аналогичных значений почв под естественным лугом (939 и $329 \text{ нМ МУФ г}^{-1} \text{ почвы ч}^{-1}$ для β -глюкозидазы и хитиназы соответственно). В почвах 25-летней залежи активность β -глюкозидазы и хитиназы в 3 и в 4 раза ниже относительно почв под естественным лугом.

Увеличение активности гидролитических ферментов углеродного цикла в процессе постагрогенной эволюции почв обусловлено возрастанием количества и доступности C_{org} . Возрастающая активность гидролитических ферментов в залежных почвах способствует ускорению минерализации органического вещества. Что приводит к увеличению интенсивности выделения из почв CO_2 в результате микробного дыхания. Средняя скорость базального дыхания в верхних 10 см почвы увеличивается в 7 раз в ряду от пашни к залежам.

Таким образом, при постагрогенной эволюции почв происходит повышение активности ферментного и микробного пула, что стимулирует процессы минерализации органического вещества.

Исследование выполнено при поддержке проекта «Устойчивость и функции почвенного углерода в агросистемах России (CarboRus)», № 075-15-2021-610.

К ВОПРОСУ О РАЦИОНЕ ПИТАНИЯ ВОДЯНОЙ НОЧНИЦЫ (*MYOTIS DAUBENTONII*)
ДАРВИНСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО ПРИРОДНОГО
БИОСФЕРНОГО ЗАПОВЕДНИКА

Солнцева С.А.¹, Петрова В.В.¹, Шапкин О.А.²

¹Череповецкий государственный университет, Череповец, Россия

²Дарвинский государственный природный биосферный заповедник, Россия

fiery.claw1817@yandex.ru

На территории Дарвинского государственного природного биосферного заповедника (ДГПБЗ) обитает 9 видов гладконосых рукокрылых. Ночницы самый обширный род этого семейства. В ДГПБЗ в настоящее время отмечены такие виды ночниц как: прудовая ночница, ночница Бранта и водяная ночница. Водяная ночница является типичным энтомофагом, охотящимся над водой, поедая околотовных насекомых.

Целью нашего исследования стало изучение рациона питания водяной ночницы (*Myotis daubentonii*) на территории Дарвинского государственного природного биосферного заповедника. В задачи входило определение таксономической принадлежности фрагментов беспозвоночных в пробах экскрементов водяной ночницы ДГПБЗ, и выявление отрядов и отдельных семейств насекомых, доминирующих в её рационе.

Для изучения рациона водяной ночницы ДГПБЗ, были исследованы пробы экскрементов рукокрылых, предоставленные научным сотрудником заповедника О. А. Шапкиным. Сбор материала проводился в июне и июле 2022 года. После отлова зверьки помещались в мешочки из хлопчатобумажной ткани на 9-10 часов, затем выпускались в месте отлова. Фекальные шарики, собранные из мешочков, помещались в пронумерованные zip-пакеты. Пробы экскрементов ночницы исследовались по стандартной методике. Всего нами было обработано 354 пробы от 18 особей водяной ночницы.

Результаты работы показали, что рацион питания водяной ночницы представлен семью отрядами насекомых: Diptera, Coleoptera, Trichoptera, Heteroptera, Hymenoptera, Neuroptera, Lepidoptera. Кроме того, в фекальных пробах отмечены личинки и имаго клещей отряда Mesostigmata. Чаще всего в исследованных пробах встречались фрагменты отрядов Diptera и Coleoptera, они присутствовали в фекальных пробах всех исследованных ночниц. Субдоминантами в рационе питания стали два отряда: Trichoptera и Heteroptera, они встретились у 8 из 18 особей. Реже всего встречались фрагменты отрядов Hymenoptera и Neuroptera, они отмечены у 6 и 3 особей соответственно. У 15 исследуемых особей водяной ночницы отмечены фрагменты отряда Lepidoptera, но невозможно точно утверждать о преобладании этого отряда в рационе ночницы, т.к. в фекальных пробах встречались только чешуйки с крыльев, которые не выводятся сразу из организма мышей и встречаются в фекалиях на протяжении длительного времени.

Данные пищевые предпочтения связаны со способом питания водяной ночницы. Она питается надводными насекомыми и может подхватывать насекомых с поверхности воды. Во всех исследованных фекальных пробах встречались фрагменты семейства *Chironomidae* – комары-звонцы. Особи этого семейства образуют скопления над водой для спаривания, после чего самки откладывают яйца на поверхность воды. Водяная ночница влетает в рой и ловит насекомых раскрытой пастью. Размножение видов отряда Trichoptera также связано с водой. Самки прикрепляют яйца к камням в воде, в процессе этого они могут быть пойманы водяной ночницей. Редкая встречаемость в фекальных пробах представителей отрядов Hymenoptera и Neuroptera, связана с их предпочтительным обитанием в лесных и луговых биотопах. Из отряда Heteroptera встречались фрагменты тлей, а из отряда Coleoptera были встречены фрагменты семейства *Dytiscidae*. Тлей водяная ночница может собрать с листьев около своего убежища.

Таким образом, был выявлен спектр питания водяной ночницы, обитающей на территории ДГПБЗ. Приоритеты питания водяной ночницы связаны с особенностями ее биологии и экологии.

ПОЧВЕННАЯ МИКОБИОТА УРБАНИЗИРОВАННЫХ ТЕРРИТОРИЙ КОЛЬСКОЙ СУБАРКТИКИ

Сошина А.С.^{1,2}, Корнейкова М.В.^{1,2}, Никитин Д.А.³, Долгих А.В.⁴

¹Институт проблем промышленной экологии Севера – обособленное подразделение ФИЦ
Кольский научный центр РАН, Апатиты, Россия

²Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

³Почвенный институт им. В.В. Докучаева, Москва, Россия

⁴Институт географии РАН, Москва, Россия

anastasiya.soshina97@yandex.ru

Актуальность изучения арктических и субарктических регионов растет быстрыми темпами в связи с чувствительной реакцией хрупких экосистем в условиях изменения климата и возрастающей антропогенной нагрузки. Современные города — это особые экосистемы, которые отличаются от фоновых по климатическим, физико-химическим свойствам почв, структуре сообществ животных, растений, микроорганизмов, высокому уровню загрязнения внешней среды и т. д. Микроорганизмы, в том числе микроскопические грибы, – наиболее отзывчивая на изменения в экосистемах часть почвенной биоты.

Целью работы было изучение количественных и качественных параметров микобиоты в почвах основных функциональных зон г. Апатиты (67°34'03" с. ш. 33°23'36" в. д.), пятого по величине города в мире за Северным полярным кругом.

Биомасса грибов в почвах селитебной зоны (дерновоподзол иллювиально-железистый урбостратифицированный) составляла 0.18–0.20 мг/г, в фоновой лесной почве (подзол иллювиально-железистый грубогумусированный) – 0.31 мг/г. Наименьшие значения (0.04–0.08 мг/г) характерны для участков селитебной зоны с отсутствием растительности с сильно уплотненной поверхностью – пешеходная дорога без твердого покрытия, и на детской площадке, где происходит активное перемешивание верхнего привнесенного минерального горизонта. В почвах рекреационной (дерновоподзол иллювиально-железистый урбостратифицированный) и лесной территорий грибы находились преимущественно в виде мицелия, а в почвах селитебной и сельскохозяйственной (агродерновоподзол иллювиально-железистый глееватый) территорий – в виде спор.

Численность копий рибосомальных генов грибов в почвах разных функциональных зон изменялась от 4.0×10^9 до 1.14×10^{10} копий/г почвы, при этом наибольших значений достигала в фоновом подзоле (лесная зона) и подзоле урбостратифицированном детской площадки (селитебная зона).

Численность культивируемых микромицетов в верхнем почвенном горизонте колебалась от 1×10^3 до 9×10^4 КОЕ/г почвы, достигая максимальных значений в почве рекреационной зоны. В почвах рекреационной, сельскохозяйственной и лесной зон максимальная численность отмечена в верхнем горизонте, тогда как в почвах селитебной зоны выявлено накопление зачатков микромицетов в нижних горизонтах.

В целом городские почвы характеризовались низким видовым разнообразием комплексов микромицетов и специфической структурой, существенно отличающейся от фоновых почв. Род *Penicillium* характеризовался максимальным видовым разнообразием (9 видов). В почвах селитебной зоны доминировали *Trichocladium griseum* и *Penicillium dierckxii*, в рекреационной зоне и подзоле урбостратифицированном детской площадки – *P. melinii*, в почве сельскохозяйственной зоны – микромицеты рода *Fusarium*, а в фоновой лесной почве – *P. decumbens*.

Таким образом, были выявлены существенные различия количественных и качественных показателей грибных комплексов городских почв Субарктической зоны на примере города Апатиты по сравнению с зональными почвами.

Исследование выполнено при поддержке проекта РНФ № 23-17-00118, полевые работы – в рамках темы НИР по госзаданию № 122022400109-7.

СРАВНЕНИЕ ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ И ДОЗ АЗОТНЫХ УДОБРЕНИЙ НА
ПРОДУКТИВНОСТЬ ЗЛАКОВЫХ ТРАВ ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ НА
НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННОМ ПОДЗОЛЕ ИЛЛЮВИАЛЬНО-ЖЕЛЕЗИСТОМ И
ОЛИГОТРОФНОЙ ТОРФЯНОЙ ПОЧВЕ

Стройкова М.Н., Григорьева И.И.

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

martastr@yandex.ru

Актуальность работы диктуется опасностью нефти и нефтепродуктов как загрязнителей окружающей среды, в связи с чем исключительную важность приобретает проблема ремедиации почв.

Целью работы является оценка влияния форм и доз минеральных удобрений на продуктивность злаковых трав и ферментативную активность подзола иллювиально-железистого и торфяной олиготрофной почвы с разными уровнями нефтезагрязнения, а также выявление оптимального агрохимического фона для достижения максимальной эффективности процесса рекультивации для этих подтипов почв.

Образцы были отобраны на территории Самотлорского месторождения. Исследовались два уровня загрязнения 5 и 7 г НП/кг почвы для подзола иллювиально-железистого и 100 и 130 г НП/кг почвы для торфяной олиготрофной почвы. Данные дозы нефтепродуктов соответствуют высокому уровню нефтезагрязнения для этих типов почв. Создавалось два уровня обеспеченности макроэлементами – средний и повышенный, а варианты различались формой применяемых азотных удобрений (аммонийная, нитратная и нитратно-аммонийная). В качестве фиторемедианта использовалась смесь злаковых трав, в которую входят тимофеевка луговая (*Phleum pratense*), овсяница луговая (*Festuca pratensis*), кострец безостый (*Bromopsis inermis*).

Оптимальной формой азотных удобрений для роста злаковых трав на нефтезагрязненном подзоле иллювиально-железистом оказалась нитратная форма при обеих дозах нефтезагрязнения, а на нефтезагрязненной олиготрофной торфяной почве – аммиачно-нитратная.

Продуктивность злаковых трав оказалась максимальной на варианте с нитратной формой азота при выращивании на подзоле иллювиально-железистом и на варианте с аммиачно-нитратной – на олиготрофной торфяной. На обеих почвах при повышенном уровне обеспеченности растений макроэлементами наблюдается тенденция к повышению содержания азота, фосфора и калия в злаковых травах по сравнению со средним уровнем обеспеченности.

На подзоле иллювиально-железистом активность уреазы на всех удобренных вариантах выше по сравнению с контролем в среднем в 1,5-2 раза, а фосфатазная активность ниже в среднем на 20%. На олиготрофной торфяной почве внесение аммиачно-нитратной формы азотных удобрений увеличивало активность уреазы в 2-3 раза по сравнению с контролем, а активность фосфатазы увеличивалась на всех удобренных вариантах, достигая максимума на варианте с применением аммиачно-нитратными удобрениями. На активность каталазы внесение удобрений не оказало существенного влияния на обеих почвах.

Наибольшее снижение содержания нефти на подзоле иллювиально-железистом произошло в варианте с внесением азота в нитратной форме и составило 12 %, а на торфяной олиготрофной почве – в вариантах с внесением азота в аммиачно-нитратной форме и составило в среднем 10-14%.

ОСОБЕННОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УГЛЕРОДА МИКРОБНОЙ БИОМАССЫ В АГРОЧЕРНОЗЕМЕ МЕТОДАМИ СУБСТРАТ-ИНДУЦИРОВАННОГО ДЫХАНИЯ И ФУМИГАЦИИ-ЭКСТРАКЦИИ

Урабова С.А., Иващенко К.В.

Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН – обособленное
подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушино, Россия

urabovas@mail.ru

Почвенные микроорганизмы играют важную роль в функционировании наземных экосистем. Существует ряд методов, позволяющих определить содержание углерода микробной биомассы ($C_{\text{мик}}$). Среди них наиболее востребованными являются методы субстрат-индуцированного дыхания (СИД, substrate-induced respiration, SIR) и фумигации-экстракции (ФЭ, chloroform fumigation-extraction, FE). Применение метода СИД в почвенных образцах с щелочной реакцией среды (≥ 8.0) ограничено. В таких почвах выделенный в процессе микробного дыхания CO_2 может связываться почвенным раствором, что приведет к менее точной оценке $C_{\text{мик}}$. Метод ФЭ подходит для анализа $C_{\text{мик}}$ в щелочных почвах, но он требует применения биоцидной обработки образцов и весьма трудоемок. Следовательно, цель нашего исследования – определить коэффициент пересчета для оценки $C_{\text{мик}}$ методом СИД в агрочерноземе на основе данных, полученных методом ФЭ. Для исследования были выбраны образцы почв, отобранные в агрохозяйстве, расположенном в Матвеево-Курганском районе Ростовской обл. Образцы отбирали с глубины 0-10 и 10-30 см на участках с традиционной (пашня, $n=10$) и нулевой обработкой (no-till, $n=10$) почвы. Величину актуальной кислотности ($\text{pH}_{\text{водн}}$) определяли в почвенных суспензиях потенциометрическим методом. Скорость субстрат-индуцированного дыхания измеряли на газовом хроматографе «Кристаллюкс-4000М». Для оценки $C_{\text{мик}}$ методом СИД использовали стандартный коэффициент пересчета ($C_{\text{мик}} = 40.04 \times \text{СИД} + 0.37$, $r=0.96$), предложенный авторами метода. После проведения ФЭ, концентрацию углерода в почвенных вытяжках определяли на анализаторе «ТОПАЗ NS» (коэффициент пересчета $k_{\text{ЕС}} = 0.54$).

Величина $\text{pH}_{\text{водн}}$ в верхнем и нижнем слоях агрочернозема была в пределах 7.9-8.0. Содержание $C_{\text{мик}}$ в почвенных образцах варьировало от 15.2 до 55.0 мг С / 100 г при определении методом СИД и от 21.9 до 58.5 мг С / 100 г – методом ФЭ. Разница значений $C_{\text{мик}}$ при использовании ФЭ и СИД была незначительной ($p=0.16$) и составила в среднем 3.3 мг С / 100 г. Далее, были выполнены расчеты на основании простой линейной регрессионной модели для величины СИД и содержания $C_{\text{мик}}$, проанализированного методом ФЭ. Получено следующее уравнение: $C_{\text{мик}} = 38.46 \times \text{СИД} + 8.08$, $r=0.87$ ($n=17$). При применении полученного уравнения разница значений $C_{\text{мик}}$ между двумя методами также была незначимой и составила 4.1 мг С / 100 г ($p=0.06$).

Таким образом, предварительные результаты показали, что коэффициенты пересчета, полученные в данном исследовании и авторами метода СИД довольно близки: 38 и 40 соответственно.

Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 122111000095–8).

ИНДИКАТОРЫ ТЕРМИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ ОРГАНИЧЕСКОГО ВЕЩЕСТВА ПОЧВЫ

Филимоненко Е.А., Арбузова Е.А., Упорова М.А., Самохина Н.П.

Тюменский государственный университет, Тюмень, Россия

efilimonenko@mail.ru

Стабильность органического вещества (ОВ) почв определяет скорость его микробного разложения, что является важным фактором для оценок секвестрации углерода. Для определения стабильности ОВ почв наиболее концептуально подходящими являются критерии его устойчивости к микробному разложению. Однако, они характеризуют не только собственную стабильность ОВ, но и зависят от экофизиологического состояния микробного сообщества почвы, его активности и функционального разнообразия. Альтернативным подходом для оценки собственной, т.е. внутренней, стабильности ОВ почв является метод термического анализа, который позволяет определить энергию в виде тепла, необходимого для термического окисления ОВ почвы (т.е. сжигания), и рассматривается как энергетический барьер для разложения ОВ почвы.

Для выявления индикаторов термической стабильности ОВ почв была исследована серая среднесуглинистая почва (Haplic Luvisol (Siltic)). Территория исследования расположена в сосновом вейниково-осоково-разнотравном лесу в Заларинском районе Иркутской области. Почвы отбирались на трех участках с глубин 0-5, 5-10, 10-20 и 20-30 см. Все образцы были высушены, просеяны (2 мм) и гомогенизированы. Содержание органического С в почвах определялось методом сухого каталитического сжигания. Скорость базального дыхания установлена по интенсивности выделения из почвы CO₂ после ее инкубирования в течение 7 дней при 20 °С и влажности, соответствующей 60% от водоудерживающей способности. Термический анализ почв проводили при нагревании образцов до 600 °С со скоростью 10 °С в минуту в окислительной атмосфере.

Запас органического С в верхних 30 см серой почвы под лесом составил 204 г/та, из которых 80% приходится на слой 0-10 см. В составе ОВ почвы преобладает термически лабильный пул (термическое окисление происходит при 180-380 °С) – 65%, доли стабильного (380-480 °С) и устойчивого (480-600 °С) пулов равны 25% и 10% соответственно. Количественной мерой термической стабильности ОВ является энергия активации их конверсии в CO₂, т.е. сжигания. Рассчитанная по методу Коутса-Редферна энергия активации лабильного пула ОВ равна 68 кДж/моль, стабильного – 111 кДж/моль, устойчивого – 196 кДж/моль. ОВ почв с высокой термической стабильностью более устойчиво к разрушению, и поэтому с большей вероятностью сохраняется в почве в течение более длительного времени, чем ОВ с меньшей термической стабильностью. Температура потери 50% содержащегося в почве ОВ (T₅₀) линейно увеличивается на 4 °С при повышении энергии активации ОВ на 1 кДж/моль и отражает термическую стабильность ОВ почв. Средние значения T₅₀ и энергии активации ОВ в верхних 30 см почвы равны 356 °С и 96 кДж/моль. Оценка термической стабильности ОВ почв на основе отношения содержания лабильного ОВ к сумме стабильного и устойчивого пулов ОВ позволила установить, ОВ на глубине 20-30 см в 2 раза стабильнее, чем в верхних 5 см почвы.

Применимость приведенных критериев термической стабильности ОВ почв для оценки устойчивости ОВ к микробному разложению подтверждается установленной взаимосвязью между энергией активации и скоростью базального дыхания – с увеличением энергии активации базальное дыхание экспоненциально снижается. Таким образом, энергия активации сжигания ОВ, температура потери 50% содержащегося в почве ОВ и отношение содержаний пулов ОВ с различной термической стабильностью являются индикаторами стабильности ОВ почвы.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда «Термические свойства почв как индикатор стабильности почвенного органического вещества» (РНФ № 23-24-00370).

ПОЧВЕННАЯ ДЕСТРУКЦИЯ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ ДЛЯ СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА

Хабибуллина Л.Р., Халиуллина А.М., Дружинина В.К., Перушкина Е.В.

Казанский национальный исследовательский технологический университет, Казань, Россия

Leilik02@mail.ru

Широкое распространение мульчирующих пленок привело к ряду негативных последствий, в том числе к проблеме накопления частиц микропластика в почвенных экосистемах после сбора урожая. Биоразлагаемые пленки рассматриваются как экологически устойчивая альтернатива традиционным полиэтиленовым материалам и становятся перспективным решением для сельского хозяйства.

В настоящее время для производства изделий из биопластиков в качестве сырья часто выбирают полигидроксиалканоаты (ПГА), отличающиеся термопластичностью, высокими прочностными характеристиками и способностью к биоразлагаемости в почве в течение короткого срока экспозиции. ПГА представляют собой полиэфиры микробного происхождения, являются запасными веществами у различных видов бактерий и архей. Для тестирования биопластиков исследователи часто выбирают серую лесную почву, в которую на определенную глубину вносят образцы. Однако для сельскохозяйственного применения материалов и проверки их биодеструкции представляет интерес использование почвогрунта, рекомендуемого для выращивания рассады и в теплицах. Таким образом возможно провести тест на биоразлагаемость в условиях, имитирующих естественную эксплуатацию материала.

Цель исследования состояла в оценке почвенной деструкции образцов на основе ПГА и их влияния на ферментативную и респираторную активности почвы.

Испытания проводили для полимерных образцов ПГА, а также биокompозитов на основе ПГА и производных крахмала, полученных методом экструзии на лабораторной установке Brabender. Почвенные тесты проводили при температуре 20 °С и влажности почвы 60 % в течение 4 месяцев, контролировали рН почвенной вытяжки по ГОСТ 26483-85 и ГОСТ 26423-85 с использованием рН-метра рН-150МИ, влажность почвы по ГОСТ 28268-89, респираторную активность почвы по ISO 14240-1. Дегидрогеназная активность почвы анализировалась по колориметрическому измерению формазана, образующегося в результате восстановления 2,3,5-трифенилтетразолийхлорида. Биодegradацию полимерных образцов оценивали по изменению их внешнего вида и потере массы.

При тестировании на поверхности почвогрунта материалов на основе ПГА установлено, что в течение 4 месяцев размер и механические свойства образцов не изменились. На поверхности полимеров зафиксировано изменение цвета образца на 30-40 % его площади (появление темно-оранжевых пятен и микроскопических грибов). Для биокompозитов ПГА и производных крахмала отмечена фрагментация образцов на почве и потеря массы образцов более 40% от начальной, хрупкость материалов, появление темно-коричневых пятен на 20% общей площади поверхности. Это связано прежде всего с развитием на полимерных образцах гетеротрофных микроорганизмов и утилизацией крахмалсодержащего компонента в составе биокompозита.

Важным этапом эксперимента стала оценка показателей метаболизма почвы до и после 4-месячной экспозиции полимерных материалов. Для почвогрунта в присутствии ПГА-образцов установлено снижение дегидрогеназной активности на 30% от начального значения. Дыхательная активность почвы после инкубационного теста для всех испытуемых материалов составила в среднем 0,272 мг СО₂ – С/г в час. Таким образом, можно сделать вывод о биодеструкции материалов на основе полигидроксиалканоата в почвогрунте и их влиянии на динамику активности почвенных микроорганизмов в процессе минерализации органических веществ.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ДЕФОСФАТИРУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КУЛЬТУР ПРИ ПЕРИОДИЧЕСКОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

Хасанова А.А., Сироткин А.С., Перушкина Е.В.

Казанский национальный исследовательский технологический университет, Казань, Россия

hasanovaaiigyl@mail.ru

Бактериальные биопленки представляют собой скопление клеток, заключенных в матрикс и прикрепленных на различных поверхностях. Основными этапами формирования биопленок являются прикрепление планктонных клеток к поверхности, секреция внеклеточного полисахаридного матрикса и процесс созревания. Структура биопленки предполагает формирование оптимальной среды для межклеточного взаимодействия, обмена генетическим материалом и диффузии метаболитов.

Агрегированные клетки микроорганизмов в биопленке обладают повышенной устойчивостью ко многим стрессовым факторам окружающей среды. Высокие адаптационные свойства бактериальных биопленок имеют значение для процесса биотрансформации загрязняющих веществ в водных и почвенных экосистемах.

Особый интерес представляет изучение процесса биологического удаления соединений фосфора из стоков с применением агрегированных форм микроорганизмов. Биопленки, продуцируемые бактериями родов *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Brevibacterium*, *Actinobacteria*, *Tetracoccus*, способны эффективно биоаккумулировать фосфаты из сточных вод. В связи с интенсивным развитием процесса эвтрофикации водных экосистем необходимым является усовершенствование технологии глубокого удаления соединений фосфора из стоков.

Целью работы являлась оценка дефосфатирующей способности биопленки различных групп микроорганизмов при их периодическом культивировании.

Объектами исследования выступали микроорганизмы *Rhodococcus erythropolis* 11-2 и *Bacillus proteolyticus*, осуществляющие очистку промышленных и коммунально-бытовых сточных вод.

