

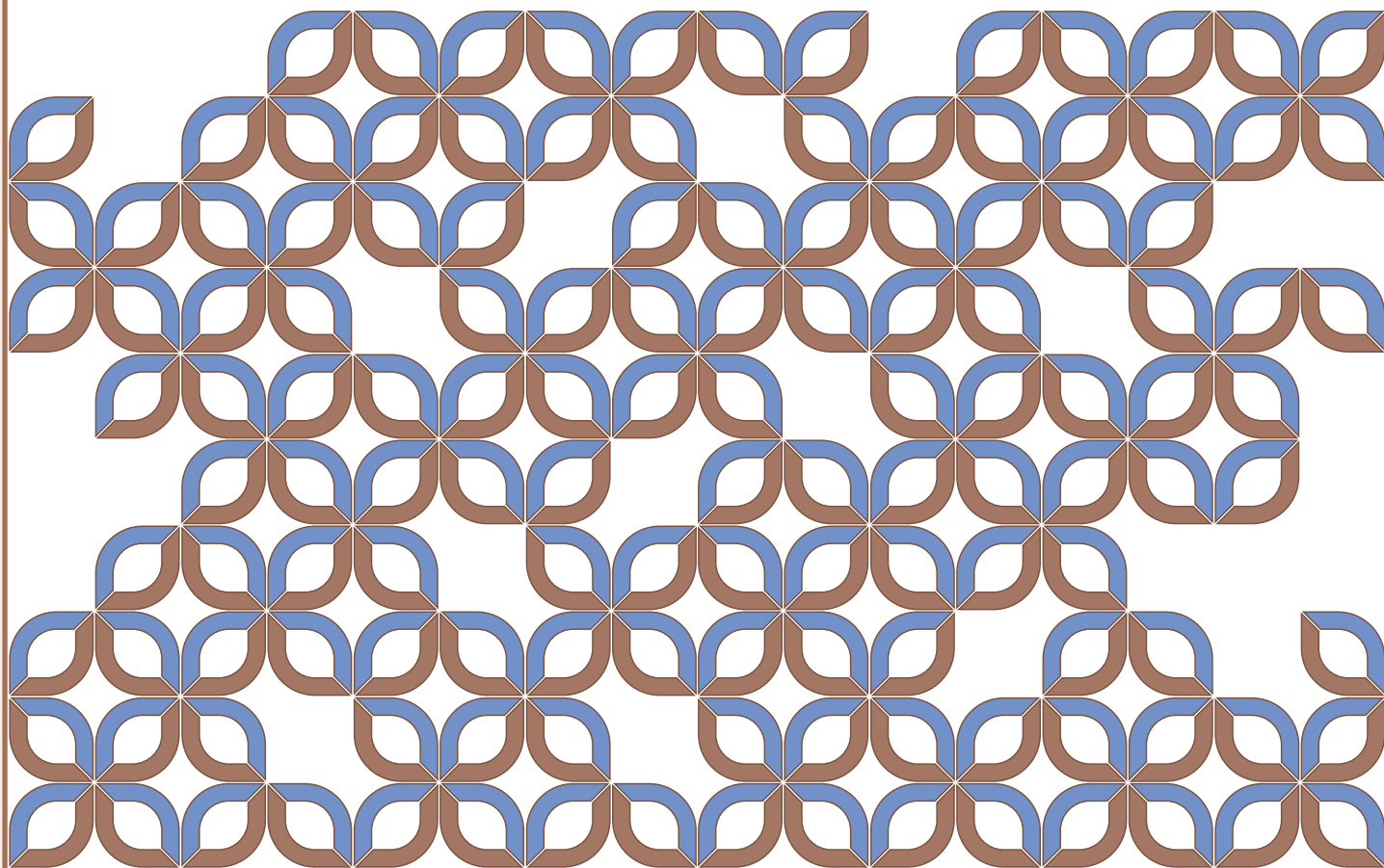


школа-конференция
МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ



БИОЛОГИЯ
наука XXI века

Сборник Тезисов



Пушино, 21-24 апреля 2025 г.

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

С23 Сборник тезисов 28-й Пушкинской школы-конференции молодых ученых с международным участием «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА».
Пушино: ФИЦ ПНЦБИ РАН, 2025. – 668 с.

С 21 по 24 апреля 2025 года в г. Пушкино проходила 28-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 404 докладов участников конференции по следующим направлениям:

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

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», 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

Секция 1 «МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ И БИОИНФОРМАТИКА»	4
Секция 2 «КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ»	157
Секция 3 «МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ»	229
Секция 4 «ФИЗИОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ И БИОМЕДИЦИНА»	383
Секция 5 «ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ ОРГАНИЗМОВ»	481
Секция 6 «ЭКОЛОГИЯ И ПОЧВОВЕДЕНИЕ»	517
Секция 8 «НЕЙРОБИОЛОГИЯ»	575
АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ	654

Секция 1

«МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ И БИОИНФОРМАТИКА»

РОЛЬ ДЫРОЧНО-ТРАНСПОРТНОГО МАТЕРИАЛА В ПЕРОВСКИТНЫХ СОЛНЕЧНЫХ ЭЛЕМЕНТАХ: МЕТА-АНАЛИЗ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ МЕТОДАМИ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ

Агафонова Е.Е., Красников Д.В., Насибулин А.Г.

Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

ekaterina.agafonova@skol.tech

Интеграция методов машинного обучения (МО) в хемоинформатику стала катализатором революционных достижений в области молекулярного дизайна, в частности, в сфере открытия лекарств и биологических систем [1]. Общее свойство всех органических соединений – настраиваемость их свойств в широком диапазоне в соответствии с химическими составом и структурой – бросает вызов комбинаторным методам и требует рационального подхода к отбору соединений. Несмотря на некоторые терминологические различия, граница между «малыми молекулами» в биологии и гибкой электронике с точки зрения хемоинформатики перестаёт быть чёткой.

В нашей работе мы решаем задачу предсказания эффективности перовскитной солнечной ячейки (ПСЯ) по химической структуре дырочно-транспортного материала (ДТМ). В последние несколько лет использование методологий МО для исследования влияния ДТМ на базе малых молекул на эффективность ПСЯ набирает популярность [2]. Cueto *et al.*[3] проанализировали данные о 280 ПСЯ, дав представление о взаимодействии ДТМ с перовскитными поглотителями различного элементного состава в контексте различных геометрий. В работе Saqib *et al.*[4] внимание уделено электронным свойствам малых молекул, представлена модель для предсказания энергии реорганизации структуры ($R^2=0.89$). 30 структур малых молекул было предложено на базе высокопроизводительного скрининга и отбора из созданного *de novo* обширного набора структурных данных о ДТМ (10000 строк). Кроме того, Abdella *et al.*[5] применили методологию autoQSPR в пакете Schrodinger Suite для проведения исследований *in silico*, успешно предсказав фотоэлектрические свойства ПСЯ со среднеквадратической ошибкой (RMSE) приблизительно 3%. Тем не менее, нам представляется, что всесторонний статистический анализ результатов кросс-лабораторных экспериментов относительно влияния ДТМ, ориентированных на производительность *n-i-p* ПСЯ с использованием методов машинного обучения, на данный момент отсутствует.

В данной работе мы построили прогностическую модель на базе набора данных в 368 строк, полученного из 180 рецензируемых научных статей. Этот массив экспериментальных данных позволяет количественно оценить влияние ДТМ на производительность устройства как $\pm 5\%$ в приближении логнормального распределения. Более того, мы показали, что использование машинного обучения могло бы сократить этот разброс (RMSE) до $\pm 2\%$. Ожидается, что описанные методы будут полезны для предварительной оценки эффективности ДТМ в конечном ПСЯ и внесут вклад в развитие молекулярного дизайна структур для носимой электроники.

Литература.

- [1] A.U. Rehman et al., “Role of artificial intelligence in revolutionizing drug discovery,” *Fundamental Research*, May 2024, doi: 10.1016/j.fmre.2024.04.021.
- [2] R.M. El-Shishtawy and N. ElShishtawy, “Perovskite solar cells: Organic-based molecules for electron and hole transport materials with machine learning insights,” *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, vol. 74, p. 101848, Aug. 2024, doi: 10.1016/j.cocis.2024.101848.
- [3] M. Del Cueto, C. Rawski-Furman, J. Aragón, E. Ortí, and A. Troisi, “Data-Driven analysis of Hole-Transporting materials for perovskite solar cells performance,” *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 126, no. 31, pp. 13053–13061, Jul. 2022, doi: 10.1021/acs.jpcc.2c04725.
- [4] M. Saqib et al., “Machine learning assisted designing of hole-transporting materials for high performance perovskite solar cells,” *Chemical Physics*, vol. 589, p. 112515, Nov. 2024, doi: 10.1016/j.chemphys.2024.112515.
- [5] I.M. Abdellah and A. El-Shafei, “A machine learning approach for In-Silico prediction of photovoltaic properties of perovskite solar cells based on Dopant-Free Hole-Transporting materials,” *New Journal of Chemistry*, Jan. 2024, doi: 10.1039/d4nj03777d.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ГИПУЗИНИРОВАНИЯ У *CANDIDA ALBICANS*:
ВЫДЕЛЕНИЕ, МУТАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
ДЕЗОКСИГИПУЗИНСИНТАЗЫ

Агбоигба Э.Э.К.^{1,2}, Юсупова А.Ф.^{1,2}, Усачев К.С.¹, Валидов Ш.З.¹

¹ФИЦ «Казанский научный центр РАН», Казань, Россия

²Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

kouranelvis@gmail.com

Candida albicans (*C. albicans*) – условно-патогенный грибковый микроорганизм, способный вызывать широкий спектр слизистых и системных инфекций, особенно у пациентов с ослабленным иммунитетом. Инвазивные кандидозы, часто возникающие в результате распространения патогенных форм гриба, представляют серьезную угрозу для здоровья и жизни, особенно в условиях внутрибольничных инфекций и у пациентов с иммунодефицитами. Несмотря на значительный прогресс в диагностике и лечении, количество эффективных противогрибковых препаратов остается ограниченным, а их применение часто сопровождается токсичными побочными эффектами и развитием устойчивости у патогена. Это связано с филогенетической близостью грибковых патогенов к человеку, что затрудняет поиск селективных мишеней для терапии. Одним из перспективных подходов к разработке новых противогрибковых препаратов является нацеливание на процесс гипузинирования – уникальной посттрансляционной модификации эукариотического фактора трансляции eIF5A, необходимой для его функциональности. Гипузинирование катализируется ферментами дезоксиhipузинсинтазой (DHS) и дезоксиhipузингидроксилазой (DONH), что делает их потенциальными мишенями для ингибирования.

В данной работе исследовали молекулярные механизмы гипузинирования у *C. albicans*, сосредоточившись на изучении ключевого фермента этого процесса – DHS. Для этого проведено выделение и очистка DHS с использованием гетерологичной экспрессии в *E. coli* и методов аффинной хроматографии. Сравнение аминокислотных последовательностей DHS *C. albicans* и человека выявило консервативные участки, включая ключевые аминокислотные остатки, предположительно участвующие в связывании кофакторов (NAD и спермидина) и каталитической активности. Для проверки функциональной роли этих остатков проведен сайт-направленный мутагенез с заменой аминокислот. Активность мутантных форм DHS оценивалась *in vitro* с помощью ферментативной реакции, основанной на измерении образования NADH (продукта реакции гипузинирования) при длине волны 340 нм. Результаты показали, что замена ключевых остатков приводит к значительному снижению каталитической активности DHS, что подтверждает их критическую роль в функционировании фермента, а именно, участие в связывании кофакторов и стабилизации активного центра.

Полученные данные демонстрируют, что ключевые аминокислотные остатки DHS *C. albicans* являются перспективными мишенями для разработки селективных ингибиторов. Это открывает новые возможности для создания противогрибковых препаратов, направленных на подавление гипузинирования – уникального процесса, необходимого для жизнедеятельности патогена.

Работа поддержана грантом № 20-65-47031.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ПЕРВИЧНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АКТИВНОСТИ НУКЛЕАЗЫ,
АССОЦИИРОВАННОЙ С БЕЛКОМ-АРГОНАВТОМ ИЗ МЕЗОФИЛЬНОЙ БАКТЕРИИ

Алиева М.К., Лисицкая Л.А., Гельфенбейн Д.М., Кульбачинский А.В.

Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

maya.alieva.sci@gmail.com

Белки-Аргонавты широко известны как ключевой компонент РНК-интерференции в эукариотических клетках, однако у некоторых бактерий и архей также обнаружены подобные белки. Считается, что прокариотические белки-Аргонавты участвуют в иммунном ответе клетки, защищая её от чужеродных нуклеиновых кислот – бактериофагов и плазмид. Механизм их действия основан на связывании короткой нуклеиновой кислоты-гида и последующем распознавании комплементарной молекулы-мишени. В случае наличия в Аргонавте активного центра, мишень разрезается непосредственно белком-Аргонавтом. Большинство исследованных активных прокариотических белков-Аргонавтов связывают ДНК-гид для расщепления ДНК-мишени, но недавно обнаружены белки, использующие ДНК-гид для разрезания РНК-мишени, исследуемые в данной работе. В одном опероне со многими белками-Аргонавтами закодированы белки-партнеры, содержащие различные эффекторные домены, которые потенциально могут взаимодействовать с белком-Аргонавтом и участвовать в иммунном ответе. Такие партнеры обнаружены и для белков исследуемой группы: в одном опероне с этими Аргонавтами закодированы нуклеазы семейства PD-(D/E)XK с Cas4-подобным доменом. Активность этих белков и их роль в иммунном ответе на данный момент не изучены.

В данной работе мы впервые получили препарат комплекса длинного активного белка-Аргонавта с ассоциированной нуклеазой из мезофильной бактерии при экспрессии в клетках *Escherichia coli*. Также был выделен комплекс с каталитически неактивным мутантом нуклеазы-партнера. Мы выяснили, что нуклеаза проявляет ДНКазную активность на одноцепочечных ДНК-субстратах (оцДНК) и обладает преимущественно 3'-5' экзонуклеазой ферментативной активностью. Было обнаружено изменение эффективности расщепления оцДНК-субстратов в зависимости от их длины и нуклеотидного состава. Это указывает на возможное предпочтение нуклеазы к определенной структуре и нуклеотидным мотивам. Дальнейшее исследование выделенного комплекса белков поможет выяснить механизм активации белка-Аргонавта и ассоциированной нуклеазы в клетках бактерий и роль этого комплекса в антифаговой защите или в регуляции экспрессии генов.