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ ПИРОЛИЗА НА СОСТАВ И БЕЗОПАСНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ БИОУГЛЯ ИЗ ОСАДКА СТОЧНЫХ ВОД ДЛЯ РЕМЕДИАЦИИ ПОЧВ

Хронюк О.Е., Бауэр Т.В., Барахов А.В., Иванов Ф.Д., Тимофеева А.Г.

Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

hronyuk@sfedu.ru

Антропогенное воздействие приводит к загрязнению окружающей среды, главным аккумулятирующим компонентом которой является почва. В последние годы для борьбы с загрязнением почв широкую популярность получило развитие устойчивых технологий. Шаг к устойчивому развитию может быть сделан путем использования органических отходов в качестве исходного сырья для получения биоугля в процессе карбонизации, который одновременно способен эффективно снизить нагрузку, связанную с переработкой отходов и загрязнением почв. Одним из перспективных видов сырья для получения биоугля являются осадки сточных вод, количество которых ежегодно увеличивается из-за роста населения, урбанизации и индустриализации, что приводит к наличию проблемы их утилизации. Пиролиз осадка сточных вод позволяет свести к минимуму содержание органических загрязнителей и доступных фракций тяжелых металлов в конечных продуктах процесса. При этом условия проведения пиролиза оказывают ключевое влияние на физико-химические свойства биоугля и экологическую безопасность его использования в целях ремедиации почв.

Цель данной работы заключалась в изучении влияния температуры пиролиза на свойства биоугля и оценке потенциального экологического риска, связанного с присутствием в нем тяжелых металлов. В пиролизной установке были получены образцы биоугля из осадка сточных вод (SS), которые были обозначены как BSS-300, BSS-500, BSS-700 и BSS-900, где цифры от 300 до 900 указывают на температуру пиролиза. Во всех случаях время выдержки (60 мин) и скорость нагрева (10 °С/мин) оставались постоянными. Фракционный состав тяжелых металлов в биоугле анализировался стандартизированным методом BCR. Установлено, что площадь удельной поверхности в образцах изменяется в следующем ряду: BSS-700 (14,02 м²/г) > BSS-900 (13,87 м²/г) > BSS-500 (9,62 м²/г) > BSS-300 (3,49 м²/г). В свою очередь, средний диаметр пор имеет обратную зависимость. Выявлено, что с повышением температуры пиролиза происходит снижение атомных соотношений Н/С и О/С: с 1,20 до 0,47 и с 0,37 до 0,16.

Установлено, что концентрации тяжелых металлов в осадке сточных вод убывают в ряду: Mn (1099,55±20,49 мг/кг) > Zn (576,13±11,83 мг/кг) > Cu (95,02±2,27 мг/кг) > Cr (76,43±3,26 мг/кг) > Ni (46,12±2,40 мг/кг) > Pb (20,31±1,82 мг/кг) >> Cd (1,13±0,03 мг/кг). После процесса пиролиза концентрация всех металлов в биоуглях возрастает, причем чем больше температура, тем больше каждого металла содержится в образце: Mn (1168,47-1326,15 мг/кг) > Zn (761,18-1136,43 мг/кг) > Cr (152,38-211,62 мг/кг) > Cu (129,06-153,28 мг/кг) > Ni (58,12-74,32 мг/кг) > Pb (26,01-33,09 мг/кг) >> Cd (1,51-1,95 мг/кг). При этом с повышением температуры пиролиза происходит снижение доли биодоступных фракций (кислоторастворимая (F1) + восстанавливаемая (F2)) для всех металлов, рассчитанных с использованием схемы последовательной экстракции BCR: Mn (с 83% до 67%) > Zn (с 84% до 65%) > Cd (с 79% до 59%) > Ni (с 62% до 50%) > Pb (с 44% до 31%) > Cu (с 43% до 32%) > Cr (с 41% до 29%). Имобилизация металлов происходит путем преобразования биодоступной фракции в окислительную (F3) и остаточную (F4).

Таким образом, проведенное исследование показывает, что пиролиз является многообещающим методом обработки осадка сточных вод с целью иммобилизации тяжелых металлов в биоугле и подчеркивает возможность минимизации вредного воздействия металлов, содержащихся в биоугле путем контроля температуры пиролиза.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 22-76-10054) в Южном федеральном университете.

РЕЗУЛЬТАТЫ МНОГОЛЕТНИХ ИССЛЕДОВАНИЙ МУЖСКОЙ ГЕНЕРАТИВНОЙ СФЕРЫ СОСНЫ КРЫМСКОЙ В ВОРОНЕЖСКОЙ ОБЛАСТИ

Чугреев М.Ю.

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

michael.yurievich@yandex.ru

Сосна крымская (*Pinus pallasiana* Lamb.) – часто встречающийся в городском озеленении вид интродуцированных хвойных. В качестве показателя приспособленности интродуцированного вида к местным условиям произрастания можно рассмотреть результаты многолетней оценки влияния метеоусловий и степени антропогенного воздействия на состояние его генеративной сферы.

Проведено обобщение с помощью методов описательной статистики результатов проращивания пыльцы крымских сосен из различающихся по степени антропогенного воздействия мест произрастания за 2015 – 2022 годы.

Наблюдается разброс обобщённых значений жизнеспособности пыльцы при стандартной температуре проращивания по годам исследования от $79,6 \pm 6,9\%$ до $88,2 \pm 2,2\%$. Наименьшее обобщенное значение качества пыльцы наблюдалось в 2022, наибольшее – в 2021 году, однако статистические различия были минимальны. При повышении температуры проращивания достоверных изменений числа проросших пыльцевых зерен не наблюдается, за исключением 2018 года – уровень адаптационного потенциала в этот год был снижен, в остальные высок.

Обобщение результатов многолетнего исследования произрастающих в различающихся по уровню техногенного загрязнения условиях деревьев сосны крымской показало, что качество пыльцы при стандартной температуре проращивания в большинстве мест было высоким. Исключение составило дерево из центра города, чьи микростробилы были сильно повреждены энтомовредителями. Повышение температуры культивирования не приводило к статистически значимому изменению числа проросших зерен у всех изученных деревьев. Их адаптационный потенциал можно считать высоким.

Сравнение обобщенных данных исследования мужской генеративной сферы в зависимости от метеоусловий года и места произрастания конкретных деревьев за 2015-2022 годы наблюдений показали, что сосна крымская обладает высокими показателями жизнеспособности пыльцы и уровня адаптационного потенциала вне зависимости от метеоусловий года наблюдений и экологических условий места произрастания.

Снижение качества пыльцы или уровня адаптационного потенциала наблюдалось сильнее под воздействием метеоусловий года исследования, чем техногенного загрязнения места. Это подтверждает предположение, что метеоусловия места произрастания оказывают ведущее влияние на состояние изучаемых деревьев. Если метеоусловия будут благоприятными, интродуцированные виды могут противостоять не только интродукционному стрессу, но и техногенному.

На основании этого можно сделать вывод, что сосна крымская хорошо приспособлена к метеоусловиям Воронежской области.

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ПОПУЛЯЦИЙ *LYMNAEA STAGNALIS* НА ТЕРРИТОРИИ Г. БЕЛГОРОД С ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛОКУСОВ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ЭСТЕРАЗ (EST) И СУПЕРОКСИДИСМУТАЗ (SOD)

Юсупов С.Р., Снегин Э.А.

Белгородский государственный национальный исследовательский университет,
Белгород, Россия

yusupovkrug@mail.ru

Lymnaea stagnalis (Linnaeus, 1758) (прудовик большой) – вид, ареал обитания, которого охватывает всю Северную Америку, Европу, а также некоторые части Азии и Австралии (Atli, Grosell, 2016). Данный вид, является фоновым на территории Белгородской области и одним из наиболее удобных модельных объектов для проведения популяционных исследований.

Целью исследования было оценить генетическую структуру популяций *Lymnaea stagnalis* на территории города Белгорода с использованием аллозимных маркеров.

Моллюски были собраны в 2023 году в 4 пунктах на территории г. Белгорода: №1 «р. Разумная» (50.530250, 36.649603), №2 «пруд Оскочное» (50.647733, 36.556956), №3 «р. Северский Донец» (50.594164, 36.612449), №4 «р. Везелка» (50.593685, 36.567935). Для анализа использовали только половозрелых особей. Из каждой популяции было проанализировано по 28 образцов.

Электрофорез изоферментов проводили в 10% полиакриламидном геле (Гааль, 1982). Для анализа генетической структуры использовались 2 локуса неспецифических эстераз (EST-1 и EST-2) и два локуса супероксидисмутазы (SOD-3 и SOD-5). Все используемые локусы – мономеры с двумя аллелями. Обработка данных проводилась с использованием программы GenALEx 6.501 (Peakall, Smouse, 2012).

Согласно полученным данным в трех популяциях все используемые локусы оказались полиморфными. Исключение составила популяция №3 «р. Северский Донец», где доля полиморфных локусов составила 75%. Популяции прудовика большого из Белгорода демонстрировали относительно высокую генетическую изменчивость. Наибольший вклад в межпопуляционное разнообразие, оцениваемое по коэффициенту инбридинга F_{st} , вносил локус EST-1 (0,160), наименьший – SOD-3 (0,008). Наименьшие значения индекса Шеннона было отмечено в популяции №3 «р. Северский Донец» ($H=0,461\pm 0,156$), ожидаемая гетерозиготность ($H_e=0,319\pm 0,109$) и эффективное число аллелей ($N_e=1,563\pm 0,202$). Также был выявлен относительно низкий уровень межпопуляционной дифференциации ($F_{st}=0,075\pm 0,032$) изменения по отдельным локусам составили от 0,008 до 0,160).

Таким образом, нами были получены предварительные результаты о генетической структуре прудовика большого на территории г. Белгорода, что позволяет расширить представления об экологических особенностях видов и микроэволюционных процессах, протекающих в их популяциях.

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ *CAUCASOTACHEA VINDOBONENSIS*
(GASTROPODA, HELICOIDEA) В УСЛОВИЯХ УРБАНИЗИРОВАННОЙ ТЕРРИТОРИИ
Г. БЕЛГОРОДА

Юсупова А.Ю., Снегин Э.А., Барыбина О.В.

Белгородский государственный национальный исследовательский университет,
Белгород, Россия

tishchenko_ayu@bsu.edu

Внутривидовое генетическое разнообразие является одним из базовых уровней биоразнообразия, которое способствует сохранению видов, обеспечивая адаптацию к особенностям и изменениям окружающей среды. Особенно уязвимыми в этом отношении являются популяции, находящиеся на границах ареалов видов. Так, наземный брюхоногий моллюск, *Caucasotachea vindobonensis* (Férussac, 1821) – вид, обитающий в центральной и восточной Европе. Белгородская область является северо-восточным краем его естественного ареала. Моллюск внесен в Красную книгу Белгородской области.

Целью данной работы было оценить уровень генетического разнообразия моллюска *Caucasotachea vindobonensis* в условиях изолированных городских биотопов города Белгорода с использованием аллозимных маркеров.

Исследовали выборки из трех популяции, обитающих на территории города Белгорода, №1 «ул. Магистральная» (50.571049, 36.526318), №2 «ЖД вокзал» (50.595935, 36.612709), №3 «Везелка» (50.595207, 36.565618). В качестве молекулярных маркеров использовали четыре локуса неспецифических эстераз: EST1, EST2, EST3, EST9 и один локус малатдегидрогеназы (MDH1). Электрофорез проводили в 10% ПААГ геле на основе трис-HCl буфера. Обработку данных проводили с использованием программы GenAlEx (Peakall & Smouse, 2006).

В среднем, были получены относительно высокие уровни генетического разнообразия популяций. Так, в популяции №1 «ул. Магистральная» эффективное число аллелей (A_e) в среднем составило $1,42 \pm 0,24$, индекс Шенона (I) $0,33 \pm 0,17$, уровень ожидаемой гетерозиготности (H_e) $0,21 \pm 0,12$. В популяции №2 «ЖД вокзал»: $A_e = 1,72 \pm 0,13$, $I = 0,60 \pm 0,05$, $H_e = 0,41 \pm 0,05$ и в популяции №3 «Везелка»: $A_e = 1,65 \pm 0,18$, $I = 0,57 \pm 0,9$, $H_e = 0,36 \pm 0,08$. При этом, практически по всем локусам было зафиксировано преобладание показателей наблюдаемой гетерозиготности (H_o) над ожидаемой, соответственно внутривидовой коэффициент инбридинга (F) носил отрицательные значения. Несмотря на близкое расположение популяций друг к другу также был отмечен относительно высокий уровень пространственной подразделенности популяционных генофондов ($F_{st} = 0,24 \pm 0,12$).