Работа поддержана грантом РФФ № 22-14-00182.

ПОЛУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ, КОДИРУЮЩИХ ФАКТОРЫ
ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ eIF4G И eIF4G(ISO) *SOLANUM TUBEROSUM*

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

¹Институт белка РАН, Пушино, Россия

²Пушинский филиал федерального государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего образования «Российский биотехнологический университет
(РОСБИОТЕХ), Пушино, Россия

vvlad.andr@gmail.com

Эукариотический фактор инициации трансляции eIF4G входит в состав eIF4F комплекса. Он выступает в роли платформы, которая имеет сайты связывания с eIF4E, eIF4A, eIF4EB, PABP и мРНК, тем самым обеспечивая сборку функционально зрелого инициаторного комплекса. Однако до сих пор практически нет данных о структурной организации данного фактора, за исключением структурных данных о доменах MIF4G, MA3, W2 и 4E-связывающего мотива. В основном эти данные представлены для таких организмов как *Homo sapiens*, *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio* и других модельных объектов. Для растений же структурные данные имеются только для комплекса eIF4E-4E связывающего мотива eIF4G. Отсутствие данных о строении полноразмерного eIF4G объясняются, во-первых, его большим молекулярным весом, а во-вторых, сложностью его получения в бактериальной системе. Однако необходимость изучения структурной организации растительных факторов инициации трансляции обусловлена не только отсутствием данных, но и тем, что они могут быть потенциальными мишенями для создания вирусоустойчивых растений. Это обусловлено тем, что возбудители различных вирусных инфекций способны использовать факторы инициации трансляции хозяина для синтеза собственных белков.

В нашей работе представлены результаты по сборке генетических конструкций для наработки факторов инициации трансляции eIF4G и eIF4G(iso) *Solanum tuberosum* и их функциональных доменов. Оптимизирована методика по сборке конструкции с помощью ПЦР амплификации нескольких фрагментов с дальнейшим использованием метода IVA. Для химической трансформации использовались высоко компетентные марганцевые и кальциевые клетки XL1-Blue. В ходе работы выявлено, что плазмиды, несущие последовательность генов функциональных доменов и eIF4G(iso), подавляют рост бактериальных клеток. Во избежание этого эффекта необходимо присутствие в питательной среде 0,2 % глюкозы.

Все полученные конструкции были проверены с помощью секвенирования.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда: грант № 24-44-04007.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОВ БИОСИНТЕЗА МЕЛАТОНИНА *SNAT1* И *SNAT2* У ЧЕСНОКА *ALLIUM SATIVUM* L.

Анисимова О.К.

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

lelikanis@yandex.ru

Мелатонин (N-ацетил-5-метокситриптамин) является индоламиновым вторичным метаболитом, выполняющим множество функций как у животных, так и у растений. У растений мелатонин, в первую очередь, рассматривается в качестве антиоксиданта из-за участия в контроле активных форм кислорода (ROS) и азота (RNS), а также других свободных радикалов, в связи с чем напрямую связан с защитой растений от биотических и абиотических стрессов. Кроме того, растительный мелатонин, являясь фитогормоном, участвует во многих физиологических процессах. Непосредственным предшественником мелатонина является N-ацетилсеротонин, реакция образования которого является ключевым этапом метаболического пути и катализируется серотонин-N-ацетилтрансферазой (SNAT). Целью данной работы стала идентификация и структурно-функциональная характеристика генов *SNAT* у чеснока *A. sativum*.

В геномных данных чеснока *A. sativum* сорта Ershuizao нами был проведен поиск генов SNAT. Было впервые идентифицировано два гена-гомолога – *AsSNAT1* и *AsSNAT2*, локализованные на хромосомах 2 и 4, соответственно. Анализ экзон-интронной структуры показал, что ген *AsSNAT2* состоит из одного экзона, тогда как *AsSNAT1* – из семи, хотя для большинства покрытосеменных растений данный ген является восьмиэкзонным.

Были проанализированы белковые последовательности *AsSNAT1* и *AsSNAT2* и определены основные физико-химические параметры и возможная клеточная локализация белков *AsSNAT*. Дальнейший анализ аминокислотных последовательностей выявил в обоих белках наличие полных последовательностей активного домена NAT_SF (cd04301), а также семи консервативных мотивов, три из которых являются общими для *AsSNAT1* и *AsSNAT2*.

Программа PANNZER по предсказанию биологических и молекулярных функций белков подтвердила, что и *AsSNAT1*, и *AsSNAT2* вовлечены в процесс биосинтеза мелатонина (GO:0030187) и обладают N-ацетилтрансферазной активностью (GO:0008080).

В промоторных областях генов (2000 пн) *AsSNAT* был проведен поиск *cis*-действующих регуляторных элементов, в результате которого выявлены сайты, связанные с ответными реакциями на действие различных фитогормонов и стрессовых факторов; при этом, промотор гена *AsSNAT2* был более насыщен *cis*-элементами, чем *AsSNAT1*.

Анализ транскриптомных данных *A. sativum* сорта Ershuizao показал, что ген *AsSNAT1* экспрессируется во всех анализируемых органах чеснока (корни, листья, псевдостебель, цветки, почки и луковицы разных стадий развития), тогда как экспрессия *AsSNAT2* не детектирована в луковицах (за исключением следовых количеств в двух из восьми стадий развития) и корнях. В целом, активность *AsSNAT2* в разных органах была гораздо ниже таковой *AsSNAT1*. Максимальные уровни экспрессии обоих генов были обнаружены в проростках и листьях чеснока.

Работа поддержана грантом РНФ № 25-26-00074 и Министерством науки и высшего образования РФ.

ИЗУЧЕНИЕ СПЕКТРА ПРОМОТОРОВ *TALAROMYCES CELLULOLYTICUS*,
ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ РАЗНЫЙ УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ЦЕЛЕВЫХ ГЕНОВ

Апаркина Д.Г., Орленева А.П., Ямпольская Т.А.

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

Darya_Aparkina@agri.ru

Мицелиальный гриб *Talaromyces cellulolyticus*, ранее известный как *Acremonium cellulolyticus* (в некоторых публикациях можно встретить название *Talaromyces pinophilus*), в настоящее время активно изучается как промышленный микроорганизм, способный эффективно перерабатывать лигноцеллюлозные субстраты в моносахара. Для дальнейшего исследования метаболизма и промышленного применения *T. cellulolyticus* необходима разработка удобного генно-инженерного инструментария. В частности, представляется важным иметь библиотеку промоторов, способных обеспечивать необходимый уровень экспрессии целевых генов в различных условиях культивирования клеток (на разных источниках углерода).

С целью создания такой библиотеки в данной работе была исследована сила ряда промоторов *T. cellulolyticus*. Важным инструментом для изучения регуляции экспрессии генов является репортерный ген, кодирующий белок с легко измеряемой активностью. Ранее нами было показано, что в качестве репортерного гена при работе с *T. cellulolyticus* удобно использовать ген *lacA*, кодирующий β-галактозидазу. В хромосоме *T. cellulolyticus* нативный промотор гена *lacA* был заменен с помощью метода «Split-Marker» рекомбинации на промоторы генов *cbh1*, *tef*, *gpdA*, *pki*, *act*, *mbfA*. Полученные штаммы культивировали в полноценной среде PD, а также на минимальной среде с добавлением глюкозы или целлюлозы, после чего измеряли β-галактозидазную активность, позволяющую судить об уровне экспрессии *lacA*.

Показано, что при росте на полноценной и минимальной среде сила исследуемых промоторов менялась в сторону уменьшения в ряду *Ptef* – *PgpdA* – *Ppki* – *PmbfA* – *Pact*. *Ptef* продемонстрировал наиболее высокий уровень экспрессии гена *lacA* на всех средах, включая среду с целлюлозой (Avicel), обеспечивая при этом конститутивную экспрессию.

Таким образом, выявлена линейка промоторов разной силы, что позволяет осуществлять контроль экспрессии целевых генов *T. cellulolyticus* на определенном уровне при культивировании на различных средах.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОМОТОРА ГЕНА *GSPT2*

Асадуллин А.Ф.¹, Бондарев С.А.^{1,2}, Журавлева Г.А.^{1,2}

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

²Лаборатория биологии амилоидов, Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия

asadullin@aptyp.ru

Ген *GSPT2*, кодирующий один из факторов терминации трансляции у млекопитающих, возник в результате ретропозиции гена *GSPT1* и демонстрирует тканеспецифическую экспрессию, преимущественно в мозге и семенниках. При этом все еще остается открытым вопрос о возникновении промотора этого гена и его регуляции. Мы провели биоинформатический поиск сайтов связывания транскрипционных факторов (ТФ) на участках длиной 4000 п.н. (3000 п.н. перед геном и 1000 п.н. после начала генов *GSPT1* и *GSPT2*) с использованием базы данных JASPAR2024 и пакета TFBSTools. В результате были обнаружены сотни подобных сайтов, большинство из которых общие для *GSPT1* и *GSPT2*, что согласуется с гипотезой о ретропозиции *GSPT2*. При этом были выявлены уникальные ТФ для *GSPT2*, такие как BARHL2, RHOXF1 и LHX9, наличие которых может объяснять тканеспецифичную экспрессию этого гена. Мы также обнаружили в промоторной области *GSPT2* несколько скоплений сайтов ТФ, при этом их распределение оказалось сходным для обоих генов. В отличие от данных 2006 года, где предполагалось, что промотор *GSPT2* ограничен коротким участком вблизи кодирующей последовательности, мы также обнаружили скопления сайтов ТФ на большем расстоянии от гена. Это позволяет предположить, что в процессе ретропозиции был перенесён более крупный участок. Таким образом, исследование выявило потенциальные участки связывания ТФ в промоторной области *GSPT2*, которые могут определять его тканеспецифическую экспрессию.

С целью дополнительной проверки гипотезы о ретропозиции гена *GSPT1* у общего предка плацентарных млекопитающих, мы проанализировали блоки синтении на X хромосоме 12 видов млекопитающих. Для идентификации таких блоков был использован инструмент MCSanX. В результате мы убедились, что у представителей разных отрядов плацентарных млекопитающих *GSPT2* расположен в одних и тех же блоках синтении. Это дает большую уверенность в том, что ретропозиция произошла единожды в эволюции.

Работа поддержана грантом РНФ № 23-14-00063.

РАЗРАБОТКА ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ АФФИННЫХ СОРБЕНТОВ НА
ОСНОВЕ СИСТЕМЫ SPYCATCHER-SPYTAG НА ПРИМЕРЕ СОРБЕНТА С БЕЛКОМ А

Баскова М.В.^{1,2}, Телепенина К.П.², Терешин М.Н.^{1,2}, Мелихова Т.Д.², Степаненко В.Н.²

¹ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет, Институт тонких
химических технологий им. Ломоносова, Москва, Россия

²Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова,
Институт трансляционной медицины и биотехнологии, Москва, Россия

milena.baskova@yandex.ru

Аффинные сорбенты с иммобилизованным рекомбинантным белком А широко используются для очистки иммуноглобулинов класса G (IgG). В данном исследовании показан эффективный альтернативный химическому синтезу подход: биокаталитическая иммобилизация белка А на полимерной матрице с помощью фермента сортаза А, а также повышение ёмкости сорбента за счет увеличения повторов доменов Б белка А (BDPA) с помощью системы конъюгации SpyCatcher-SpyTag.

Система биоконъюгации SpyCatcher-SpyTag основана на специфическом взаимодействии между белком SpyCatcher и пептидом SpyTag, полученных при расщеплении белка, связывающего фибронектин *Streptococcus pyogenes*. Это взаимодействие приводит к образованию ковалентной связи между лизином в SpyCatcher и аспаратом в SpyTag, формируя стабильный конъюгат. Благодаря встраиванию аминокислотных последовательностей SpyTag или SpyCatcher на обоих концах белковой цепочки, становится возможным создание белковых полимеров.

В данной работе аминокислотная последовательность одного из используемых гибридных белков включает в себя один домен Б белка А *Staphylococcus aureus*, последовательность SpyCatcher и сайт распознавания сортазы А – LPETG (BDPA-SpyCatcher). Аминокислотную последовательность другого составили четыре последовательности домена Б белка А и SpyTag (4BDPA-SpyTag).

Гибридный белок BDPA-SpyCatcher был выделен с помощью аффинной хроматографии на сорбенте Ni-ИМАС с выходом 1,8 г белка с 1 л культуры *Escherichia coli* и его электрофоретическая чистота составила не менее 95%. Другой гибридный белок 4BDPA-SpyTag был выделен с помощью двух последовательных ионообменных хроматографий: на DEAE sepharose (на пропуск) и на Q sepharose. Выход белка составил 1,2 г с 1 л культуры с электрофоретической чистотой не менее 95%. После очистки растворы гибридных белков были обессолены с помощью диализа.

Иммобилизация BDPA-SpyCatcher проводилась на полимерную матрицу UniGel-65NH₂ (Китай), содержащую свободные аминогруппы, с использованием фермента сортаза А. Динамическую связывающую способность (DBC₁₀) полученного сорбента при времени контакта (RT) 6 минут оценивали при помощи рекомбинантных моноклональных антител. У

полученного сорбента с лигандом, содержащим один BDPA DBC10 при RT6 составила 13 мг/мл.

Биоконъюгация белка 4BDPA-SpyTag с иммобилизованным BDPA-SpyCatcher проводилась в течение часа при комнатной температуре в буфере 50 мМ Tris pH 8. В результате был получен сорбент с DBC10 36 мг/мл при RT6.

В результате проведенных исследований была разработана платформа для получения аффинных сорбентов на основе системы SpyCatcher-SpyTag. Используя данный способ, был получен аффинный сорбент на основе белка А с повышенной динамической емкостью, содержащий пять повторностей BDPA, что показывает эффективность данного подхода.

БЕЛКИ WNT В ОПУХОЛЕВОМ МИКРООКРУЖЕНИИ КАК ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ПРИ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЕ

**Белик Л.А.^{1,2}, Остромышенский Д.И.¹, Семенова Н.Ю.²,
Мартынкевич И.С.², Енукашвили Н.И.^{1,2}**

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

²НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА, Санкт-Петербург, Россия

l.a.belik@list.ru

Лечение множественной миеломы (ММ), одного из наиболее распространенных гемобластозов, существенно затруднено из-за влияния опухолевой ниши, которая поддерживает функционирование раковых клеток. Взаимодействие с клетками ММ (трансформированными плазматическими клетками, ПК) приводит к изменению гемопоэтической ниши костного мозга, включая мезенхимные стромальные клетки (МСК), что является одной из причин рецидивов. В контактирующих с опухолевыми клетками МСК изменяется характер экспрессии семейства WNT. Цель работы – выявление среди белков семейства WNT потенциальных маркеров, анализ экспрессии которых позволил бы оценивать наличие опухолевых изменений в гемопоэтической нише и прогнозировать ответ на лечение.