Таким образом, на основе полученных данных было показано, что популяции *C. vindobonensis* на территории г. Белгорода обитают в условиях антропогенной изоляции, при этом повышенное генетическое разнообразие может быть следствием урбанизации региона, в том числе интродукции.

Секция 7

ЦИФРОВИЗАЦИЯ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И МЕДИЦИНСКАЯ БИОИНФОРМАТИКА

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ГИСТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МЕЛАНОМЫ И РАЗЛИЧНЫХ НОЗОЛОГИЧЕСКИХ ГРУПП НЕВУСОВ

Антонова Е.И., Красникова К.А., Ачилов А.Б., Фирсова Н.В., Балацук Е.В.

Научно-исследовательский центр фундаментальных и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии – структурное подразделение ФГБОУ ВО Ульяновского государственного педагогического университета имени И.Н. Ульянова, Ульяновск, Россия

antonov_67@mail.ru

Меланома кожи – опухоль нейроэктодермального происхождения, развивающаяся из трансформированных меланоцитов кожи или из предшествующего невуса. Основную роль в патогенезе меланомы играет активация сигнального пути MAPK, через активацию, в первую очередь, генов семейства RAS и RAF. Цель работы – определение гистогенетических корреляции в группах пациентов, больных меланомой, и с гистологическим заключением «невус кожи». Для исследования были использованы парафиновые блоки образований кожи (n=20). Первая группа – пациенты с диагнозом «меланома» (узловая меланома), вторая группа – пациенты с гистологическим заключением «невус» (внутридермальный невус с сопутствующим образованием, внутридермальный невус, внутридермальный невус с пигментным компонентом, диспластический невус). Мутации генов BRAF и NRAS определяли методом двунаправленной аллель-специфичной амплификации с детекцией результатов в режиме реального времени («real-time» ПЦР).

Результаты и выводы: Все нозологические группы невусов локализованы в области туловища, за исключением невусов с сопутствующими образованиями (папиллома); меланома – в области головы, т.е. на участке тела с CSD (chronically sun damaged). Средний возраст пациентов обеих групп составил 35 лет, пациенты с диагнозом «меланома» в возрасте старше 60 лет. Пациенты с гистологическим заключением «невус» моложе 40 лет, особенно в группе пациентов с гистологическим заключением «невус с пигментным компонентом» и «диспластический невус». 18 пациентов с гистологическим заключением «невус» несут мутации в гене BRAF p.V600E (с.1799T>A) – mtBRAF. При этом 7 пациентов, p.negative по обоим анализируемым генам. Большая часть mtBRAF и BRAF-негативные (wtBRAF) – пациенты женского пола. В группе с диагнозом «меланома» mtBRAF пациент мужского пола. Мутации в четырех анализируемых точках гена NRAS p.Q61K (с.181C>A), p.Q61R (с.182A>G), p.Q61L (с.182A>T), p.Q61H (с.183R>Y) в обеих группах не выявлены.

Методом анализа качественных признаков дихотомической природы с определением относительного риска двух сравниваемых выборок и 95%-го доверительного интервала проводилась оценка риска обнаружения BRAF p.V600E (с.1799T>A) в сопряженности с полом пациентов. Выявлено, что у пациентов мужского пола вероятность обнаружения данной мутации выше в 2,14 раз (ДИ = 1,27; 3,68), для сравнения применялся критерий χ^2 Мак-Немара. Полученные данные выявили статистически значимые различия в количестве пациентов с мутацией BRAF p.V600E (с.1799T>A) относительно пола (критерий χ^2 Мак-Немара равен 7, p=0,009). Оценка силы связи между полом и обнаружением мутации с применением критерия Крамера выявила наличие относительно сильной связи (критерий Крамера равен 0,47).

УФ-излучение фактически является основным фактором риска, связанным с развитием как меланомы *in situ*, так и меланомы на фоне предшествующего невуса. Выявленные нами сопряженности генетических показателей с полом, возрастом и локализацией образований отражают более высокий риск трансформации невусов в меланому в нозологической подгруппе диспластический невус и внутридермальный невус с пигментным компонентом.

Исследования выполнены в рамках дополнительного соглашения №073-03-2024-060/1 от 13.02.2024 к Соглашению о предоставлении субсидии из федерального бюджета на финансовое обеспечение выполнения государственного задания на оказание государственных услуг (выполнения работ) № 073-03-2024-060 от 18.01.2024, заключенным между ФГБОУ ВО «УлГПУ им. И.Н. Ульянова» и Министерством просвещения Российской Федерации.

РАЗРАБОТКА МЕТОДА РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ ЛЕВОГО ПРЕДСЕРДИЯ ПАЦИЕНТА НА ОСНОВЕ LGE-MRI ДАННЫХ

**Бережной А.К.^{1,2,4}, Слотвицкий М.М.^{1,2,4}, Паршин Д.А.², Селиванов А.С.¹, Демин А.Г.²,
Калинин А.И.¹, Сыровнев В.А.³, Кириллова В.С.⁵, Аитова А.А.¹,
Цвеляя В.А.^{1,2,4}, Агладзе К.И.^{1,4}**

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

²Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

³Клиническая больница №1 (Волынская) Управления делами Президента РФ, Москва, Россия

⁴Московский областной научно-исследовательский клинический институт
им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия

⁵Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Россия

Berezhnoi.ak@phystech.edu

Согласно исследованиям Всемирной организации здравоохранения, сердечно-сосудистые заболевания являются наиболее распространенной причиной смертности среди трудоспособного населения в развитых странах. Фибрилляция предсердий (ФП) очень распространена и поражает до 2% взрослого населения в развитых странах. Прогнозирование и оценка риска возникновения аритмий (волн реентри) является актуальной задачей современного здравоохранения.

Основным методом лечения ФП является абляция – создание искусственных препятствий на поверхности ткани, призванных остановить появление и развитие спиральных волн. Однако процент рецидивов во время таких операций чрезвычайно высок: до 50% пациентов могут возвращаться на повторную операцию. В этой работе описывается разработка инструмента автоматической сегментации предсердий при магнитно-резонансной томографии в рамках создания индивидуальной модели предсердий человека. Это необходимо для воссоздания формы предсердий пациента и неоднородностей в их тканях, способных служить субстратами (инициаторами) аритмий. Используя полученную модель, можно выполнить моделирование волновой динамики ткани и, как следствие, спрогнозировать оптимальный протокол операции для выбранного пациента.

В рамках исследования магнитно-резонансные изображения из открытых источников были помечены вручную и получены в партнерстве с лечебными учреждениями. Используя эти данные, нейронная сеть была обучена сегментировать стенки предсердий, внутреннее пространство предсердий и фиброз в ткани. Набор данных и доработка архитектуры нейронной сети продолжаются, алгоритм сегментации фиброза в ткани требует наибольшего внимания, что связано с очень малым размером таких зон на изображении.

Модель основана на электрофизиологической модели Контерманша и морфологической модели Поттса. Первая показала себя хорошим описанием электрофизиологии кардиомиоцитов предсердий для описания аритмогенных процессов в ткани. Моделирование электрофизиологически основано на численном решении системы уравнений типа Ходжкина-Хаксли. Вторая модель представляет собой модель адгезии кардиомиоцитов на поверхность, отражает формирование монослоя сердечных клеток человека и, по существу, полностью структурно характеризует предсердия.

На основе этих моделей была создана унифицированная компьютерная модель сердечной ткани с электрофизиологией, которая соответствует параметрам ткани предсердий человека, согласно принципу создания DigitalTwins. В дальнейшем будет проведена работа по интеграции данных в модель магнитно-резонансной томографии, будет доступна для использования полная система моделирования волновой динамики в ткани предсердий с учетом индивидуальных особенностей пациента.

АППРОКСИМАЦИЯ ПОПУЛЯЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ С ПОМОЩЬЮ РЕКУРРЕНТНЫХ НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ

Васильев А.О., Мысин И.Е.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино Россия

vasilev.artem.8.7.03@gmail.com

В экспериментах по изучению активности мозга зачастую исследуются свойства не отдельных нейронов, а свойства присущие популяциям клеток. Существующие методы моделирования популяций, однако, либо слишком вычислительно затратны (прямое моделирование, модель на основе уравнения Фоккера-Планка, CBRD подход), либо слишком просты и не могут отражать эффекты, которые наблюдаются в экспериментах (модель Вильсона-Кована). В этой работе мы применили нейронные сети для аппроксимации динамики популяций нейронов.

Прямая стимуляция нейронов – концептуально простой, однако вычислительно затратный способ симуляции популяции. Результаты такой симуляции мы принимаем за основу при обучении модели. Обучив модель аппроксимировать зависимость частоты разрядов нейронов в зависимости от стимулирующего тока на небольшом количестве данных, мы можем заменять её предсказаниями прямую симуляцию.

Обучение производилось для шестнадцати популяций – всех популяций нейронов поля CA1 гиппокампа. В качестве модели единичного нейрона использовалась модель Ижикевича, в каждой популяции было 4000 клеток. Параметры нейронов для каждой популяции были взяты из репозитория hipposamprom.org. Каждый нейрон получал индивидуальный шум. Порог генерации потенциала действия для каждого нейрона выбирался из нормального распределения, среднее значение бралось из базы данных, стандартное отклонение 4мВ. На каждый нейрон подавался ток двух видов – возбуждающий и тормозный. Форма каждого тока задавалась суммой синусоид со случайно выбранной фазой и случайной амплитудой. Для каждой популяции проводили 100 симуляций, каждая длиной 2 секунды, использовались в качестве обучающих данных, а 20 симуляций использовались в качестве тестовых данных.

В качестве модели использовалась модель LSTM с полносвязным последним слоем. Последовательности значений токов использовались как предикторы, а доля разряжающихся нейронов использовалась предсказываемая величина.

При помощи этого подхода нам удалось аппроксимировать частоту разрядов для всех шестнадцати популяций нейронов. В дальнейшем мы планируем объединить обученные модели в сеть. В перспективе этот подход можно применить для вычислительной оптимизации моделей нейронных сетей мозга. Это также позволит подгонять связи между популяциями для описания сетевых эффектов, известных из экспериментальных работ.

АВТОМАТИЗИРОВАННАЯ СИСТЕМА ЧИСЛЕННОЙ ОЦЕНКИ ПЛОЩАДИ РАНЫ КРЫС ПО ИЗОБРАЖЕНИЮ

Круглова С.М.¹, Трактиров Д.С.²

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

²Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт
экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

kruglova.sm@spbstu.ru

Современные исследования в области нейрофизиологии все больше опираются на компьютерные технологии и методы анализа данных. Перед исследователями, в свою очередь, все чаще встает вопрос обработки и визуализации данных, полученных экспериментальным путем. Одной из распространенных методик изучения репаративных процессов является моделирование ран на животных. Для анализа скорости заживления раны во многих случаях используется лишь качественный анализ, позволяющий оценить факт заращения раны, но упускающий из вида сам процесс заживления. Даже при нанесении круглой раны, в ходе процесса заживления со временем её форма изменяется несимметрично, не позволяя провести более точную оценку на разных стадиях заживления. Используя возможности применения языка программирования Python и технологию компьютерного зрения, можно значительно расширить получаемые результаты и провести количественный анализ.

Цель данной работы – разработка приложения, позволяющего эффективно отслеживать процесс заживления раны в динамике и расширить возможности проводимого анализа. Данное приложение разрабатывалось для работы, посвященной исследованию эффективности различных средств местного лечения для заживления ран. Опыты проводились на самцах (n=10) линии Wistar. Животным удаляли шерсть на месте предполагаемого нанесения повреждения кожи. Затем с использованием инструмента для панч-биопсии (Medax EPT8000–00, Италия; диаметр 8 мм) наносились раны в поясничном и грудном отделах. Все операции проводились под местной анестезией (2 % раствор лидокаина)

Для отслеживания процесса и скорости регенерации на протяжении 28 дней делались фотографии животных. Площадь раны определялась при помощи разработанной программы. Оценить площадь раны, не имеющей геометрически правильную форму, по фотографии без помощи компьютерных технологий не предоставляется возможным.

Для написания программы использовался язык программирования Python 3.9.13, библиотека OpenCV 4.8.1, предназначенная для обработки изображений, а также пакет matplotlib.pyplot 3.8.2. Краткое описание программы: 1) изменение формата изображения, необходимое для уменьшения вычислительной нагрузки, улучшения алгоритма поиска контуров, посредством упрощения изображения; 2) нахождение всех контуров и их отрисовка на изображении; 3) использование методов аппроксимации для поиска только замкнутых контуров; 4) ввод координаты с тачпада, для выбора нужного объекта; 5) вывод изображения с выбранными границами раны; 6) сопоставление расстоянию в пикселях расстоянию в миллиметрах.

Был проведен эксперимент в рамках лаборатории, мы попросили участников вычислить площадь раны у крысы. Результаты показали, что точность анализа площади раны экспериментатором оказалась ниже, чем точность программы ($70,8 \pm 3,3$ vs $150,8 \pm 97,0$) мм². Кроме того, среднее время ручного анализа человеком оказалось ожидаемо выше, чем время анализа с использованием программы ($75,00 \pm 14,27$ vs $398,4 \pm 273,0$) с.

Данная работа разрешает проблему сложности анализа при обработке фотографий, отображающих ход эксперимента, и, соответственно, уменьшает погрешности, обусловленные человеческим фактором в конечной исследовательской работе.

IN SILICO МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ
РОССИЙСКИХ ИСТИННЫХ ТРЮФЕЛЕЙ С ХОЛИНЭСТЕРАЗАМИ

Моргунова М.М.^{1,3,4}, Попов Р.С.², Дмитриева М.Е.^{1,4}, Шашкина С.С.^{1,3,4}, Кулинич С.В.¹,
Евстафьев С.Н.³, Аксёнов-Грибанов Д.В.^{1,4}

¹Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

²Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток, Россия

³Иркутский национальный исследовательский технический университет, Иркутск, Россия

⁴ООО ГРИНТЕХБАЙКАЛ, Иркутск, Россия

marymikhmorg@gmail.ru

В данный момент исследование ингибирования активности холинэстераз является эффективной стратегией, применяемой при лечении основных нейродегенеративных заболеваний. В связи с этим, основной целью являлось изучение фармацевтического потенциала низкомолекулярных метаболитов истинных трюфелей, собранных в России (г. Сочи). Для выполнения задач исследования была выполнена идентификация вторичных метаболитов плодовых тел и моделирование их взаимодействия с холинэстеразами *in silico*.

Изучение профилей вторичных метаболитов в метанольных экстрактах плодового тела проводили при помощи сочетания высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием с использованием гибридного квадрупольно-времяпролетного масс-спектрометра *maXis impact II* (Bruker) Предварительную обработку полученных хроматограмм и спектров выполняли с помощью программного обеспечения *MZmine 2.53*. Для идентификации вторичных метаболитов столь малоизученного объекта как российский черный трюфель, впервые применили подход с использованием молекулярных сетей *GNPS UCSD*. Визуализацию полученных данных проводили с применением программного обеспечения *Cytoscape (v3.10.1)*. Для проведения молекулярного докинга использовали ресурс *SwissDock*. В качестве мишеней нейродегенеративных заболеваний были выбраны структуры ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы. Все структуры мишеней были получены из банка данных белков *Protein Data Bank*. Подготовка лигандов и рецепторов были произведены с помощью сервисов *GUI-HBDock1.0* и *OpenBabel*.

Подход к идентификации вторичных метаболитов с использованием молекулярных сетей позволил идентифицировать ранее не описанные для данного объекта химические соединения. Использование правила Липинского позволило обособить 25 основных соединений – кандидатов, обладающих проницаемостью через клеточные мембраны, для которых было проведено моделирование взаимодействия с холинэстеразами. Наиболее выраженное взаимодействие с активным центром бутирилхолинэстеразы проявили такие соединения как рускогенин, поланразин Б, пилокарпин, изонерилгераниоловая кислота. Показано, что метиловый эфир гидроксикоричной кислоты, содержащийся в экстракте черного трюфеля обладает аффинностью по отношению к ацетилхолинэстеразе. С высокой вероятностью, обнаруженные вещества в плодовых телах истинных трюфелей смогут контролировать патологические процессы, возникающие при деградации нервных тканей.

Работа поддержана грантом РФФ № 23-25-00344.

ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ХОЛЕСТЕРОЛА С АМФОТЕРИЦИНОМ В ЛИПИДНЫХ МИКРОДОМЕНАХ МЕМБРАН КЛЕТОК КРОВИ

Соколова Л.О.¹, Калаева Е.А.¹, Кондратьев М.С.^{1,2}, Артюхов В.Г.¹

¹Воронежский государственный университет, г. Воронеж, Россия

²Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пуштинский
научный центр биологических исследований РАН», Пушино, Россия

lyudmila.sokolova.94@mail.ru

Вопросы о механизмах взаимодействия амфотерицина В (AmB) с мембранами клеток крови, которые содержат различные виды стеролов, и о роли липидного состава плазмалеммы в этих взаимодействиях остаются малоизученными и являются актуальной темой, поскольку этот препарат является одним из наиболее эффективных противогрибковых средств, применяемых в медицинской практике. Для количественной оценки содержания холестерина в мембранах и анализа особенностей его связывания с амфотерицином В используют методы спектрофлуориметрии и молекулярного докинга.

Измерение интенсивности флуоресценции исследуемых образцов липидных микродоменов мембран эритроцитов и лимфоцитов, окрашенных амфотерицином В, проводили на спектрофлуориметре RF-1501 (Shimadzu, Япония) в диапазоне длин волн 350–550 нм при длине волны возбуждения 328 нм. Подготовку структур для докинга выполняли по схеме для Autodock Vina. Были исследованы термодинамические параметры связывания молекул холестерина (лиганд) и амфотерицина В (рецептор).

Было установлено, что максимум испускания флуоресценции ассоциатов «холестерин – амфотерицин В» в составе липидных микродоменов приходился на 468–470 нм. Интенсивность флуоресценции мембранных микродоменов эритроцитов, окрашенных амфотерицином В в концентрациях $2,5 \times 10^{-5}$; $5,4 \times 10^{-5}$ и $3,24 \times 10^{-4}$ моль/л, составила $4,13 \pm 1,13$; $6,14 \pm 1,09$ и $11,50 \pm 3,14$ отн. ед., соответственно. Интенсивность флуоресценции окрашенных микродоменов мембран лимфоцитов составляла $4,23 \pm 0,38$; $7,16 \pm 0,64$ и $11,90 \pm 3,64$ отн. ед., соответственно.

Согласно расчетам, свободная энергия образования комплекса «холестерол-амфотерицин В» составила $-5,42 \pm 0,08$ ккал/моль, длина водородной связи – 2,89 Å.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что образование ассоциатов «холестерол-амфотерицин В» термодинамически возможно. На основании анализа данных спектрофлуориметрического анализа можно сделать заключение, что данное взаимодействие подчиняется количественным закономерностям. Значения интенсивности флуоресценции свидетельствуют о сходном содержании холестерина в липидных микродоменах эритроцитов и лимфоцитов периферической крови человека.

УЧАСТИЕ КАРОТИНОИДОВ В ОБРАЗОВАНИИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА И ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СО СВЕТСОБИРАЮЩИМИ ПИГМЕНТ-БЕЛКОВЫМИ КОМПЛЕКСАМИ LH2 ПУРПУРНЫХ СЕРНЫХ БАКТЕРИЙ

Большаков М.А., Яныкин Д.В.

Институт фундаментальных проблем биологии РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушино, Россия

AshikhminAA@gmail.com

Обсуждается каротиноид-зависимое образование АФК при освещении сине-зеленым светом светособирающих комплексов LH2 пурпурных серных бактерий *Ectothiorhodospira* (*Ect.*) *haloalkaliphila* и *Allochromatium* (*Alc.*) *minutissimum*.

При действии сине-зеленого света на препараты комплексов LH2 как из *Alc. minutissimum*, так и *Ect. haloalkaliphila* наблюдалось уменьшение амплитуды полосы поглощения БХл850, одновременно с этим происходило образование продукта окисления БХл – 3-ацетил-хлорофилла, с максимумом поглощения при 698 нм. За 30 мин экспозиции в комплексах LH2 из *Alc. minutissimum* происходило уменьшение амплитуды полосы поглощения БХл850 на 70%, тогда как в комплексах LH2 из *Ect. haloalkaliphila* всего на 30%. Добавление L-гистидина (или тролокса или L-аскорбата натрия) ингибировало этот процесс в обоих исследуемых образцах. Можно предположить, что более эффективное фотовыцветание БХл850 в комплексах LH2 из *Alc. minutissimum* может свидетельствовать о том, что молекулы пигментов у *Alc. minutissimum* выигрывают конкуренцию у молекул предшественников гидропероксидов.

Для препаратов комплексов LH2 из *Ect. haloalkaliphila* общее количество гидропероксидов (R-ООН) достигало максимального уровня (до 80 молекул на один LH2) на 20-й минуте. Добавление 10 мМ L-гистидина приводило, с одной стороны, к резкому снижению фотопродукции LP-ООН (на 80%), а с другой - к увеличению фотопродукции HP-ООН. Другие тушители синглетного кислорода также уменьшают фотообразование LP-ООН и увеличивают фотообразование HP-ООН. Добавление СОД и каталазы перед освещением LH2 практически не приводило к ингибированию фотопродукции HP-ООН и снижало фотопродукцию LP-ООН в два раза. Ферменты, добавленные после освещения препаратов, не влияли на содержание R-ООН. Полученные данные позволяют исключить участие пероксида водорода и супероксидного анион-радикала в образовании гидропероксидов. Показано, что при освещении образцов комплекса LH2 не происходит образование гидропероксидов БХл и каротиноидов. В случае комплексов LH2 из *Alc. minutissimum*, не было обнаружено образование R-ООН ни в зависимости от времени освещения ни в белковом матриксе, ни в пигментах (БХл и каротиноиды).

Освещение комплексов LH2 из *Ect. haloalkaliphila* в область поглощения каротиноидов приводит к фотопотреблению молекулярного кислорода со скоростью 993 мкмоль O₂ (мкмоль LH2)⁻¹ ч⁻¹ в первую минуту непрерывного освещения и 165 мкмоль O₂ (мкмоль LH2)⁻¹ ч⁻¹ позже. Освещение препаратов комплексов LH2 из *Alc. minutissimum* не приводило к видимому поглощению кислорода.

Таким образом, представленные данные подтверждают возможность того, что каротиноид-зависимая фотогенерация синглетного кислорода в LH2 *Ect. haloalkaliphila* приводит к образованию органических гидроперекисей и повреждению, как пигментов, так и белкового матрикса.

Работа выполнена при поддержке РФФ проект № 23-24-00362 (<https://rscf.ru/project/23-24-00362/>).