Методами биоинформатики проанализировали опубликованные риды секвенирования ПК здорового костного мозга и ПК при ММ и сходных миелопролиферативных нарушениях. Данные *in silico* проверили *in vitro* на культивируемых МСК, полученных из костного мозга пациентов с ММ – методом кПЦР оценивали в них транскрипцию генов WNT и гена CTNNB1 (кодирует β-катенин, внутриклеточный компонент канонических каскадов WNT). Дальнейшие исследования проводили методом иммуногистохимии (ИГХ) с антителами к белкам, для которых *in silico* была показана дифференциальная экспрессия. ИГХ-анализ проводили на трепанобиоптатах пациентов с ММ (при наличии информированного согласия и разрешения ЛЭК), разделённых на группы: не получавшие терапию, без ответа на терапию, с частичным или полным ответом на терапию. Для определения типов клеток, в которых находились белки, проводили мультиплексное иммунофлуоресцентное окрашивание методом TSA (Acoya): МСК идентифицировали, используя антитела к альфа-гладкомышечному актину, ПК – антитела к CD138.

Анализ транскриптомов выявил дифференциальную экспрессию генов WNT5A, WNT10B и CTNNB1; их, а также ген WNT3A выбрали для дальнейших экспериментов. Определение уровней мРНК в культурах МСК продемонстрировало различающиеся паттерны транскрипции у здоровых доноров и пациентов с разным ответом на лечение от ММ. Наибольшие различия наблюдались для генов CTNNB1, WNT3, WNT3A, WNT5A, WNT8B, WNT10B. По результатам ИГХ-анализа трепанобиоптатов обнаружили повышенные количества белков WNT3A и WNT10B у пациентов с ММ, а также β-катенина у пациентов, ответивших на терапию. Мультиплексное окрашивание позволило определить, что белки WNT5A и WNT10B преимущественно находились в ПК, тогда как WNT3A и β-катенин можно было обнаружить приблизительно в равной степени как в ПК, так и в МСК. Таким образом,

уровни экспрессии белков, задействованных в каскадах WNT, отличались в костном мозге, поражённом ММ, по сравнению со здоровым костным мозгом. При этом, белки обнаруживали как в опухолевых клетках (ПК), так и в клетках гемопоэтической ниши, в том числе в МСК. Полученные данные дают основание предположить, что экспрессия белков WNT может служить индикатором, свидетельствующим о состоянии опухолевой ниши в костном мозге.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФМБА России (тема № 224012900581-4).

КСЕНОПРИН, НОВЫЙ ИНГИБИТОР МЕТАЛЛОПРОТЕАЗ ИЗ *XENORHABDUS NEMATOPHILA*: ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ

Бобровских Е.А.^{1,2}, Карасева М.А.¹

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

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

katya.cotik03@gmail.com

Протеолитические ферменты играют ключевую роль в жизнедеятельности всех организмов, участвуя в регуляции множества биологических процессов. Активность протеаз строго контролируется, поскольку неуправляемое расщепление пептидных связей может быть губительно для клетки. Одним из важных механизмов регуляции активности протеаз является использование эндогенных белковых ингибиторов. В ряде случаев в геномах бактерий гены селективных белковых ингибиторов обнаруживаются рядом с генами протеаз-мишеней, в том числе в составе одного оперона. Примером такой ассоциации являются протеализинподобные протеазы (ППП) и эмфориноподобные ингибиторы (ЭПИ). Однако в геномах бактерий из рода *Xenorhabdus* гены ППП соседствуют не с генами ЭПИ. На их месте расположены гены, которые кодируют гипотетические белки, демонстрирующие гомологию с пропептидами ППП. В лаборатории функциональной энзимологии НИЦ «Курчатовский институт» на основе клеток *Escherichia coli* был сконструирован рекомбинантный продуцент одного из таких белков – ксеноприна (Xin) из *Xenorhabdus nematophila*. Целью данного исследования стало получение Xin и характеристика механизма его действия.

Электрофоретически гомогенный препарат Xin был получен с использованием комбинации катионообменной и эксклюзионной хроматографий. Для анализа активности ингибитора использовали подход, основанный на оценке влияния различных концентраций Xin на гидролиз протеализином (Pln), прототипом ППП из *Serratia proteamaculans*, субстрата с внутренним тушением флуоресценции. Полученные результаты показали, что Xin высокоэффективно ингибирует Pln ($K_i = 10.1 \pm 0.5$ нМ) по неконкурентному механизму.

Выравнивание последовательностей Xin и пропептида Pln показало наличие у Xin ключевых остатков, важных для взаимодействия с каталитическим доменом Pln, а именно RPL-мотива (остатки 11-IPRYLL-17). Этот мотив представляет собой гидрофобный кластер из семи аминокислотных остатков консервативный для пропептидов ППП. При взаимодействии пропептида с каталитическим доменом фермента первые два остатка RPL-мотива занимают S1'-S2'-сайты субстрат-связывающей области протеазы, после чего на первом этапе процессинга предшественника ППП происходит автокаталитическое отщепление находящейся перед RPL-мотивом N-концевой области пропептида. В результате свободная α -аминогруппа первого аминокислотного остатка RPL-мотива формирует координационную связь с ионом цинка активного центра протеазы и вытесняет каталитическую молекулу воды, что приводит к подавлению активности фермента. Мы экспериментально подтвердили, что Pln способен ограниченно гидролизовать Xin. Учитывая этот факт, а также гомологию между Xin и пропептидом Pln, можно предположить, что

молекулярные механизмы ингибирования у Xip и пропептидов ППП схожи. Мы предполагаем, что N-концевая область Xip взаимодействует с субстрат-связывающей областью фермента, что приводит к гидролизу связи Ser10-Ile11 и освобождению α -аминогруппы Ile11, которая координирует ион цинка, вытесняя воду и подавляя активность фермента.

Таким образом, нами экспериментально продемонстрировано, что Xip является сильным неконкурентным ингибитором ППП, а также предложен молекулярный механизм его ингибиторного действия.

Работа выполнена в рамках государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ В ЦИБРИДНЫХ КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЯХ

Борисов Е.Е.¹, Омельченко А.В.², Косырева А.М.¹

¹Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына
ФГБНУ Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского,
Москва, Россия

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

borisovevgenij5@gmail.com

Введение. Мы изучаем вклад митохондриального генома в развитие атеросклероза, используя цибридные клеточные линии с идентичной ядерной ДНК и различными митохондриальными геномами, несущими атеросклероз-ассоциированные мутации, предполагая, что накопление этих мутаций индуцирует хроническое воспаление и окислительный стресс. Ранее мы обнаружили дефект митофагии (отсутствие реакции на модулятор митофагии FCCP) в некоторых цибридных линиях. В данной работе мы сравниваем генетические и биохимические характеристики двух цибридных линий, ТС-520 (дефектная митофагия) и ТС-522 (нормальная митофагия), для выявления связей между экспрессией митохондриальных генов, дефектностью митофагии, уровнем апоптоза и его регуляцией, а также с генерацией активных форм кислорода (АФК) митохондриями.

Материалы и методы. Транскриптом получали методом РНК-секвенирования на платформе Illumina NovaSeq 6000. Транскриптомный анализ включал использование пакетов hisat2, samtools, htseq-count и собственных скриптов на языке R. Для оценки содержания АФК в цитоплазме применяли проточную цитометрию (зонд H2DCFDA, цитометр CytoFLEX). Апоптоз анализировали двумя независимыми методами: количественным ПЦР в реальном времени (гены-маркеры *BID*, *BAX*, *BCL2*, *MCL1*) и проточной цитометрией (набор Annexin V-FITC/PI).

Результаты и обсуждение. В линии ТС-520 (дефектная митофагия) наблюдается сниженная экспрессия ряда генов по сравнению с линией ТС-522 (нормальная митофагия), что, возможно, и является причиной развития дефекта митофагии. Обе линии демонстрируют повышенную экспрессию митохондриальных генов по сравнению с ТНР-1, что можно рассматривать как компенсаторный механизм к накоплению митохондриальных мутаций. Исследование биохимических особенностей функционирования митохондрий выявило, что линия ТС-520 характеризуется повышенным уровнем АФК и нарушениями в регуляции внутреннего пути апоптоза.

Заключение. Дефект митофагии в линии ТС-520 связан с нарушениями экспрессии митохондриальных генов и ведет к увеличению генерации АФК и к нарушению регуляции апоптоза в стрессовых условиях. Полученные результаты указывают на важную роль митохондриального генома в поддержании клеточного гомеостаза и в выживаемости клеток в

норме и при стрессе, а также позволяют выдвинуть предположения о природе митохондриальной дисфункции.

Работа поддержана грантом РФФ № 24-65-00027.

Литература.

Batty M., Bennett M.R., Yu E. The Role of Oxidative Stress in Atherosclerosis // *Cells*. 2022. 3843.

Sazonova M.A., Sinyov V.V., et al. Creation of Cybrid Cultures Containing mtDNA Mutations m.12315G>A and m.1555G>A, Associated with Atherosclerosis // *Biomolecules*. 2019. 499.

Orekhov A.N., Borisov E.E., et al. Defective Mitophagy is Associated with Mitochondrial DNA Mutations // *Current Medicinal Chemistry*. 2025. in press.

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО CAS9V3

Борисова В.Д.¹, Улитин А.Б.², Головина В.Ю.³

¹ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет», Москва, Россия

²Институт биологического приборостроения РАН – обособленное подразделение ФИЦ
Пушкинский научный центр биологических исследований РАН, Пушино, Россия

³ООО «БИГБИОБЕНГ», Пушино, Россия

vasilinkab07@yandex.ru

В последние годы широкое применение нашла система генетического редактирования CRISPR-Cas, позволяющая вносить точные разрывы в ДНК с помощью направляющей РНК и нуклеазы Cas. Преимуществами данной системы являются ее эффективность и простота использования в сравнении с аналогами, такими как TALEN (эффektorные нуклеазы, подобные активатору транскрипции) и ZFN (нуклеазы цинковых пальцев). Среди нуклеаз семейства Cas наиболее охарактеризована и широко используется SpCas9 дикого типа (WT). Однако ее существенным недостатком является высокий уровень нецелевой нуклеазной активности.

Целью работы было получение варианта Cas9, имеющего высокую точность и эффективность редактирования целевого гена, подбор условий экспрессии и очистки фермента, сравнение целевой активности полученного варианта Cas9 с SpCas9 WT.

В ходе работы была выбрана нуклеаза HiFi Cas9 (высокоточный Cas9), несущая единственную точечную мутацию (R691A) в Cas9, существенно увеличивающую точность нокаута целевого гена. Нами был разработан и создан плазмидный вектор на основе HiFi Cas9 (Cas9V3), оптимизированный для эффективной экспрессии фермента в бактериях *E.coli*, подобраны штамм продуцент и условия экспрессии, обеспечивающие высокий выход рекомбинантного белка в растворимой форме, разработана схема очистки фермента на металл-хелатной аффинной и ионообменной хроматографии, обеспечивающая высокую чистоту Cas9 V3 от примесных белков и нуклеиновых кислот. А также отработан протокол создания и трансфекции Cas9 рибонуклеопротеидного (RNP) комплекса в клетки. Для получения протяженных делеций и проведения количественной оценки эффективности нокаута целевого гена были получены RNP комплексы с двумя направляющими РНК. В ходе эксперимента было протестировано несколько вариантов комбинаций направляющих РНК для выявления пары, способствующей наиболее эффективному нокауту гена.

Эффективность нокаута гена рецептора FLT3 (fms-подобной тирозинкиназы 3) полученным RNP-Cas9V3 была апробирована на линии моноцитарных клеток человека THP-1. В контрольном варианте после нокаута гена RNP-SpCas9 WT экспрессия FLT3 наблюдалась у 95.5 % клеток и отсутствовала у 4.5%. При нокауте гена RNP-Cas9V3 экспрессия FLT3 наблюдалась у 26.2 % клеток и отсутствовала у 73.8%.

Дальнейшая работа будет нацелена на совершенствование системы генетического редактирования на основе CRISPR-Cas9V3 RNP путем подбора трансфицирующих агентов и создания белковых модулей, специфично связывающих Cas9 фермент. В будущем эта система может быть применена для *in vitro* клеточных исследований, диагностики и терапии.

ОСОБЕННОСТИ РАЗРАБОТКИ И ОПТИМИЗАЦИИ МЕТИЛ-СПЕЦИФИЧНОЙ ПЦР ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ МЕТИЛИРОВАНИЯ НА ПРИМЕРЕ ГЕНА RELN

Буртовская М.И.^{1,2}, Карпова Н.С.¹, Нурбеков М.К.¹, Аршинова Е.С.¹

¹Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва, Россия

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

m.burtovskaya@gmail.com

Аберрантное метилирование ДНК – один из ключевых эпигенетических механизмов, вовлеченных в развитие целого ряда заболеваний. Например, при шизофрении обнаружено гиперметилирование промотора гена RELN. Анализ уровня метилирования часто проводят с помощью бисульфитного секвенирования, однако этот метод трудоемкий и малодоступен. Более простым, быстрым и относительно недорогим методом является метил-специфичная ПЦР (MSP). Метод основан на использовании двух наборов праймеров, специфичных к метилированным и неметилированным цитозинам, в бисульфит-конвертированной ДНК.

В рамках пилотного исследования с помощью бисульфитного секвенирования мы выявили гиперметилирование в некоторых локусах промотора гена RELN. Для их дальнейшего таргетного изучения мы разработали MSP тест-систему. Для целевого участка мы выбрали пары праймеров и температуру отжига с помощью ПО MethPrimer (v.1.0). Мы отобрали набор, соответствующий условиям: температуры плавления (T_m) праймеров $>55^\circ\text{C}$ с разницей в паре $<5^\circ\text{C}$, и каждая пара праймеров *In silico* PCR в ПО BiSearch образует один специфичный ампликон в целевой промоторной области гена RELN.