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

А

Абашин И.Ю.	168	Аракелян А.Г.	7
Абашина Т.Н.	197, 217, 240	Арбузова Е.А.	400
Абдуллатыпов А.В.	362	Артыкбаева Г.М.	285
Абдуллина А.А.	246	Артюхов В.Г.	146, 413
Абдуллина М.И.	102	Архипов А.Ю.	12
Абдулхаков С.Р.	201	Архипов В.И.	342
Абдыев В.К.	128	Аршинова Е.С.	12
Абрамов А.А.	199	Асатурова А.В.	36
Абрамов В.М.	159	Астанкова А.С.	173
Абуладзе В.Г.	170	Асякина А.С.	149
Аверина С.Г.	202	Атюков М.А.	113
Агеевец В.А.	97	Афошин А.С.	188, 195
Агладзе К.И.	104, 157, 161, 409	Ахбарова Л.И.	174
Адамейко К.И.	94	Ачасова К.М.	298
Адельшина Э.В.	17	Ачилов А.Б.	408
Адонин Л.С.	226	Ашихмин А.А.	364
Азев В.Н.	183, 236		
Азнабаева З.А.	216, 237	Б	
Аитова А.А.	104, 157, 161, 409	Бабаева Г.	126
Аксёнов-Грибанов Д.В.	28, 242, 377, 412	Бабенко Е.Л.	373
Александр-Синклер Э.И.	138	Бабенкова П.И.	251
Александрова К.В.	103	Бабынин Э.В.	25, 174
Александрова М.В.	192	Бадеева Е.К.	174
Александрова С.А.	121	Байдамшина Д.Р.	203
Александрова С.С.	34	Бакаленко Н.В.	113
Алёхина М.С.	247	Балалаева И.В.	74, 119, 166
Алёшина Н.М.	248	Балацюк Е.В.	408
Алимова А.А.	353	Балашов Н.В.	354, 355
Алов А.В.	249	Балханов Ю.С.	117
Алхиреенко Д.А.	5	Балыкина А.М.	303
Альбертина А.А.	264	Барахов А.В.	403
Аль-Шехадат Р.И.	205	Барсук Д.А.	89
Амиров Р.Р.	256	Барыбина О.В.	406
Ананьев А.С.	250, 267	Барыгин О.И.	280, 307
Андреева А.Ю.	266	Барыкин Е.П.	16
Андреева-Ковалевская Ж.И.	18	Басова М.А.	252
Андрейцев В.В.	6, 37	Басович Л.С.	8
Анисимова Л.Г.	171	Баталова А.А.	242
Антонова Е.И.	408	Батальщикова С.А.	271
Антонова Н.П.	172, 200	Бауэр Т.В.	403
Антонова О.Ю.	130, 131	Башкиров С.Д.	175
Ануфриева Н.В.	127	Башкирова И.Г.	176
		Беднягина О.О.	106

Безручко М.В.	190	Бровко Ф.А.	18
Белашова Т.А.	15, 100	Брускин С.А.	165
Белов А.А.	199	Брускова Н.А.	180
Белогорлова Н.А.	218	Бтейх Т.	31, 43
Белослудцев К.Н.	124	Бублик А.А.	49
Белослудцева Н.В.	124	Буев В.С.	9
Белых Е.С.	74, 87	Бузиков Р.М.	181
Бельтюкова А.В.	253, 305	Букатин А.С.	145
Беляев Г.П.	254	Букин С.В.	10
Беляков Д.Ю.	116, 255, 282	Буланова Е.А.	376
Беляков М.В.	303	Булатова Л.Ф.	84
Бервинова А.В.	256	Булыгина Е.А.	201
Бережнов А.В.	42, 344	Бульмакова Д.С.	182, 227
Бережной А.К.	104, 409	Буравкова Л.Б.	163
Беркутова Е.С.	182, 227	Бурова Е.Б.	163
Беспалов А.Я.	45	Буртовская М.И.	12
Бессонова В.А.	374	Бурыгин Г.Л.	39, 173, 238
Бикмуллина А.М.	177	Бухлицкая И.В.	323
Бильдюг Н.Б.	138	Бушуева А.С.	365
Билялов А.И.	122	Быков В.В.	183, 236
Биницкая Н.В.	91	Бычкова А.В.	102
Бирюков Н.С.	134	Бычкова Т.М.	260, 321, 322
Битаршвили С.В.	73		
Блинова Я.А.	70	В	
Бобко А.С.	178	Вавилина Т.Н.	377
Бобков Д.Е.	133	Вайман Е.Э.	287
Бобылёв А.Г.	90	Вайнштейн М.Б.	240
Бобылёва Л.Г.	90	Валеева Е.В.	262
Богдан Е.В.	375	Валиахметов Э.Э.	14, 231
Богомолов М.А.	137	Валидов Ш.З.	14, 207, 231
Бодров Я.В.	82	Валиева Д.Г.	263
Божко А.А.	257	Валина А.А.	15, 100
Болдырева Л.В.	298	Варламова Е.Г.	76
Большаков М.А.	414	Варшавская К.Б.	16
Большева Н.Л.	26	Васильев А.О.	410
Бонарцев А.П.	123	Васильев Д.С.	249
Бондарева А.А.	177	Васильева Е.В.	246
Бондаренко С.С.	266	Васильева Ю.А.	184, 189
Борисов Е.Е.	107	Васина Д.В.	172, 200
Борисова-Мубаракшина М.М.	354, 355, 364	Вахитова Ю.В.	325, 348
Бороздина Н.А.	258, 259	Ващенко К.Д.	17
Борхерт Е.В.	26	Ведяйкин А.Д.	77
Борщевский В.И.	79	Веланский П.В.	369
Бочаров Д.А.	260, 321	Велегжанинов И.О.	74, 87
Бочаров Э.В.	19, 31, 43	Величко А.К.	27
Бочкова М.С.	162	Верхотурова С.И.	218
Бочковский С.К.	276	Вершинина Д.Д.	185
Бражникова А.В.	355		
Братушева А.А.	179		

Вершинина С.О.	108	Гилиждинова К.Р.	267
Ветошкина Д.В.	354, 366	Гильмутдинова А.И.	184, 189
Ветрова А.А.	185	Гильфанов И.Р.	203
Ветрова О.С.	18	Гинзбург А.П.	380
Ветровой О.В.	315, 327	Гладких М.И.	232
Вильянен Д.В.	356, 364	Гладышева А.В.	5, 62
Винник Д.А.	109	Глинская Е.В.	381
Виноградов Р.А.	149	Глушанкова Л.Н.	270
Виноградова С.В.	180	Глушкова О.В.	279, 292
Витковская Е.В.	111	Говорун В.М.	96
Вихлянцев И.М.	89, 90	Годовалова О.С.	268
Власевская А.Д.	186	Головашкина Е.Ю.	170
Власенко В.П.	388	Голофеева Д.М.	21, 77
Власова А.А.	242, 377	Голубев Д.М.	381
Водопьянова Е.В.	112	Голубкова Е.В.	24
Волкова А.А.	264, 266	Голубчиков Д.О.	115, 154
Волкова Е.С.	189	Гончаров Н.Е.	190
Волкова П.Ю.	70, 73	Горб А.И.	133
Волкова Т.Ю.	378	Горбатов А.В.	168
Вологжанникова А.А.	183, 236	Горбова А.В.	54, 276
Вольховский А.В.	228	Горбунова Е.Ю.	183, 236
Воробьев И.И.	164	Горенкова А.И.	22
Воронежская В.С.	70	Горланова Л.А.	374
Воротеляк Е.А.	128	Горностаева А.Н.	136
Врублевская В.В.	120, 143	Горобец М.Г.	102
Выштакалюк А.Б.	254	Горохов И.А.	190
		Горохова А.А.	166
		Горская А.В.	269
Г		Горшенева Н.А.	20
Габдулхаков А.Г.	90	Горшкова М.А.	191
Гавриленкова А.А.	19	Горюнов К.В.	350
Гаврилов А.Е.	20	Гранович А.И.	196
Гаврилова Е.А.	187	Грановский И.Э.	191
Гавриш М.С.	55	Грачева А.И.	23
Гайдин С.Г.	152, 160	Гренроос С.Б.	269
Гайфуллина Л.М.	113	Григорьев И.В.	172
Галаева З.Р.	114	Григорьева Е.Р.	270
Галашин А.С.	265	Григорьева И.И.	398
Галемина И.Е.	188, 195	Григорьева Т.В.	192, 201, 287
Галимова Э.С.	347, 349	Громов Н.В.	305
Галкин А.П.	15, 100	Грудень М.А.	284, 300, 318
Галяметдинова И.В.	254	Грудкова Д.М.	24
Гамбарян С.П.	299, 303	Грязнова У.В.	357
Ганнесен А.В.	209, 215	Гужова И.В.	151
Гафарова Е.Р.	21, 196	Гузенко В.В.	271
Гаямова Е.А.	164	Гуляева Е.Н.	393
Герасимова С.А.	305	Гуляева Н.В.	141, 283, 313
Герасимчук А.Л.	208	Гуреев А.П.	251, 306, 353, 358, 360
Герда Б.А.	266	Гуреева М.В.	353, 358, 360
		Гусева Е.А.	9
		Гусманова Ю.Р.	25

Д

Давыдова Е.Ю.	116, 282
Данилова О.А.	192
Данилова Ю.В.	184, 189
Дарбаидзе П.М.	204
Дворянинова Е.М.	26, 82
Девяткин А.А.	93
Девятков С.О.	272
Дегтярева И.А.	25
Деев И.Е.	19
Деенкова А.Ю.	346
Дейкин А.В.	291
Делеган Я.А.	197
Демин А.Г.	409
Дёмина Е.С.	117
Дериглазов Д.А.	27
Дерягина Е.В.	295
Диоманте М.Х.Ж.	382
Дмитриев А.А.	26, 82, 88
Дмитриева Д.С.	79
Дмитриева Е.А.	273
Дмитриева М.Е.	28, 242, 412
Долгих А.В.	397
Долгих В.В.	44, 91, 244
Долодоев А.С.	117
Донцова О.А.	38
Драница И.С.	193, 218
Дрожжачих М.С.	156
Дроздова П.Б.	186
Дронь М.Ю.	278
Дружбина А.А.	147
Дружинина В.К.	401
Дружкова Т.А.	283
Дубенская Н.А.	118
Дубровин С.В.	274
Дубровская А.С.	275
Дудина В.А.	276
Думина М.В.	34
Дымова Е.А.	277
Дынник В.В.	265
Дьяченко И.А.	259, 314
Дюкина А.Р.	23

Е

Евдокимов П.В.	115
Евдокимова А.И.	383
Евланенков К.К.	278

Евстафьев С.Н.	412
Егоров А.Д.	126
Егорова А.А.	212
Егорова Е.А.	182, 227
Егорова М.С.	142
Ежков В.О.	187
Ежкова А.М.	187
Елагина Д.М.	119
Ельцов О.С.	159
Ерастенкова М.В.	129
Еремина А.А.	358
Ерилина Д.А.	279
Ермаков А.М.	30
Ермакова Е.В.	286
Есюнина Д.М.	29
Ефимова Л.А.	393
Ефимова С.С.	51, 112

Ж

Жанина М.Ю.	283
Жарикова Н.В.	171
Жаркова И.И.	123
Жданкина Ю.С.	134
Жданов Д.Д.	34, 144
Жданова Е.С.	30
Жернова Д.А.	26, 82
Жигулин А.С.	280, 307
Жмурина М.А.	120, 143
Журина М.В.	219

З

Заварыкина Т.М.	36
Загоскин А.А.	213
Загрядская Ю.А.	31, 43
Задорина И.И.	281
Зайнуллина Л.Ф.	125, 297
Закарова Н.Д.	194
Закопайко Б.А.	121
Закржевская В.Д.	116, 282
Закусина А.В.	384
Залесский А.Д.	142
Заливако А.С.	122
Заморина С.А.	272
Замятина А.В.	18
Зарипов П.И.	32
Захаренко А.С.	10

Зацаринная Е.А.	170, 204
Здобнова Т.А.	119
Зеленов Д.В.	188, 195
Зелинский А.А.	86
Зельцер А.И.	123
Земская А.С.	127
Земская Н.В.	63
Земская Т.И.	10
Зильберман Р.Д.	323
Зобов В.В.	254
Зозуля Л.В.	131
Золотаренко А.Д.	165
Золотоверхая Е.А.	45
Золотовская Е.Д.	186
Зотова П.А.	38
Зрилова Ю.А.	260, 321, 322
Зубарев Ю.А.	88
Зубова Е.В.	196

И

Ибрагимова Э.А.	285
Иванов Б.Н.	354
Иванов В.К.	109
Иванов Ф.Д.	403
Иванова А.А.	185
Иванова А.Г.	57
Иванова Е.С.	392
Иванова Ю.С.	111
Ивасенко Д.А.	208
Иващенко К.В.	373, 399
Игнатьева М.В.	117
Иерусалимский Н.В.	283
Изместьева О.В.	324
Ильзоркина А.И.	124
Ильина В.Н.	194, 237
Ильина И.В.	210
Ильюшин В.А.	228
Илюшина Е.А.	125
Иминова Л.Р.	197
Инокентьева В.И.	284
Иовчева А.Д.	385
Ионов О.В.	350
Исаева А.С.	126
Исмаилова А.М.	312, 314, 328
Ишанходжаев Т.М.	285