Согласно результатам MethPrimer (v.1.0), T_m праймеров для метилированных и неметилированных последовательностей значительно различались ($57-60^\circ\text{C}$ и $53-56^\circ\text{C}$, соответственно). ПЦР с усредненной температурой отжига праймеров 56°C продемонстрировала низкую специфичность. Электрофорез ампликонов в 3% агарозном геле показал, что целевой ампликон отсутствовал, наблюдались неспецифические продукты и димеры праймеров.

Мы предположили, что это может быть связано с рядом факторов. Для метил-специфичных праймеров стандартный 30-секундный отжиг слишком долгий, что увеличивает риск неспецифического образования праймер-димеров за счет увеличения вероятности взаимодействия с частично комплементарными последовательностями. Поэтому время отжига сократили до 20 секунд, компенсировав это увеличением числа циклов амплификации до 45. Это обеспечивает достаточную амплификацию целевых участков, несмотря на более короткое время отжига.

Для подбора оптимальной температуры отжига поставили градиентную MSP $54^\circ\text{C}-56^\circ\text{C}-58^\circ\text{C}-60^\circ\text{C}$ с метилированным стандартным ДНК и образцом с неметилированным целевым участком. Электрофорез ампликонов в 3% агарозном геле показал прямую связь

между температурой отжига и образованием специфичного продукта. Увеличение температуры также сократило образование димеров праймеров.

В результате при температуре отжига 60°C праймеры, специфичные к метилированию, дали один ампликон со стандартной ДНК, а праймеры, специфичные к неметилированию, – один ампликон с небольшим количеством димеров праймеров, что является допустимым при 45 циклах ПЦР. Подобранные условия позволяют проводить анализ метилирования промотора гена RELN с помощью ПЦР в реальном времени.

Работа выполнена в рамках гос. задания FGFU-2025-0007.

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ БИОСИНТЕЗА АНТОЦИАНОВ
В ЛИСТЯХ РАСТЕНИЙ *SOLANUM TUBEROSUM* ПРИ КРАТКОВРЕМЕННОМ
ХОЛОДОВОМ СТРЕССЕ

Быкова А.В.

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

kulakova_97@mail.ru

Как и все флавоноиды, антоцианы принимают активное участие в защите растения от стрессовых факторов, в том числе и при холодовом стрессе. Известно, что у картофеля могут синтезироваться все шесть антоцианов и в геноме *S.tuberosum* идентифицированы гены их биосинтеза. Однако влияние различных стрессов на уровень биосинтеза антоцианов у *S.tuberosum* определены не были. Поэтому целью работы стало изучение изменения содержания антоцианов и экспрессии кодирующих их генов в ответ на действие кратковременного холодового стресса (+3°C) в листьях двух сортов *S.tuberosum*, различающихся содержанием пигментов – зеленолистного Леди Клер и фиолетоволистного Гибрида 1.

Содержание антоцианов и уровень транскрипции определяли в условиях холодового стресса в листьях двух сортов картофеля в нескольких точках: 'к0' (контроль, 21°C), '6ч', '24ч', '48ч' (стресс, 3°C) и 'в12ч' (восстановление после стресса, 21°C).

Содержание антоцианов увеличивалось при холодовом стрессе у обоих сортов, однако динамика изменений отличалась. Так, в листьях сорта Леди Клер количество пигментов увеличивалось после 6 часов холодового стресса, затем несколько снижалось после 24 часов, и после 48 часов стресса снова увеличивалось, достигая максимума. У фиолетовоокрашенных листьев Гибрида 1 наблюдалось плавное увеличение содержания антоцианов к 24 часам стресса, а затем падение к 48 часам, но не ниже контрольного уровня.

Также был изучен паттерн экспрессии ключевых генов биосинтеза антоцианов, которые охватывают весь путь метаболизма (*StCHS2*, *StCHI*, *StF3H*, *StDFR*, *StANS*). Анализ экспрессии в листьях сорта Леди Клер показал увеличение транскрипции всех генов в условиях стресса. При этом наблюдался сходный паттерн экспрессии: спустя 6 часов стресса уровень транскрипции всех генов повышался в 2-5 раз, через 24 и 48 часов наблюдалось снижение транскрипции или достаточно резкое, как в случае генов *StCHS2* и *StDFR*, или плавное, как в случае генов *StCHI* и *StF3H*. В восстановительный период для генов *StCHS2*, *StCHI*, *StF3H* наблюдалось значительное (до 11 раз) увеличение транскрипции в сравнении контролем.

В случае с фиолетоволистными растениями Гибрида 1 отмечался гораздо более высокий уровень транскрипции всех генов, в 7,5-100 раз превышающий таковой в зеленых листьях сорта Леди Клер даже в отсутствии стресса. Паттерн экспрессии в богатых антоцианами листьях линии Гибрид 1 был сходен с таковым в листьях зеленолистного растения, но, в отличие от растений сорта Леди Клер, где наблюдался быстрый ответ через 6

часов стресса, в листьях Гибрида 1 максимальное (в 5 раз) увеличение экспрессии наблюдалось через 24 часа стресса.

Таким образом, впервые для *S. tuberosum* проведен анализ транскрипции 5 генов биосинтеза антоцианов в листьях при кратковременном холодовом стрессе. Показано, что в листьях картофеля, вне зависимости от количества содержащегося в них антоциана, стресс приводил к значительной активации транскрипции генов биосинтеза: через 6 часов (в случае зеленолистного растения) или через 24 часа (в случае фиолетоволистного растения) стресса уровень транскриптов повысился в 2-5 раз и затем через 48 часов стресса снижался. В обоих случаях выявлена корреляция между содержанием антоцианов и паттернами экспрессии генов их биосинтеза при кратковременном холодовом стрессе.

Работа поддержана ФНТП «Развитие селекции и семеноводства картофеля в РФ», рег. № 123071400015-8) и МОН РФ.

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДИК ТРАНСФОРМАЦИИ *PISUM SATIVUM*

Ванина А.А.¹, Творогова В.Е.¹, Симонова В.Ю.², Лутова Л.А.¹

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

²Научно-технологический университет «Сириус», Сочи, Россия

studentsashaspb@gmail.com

Трансформация растений является важным инструментом биотехнологии, позволяющим получать растения с заданными свойствами. Однако при трансформации гороха возникает ряд трудностей, таких как низкая эффективность трансформации и регенерации, зависящие от генотипа. Это затрудняет получение трансгенных растений и делает необходимым индивидуальный подбор условий.

Существующие протоколы трансформации зачастую разрабатывались для ограниченного набора генотипов и не всегда универсальны. Мы тестируем опубликованные протоколы трансформации на современных сортах гороха, используемых в России (*Мадрас* и *Ягуар*) с помощью маркеров *Ruby* и *GFP* для визуальной оценки эффективности трансформации и анализируем влияние различных факторов, таких как состав питательной среды, гормональные регуляторы и условия культивирования, на успех трансформации.

Кроме того, мы работаем над созданием протокола, который был бы эффективен для широкого спектра генотипов. Параллельно ведётся работа по созданию методики получения и детекции трансгенных тканей гороха, исследуется возможность применения новых генов-стимуляторов регенерации. В качестве модельного объекта нами используется бобовое растение *Medicago truncatula*.

Адаптация существующих протоколов на современных сортах дала частично успешные результаты, однако оптимальные условия всё ещё подбираются. Дальнейшие исследования направлены на поиск и тестирование генов-стимуляторов регенерации, что может значительно повысить эффективность трансформации.

Работа поддержана грантом РНФ № 24-26-20117.

КАРТИРОВАНИЕ ПРОТЕАЗОУСТОЙЧИВЫХ СТРУКТУР ДРОЖЖЕВОГО ПРИОНА RNQ1

Галлямов А.А.¹, Малухина А.Д.^{1,2}, Кушников В.В.¹

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

²Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

arturens96@gmail.com

Rnq1 – белок с неизвестной функцией, который образует один из наиболее изученных дрожжевых прионов [RNQ⁺], способствующий *de novo* возникновению других прионов. По биоинформатическим расчётам и экспериментальным данным Rnq1 имеет потенциальную прионогенную С-концевую область размером в 250 аминокислотных остатков, обогащённых глутамином и аспарагином (QN), из суммарно 405 остатков. Однако в нашей лаборатории было показано, что в протеазоустойчивую амилоидную структуру входят только последние 40 остатков. При этом, согласно ряду других работ, остальные участки QN-богатой области также важны для приона [RNQ⁺]. Аналогичная ситуация выявлена и в другом прионном белке Swi1, в котором из около 400 остатков QN-богатой области для прионных свойств необходимы и достаточны только первые 37. В этой работе, используя два варианта приона [RNQ⁺] дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, мы картировали протеазоустойчивые участки приона, образованного Rnq1 и различными модификациями его С-концевых укорочений. Расположение этих участков в большинстве случаев отличалось от компьютерных предсказаний и лучше всего коррелировало с высокой долей содержания QN.

С использованием системы хромосомного редактирования CRISPR/Cas9 мы создали ряд штаммов *Saccharomyces cerevisiae*, экспрессирующих укороченные с С-концевой области Rnq1. Во всех случаях, кроме укорочения до 392-ого остатка, оба варианта [RNQ⁺] после этого пропадали. Были получены *de novo* прионы, образованные некоторыми из вариантов укорочений Rnq1. Флуоресцентная микроскопия при сверхпродукции GFP, конъюгированного с последними 72 аминокислотными остатками Rnq1, показала отсутствие коагрегации с полноразмерным Rnq1. Это демонстрирует важную, но не исключительную роль терминального прионогенного домена Rnq1. В целом, результаты исследования говорят о сложном поведении [RNQ⁺] в сравнении с остальными дрожжевыми прионами, что может стать предметом дальнейшего изучения.

Кроме того, при хромосомной замене белка Rnq1 на гибридный белок Rnq1 с С-концевым слиянием GFP (Rnq1-GFP) прион [RNQ⁺] пропал. Исчезали терминальные протеазоустойчивые участки агрегатов, полученных сверхпродукцией Rnq1-GFP в сравнении с N-концевым слиянием GFP (GFP-Rnq1). Удалось получить *de novo* прион на основе Rnq1-GFP, но в нём также отсутствовал терминальный протеазоустойчивый участок. Паттерны агрегации, наблюдаемые с помощью флуоресцентной микроскопии при сверхпродукции Rnq1-GFP и GFP-Rnq1, существенно отличались. Всё это указывает на то, что Rnq1-GFP является некорректным инструментом при исследовании свойств приона [RNQ⁺]. В общих случаях следует размещать флуоресцентную метку с противоположной стороны от прионогенного домена.

Работа поддержана грантом РФФ №23-74-00062.

СПОСОБ ПЦР-ПДРФ-ГЕНОТИПИРОВАНИЯ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ПО SNP-МАРКЕРАМ ГЕНА *iNOS*

Гильманов Х.Х., Вафин Р.Р., Шастин П.Н.

Федеральный научный центр Всероссийский научно-исследовательский институт
экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН,
Москва, Россия

gilmanov.xx@mail.ru

Ген *iNOS* (*inducible nitric oxide synthase*), также известный как *NOS2* (*nitic oxide synthase 2*), является важным объектом исследования в области молекулярной генетики сельскохозяйственных животных. Этот ген, расположенный на 19-ой хромосоме крупного рогатого скота, кодирует фермент индуцибельную синтазу оксида азота, который играет ключевую роль в регуляции различных патофизиологических процессов, апоптоза и функционирования системы врожденного иммунитета. Исследование полиморфизма гена *iNOS* особенно актуально для изучения его связи с восприимчивостью к лейкозу крупного рогатого скота.

В данной работе были проведены исследования по картированию полиморфных сайтов рестрикции у шести однонуклеотидных полиморфизмов (SNP-маркеры *AH13-1*, *AH13-2*, *AH13-3*, *AH13-4*, *AH13-5* и *AH13-6*) гена *iNOS Bos taurus*. Были рассчитаны профили ПЦР-ПДРФ (полимеразная цепная реакция, совмещенная с полиморфизмом длин рестрикционных фрагментов) возможных генотипов, что позволило разработать способ генотипирования крупного рогатого скота по указанным маркерам. Метод ПЦР-ПДРФ является относительно простым и доступным способом определения генетического разнообразия, широко используемым в современной лабораторной практике.

Биоинформационный анализ депонированных нуклеотидных последовательностей гена *iNOS Bos taurus* выявил наличие двух новых SNP-маркеров (*AH13-5* и *AH13-6*) помимо четырех ранее описанных (*AH13-1*, *AH13-2*, *AH13-3*, *AH13-4*). Для анализа использовались последовательности *AF465168*, *LR962749* и *OX344708* из базы данных GenBank NCBI. На основе множественного выравнивания этих последовательностей была смоделирована смешанная последовательность, содержащая полиморфные позиции всех шести маркеров. Программное картирование рестрикционных сайтов было выполнено с помощью онлайн-программы NEBcutter V2.0.

Экспериментальная часть исследования включала выделение ДНК из проб цельной консервированной крови голштинизированного скота черно-пестрой породы, амплификацию локуса гена *iNOS* длиной 258 bp с использованием праймеров *iNOS-F* и *iNOS-R*, эндонуклеазное расщепление амплификатов и гель-электрофоретическую детекцию полученных фрагментов. Для детекции каждого маркера применялись специфические рестриктазы: *HinfI* (для *AH13-1* и *AH13-6*), *AspS9I* (для *AH13-2*), *HpyAV* (для *AH13-3*), *Sse9I* (для *AH13-4*) и *Bst4CI* (для *AH13-5*). В результате тестирования разработанного способа ПЦР-

ПДРФ-генотипирования крупного рогатого скота по SNP-маркерам гена *iNOS* были выявлены различные генотипы SNP-маркеров, включая комплексные генотипы *AH13-1/AH13-6*.

Результаты картирования полиморфных сайтов рестрикции у 6 SNP-маркеров гена *iNOS Bos taurus* (*AH13-1*, *AH13-2*, *AH13-3*, *AH13-4*, *AH13-5* и *AH13-6*) и расчета ПЦР-ПДРФ-профилей возможных генотипов подтвердили возможность их детекции. Экспериментальное тестирование разработанного способа генотипирования крупного рогатого скота с использованием 5 эндонуклеаз (*HinfI*, *AspS9I*, *HpyAV*, *Sse9I*, *Bst4CI*), преимущественно отечественного производства (за исключением *HpyAV*), показало его эффективность и позволило снизить себестоимость исследования.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-76-10011.