К

Кабанов А.В.	83
Кабилов М.Р.	38
Кабирова А.А.	286
Каверина А.П.	127
Кадирова Ф.Р.	33
Кадников И.А.	297
Казакова Е.А.	70, 73
Казанцева О.А.	40, 181
Каземзаде Ш.	232
Казначеева Е.В.	270
Кайшева А.Л.	59
Калаева Е.А.	413
Калашникова Т.В.	198
Калёнов С.В.	206, 212
Калинин А.И.	409
Калинин Д.С.	191
Калинин П.И.	376
Калинин С.Г.	34
Калинкина В.А.	128
Калюжная Л.И.	121
Калюжная Ю.Н.	271
Камышацкая О.Г.	233
Каплун А.М.	82
Каплун Д.С.	31, 43
Капралова М.А.	36
Карабельский А.В.	126
Каранкевич Е.Г.	323
Карасева О.С.	187
Каратовская А.П.	18
Каримова Е.Д.	283
Карпенко М.Н.	339
Карпова Н.С.	12
Карунас А.С.	367
Касаткина А.Н.	199
Каюмов А.Р.	187, 194, 203, 214, 216, 237, 281
Каюмова Л.Н.	36
Кечко О.И.	301
Кипелкин И.М.	305
Кириллова В.С.	409
Кирсанова А.С.	129
Кисель А.А.	275
Киямова Р.Г.	84
Климова А.А.	172, 200
Ковалева Н.А.	386
Коваленко А.В.	201

Коваленко С.Г.	161	Крещенко Н.Д.	293
Коваль В.С.	48	Кривова Ю.С.	268, 311
Коваль Л.А.	63, 340	Кривцова В.Н.	375
Ковган П.Е.	299	Крицкая К.А.	42
Кожевникова Е.Н.	298	Крицкий К.А.	388
Козлов А.В.	225	Круглова С.М.	411
Козлов А.П.	33	Крупская В.В.	384
Козлова А.Д.	287	Крылова В.А.	204
Козлова М.В.	359	Крюков А.А.	22
Козлова О.С.	122	Крюкова В.А.	360
Козулева М.А.	356	Крючкова А.К.	31, 43
Козырева Н.Г.	168	Крючкова О.А.	289
Козырева Т.В.	310	Кубарская Л.Г.	45
Козьмин Г.В.	252	Куваева З.И.	323
Кокина А.В.	333	Кудрин В.С.	300
Колган Н.Р.	202	Кудринская В.М.	290, 302, 309
Колесников Д.О.	270	Кудрявцева Л.П.	82
Колесников С.С.	83	Кудрявцева Ю.С.	44
Колесникова А.И.	203	Кудрякова И.В.	188, 195
Колесникова В.В.	6, 37, 50	Кудряшов Т.А.	183, 236
Колтаков И.А.	146	Кудряшова Н.И.	291
Кольжецов Н.П.	234	Кузеева А.А.	279, 292
Комарова Е.С.	38	Кузнецов Г.В.	293
Кондратенко А.А.	121	Кузнецова А.П.	205
Кондратенко Р.В.	320	Кузнецова Н.В.	45
Кондратьев М.С.	413	Кузовенко О.А.	391
Конова К.Ю.	72	Кузьмицкая А.А.	206
Конопатов А.В.	72	Кулешова Ю.Д.	32
Константинова Е.А.	39	Куликов А.В.	308
Копосова О.Н.	40, 243	Куликова В.В.	48
Копылова Е.Е.	41, 247, 288	Куликова Е.Д.	337
Корнейкова М.В.	397	Куликова Л.И.	59
Королёва С.А.	144	Кулинич С.В.	412
Корпусова Е.И.	346	Куличихин К.Ю.	20
Корсакова Е.С.	175	Кульбачинский А.В.	29, 69
Косенко Н.Р.	387	Кулябин В.А.	46
Косенков А.М.	152	Кунгуров Г.А.	14, 207, 231
Костевич В.А.	57	Куницина А.Е.	271
Косырева А.М.	107	Курганова И.Н.	378
Котелевцев Ю.В.	291	Куркин Т.С.	79
Котельникова С.О.	325	Курочкина Л.П.	92
Котихина Е.Е.	253	Курячий Д.С.	196
Котова П.Д.	277		
Кочеткова О.Ю.	130, 131	Л	
Кочкина Е.Н.	41, 288	Лазарев В.Ф.	151
Кравченко В.И.	131	Ландынья С.С.	347, 349
Кравченко Е.В.	323	Лаптева Ю.С.	183, 236
Кравчук О.И.	94	Ласточкина Е.Э.	189
Красников Н.Ю.	222		
Красникова К.А.	408		

Латанова А.А.	47	Макарова К.А.	295
Лебедев В.Г.	367	Максимов Г.В.	32
Лебедев Е.Е.	226	Максимова Ю.Г.	220
Лебедев Т.Д.	137	Малашичева А.Б.	8, 113
Лебедева А.А.	338	Малеев М.Г.	50
Лебедева А.В.	253, 305	Маликова О.А.	86
Лебедева Л.А.	72	Малоголовкин А.С.	126
Лебедева М.А.	363	Маломуж А.И.	158
Лебедева М.В.	368	Мальгина Е.В.	242, 377
Лебедева-Георгиевская К.Б.	335	Мальхина А.И.	51, 112
Леванова Т.А.	305	Мальков А.А.	134
Левитская К.Д.	208	Мальков А.Е.	253, 305
Левшина К.П.	48	Мальцева А.Л.	196
Леконцева Н.В.	64, 85	Мальцева В.Н.	160
Лендел А.М.	172	Мальцева П.Ю.	210
Ленина О.А.	254	Мамлеев А.Р.	294, 296, 329, 330
Леонтьевская Е.А.	188, 195	Мамошина А.А.	147
Леонтьевская Н.В.	188, 195	Манолова А.О.	141, 313
Летягин П.И.	326	Мариевский В.Е.	297
Лещенко Е.Ф.	361	Маркелова М.И.	201, 287
Ли А.А.	132	Маркелова Н.Ю.	234
Лиманкин О.В.	287	Маркин Р.В.	354, 362
Линкевич Е.В.	393	Мартиросян Д.Ю.	142
Литвинова С.А.	348	Мартынова Е.И.	28
Логашкин А.Е.	294, 296, 329, 330	Марьясина С.С.	95
Логинова Н.А.	209	Матвеева Д.К.	136
Логунов А.Т.	312	Матвеев А.Г.	20
Локтева А.В.	178	Матора Л.Ю.	39
Ломакина А.В.	10	Матюнина Е.А.	33
Ломскова П.К.	36	Махортых С.С.	211
Ломтева Н.А.	341	Медведева А.С.	389
Лужин А.В.	27	Медведева С.С.	298
Лукачева А.В.	133	Медвинский А.Б.	390
Лукьянова Т.Е.	98	Мезенцев Е.С.	239
Лунин С.М.	279	Мейта Е.С.	310
Лупачев А.В.	380	Мелехин В.В.	159
Лутова Л.А.	363	Мелконян К.И.	149, 343
Лучникова Н.А.	210	Мельникова Н.В.	26, 82, 88
Любашина О.А.	334	Мехова А.А.	99
Люпина Ю.В.	94	Мидзяновская И.С.	141, 319
Лянгузова А.Д.	21	Микаелян А.С.	291
		Микеладзе М.А.	151
М		Микулинская Г.В.	7
Магера Е.М.	49	Минаев И.С.	390
Майоров С.А.	152	Минаев Н.С.	390
Майорова О.А.	102	Минайчев В.В.	153
Макаров А.А.	16, 32	Миндубаев А.З.	174
		Миндукшев И.В.	264, 266, 299
		Минина Ю.А.	53

Минлебаев М.Г.	294, 296, 329, 330	Незнанов Н.Г.	287
Миняковский И.О.	212	Немчинова А.Р.	57
Мирзоян Р.А.	213	Несговорова Н.А.	58, 65, 205, 241
Миролубов А.А.	21	Нестеренко М.А.	21
Миронова А.В.	214	Нестеркина Д.Д.	381
Митрохина Е.С.	378	Нестерова В.В.	306
Митрошина И.Ю.	23	Нестерова Е.Ю.	232
Митькевич В.А.	16, 301	Нешев Н.И.	118
Михайленко В.Л.	193, 218	Никаноркина В.В.	368
Михайлова Г.З.	89	Никитенко О.В.	260, 321, 322
Михайлова Д.М.	299	Никитин Д.А.	397
Михайлова Н.П.	284, 300	Никитин Д.О.	262
Михеева А.М.	137	Никитина Е.В.	187
Михель А.В.	54, 249, 276	Никитина Л.Е.	203
Мишин А.В.	79	Никитина М.Д.	272
Моисеева А.А.	106	Никифорова Л.С.	262
Монир Я.М.	187	Никишин Д.А.	248, 336
Моргунова М.М.	242, 377, 412	Никишина Ю.О.	275
Морева В.О.	138	Николаев М.В.	278
Моренков О.С.	120, 143	Никольский К.С.	59
Мороз В.Д.	126	Никонов О.С.	6, 37, 50, 64
Морозова Е.С.	127	Никонова Е.Ю.	6, 37, 50
Москалев А.А.	63, 340	Никоноров М.М.	391
Московский А.А.	140	Никулин А.Д.	64, 85
Мосолова А.М.	215	Никулин А.С.	255
Моторина А.О.	55	Нимаева А.А.	117
Мурашев А.Н.	256, 312, 314	Новаковский Р.О.	88
Мусорина А.С.	133	Новикова А.Е.	66
Мустаева Л.Г.	183, 236	Новикова А.О.	307
Мустафакулов М.А.	285	Новикова В.О.	308
Муталлапова Г.И.	216, 237	Новоселова Е.Г.	292
Мухина К.А.	301	Номеровская М.А.	270
Мысин И.Е.	274, 331, 410	Носков А.Е.	217
Н		Нуралиева С.З.	60
Нагаткина М.В.	263	Нурбеков М.К.	12
Нагель А.С.	18	Нуриева Н.И.	390
Назаров И.Р.	290, 302, 337	Нурмиева Д.А.	267
Найда Л.В.	303	О	
Найдов И.А.	355, 356	Обморнов О.Д.	81
Наквасина М.А.	346	Обухова Д.А.	290, 302, 309
Напрягло Е.А.	56	Овечкина А.А.	381
Наркевич В.Б.	300	Овчинников Р.С.	224
Насырова Р.Ф.	287	Огиенко А.А.	298
Наумов А.В.	305	Огнева И.В.	134
Наумов В.Д.	104	Одринская М.С.	141
Недогреева О.А.	263	Озолин О.Н.	234

Октябрьский О.Н.	198, 230	Плотников Е.Ю.	306
Ольгомец Л.М.	323	Подлущкая А.В.	70
Орлов И.В.	310	Подлущкий А.А.	73
Орлова А.А.	193	Подлущкий М.С.	70
Орлова Н.А.	164	Позднякова-Филатова И.Ю.	53
Орлова Ю.В.	12	Покидова О.В.	308
Осинкина И.А.	62	Покровская М.В.	34
Остроумова О.С.	51, 112	Покровский В.С.	126
Осыченко А.А.	142	Полев Д.Е.	190
Отлыга Д.А.	311	Поливцева В.Н.	197
Отлыга Е.Г.	311	Полянская Г.Г.	133
Охрименко И.С.	31, 43	Пометун А.А.	97, 98
П		Попкова Д.В.	259
Павлов Н.Б.	256, 312	Попов А.Л.	109
Павлова В.А.	82	Попов Д.Ю.	255, 282
Павлова О.Н.	10	Попов Р.С.	412
Пакшина Н.Р.	63	Попова И.Ю.	301
Паликов В.А.	312	Попова М.К.	72
Панкратова П.Ю.	64	Попова С.С.	89
Пантелеев М.А.	257	Поротикова Е.В.	180
Парамонова А.Э.	313	Потапова Н.А.	28
Парфенов А.А.	254	Потапова С.С.	315, 327
Парфенюк С.Б.	279	Празян А.А.	73
Паршин Д.А.	409	Прасолов В.С.	137
Паршина Е.Ю.	32	Предущенко П.А.	88
Певцова Я.Н.	392	Приставка А.А.	67, 193, 218
Пеньдюхова А.С.	218	Прокопюк В.М.	393
Пеньков Н.В.	90	Пронин Н.А.	316
Перевезенцев А.А.	335	Протасова Е.М.	220
Перепеченова Н.А.	314	Прохоров Д.А.	7
Перушкина Е.В.	401, 402	Прошкина Е.Н.	63, 340
Перцева А.С.	58, 65, 205, 241	Прощина А.Е.	268, 311
Пестерева Н.С.	337	Психа Б.Л.	118
Петренко В.А.	363	Птицын Л.Р.	66
Петренко В.С.	120, 143	Пуговкина Н.А.	111
Петров М.Н.	66	Пудова Д.С.	221
Петрова В.В.	396	Пукасева А.А.	146
Петрова Н.В.	27	Пупов Д.В.	69
Петровский Д.В.	59	Путляев В.И.	115, 154
Петропавловская Е.А.	326	Пушкова Е.Н.	26
Петрушанко И.Ю.	16, 32	Пыхова Е.С.	364
Петряев Е.Р.	144	Пятибратов М.Г.	39
Петухова О.С.	67	Р	
Петушков И.В.	69	Радченко В.В.	192
Пичкур Е.Б.	92	Раев М.Б.	272
Пичугова П.А.	81	Раевский В.В.	141
Плешаков П.С.	145	Ражина О.А.	368
Плешко Е.М.	219		

Разин В.В.	305	Садовский М.С.	325
Разин С.В.	27	Сазонова О.И.	185
Райхман Е.В.	130, 131	Саитова А.Т.	190
Расова Е.Е.	74, 87	Сайганова М.А.	93
Ратмиров А.М.	284, 318	Саликова Д.А.	326
Ратушный А.Ю.	163	Саловарова В.П.	67
Ребик А.А.	319	Салынкин П.С.	153
Ревтович С.В.	48, 127	Самбунова М.И.	305
Резвых Л.Ф.	75	Самигуллина С.Р.	223
Резьпова А.К.	394	Самойлова Н.А.	333
Репкин Е.А.	196	Самотаева И.С.	283
Решетин Д.С.	270	Самофалов П.С.	154
Ржевский С.Г.	365	Самохина Н.П.	395, 400
Рогачев В.В.	76	Самусева П.Д.	78, 99
Рогачевская О.А.	41, 247, 277, 288	Самыгина В.Р.	57, 92
Рогожин Е.А.	371	Самылина И.В.	224
Рогозин П.Д.	320	Санина Н.А.	308
Родионова Е.Д.	260, 321	Сафарова Д.Н.	315, 327
Родионова М.А.	66	Сафонова Т.А.	266
Рожмина Т.А.	26, 82	Сафронова Н.А.	79
Розенман В.А.	15	Саченков О.А.	281
Романова С.А.	104, 147, 161	Свитко С.О.	250
Ромашова А.К.	28	Северюхина М.С.	328
Ромодин Л.А.	140, 260, 321, 322	Селиванов А.С.	409
Рубель А.А.	20, 86	Селиванова Е.В.	367
Рудакова Н.Л.	184, 189	Семейкина А.А.	106
Руденко Н.В.	18	Семенов В.Э.	254
Руденко Н.Н.	362	Семёнова Е.М.	223
Руднев В.Р.	59	Семенцов М.В.	137
Рукояткина Н.И.	303, 316	Семидетнов И.С.	104
Румянцева Н.А.	77	Семина И.И.	262
Русинова Т.В.	149, 343	Сендерский И.В.	244
Рыбак А.В.	74, 87	Сенина А.М.	192, 201, 287
Рыжих Ю.С.	366	Сенотов А.С.	153
Рыжманова Я.В.	211	Сенча Л.М.	74, 119
Рыкова В.С.	222	Сергеев А.О.	156
Рыкунова Е.Б.	151	Сергеева Л.А.	81
Рязанцева П.Е.	152	Сергеева Т.О.	157
		Сергиев П.В.	9, 38, 95
С		Середенин С.Б.	125, 297, 348
Саатов Т.С.	285	Серова О.В.	19
Саванец О.Н.	323	Серых М.Ф.	117
Савельев С.В.	268, 311	Сибгатуллина Г.В.	158
Савченко Т.В.	357, 361	Сиваченко И.Б.	334
Садек А.	324	Сигова А.А.	193
Садова А.В.	79	Сигова Е.А.	26, 82
Садовникова Е.С.	314	Силаева В.М.	294, 296, 329, 330
		Силачев Д.Н.	350
		Синегубова М.В.	164

Синягина М.Н.	201	Суворина М.Ю.	117
Сироткин А.С.	402	Суворова И.И.	103
Ситдикова В.Р.	294, 296, 329, 330	Судницына Ю.С.	299
Ситдикова Г.Ф.	250, 286, 332	Сузина Н.Е.	197
Сиунов А.В.	18	Сулейманова А.Д.	227
Скарга Ю.Ю.	120, 143	Сурин А.К.	117
Скачкова А.Д.	225	Сутормина Л.В.	230
Скверчинская Е.А.	264, 266, 299	Суханов А.Ю.	14, 207, 231
Скобелева К.В.	270	Сухоруков В.Н.	132
Скороход С.Н.	331	Сушкевич Б.М.	334
Скорынина А.В.	46	Сущенко А.С.	368
Сладков К.Д.	83	Сыровнев В.А.	409
Слатинская О.В.	32	Сыромятников М.Ю.	232, 251
Слащева Г.А.	314		
Слидзюк И.А.	84	Т	
Слотвицкий М.М.	104, 157, 161, 409	Табацкая Т.М.	365
Смагин А.В.	375	Тавлеева М.М.	74, 87
Смирнов Л.А.	305	Таймарова К.М.	233
Смирнова Г.В.	198, 230	Талызёноква А.Д.	116, 282
Смирнова Д.С.	113	Тальдаев А.Х.	226
Смольянова Н.А.	85	Тарабыкин В.С.	55
Смутин Д.В.	226	Таранов В.В.	368
Снегин Э.А.	405, 406	Тельнова Т.Ю.	377
Снегирёв А.С.	252	Тимофеев С.А.	44, 244
Снытко Д.В.	147	Тимофеева А.Г.	403
Соколов А.В.	57	Тимченко М.А.	90
Соколов А.С.	183, 236	Тихонов К.Г.	357, 361
Соколова Д.Ш.	223	Тишков В.И.	97, 98
Соколова Е.М.	118	Тишкова Е.А.	335
Соколова Л.О.	413	Ткаченко М.Д.	275, 336
Сокольников Л.В.	182, 227	Товпеко Д.В.	121
Солнцева С.А.	396	Токмакова А.Р.	158
Соловьева О.А.	284, 300	Токтохоева Л.Н.	117
Солонин А.С.	18	Толпешта И.И.	384
Сольев П.Н.	48, 127	Торговцев А.А.	287
Соляникова И.П.	197	Тохтуева М.Д.	159
Сорокин Д.П.	228	Трактиров Д.С.	337, 411
Сорокина Д.М.	332	Трахтман Н.В.	14, 207, 231
Сошина А.С.	397	Трегубова О.В.	338
Спирин П.В.	137	Тризна Е.Ю.	203, 214, 237, 281
Стариков М.С.	388	Трошина Д.А.	234
Стародубова Е.С.	47	Трубицин И.В.	362
Стародубцева Н.Л.	350	Трубицина Л.И.	362
Стафеева К.С.	333	Трубицын В.Э.	235
Сторожева З.И.	284, 300, 318	Трунилина М.В.	183, 236
Стратилов В.А.	315, 327	Туманова Н.Л.	249
Стрелкова А.Н.	49	Туманова Т.С.	289
Стройкова М.Н.	398		
Стюфляева Ю.К.	86		

Тумозов И.А.	160	Харькова А.С.	389
Турба А.А.	88	Хасанов Д.И.	184, 189
Турчанинова Е.А.	161	Хасанова А.А.	402
Тутукина М.Н.	81, 177	Холмуродов Х.Т.	279
Тутукова С.А.	55	Холова Г.И.	351
Туховская Е.А.	314	Хорошаева Т.П.	362
Тютюнник Т.В.	309, 339	Хотин М.Г.	138
		Хотина В.А.	107, 132
У		Хохлова М.А.	95
Уланова А.Д.	89, 90	Хохлова С.В.	36
Уляшева Н.С.	340	Храмцов П.В.	114
Упорова М.А.	400	Храмцова Ю.С.	324
Урабова С.А.	399	Хренов М.О.	279
Уранова В.В.	341	Хронюк О.Е.	403
Урюпина Т.А.	90	Хуснутдинова Д.Р.	192, 201
Усанина Д.И.	162		
Ушаков Р.Е.	163	Ц	
Уэйли А.К.	316	Цай А.А.	344
Уэйли А.О.	316	Цвеляя В.А.	104, 157, 161, 409
		Цишевская А.А.	5
Ф		Цой Е.А.	96
Фадеев Р.Р.	91	Цыбденова А.П.	117
Федоров Д.А.	342		
Федоров Н.В.	92	Ч	
Федорова А.А.	273	Чаговец В.В.	350
Федорова Е.В.	265, 342	Чадова К.А.	369
Федорова М.С.	214, 216, 237	Чепцов В.С.	384
Федотова Е.И.	42	Черкасова Е.А.	238
Феоктистова С.Г.	93	Черницына С.М.	10
Филатов Н.А.	145	Чернов А.Н.	347, 349
Филимоненко Е.А.	395, 400	Черноморец И.Ю.	342
Финошин А.Д.	94	Чертолясова А.М.	146
Фирсова Н.В.	408	Чикадзе Е.Д.	239
Фирстова Ю.Ю.	246	Чугреев М.Ю.	404
Фисунов Г.Ю.	96	Чумарина А.И.	345
Фоменко А.А.	343	Чурсанова Е.Н.	346
Фролова М.С.	30	Чутко А.Л.	347
Х		Ш	
Хабас Г.Н.	36	Шавкунов К.С.	234
Хабибуллина Л.Р.	401	Шадрин А.М.	40, 46, 181, 243
Халиуллина А.М.	401	Шайдуллов И.Ф.	332
Хан И.И.	126	Шайдуллова К.С.	250, 267
Хантемиров Р.М.	374	Шайкин А.А.	240
Харламова А.С.	268	Шайфутдинов Р.Р.	164

Шайхутдинова Э.Р.	314		
Шалыгин А.В.	270		
Шангин С.В.	348		
Шапкин О.А.	383, 392, 396		
Шапошников Л.А.	97		
Шапошников М.В.	63, 340		
Шарапов М.Г.	279		
Шарапов Я.А.	347, 349		
Шардина К.Ю.	162		
Шарипова М.Р.	184, 221, 227		
Шашин М.С.	254		
Шашкина С.С.	412		
Шашковская В.С.	291		
Шевелева М.П.	183		
Шевцов М.Б.	79		
Шевцова Ю.А.	350		
Шевченко А.С.	241		
Шелковникова В.Н.	28, 242		
Шептий В.В.	165		
Шестакова А.В.	116, 282		
Шестерикова Е.М.	70, 73		
Шестибратов К.А.	367		
Шестопалова Л.Б.	326		
Шестых В.А.	346		
Шехтман С.П.	98		
Шигалугова Е.Д.	351		
Шидловский Ю.В.	60, 72		
Шилова Е.В.	146		
Широков А.А.	39		
Широкова А.А.	98		
Шишпарёнок А.А.	371		
Шишпарёнок А.Н.	144		
Шлыков М.А.	153		
Шляпников М.Г.	191		
Шмакова Д.Е.	166		
Шмарев А.Н.	367		
Шнайдер Н.А.	287		
Шорохова И.А.	243		
Штиль А.А.	108		
Шухалова А.Г.	244		
		Щ	
		Щёголев С.Ю.	39
		Щеголева Е.В.	63
		Щербакова В.А.	211, 235
		Щербицкая А.Д.	54
		Щукина А.Д.	99
		Э	
		Эльдаров М.А.	34
		Эльдаров Ч.М.	350
		Ю	
		Южаков А.Г.	222
		Юзман А.К.	15, 100
		Юнеман О.А.	311
		Юринова Г.В.	193, 218
		Юрков А.П.	22
		Юсупов С.Р.	405
		Юсупова А.Ю.	406
		Юшков Б.Г.	324
		Я	
		Ядыкова Л.Л.	203, 237
		Яковлев А.В.	332
		Яковлева Д.В.	63
		Яковлева О.В.	332
		Яныкин Д.В.	414
		Ярулина Д.Р.	187
		Ярыгин Д.А.	193
		Яшкина Е.И.	140
		V	
		Valentina A. Gasca	137

Федеральный исследовательский центр
«Пушкинский научный центр биологических исследований
Российской академии наук»
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт белка Российской академии наук

Научное издание

Сборник тезисов

27-й Пушкинской школы-конференции молодых ученых
с международным участием

«БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА».

Материалы изданы в авторской редакции

Подписано в печать 18.04.2024. Формат 60×84/8
Усл. печ. л. 49,76

ФИЦ ПНЦБИ РАН, 2024