ПОЛИМОРФНЫЕ ВАРИАНТЫ ГЕНОВ CYP3A4 RS2740574 И CYP2D6 RS3892097 И
ТЯЖЕСТЬ ТЕЧЕНИЯ COVID-19

Градова Д.А., Иванова Е.С., Александрова А.А.

ФГАОУ ВО Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

gradova@sfedu.ru

Актуальность. Несмотря на то, что пандемия коронавируса больше не является мировой чрезвычайной угрозой в области здравоохранения, он все еще является угрозой жизни для тысяч людей (<https://data.who.int/dashboards/covid19/> – 15 марта 2025 г.). Полиморфизмы в генах цитохромов P450 могут влиять на тяжесть течения COVID-19 с помощью механизмов регуляции метаболизма лекарств, детоксикации ксенобиотиков и модуляции воспалительных процессов. Как наиболее распространенное семейство ферментов, метаболизирующих лекарственные препараты, CYP (Cytochrome P450) тесно связаны с метаболизмом эндогенных и экзогенных веществ. CYP могут влиять на патофизиологический процесс COVID-19. Более того, многие из препаратов, которые, применяют при лечении COVID-19, метаболизируются CYP. Поскольку экспрессия CYP может быть значительно изменена у пациентов с COVID-19, фармакокинетика препаратов также может различаться, а побочные эффекты, связанные с препаратами, могут усиливаться у этих пациентов (G.Wang et al., 2022).

Цель. Изучить ассоциацию полиморфных локусов генов CYP3A4 и CYP2D6 с тяжестью течения COVID-19.

Методы исследования. Материалом для исследования послужили образцы ДНК пациентов с COVID-19 жителей Ростовской области (n=87), из них: 41 образец пациентов с тяжелым течением COVID-19 и 46 - пациентов с легким течением заболевания. Группы исследования были классифицированы в соответствии с рекомендациями Министерства здравоохранения Российской Федерации. Пациентам проводились анкетирование и клиническое обследование. Тотальную геномную ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови методом термокоагуляции. Генотипирование включенных SNP осуществляли с помощью аллель-специфической ПЦР (RT-PCR). Для проведения ПЦР использовали прибор QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems, США).

Результаты. В результате проведенного исследования достоверных различий в частотах встречаемости полиморфных аллелей и генотипов у пациентов с легким и тяжелым течением COVID-19 выявлено не было. Частоты генотипов AA, AG, GG для гена CYP3A4 rs2740574 в исследуемой группе с легким течением составили 89,4%, 9,5% и 1,1%, в группе с тяжелым течением – 95,12%, 2,44% и 2,44% соответственно. Частоты генотипов CYP2D6 rs 3892097 GG и GA составили в группе с легким течением коронавирусного заболевания 71,74% и 28,26 %, в группе с тяжелым течением – 80,49% и 19,51%. Однако, анализ сопутствующих заболеваний показал, что пациенты с генотипом AA (rs2740574) с легкой формой инфекции имели меньшее число сопутствующих заболеваний, чем пациенты с тем же генотипом, но тяжелой формой течения COVID-19 (56% и 76 % соответственно). Наиболее часто

встречаемые нозологии у пациентов с легкой формой: артериальная гипертензия (15 %), хронический гастрит (12 %), патология щитовидной железы (7,3%). У пациентов с тяжелой формой: сердечно-сосудистая патология (артериальная гипертензия, ишемическая болезнь сердца, врожденный порок сердца) -56 %, сахарный диабет – 11 %, заболевания легких –9%, онкология-5%. При генотипе AG (rs2740574) и легкой формой инфекции (9% пациентов) сопутствующие хронические заболевания отсутствовали. Таким образом, было установлено, что генотип GG (rs2740574) гена CYP3A4 ассоциирован с тяжелым течением COVID-19 у пациентов с коморбидной патологией сердечно-сосудистых заболеваний.

Исследование выполнено в рамках госзадания Минобрнауки РФ № FENW-2023-0018.

ВЛИЯНИЕ КРАУДИНГ-АГЕНТОВ НА СТРУКТУРУ АГРЕГАТОВ
ОДОРАНТ-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА

**Гридасова К.Ж., Степаненко Ольга В., Сулацкий М.И., Сулацкая А.И.,
Михайлова Е.В., Степаненко Олеся В.**

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

krgridasova@yandex.ru

Образование и накопление в организме упорядоченных агрегатов белков в виде амилоидных фибрилл сопутствует различным патологиям, среди которых выделяют нейродегенеративные заболевания, системные и локальные амилоидозы. В ряде случаев переход амилоидогенных белков из растворимой в фибриллярную форму обладает биологической значимостью, но чаще является причиной утраты функциональной активности белка и сопряжён с патологиями. Объектом исследования в данной работе стал амилоидогенный одорант-связывающий белок (ОВР), способный формировать амилоидные фибриллы при физиологических температуре и pH. Процесс фибриллогенеза ОВР сопряжен с разрушением его функционального ядра, β -бочонка, что приводит к утрате способности белка связывать и транспортировать молекулы одоранта. Совокупность этих фактов позволила высказать предположение о взаимосвязи развития обонятельных дисфункций с фибриллогенезом ОВР. Для понимания того, как этот процесс может протекать в организме, необходимо провести анализ амилоидогенеза ОВР в условиях, имитирующих густонаселённую клеточную среду.

Условия молекулярного краудинга, имитирующие условия *in vivo*, *in vitro* моделируют с помощью синтетических полимеров. В настоящей работе мы проанализировали свойства агрегатов ОВР, формирующихся в присутствии синтетических полимеров, таких как декстран 40 и полиэтиленгликоль 8000 (ПЭГ-8000). Исследования были выполнены с использованием методов электронной микроскопии для визуализации агрегатов ОВР; спектроскопического анализа взаимодействия флуоресцентного красителя тиофлавина Т с анализируемыми агрегатами ОВР и метода равновесного микродиализа для пробоподготовки; кругового дихроизма в дальней УФ-области для анализа вторичной структуры агрегатов ОВР, а также колориметрического МТТ-теста для анализа цитотоксичности агрегатов ОВР. Было установлено, что агрегаты ОВР, полученные в присутствии декстрана 40, представляют собой аморфные агрегаты с участками фибриллярной морфологии, а агрегаты, полученные в присутствии ПЭГ-8000, морфологически сходны с амилоидными фибриллами. Кроме того, содержание бета-тяжей во вторичной структуре агрегатов ОВР, полученных в присутствии декстрана 40, меньше по сравнению с агрегатами, полученными в присутствии ПЭГ-8000. При связывании с агрегатами ОВР, полученными в присутствии декстрана 40, тиофлавин Т имеет меньшую величину квантового выхода флуоресценции и более коротковолновое положение спектра поглощения, чем краситель, добавленный к агрегатам ОВР, полученным в присутствии ПЭГ-8000. Также был выявлен более выраженный цитотоксический эффект на клетки эпителиоидной карциномы шейки матки HeLa ТК- агрегатов ОВР, полученных в

присутствии ПЭГ-8000, по сравнению с агрегатами, полученными в присутствии декстрана 40.

Полученные результаты позволили сделать вывод о том, что краудинг-агенты оказывают разное влияние на формирующиеся белковые агрегаты. В присутствии ПЭГ-8000 образуются агрегаты ОВР, сходные с амилоидами на основе этого белка. Свойства агрегатов ОВР, полученных при инкубировании в присутствии декстрана 40, позволили охарактеризовать их, как префибриллярные агрегаты с частично упакованными бета-тяжами. Ранее нами было показано, что такие агрегаты являются промежуточным состоянием, формирующимся в процессе фибриллогенеза ОВР. Полученные результаты являются важным шагом к пониманию механизмов развития патологических процессов в условиях, приближенных к условиям организма.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 24-24-00247).

БИОИНФОРМАТИЧЕСКОЕ ПРЕДСКАЗАНИЕ ПЛАЗМИД ШТАММА *STUTZERIMONAS STUTZERI* DIA-8 И ИХ ВЕРИФИКАЦИЯ МЕТОДОМ СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Гусманова Ю.Р.¹, Бабынин Э.В.^{1,2}

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

²ФИЦ Казанский научный центр РАН, Казань, Россия

ju.gusmanova@yandex.ru

Бактерии вида *Stutzerimonas stutzeri* известны своей способностью к денитрификации – процессу восстановления нитратов до азота, что играет важную роль в азотном цикле. Штамм *Stutzerimonas stutzeri* DIA-8 был ранее выделен из нефтезагрязненной почвы на территории Республики Татарстан. Согласно полученным данным анализа генома, штамм обладает важными экологическими функциями, включая деградацию ароматических соединений и синтез биосурфактантов, и является перспективным при создании биотехнологических препаратов для ремедиации загрязненных экосистем. Биоинформатическими методами нами была обнаружена плазмидная ДНК в геноме штамма *S. stutzeri* DIA-8. Результаты биоинформатического анализа, направленного на *in silico* идентификацию и характеристику плазмид в геномных последовательностях, требуют экспериментальной валидации, например, методом секвенирования.

С помощью инструмента plasmidSPAdes (Galaxy Version 3.15.5+galaxy2) было выявлено, что в геноме *S. stutzeri* DIA-8 содержится два участка плазмидной ДНК, которые разделены на контиги длиной 15543 и 2577 т.п.н. Для экспериментального подтверждения полученных данных проведено секвенирование по технологии Oxford Nanopore в биотехнологической компании Клонинг Фасилити (Москва). Плазмидную ДНК выделяли набором LumiSpin® PLASMID (ООО «Люмипроб РУС», Россия&ЕАЭС). Секвенирование образца выделенной плазмидной ДНК показало наличие двух плазмид в образце. Длина прочитанных плазмид составила 15416 и 2460 т.п.н., плазмиды были названы pSTD8-1 и pSTD8-2 соответственно.

Было проведено сравнение с гомологичными референсными последовательностями из базы NCBI GenBank. Анализ BLASTN позволил установить, что плаزمида pSTD8-1 обладает гомологией с плазмидой pPSEST01 штамма *S. stutzeri* RCH2, выделенного из загрязненных хромом почв в США. При анализе ДНК плазмиды pSTD8-2 была обнаружена высоко гомологичная плазмида pRGRH1809 (99% идентичности). Выявленная плазмида pRGRH1809 была ранее выделена из некультивируемого прокариотического организма, присутствующего в метабилеоме содержимого слепой кишки крысы *Rattus norvegicus*, обитающей в больничной канализационной системе в городе Копенгаген (Дания). Было проведено аннотирование с использованием Prokka 1.14.6 (Proksee 1.2.0). На плазмиде pSTD8-1 выявлено 20 белок-кодирующих последовательностей, среди них тирозиновая рекомбиназа *XerC*, транскрипционный регулятор *CsrA1* и транспозаза IS110 семейства ISWp13. Также обнаружен ген некодирующей РНК семейства *PrrB/RsmZ*. На плазмиде pSTD8-2 выявлено три гена с неизвестной функцией. Таким образом, полученные нами в результате биоинформатического предсказания данные о составе и характеристике плазмид были подтверждены независимо методом секвенирования плазмидной ДНК.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ ГИДРОЛИЗАТОВ КОЛЛАГЕНОВЫХ СТРУКТУР ПРЕСНОВОДНЫХ ГИДРОБИОНТОВ ПУТЁМ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ УЛЬТРАЗВУКА

Евдокимова Е.Я., Антипов С.С.

Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

ekaterinaevdokimova4964@gmail.com

Целью работы является получение гидролизатов, имеющих молекулярную массу ниже 10 кДа. В качестве сырья использовались дермальные покровы африканского сома (*Clarias gariepinus*) и коллаген, входящий в состав эмульсии, полученной из них. Выбор метода обуславливается тем, что ферментативный гидролиз имеет ряд преимуществ перед другими способами расщепления белков: сохранение целостности аминокислот, отсутствие необходимости в последующей очистке и др. Исходя из ранее полученных данных о гидролитической активности различных ферментов, для тестирования были выбраны пепсин и трипсин – эндопептидазы. В качестве альтернативного метода выступил гидролиз лимонной кислотой. Для повышения эффективности гидролиза каждая проба обрабатывалась ультразвуком

На сегодняшний день известно, что белковые фракции, присутствующие в дермальных покровах пресноводных гидробионтов имеют молекулярную массу преимущественно выше 100 кДа. Гидролиз коллагеновой эмульсии и дермальных покровов проводился совместно с обработкой ультразвуком при температуре 37°С и pH 7,4 в течение 6 часов. Эффективность расщепления оценивалась при помощи электрофоретического фракционирования в денатурирующих условиях в 12% ПААГ. Полученные данные свидетельствуют о том, что наибольшей ферментативной активностью обладает трипсин. Продукты гидролиза с его участием преимущественно имели молекулярную массу менее 14кДа, в то время как на электрофореграммах гидролизатов, полученных при помощи пепсина и лимонной кислоты, в основном присутствуют белковые фракции молекулярной массы свыше 14кДа. Пробы, обрабатываемые только ультразвуком без внесения фермента, также не дали результата, удовлетворяющего условиям.

Таким образом было доказано, что коллагеновые белки могут быть гидролизованы не только с использованием высокоочищенной коллагеназы, но и с помощью других ферментов, однако в таком случае полностью избавиться от примесей белков высокой молекулярной массы на данный момент не удаётся, поэтому в дальнейшем стоит сконцентрировать внимание на оптимизации условий проведения гидролиза, что позволит разработать технологию получения высокоэффективного биологически-совместимого продукта пищевого и косметологического назначения.

Список сокращений. кДа – килодальтон; ПААГ – полиакриламидный гель.

NMDA УВЕЛИЧИВАЕТ ЭКСПРЕССИЮ *NOS1AP* В КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ SH-SY5Y

Жданова М.И.¹, Бондарев С.А.^{1,2}, Журавлева Г.А.^{1,2}

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

²Санкт-Петербургский государственный университет, лаборатория биологии амилоидов,
Санкт-Петербург, Россия

st101569@student.spbu.ru

Ген *NOS1AP* кодирует цитозольный белок, который связывается с компонентами сигнального каскада нейрональной синтазы оксида азота (nNOS). *NOS1AP* экспрессируется в некоторых органах и тканях, включая головной мозг, сердце, гладкие и скелетные мышцы, а также поджелудочную железу. Его связывают с развитием атеросклероза, шизофрении и других неврологических расстройств. *NOS1AP* характеризуется разными вариантами сплайсинга и имеет три основные изоформы.

Белок участвует в регуляции передачи сигналов в комплексе с NMDA-рецептором (NMDAR), PSD-95 и nNOS. В некоторых исследованиях продемонстрировано, что при сверхпродукции *NOS1AP* образует агрегаты, вследствие чего происходит нарушение его взаимодействия с nNOS и ингибирование передачи сигнала NMDAR. Данный процесс может играть важную роль в развитии нейродегенеративных и психических заболеваний, поэтому изучение условий сверхпродукции *NOS1AP* и его способности к агрегации имеет важное значение для понимания молекулярных механизмов этих патологий и может способствовать разработке новых терапевтических подходов.

Наше исследование показывает, что воздействие NMDA на клеточную линию нейробластомы SH-SY5Y приводит к двукратному увеличению уровня *NOS1AP*. Несмотря на это, нам не удалось обнаружить детергент устойчивых агрегатов этого белка в этих условиях. Этот результат указывает на то, что небольшое увеличение продукции нативного *NOS1AP* не сопровождается его агрегацией. В дальнейшем требуется изучение дополнительных факторов, способствующих образованию агрегатов, а также возможных функциональных последствий сверхэкспрессии *NOS1AP* для передачи сигнала через NMDAR.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 22-74-10042.

ФЕРРОПТОЗ, ИНДУЦИРУЕМЫЙ В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА ПРОТЕАЗОЙ ЗС ВИРУСА ГЕПАТИТА А, СОПРОВОЖДАЕТСЯ ЭФФЕКТОМ СВИДЕТЕЛЯ

Журавлев М.^{1,2}, Рощина М.П.¹, Карасева М.А.¹, Комиссаров А.А.¹

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

²Институт тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова,
МИРЭА – Российский технологический университет, Москва, Россия

makcimus212@mail.ru

Регулируемая клеточная смерть (РКС) играет важную роль в поддержании гомеостаза организма путем целенаправленного уничтожения клеток как в ходе онтогенеза, так и при патогенезе, элиминируя поврежденные или потенциально опасные клетки. РКС определяется генетическими программами, на которые можно влиять фармакологически. Индукция РКС может происходить под действием разнообразных молекул, в том числе и вирусных белков. Так, например, протеазы ЗС пикорнавирусов вызывают в клетках человека апоптоз – наиболее часто реализуемый тип РКС. Однако нами было показано, что протеаза ЗС вируса гепатита А человека (ЗСрго) индуцирует не апоптоз, а иной тип РКС, не зависящий от каспаз. Целью данной работы стала идентификация типа РКС, вызываемого ЗСрго.

На основе коммерческого вектора рСI мы сконструировали плазмиды, обеспечивающие экспрессию активной ЗСрго и ее инактивированного варианта с заменой Cys172 на Ala в каталитическом центре. Полученные плазмиды были введены в линии клеток человека НЕК293, А549 и HeLa. Экспрессия генов активного и инактивированного фермента была продемонстрирована методом иммуноблоттинга. Было также показано, при экспрессии гена активной протеазы, но не инактивированного фермента, значительно снижается доля жизнеспособных клеток в культуре. Следовательно, цитотоксическое действие ЗСрго зависит от ее протеолитической активности.

Для выяснения того, к какому типу каспазозависимой РКС относится гибель под действием ЗСрго, были использованы ингибиторы некроптоза, партанатоza, некроза, управляемого изменением проницаемости митохондрий, и ферроптоза. Было установлено, что только ингибиторы ферроптоза останавливают гибель клеток. Основным признаком данного вида РКС является железозависимое накопление пероксидов липидов в мембранах клетки. С помощью сенсора BODIPY 581/519 C11 было показано, что в клетках, экспрессирующих ЗСрго, действительно происходит увеличение количества липидных пероксидов. Таким образом, экспрессия ЗСрго вызывает ферроптоз в клетках человека.

В нескольких опубликованных ранее работах сообщалось, что ферроптоз сопровождается так называемым эффектом свидетеля. Под этим термином понимают распространение цитотоксического эффекта от клеток, которые подвергались действию индукторов ферроптоза, на другие клетки, в которых ферроптоз не индуцировали. Так как нами впервые было показано, что ЗСрго является индуктором ферроптоза, мы проверили наличие эффекта свидетеля. Было установлено, что среда от клеток, умерших при экспрессии ЗСрго, вызывает гибель нетрансфицированной культуры, при этом добавление в среду

ингибиторов ферроптоза предотвращает смерть нетрансфицированных клеток. Причем среда от культуры, экспрессирующей инактивированную протеазу, клеточную смерть не вызывает. Следовательно, индуцированная ЗСрго гибель клеток, сопровождается эффектом свидетеля, в результате которого клетки также умирают по пути ферроптоза.

Таким образом, мы впервые установили, что ЗСрго вызывает в клетках человека *in vitro* ферроптоз, который сопровождается эффектом свидетеля. Протеаза ЗС вируса гепатита А человека – единственная известная протеаза, способная индуцировать данный тип РКС. В дальнейшем мы планируем выяснить, какие субстраты гидролизует ЗСрго в клетке, и более подробно изучить эффект свидетеля и, прежде всего, способы его распространения.

Работа выполнена в рамках государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

ОСОБЕННОСТИ ТРЕХМЕРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ХРОМАТИНА В НЕЙРОНАХ ЧЕЛОВЕКА

Загирова Д.Р.^{1,2}, Плетенев И.А.², Базаревич М.В.², Кононкова А.Д.²

¹Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН, Москва, Россия

²Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

diana.zagirova@yandex.ru

Архитектура хроматина играет ключевую роль в регуляции транскрипции и поддержании клеточной идентичности, особенно в высокоспециализированных нейронах, где функциональная сложность требует тонкой пространственной организации генома. Несмотря на прогресс в изучении 3D-структуры хроматина, особенности её организации в зрелых нейронах человека остаются недостаточно исследованными. В данной работе мы провели комплексный анализ трехмерной архитектуры хроматина в нейронах коры головного мозга человека, сравнив её с не-нейрональными клетками, с использованием метода Hi-C в сочетании с интеграцией транскриптомных (RNA-seq), эпигеномных (ChIP-seq H3K27me3, H3K4me3) и других омиксных данных.

На материале левой верхней височной извилины были построены карты Hi-C для нейронов и не-нейрональных клеток. Анализ выявил системные различия на всех уровнях организации. В нейронах зафиксировано снижение доли межхромосомных контактов, что указывает на усиление территориальной сегрегации хромосом; однако хромосомы, участвующие в формировании ядрышка, демонстрируют повышенную взаимную ассоциацию. На внутривнутрихромосомном уровне нейроны характеризуются усилением близких (<3 Мб) и ослаблением дальних контактов, что коррелирует с увеличением плотности топологически ассоциированных доменов (ТАДов). Границы нейроспецифичных ТАДов обогащены активными хроматиновыми состояниями и генами, критичными для синаптической передачи, тогда как в не-нейрональных клетках преобладают границы, связанные с поликомбопосредованной репрессией. Нейроны также обладают увеличенным количеством множественных промотор-энхансерных взаимодействий. Кроме того, впервые были выявлены нейронспецифичные дальние взаимодействия, опосредованные H3K27me3.

Уникальные черты архитектуры хроматина нейронов отражают их функциональную специализацию. Снижение силы компартментов может способствовать динамичной регуляции транскрипционных программ, необходимой для синаптической пластичности, а усиление локальных взаимодействий обеспечивает точную активацию нейроспецифичных генов. Формирование H3K27me3-опосредованных сетей может быть необходимым для репрессии не-нейрональных транскрипционных программ. Эти особенности подчёркивают роль пространственной организации генома в поддержании нейрональной идентичности и могут иметь значение для изучения нейродегенеративных заболеваний.

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 21-74-10102.

ПОДБОР ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ДНК-ШТРИХКОДИРОВАНИЯ НЕКОТОРЫХ
ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *PULSATILLA* MILL.

Зайков В.Ф.¹, Рябова К.К.^{2,3}

¹Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия

²Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия

³Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН,
Красноярск, Россия

vz1703@mail.ru

Представители рода *Pulsatilla* Mill. (прострел) – раннецветущие многолетние травянистые растения, произрастающие преимущественно в умеренных широтах Северного полушария. Прострелы находят применение в садоводстве и медицине. Систематика рода *Pulsatilla* весьма сложна, поскольку идентификация его представителей затрудняется как высокой степенью внутривидовой морфологической изменчивостью, что не всегда возможно проверить без обширных сборов материала в полевых условиях, так и часто отмечаемой межвидовой гибридизацией. Наличие ограниченного количества надежных диагностических признаков только усложняет процесс определения близких видов прострелов.

В настоящее время помимо традиционных методов ботаники, основанных на морфологических признаках, для идентификации видов довольно широко применяются генетические методы. Нами была предпринята попытка проанализировать несколько хлоропластных фрагментов ДНК для нескольких видов прострелов, принадлежащих к трем секциям подрода *Pulsatilla*: секция *Patentes* (*P. multifida* (E. Pritz.) Juz., *P. orientali-sibirica* Stepanov), Секция *Pulsatilla* (*P. herba-somnii* Stepanov, *P. turczaninovii* Krylov et Serg.), Sect. *Semicampanaria* (*P. cernua* (Thunb.) Bercht. & J.Presl, *P. chinensis* (Bunge) Regel, *P. dahurica* (Fisch. ex DC.) Spreng.).

Для прояснения филогенетических взаимоотношений исследуемых видов были секвенированы и проанализированы последовательности хлоропластной ДНК: кодирующие гены – *matK*, *rbcL*, а также межгенные спейсеры – *trnL-trnF*, *rpoB-trnC*, *atpB-rbcL*.

Участки *matK* и *rpoB-trnC* показали корректное разделение на клады (с высокой бутстреп поддержкой), соответствующие разделению видов на секции *Patentes* (*P. multifida*, *P. orientali-sibirica*), *Pulsatilla* (*P. herba-somnii*, *P. turczaninovii*) и *Semicampanaria* (*P. cernua*, *P. chinensis*, *P. dahurica*).

Участки *rbcL* и *trnL-trnF* достоверно отличают группу дальневосточных видов – *P. cernua* и *P. chinensis* от остальных видов, *rbcL* также обособляет группу *Patentes*.

Последовательность *atpB-rbcL* выделяет секции *Patentes* и *Pulsatilla*, но, амплификация участка *atpB-rbcL* дальневосточных видов *P. cernua* и *P. chinensis* проблематична ввиду, вероятно, крупных перестроек хпДНК.

Межгенные спейсеры *rpoB-trnC* и *atpB-rbcL* являются более консервативными и не подходят для построения филогении рода *Pulsatilla*. Кодирующие гены участки *matK* и *rbcL*

имеют только однонуклеотидные мутации. Крупные делеции и однонуклеотидные замены обнаружены в межгенном спейсере *trnL-trnF*, который может служить потенциальным универсальным маркером для идентификации видов рода *Pulsatilla*. В дальнейшем планируется увеличить количество видов для анализа, что позволит получить более точные результаты.

Исследование выполнено в рамках реализации программы развития Алтайского государственного университета на 2021–2030 годы в рамках реализации программы стратегического академического лидерства «Приоритет 2030», проект «ДНК-маркеры хозяйственно ценных, редких и исчезающих видов растений».

ДЕЛЕЦИЯ *PSH1* НЕ ВЛИЯЕТ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ МУТАНТОВ ПО ГЕНАМ *SUP45* И *SUP35* У ДРОЖЖЕЙ

Кадысева А.А.¹, Землянко О.М.^{1,2}, Журавлева Г.А.^{1,2}

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

²Санкт-Петербургский государственный университет, лаборатория биологии амилоидов,
Санкт-Петербург, Россия

st096377@student.spbu.ru

Терминацию трансляции у эукариот обеспечивают белковые факторы eRF1 и eRF3. У дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* их кодируют жизненно важные гены *SUP45* и *SUP35*, соответственно. Были получены жизнеспособные нонсенс-мутации в этих генах. Они приводят к нарушениям точности терминации трансляции и вызывают снижение жизнеспособности клеток по сравнению с клетками дикого типа. Ранее было показано, что у мутантов по генам *SUP45* и *SUP35* происходит дупликация мутантной аллели или увеличение числа копий плазмид, несущих мутантную аллель, и было высказано предположение, что увеличение копийности мутантных аллелей *sup45-n* или *sup35-n* способствует жизнеспособности мутантов. В другой работе было показано, что делеция *PSH1*, кодирующего E3 убиквитин-лигазу H3-подобного гистона, приводит к нарушению сегрегации плазмид. В нашей работе мы исследовали влияние делеции *PSH1* на жизнеспособность мутантов *sup45* и *sup35*. Так как делеция гена *PSH1* может оказывать влияние на число копий плазмид, то у нонсенс-мутантов по генам *SUP45* и *SUP35*, на фоне этой делеции возможно увеличение уровня продукции мутантных белков eRF1 и eRF3, что может сказываться на жизнеспособности клеток.

Методом проточной цитофлуориметрии мы сравнили жизнеспособность клеток с мутациями *sup45-105* и *sup35-218* с клетками дикого типа. Было показано, что у мутантов жизнеспособность снижается в среднем в 3 раза по сравнению с клетками, несущими соответствующие аллели дикого типа. У этих же штаммов мы проверили копийность центромерных плазмид методом ПЦР в реальном времени. Мы показали увеличение числа копий плазмид с мутантными аллелями *sup45-105* или *sup35-218* в 4-5 раз по сравнению с плазмидами, несущими аллели дикого типа. Однако нам не удалось обнаружить различия между штаммами, несущими делецию *PSH1* и без нее. Кроме того, методом вестерн-блоттинга мы сравнили уровень продукции полноразмерного белка Sup35 у мутантов с увеличенной копийностью плазмид и у клеток дикого типа. Нам не удалось обнаружить увеличения продукции полноразмерного белка Sup35.

Таким образом, мы показали, что в клетках, где единственным источником фактора терминации трансляции является белок, синтезируемый с мутантной нонсенс-аллели *sup45-105* или *sup35-218*, жизнеспособность клеток снижена, копийность плазмид увеличена, однако нам не удалось выявить влияния делеции *PSH1* ни на жизнеспособность, ни на копийность плазмид. Таким образом, жизнеспособность нонсенс-мутантов по генам *SUP45* и *SUP35* не связана с изменением экспрессии гена *PSH1*.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 23-14-00063 и с использованием оборудования РЦ СПбГУ РМиКТ.

ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ИНКУБИРОВАНИЯ АМИЛОИДОВ В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ НА ИХ УСТОЙЧИВОСТЬ К ВОЗДЕЙСТВИЮ ФЕРМЕНТОВ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

Кайда А.А., Сулацкий М.И., Степаненко Ольга В., Степаненко Олеся В., Михайлова Е.В., Сулацкая А.И.

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

arina.nurova@gmail.com

Амилоидные фибриллы представляют собой высокоупорядоченные и высокостабильные белковые агрегаты, которые образуются в результате межмолекулярных взаимодействий аномально свернутых белков. Накопление амилоидов, приводящее к нарушению функционирования органов и тканей, наблюдается при целом ряде серьезных заболеваний, в том числе нейродегенеративных (болезней Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона и др.). Поскольку эти патологии до сих пор остаются неизлечимыми, высокую актуальность в настоящее время имеют исследования, направленные на разработку эффективной антиамилоидной терапии. В частности, в целом ряде работ проводятся исследования механизмов деградации амилоидов под действием различных ферментов иммунной системы *in vitro*. В этих исследованиях в качестве объектов зачастую используются свежеприготовленные фибриллы. Однако высокая стабильность амилоидных агрегатов способствует тому, что к моменту обнаружения они уже длительное время присутствуют в организме человека. При этом возникает вопрос о том, происходит ли трансформация структуры и изменение характеристик персистирующих амилоидных фибрилл, что может повлиять на их устойчивость к внешним воздействиям. Решение данного вопроса стало целью нашего исследования.

В качестве объектов исследования были выбраны амилоидные фибриллы на основе лизоцима, накопление которых приводит к системному лизоцимовому амилоидозу. Агрегация белка проводилась при различных условиях (кислые и нейтральные рН). Свежеприготовленные амилоиды, имеющие различную структуру и степень кластеризации, были переведены в физиологические условия, в которых они инкубировались в течение нескольких месяцев. Свойства образцов, отобранных из инкубируемых проб через различные промежутки времени, были проанализированы с использованием широкого спектра физико-химических методов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что с течением времени происходит частичное разрушение исследуемых агрегатов: декомпактизация фибриллярных кластеров, расщепление фибрилл на фрагменты и их деполимеризация на мономерные субъединицы.

Далее было исследовано воздействие на амилоиды, имеющие различную степень «зрелости» (свежеприготовленные и проинкубированные в физиологических условиях в течение 12 месяцев), двух лизосомальных протеаз: катепсина В (CTSB) и катепсина D (CTSD). Оказалось, что воздействие CTSD приводит к фрагментации свежеприготовленных фибрилл, что, вероятно, обусловлено разрушением водородных связей между бета-тяжами амилоидного

волокна. При добавлении CTSB наряду с фрагментацией происходит потеря упорядоченной структуры амилоидных фрагментов, что может быть вызвано дестабилизацией гидрофобных, ионных и/или ковалентных внутримолекулярных контактов. Более эффективная деградация наблюдалась в случае тонких отдельных амилоидных волокон, при этом морфология и линейные размеры кластеризованных фибрилл изменились не так существенно. Механизмы воздействия катепсинов на свежеприготовленные и «зрелые» амилоиды оказались идентичны. При этом частичная декомпактизация амилоидных кластеров в процессе длительного инкубирования способствовала более эффективному разрушению агрегатов протеолитическими ферментами. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при тестировании потенциальных терапевтических антиамилоидных агентов необходимо проводить исследования не только на свежеприготовленных, но и на более «зрелых» амилоидах.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 23-74-10092).

СЛОЖНАЯ ГЕНЕТИЧЕСКАЯ АРХИТЕКТУРА ПРЕЭКЛАМПСИИ: МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ, СИГНАЛЬНЫЕ СЕТИ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

Карпова Н.С., Дмитренко О.П., Нурбеков М.К.

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

nataliakarpova.sp@gmail.com

Преэклампсия представляет собой мультифакторное гипертензивное заболевание со сложной генетической архитектурой, включающей взаимодействие множества генов и факторов окружающей среды. Это осложнение беременности представляет опасность одновременно для здоровья матери и плода. Существует множество гипотез, которые пытаются объяснить причины возникновения преэклампсии, однако ни одна из них не является полной и исчерпывающей его причины до конца не известны.

С развитием преэклампсии связано множество факторов риска, но течение беременности часто не осложняется этим заболеванием, что указывает на важную роль генетической предрасположенности. Первые доказательства генетической предрасположенности к преэклампсии были получены в начале 1960-х годов исследователями в Нью-Джерси, которые обнаружили, что у сестер и дочерей женщин с преэклампсией это заболевание встречается чаще. Генетическая предрасположенность играет значительную роль не только в развитии преэклампсии, но и ее основных факторов риска, таких как гипертония, ожирения и диабет. При гипертонии генетические факторы объясняют от 30% до 60% вариации артериального давления, а при ожирении генетика объясняет от 40% до 70% вариации индекса массы тела.

Некоторые из генетических вариантов, продемонстрировавших ассоциацию в рамках полногеномного поиска ассоциаций (GWAS), также модулируют риск развития ожирения (rs1421085 гена FTO) и гипертонии (rs259983 гена ZNF831). Мы предполагаем, что связь подобных генетических вариантов с преэклампсией является более сложной, чем демонстрируют GWAS. Эти данные нашли подтверждение в ранее проведенном нами исследовании. Анализируя ассоциацию rs259983 гена ZNF831 с преэклампсией в Российской популяции, мы не подтвердили влияние полиморфизма на риск развития заболевания. Однако мы обнаружили, что носители генотипа CC имеют пятикратное повышение риска развития гипертонии, которая, в свою очередь, относится к ключевым факторам риска преэклампсии.

Мы планируем продолжить исследование взаимосвязи генетических вариантов с преэклампсией и ее факторами риска, что позволит лучше понять сложную генетическую архитектуру этого заболевания.

Исследование выполнено в рамках гос. задания FGFU-2025-0007 и при финансовой поддержке Фонда научно-технологического развития Югры в рамках научного проекта № 2024-108-05».

АНАЛИЗ ПОЛНОГЕНОМНОЙ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ШТАММА СН628, ДЕСТРУКТОРА АРОМАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Кириянова Т.Д.

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал Пермского
федерального исследовательского центра Уральского отделения РАН, Пермь, Россия

kitadi2101@gmail.com

Одним из наиболее перспективных направлений борьбы с экополлютантами 2 класса опасности, в частности полихлорированными бифенилами, является их разложение с применением природоподобных технологий, основанных на использовании метаболического потенциала аэробных бактерий. В связи с этим, ведется поиск и всестороннее изучение природных штаммов, обладающих биодegradативным потенциалом в отношении хлорированных бифенилов и их возможных химических производных.

В результате проведенных ранее исследований, у штамма СН628 установлен высокий биодegradативный потенциал в отношении ряда ароматических соединений, в том числе хлорированных и гидроксильированных производных бифенила.

Цель исследования – провести анализ полногеномной нуклеотидной последовательности штамма СН628, выявить гены и ферменты, обуславливающие его биодegradативный потенциал.

На основании анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК штамм СН628 был идентифицирован как *Rhodococcus wratislaviensis*. Однако на основании анализа полногеномной последовательности (ANI) установлено, что геном штамма СН628 на 99,321 % идентичен геному типового штамма *Rhodococcus opacus* с перекрытием генома на 88,3 %.

По данным RAST размер генома штамма СН628 составляет 8,229 Мб, содержание GC – 67,2, количество контигов – 178, количество кодирующих последовательностей – 8188, количество РНК – 56. Процентное соотношение генов с известной функцией составило 22 : 78. Распределение генов по функциональным группам: аминокислоты и производные – 44, углеводороды – 672, клеточная стенка и капсула – 39, кофакторы, витамины, протезные группы, пигменты – 256, метаболизм ДНК – 97, покой и спороношение – 1, жирные кислоты, липиды и изопреноиды – 386, метаболизм и получение железа – 12, транспорт через мембрану – 49, метаболизм ароматических соединений – 203, метаболизм азота – 33, нуклеозиды и нуклеотиды – 136, фаги, профаги, транспозазы, плазмиды – 4, метаболизм фосфора – 27, метаболизм калия – 8, метаболизм белков – 203, регуляция и клеточный сигналинг – 29, дыхание – 151, метаболизм РНК – 46, вторичный метаболизм – 7, стресс ответы – 69, метаболизм серы – 25, вирулентность, заболевания и защита – 52.

Геномная аннотация позволила выявить ключевые гены, вовлеченные в деградацию ксенобиотиков, включая ген *bphA*, кодирующий α -субъединицу бифенилдиоксигеназы (GenBank MW070532). Филогенетический анализ показал высокую степень сходства последовательности *bphA*_{СН628} с геном *narA*, ответственным за синтез α -субъединицы

нафталиндиоксигеназы. Сравнение аминокислотных последовательностей выявило консервативные остатки в активном центре фермента, что указывает на схожесть каталитических механизмов. Полученные результаты позволяют предположить, что фермент VphA1_{CH628} обладает потенциалом для окисления широкого спектра ароматических соединений. Данные исследования могут быть использованы для разработки биотехнологий очистки окружающей среды от устойчивых органических загрязнителей.

Работа поддержана грантом РФФ № 24-24-00498.

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ АЛЬФА-АМИЛАЗЫ ИЗ *BACILLUS SP.*,
ЭКСПРЕССИРУЕМОЙ В ДРОЖЖАХ *S. CEREVISIAE*

Климцева А.Е.^{1,2}, Головкина Д.А.^{1,3}, Корбан С.А.^{1,3}, Евстюхина Т.А.^{1,3},
Кульминская А.А.^{1,3}, Почкаева Е.И.²

¹ФГБУ ПИЯФ им. Б.П. Константинова НИЦ Курчатовский институт, Гатчина, Россия

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

³Курчатовский геномный центр – ПИЯФ, Гатчина, Россия

klim.a.e@list.ru

Альфа-амилаза представляет собой фермент, катализирующий гидролиз гликозидных связей в полисахаридных цепях до олигосахаридов различной длины. Амилазы широко используются в различных областях промышленности, таких как переработка крахмала, пивоварение, хлебопечение, фармацевтика и др. Из-за растущего рыночного спроса существует необходимость в создании новых ферментных препаратов, способных реагировать в широком температурном и кислотном диапазонах. Эффективным решением является создание безопасных штаммов-продуцентов, обеспечивающих выход альфа-амилазы с необходимыми свойствами, генетическими методами.

Пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* активно применяются как в сфере производства, так и для лабораторных исследований, в том числе с использованием генной инженерии. Культивирование дрожжей экономически эффективно, возможность секреции белков в культуральную жидкость упрощает последующую очистку препарата, а осуществление большинства посттрансляционных модификаций позволяет получать функционально активные белки. Кроме того, *Saccharomyces cerevisiae* являются безопасными для здоровья и обладают высокой устойчивостью к бактериофагам

Целью данной работы являлось исследование свойств рекомбинантной альфа-амилазы из *Bacillus sp.*, экспрессируемой в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* КЕР1/pYES2-Amy.

В научно-исследовательской лаборатории ОМРБ ПИЯФ был создан штамм КЕР1/pYES2-Amy, обладающий регулируемой мутабельностью. Его преимуществами является исключительно медленный рост на селективной среде с содержанием крахмала при высокой скорости мутации.

Создание штамма проходило в несколько этапов. В несколько этапов был осуществлен мутагенез ультрафиолетовым облучением, в последующем перспективные клоны были перенесены на питательную среду. В результате альфа-амилазная активность наиболее перспективного штамма выросла в 30 раз по сравнению с исходным. Далее был осуществлен поиск оптимальных условий для роста *Saccharomyces cerevisiae* по составу среды и времени культивирования. В результате исследований глицерин проявил себя как наилучший источник углерода, а максимальная удельная активность рекомбинантной альфа-амилазы была достигнута на третий день.

Также был проведен анализ биохимических параметров фермента. Амилазная активность сохранялась на протяжении всех измерений. Для определения рН-оптимума использовались буферы в диапазоне от рН 2,6 до 7,6. Исследуемый штамм оказался стабилен при рН от 6 до 7,6, наибольшая амилазная активность достигалась при рН, равном 5. Температурный оптимум был достигнут при 55°C.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Курчатовского геномного центра – ПИЯФ программой развития центров генетических исследований мирового уровня, соглашение № 075-15-2019-163).

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИИ САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ ФАКТОРОВ SRY- δ И BEAF-32
НА ИХ ПРИВЛЕЧЕНИЕ В ПРОМОТОРНУЮ ОБЛАСТЬ ГЕНА *ALH* У
DROSOPHILA MELANOGASTER

Козельчук Н.Я.¹, Четверина Д.А.², Ерохин М.М.¹

¹Группа биологии хроматина, Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

²Группа эпигенетики, Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

nyk95@yandex.ru

Многие топологически-ассоциированные домены (ТАД) дрозофилы разделены участками активного хроматина, содержащими кластеризованные гены домашнего хозяйства. Очень часто эти области обогащены инсуляторным белком BEAF-32 (Boundary Element-Associated Factor). Однако по данным исследований Hi-C, деплеция BEAF-32, как и некоторых других инсуляторных белков, значительно не влияет на глобальную архитектуру ТАДов.

BEAF-32 играет роль в регуляции экспрессии генов посредством влияния на организацию и динамику хроматина. Чаще всего он связывается вблизи сайта начала транскрипции (TSS). То есть, можно говорить о том, что BEAF-32 является не только инсуляторным белком, но также – своего рода промоторным фактором. И, так как деплеция BEAF-32 не приводит к глобальному изменению структуры ТАДов, мы предположили, что роль в поддержании структуры границ ТАДов могут играть ассоциированные с BEAF-32 факторы. Одним из таких белков является Serendipity δ (SRY- δ) – малоизученный транскрипционный фактор, который является важным регулятором экспрессии генов развития дрозофилы, однако большая часть его функций, как предполагается, остаётся неизвестной. Имеются сведения о том, что он взаимодействует с BEAF-32, эффектом чего является усиление активации близлежащего промотора.

В настоящий момент полногеномное распределение SRY- δ неизвестно. Однако ранее нами был проведен анализ ChIP-seq для белков BEAF-32 и SRY- δ , где было показано что очень много их пиков перекрываются. Также выявленные мотивы связывания оказались схожими с известными ранее. Например, мотив для SRY- δ был схож с мотивом, полученным в экспериментах EMSA (Electromobility shift assay).

В ходе исследования мы выбрали несколько промоторов в геноме *Drosophila melanogaster*, связывающих как BEAF-32, так и SRY- δ . Один из таких – промотор гена *Alh* (Alhambra). Мы создали трансгенную линию мух с нативными и мутантными сайтами связывания для BEAF-32 и SRY- δ в промоторе *Alh*. Уровень привлечения факторов BEAF-32 и SRY- δ к промотору *Alh* оценивался с помощью метода иммунопреципитации хроматина (X-ChIP) с использованием специфичных антител к этим белкам. Уровень обогащения был измерен с использованием метода Real-time PCR.

В результате было показано, что уровень обогащения как BEAF-32, так и SRY- δ на промоторе *Alh* значительно понижался при мутации сайтов связывания этих факторов. Причем

уровень связывания обоих белков падал сильнее при мутации сайта SRY- δ , чем при мутации сайта BEAF-32.

Исходя из полученных данных видно, что связывание как SRY- δ , так и BEAF-32 сильнее зависит от сайта SRY- δ , чем от сайта BEAF-32. Таким образом, можно говорить, что в этом случае, вероятно, имеет место комплексное привлечение. SRY- δ и BEAF-32, работая в комплексе, помогают друг другу в привлечении на промотор. То есть для эффективного привлечения BEAF-32 нужны не только сайты BEAF-32, но и сайты SRY- δ .

Работа поддержана грантом РФФ № 20-74-10099.

СЕМЬ РАЗ ПРОВЕРЬ – ОДИН РАЗ ОТРЕДАКТИРУЙ: ПРОВЕРКА ВЛИЯНИЯ
ПРЕДСКАЗАННЫХ ЗАМЕН В БЕЛКАХ СЕМЕЙСТВА EIF4E НА СВЯЗЫВАНИЕ С
ВИРУСНЫМ БЕЛКОМ VPg PVY

**Колесникова В.В.¹, Никонова Е.Ю.¹, Андрейцев В.В.^{1,2}, Балобанов В.А.¹,
Леконцева Н.В.¹, Михайлина А.О.¹, До Ф.Т.³, Никонов О.С.¹**

¹ФГБУН Институт белка РАН, Пушино, Россия

²Пушчинский филиал ФГБОУ ВО Российский биотехнологический университет
(РОСБИОТЕХ), Пушино, Россия

³Институт биотехнологии Вьетнамской академии наук и технологий, Ханой, Вьетнам

kolesnikovavicto@yandex.ru

Семейство Потивирусов представлено несколькими родами, представители которых поражают разные семейства сельскохозяйственных культур. Например, представители рода Potyvirus преимущественно поражают растения семейства Пасленовые, а представители рода Вумовirus – Мятликовые. Вирус Y картофеля из рода Potyvirus является наиболее распространенным вирусом на картофеле в нашей стране, что делает его важным объектом для исследований. Известно, что у всех представителей данного семейства на 5'-конце РНК(+) находится вирусный геном-связанный белок VPg. Данный белок способен взаимодействовать с eIF4E клетки-хозяина. Нарушение взаимодействия между VPg и eIF4E приводит к потере вирусом способности заражать данное растение. Добиться такого эффекта можно всего одной аминокислотной заменой в eIF4E, которую можно ввести в растение быстро с помощью систем редактирования геномов. Такой подход работает быстрее по сравнению с классическими методами селекции. Какая именно мутация окажет нужный эффект и не "сломает" белок, можно предсказать с помощью структурных данных или синергии молекулярного моделирования и молекулярной динамики, подкрепленных биохимическими данными. Наше исследование направлено на поиск перспективных мутаций, проверку влияния этих мутаций *in vitro* и введение их непосредственно в растения. Нами уже проделана работа по получению рекомбинантных белков для проверки предсказанных мутаций.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда:
грант № 24-44-04007.

РАЗРАБОТКА ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ ИНДУКЦИИ ГИПЕРЭКСПРЕССИИ ГЕНА *AKT1*

Колесова Е.С.¹, Мелехин В.В.^{1,2}

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

²Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург, Россия

Elizaveta.Kolesova@urfu.ru

Создание модельных клеточных линий с гиперэкспрессией протеинкиназы В (АКТ/РКВ) представляет собой важное направление в современной биомедицинской науке. АКТ/РКВ – это ключевой компонент сигнального пути PI3K/АКТ, который регулирует множество клеточных процессов, включая рост, выживание, пролиферацию, метаболизм и апоптоз. Поскольку АКТ1 является преимущественно экспрессируемой изоформой при многих видах злокачественных новообразований, существует необходимость в разработке генно-инженерных конструкций для индукции гиперэкспрессии гена *AKT1*, а также создании модельных культивируемых клеточных линий человека с его гиперэкспрессией с целью поиска новых диагностических методов и лечебных подходов.

На основе изученной литературы в качестве источника мРНК гена *AKT1* была выбрана клеточная линия колоректальной аденокарциномы человека (CaCo-2). мРНК была использована в качестве матрицы для синтеза кДНК в реакции обратной транскрипции. Был проведен биоинформатический анализ кодирующей последовательности гена *AKT1* и плазмидного вектора рTagGFP2-С (Евроген) с использованием таких программ и сайтов, как NCBI Primer-BLAST, Ugene, Gene Runner, bioinformatics.org. По полученным данным АКТ1 и GFP будут представлять собой единый химерный белок, соединенный через С-конец GFP. К кодирующей последовательности кДНК *AKT1* были подобраны праймеры, содержащие с 5'-конца нуклеотиды зацепки и сайты рестрикции EcoRI и BamHI. ДНК гена-интереса и плазмидного вектора подвергали реакциям рестрикции и лигированию. Для визуализации результатов и оценки успешности прохождения реакций использовали метод гель-электрофореза в 1 % агарозном геле. Гель-электрофорез проводили в течение 60 минут при напряжении 80 В, силе тока 400 мА буфере 1x TAE. Полученную реакционную смесь после реакции лигирования использовали для трансфекции клеточной линии эмбриональной рабдомиосаркомы человека (Rd). В качестве трансфекционного реагента использовали PEI (Диаэм, Россия). Дополнительным подтверждением успешности получения рекомбинантной плазмиды рTagGFP2-С-АКТ1 и трансфекции была визуальная оценка флуоресценции в синем свете при помощи инвертированного микроскопа (ОРТИКА, Италия) в сравнении с положительным (трансфицированные плазмидным вектором рTagGFP2-С клетки Rd) и отрицательным (интактные клетки) контролями.

Полученные результаты подтверждают наличие кодирующей последовательности *AKT1* в плазмидном векторе рTagGFP2-С. Анализ методом гель-электрофореза показал наличие ДНК размером большим, чем фрагмент гена *AKT1* и плазмидный вектор. Также наблюдалось отсутствие полос, соответствующих по длине исходным ДНК. Уровень флуоресценции трансфицированных клеток Rd плазмидным вектором рTagGFP2-С-АКТ1 сопоставим с уровнем положительного контроля.

КОМБИНИРОВАННЫЙ ПОДХОД ИМПУЛЬСНОЙ ЭПР-СПЕКТРОСКОПИИ И
МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ КОМПЛЕКСОВ
БИМОЛЕКУЛ С ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРАМИ

**Колоколов М.И.^{1,2}, Санникова Н.И.^{1,2}, Дементьев С.А.^{1,2}, Подаров Р.А.^{1,2}, Жданова К.А.³,
Брагина Н.А.³, Чубаров А.С.⁴, Федин М.В.^{1,2}, Крумкачева О.А.^{1,2}**

¹Международный томографический центр СО РАН, Новосибирск, Россия

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

³МИРЭА – Российский технологический университет, Институт тонких химических
технологий, Москва, Россия

⁴Свободный университет Берлина, Берлин, Германия

m.kolokolov@tomo.nsc.ru

Знание структур комплексов белок–лиганд имеет большое значение для понимания терапевтических механизмов и возможных побочных эффектов. Однако применение стандартных методов структурной биологии часто ограничено из-за нестабильности образуемых комплексов или одновременного связывания лигандов в нескольких сайтах, в связи с чем зачастую применяются методы компьютерного моделирования.

Сегодня активно используется метод «слепого докинга», который позволяет определить возможные участки связывания лиганда на белке. Однако этот метод имеет недостатки: неполное покрытие конформационного пространства и упрощённые методы подсчёта энергии приводят к большой неоднозначности результатов, особенно в случаях нескольких сайтов.

В структурной биологии всё активнее применяется метод дипольного электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), который предоставляет уникальные данные о конформационном разнообразии исследуемых систем. Метод ЭПР позволяет измерять не только средние расстояния внутри комплекса, но и их распределения, благодаря чему возможно детектировать все одновременно существующие конформации систем. Однако при этом ЭПР испытывает трудности в определении относительной геометрии участников комплекса.

В данной работе представлен новый подход, объединяющий предсказательную способность слепого докинга и структурную информацию, получаемую методом ЭПР, для эффективного определения сайтов связывания лигандов с белком. Наш алгоритм использует единственное распределение расстояний ЭПР для фильтрации и валидации результатов докинга. Положения лиганда, полученные методом слепого докинга, кластеризуются, фильтруются согласно экспериментальным расстояниям и уточняются с помощью фокусированного докинга.

Для демонстрации нашего подхода мы изучили связывание человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) с фотосенсибилизаторами на основе порфирина, используемыми в фотодинамической терапии. С помощью лазерно-индуцированных

экспериментов ЭПР были получены распределения расстояний между возбужденными состояниями фотосенсибилизаторов и селективно введенной спиновой меткой. На основе полученных распределений и молекулярного моделирования мы определили возможные участки связывания ряда фотосенсибилизаторов с различными зарядами и гидрофобностью. Было показано, что связывание фотосенсибилизаторов зачастую происходит вне стандартных сайтов связывания альбумина, как правило, в нескольких участках одновременно.

Таким образом, наш алгоритм представляет собой универсальный инструмент для исследования связывания ЭПР-активных лигандов, разрешая неоднозначности как в слепом докинге, так и в данных ЭПР. При этом наш подход не содержит ограничений, характерных для флуоресцентных методов, которые подвержены ошибкам интерпретации из-за отсутствия однозначных отношений донор–акцептор при связывании в нескольких сайтах.

НОВЫЕ ДАННЫЕ ПО УНИВЕРСАЛЬНЫМ ПЦР-ПРАЙМЕРАМ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВИДОВ РОДА *SANGUISORBA* L.

Колтунова А.М.¹, Куцев М.Г.^{1,2}

¹Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия

²Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия

asya-kolt@mail.ru

Ранее было разработано 14 пар праймеров для амплификации семи участков хлоропластной ДНК [1]. Праймеры протестированы на 9 родах семейства Розоцветные и в том числе на 10 видах рода *Sanguisorba* L. Следует уточнить, что наибольшая видоспецифичность была отмечена для рода *Sanguisorba*, т.к. праймеры были разработаны на основании полногеномных последовательностей 3 видов Кровохлебки (*S. officinalis*, *S. filiformis*, *S. stipulata*). Настоящее исследование было посвящено апробированию SSR праймеров на нескольких популяциях вида *S. officinalis*.

Материалы и методы: Выделение тотальной ДНК осуществлялось с помощью набора Diamond DNA Plant kit (ООО «Алтайбиотех», Россия) по протоколу производителя. Реакцию амплификации проводили с применением готовой ПЦР смеси БиоМастер HS-Тақ ПЦР (Биолабмикс, Россия) в объеме 15 мкл и конечной концентрацией праймеров 400нМ. Амплификация проводилась в термоциклере MyCycler по следующей программе: денатурация 95°C – 60 сек., отжиг праймеров 57°C – 30 сек., элонгация 72°C – 30 сек. (всего 33 цикла). Разделение и визуализация продуктов амплификации проводили с помощью капиллярного электрофореза с использованием автоматической станции QIAxcel Advanced (Qiagen, Германия) и набора реагентов QIAxcel DNA High Resolution Kit в соответствии с инструкцией производителя (программа электрофореза OL 800, время инъекции образца 10 сек.). Материалом для исследования послужили 5 популяций *S. officinalis* по 10 образцов в каждой, собранных на территории Алтайского края и Республики Алтай. Для анализа был выбран праймер Sang2: Sang2F CGTCTTTGAGTACTCCGGCA, Sang2R TAGATCACTACCCGGCCCAT

Результаты: Во всех исследованных образцах было визуализированы 2 локуса: 211 п.н. и 215 п.н. Колебание длин у образцов разных популяций колебалось в пределах ошибки (1 п.н.). Было подтверждено, что праймер Sang 2 не подходит для популяционных исследований вида *S. officinalis*.

Исследование выполнено в рамках реализации Программы развития университета на 2021–2030 годы в рамках реализации программы стратегического академического лидерства «Приоритет 2030», проект «ДНК-маркеры хозяйственно ценных, редких и исчезающих видов растений».

Литература.

1. Колтунова А. М., Куцев М. Г., Муртазалиев Р. А. Универсальные ПЦР-праймеры для идентификации видов рода *Sanguisorba* и других представителей семейства Rosaceae // Turczaninowia, 2023. Т. 26, № 3. С. 126-136 DOI: 10.14258/turczaninowia.26.3.10. URL: <http://turczaninowia.asu.ru/article/view/14026>.

РОЛЬ МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ SETD7 В ДЕЦИДУАЛИЗАЦИИ ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Конюшатова А.О., Дерябин П.И., Бородкина А.В.

Институт цитологии РАН, Лаборатория механизмов клеточного старения,
Санкт-Петербург, Россия

konyushatova.alina@yandex.ru

Для имплантации эмбриона эндометрий, выстилающий полость матки, претерпевает ряд структурных и функциональных изменений в ходе менструального цикла. Ключевым шагом в подготовке эндометрия к имплантации является тканеспецифичная децидуальная трансформация эндометриальных стромальных клеток (эСК). Децидуализированные эСК отвечают за питание имплантирующегося эмбриона, ремоделирование внеклеточного матрикса, регуляцию локального иммунного ответа и др. Этот процесс строго регулируется транскрипционными факторами и эпигенетическими механизмами. Недавно было обнаружено, что среди ферментов, которые катализируют перенос метильных групп на гистоны, есть те, которые играют роль в децидуализации и имплантации (EZH2, SUV420H1, SUV39H2 и др.).

В настоящем исследовании мы сосредоточились на потенциальной роли SETD7 в регуляции децидуализации эСК. Первоначально SETD7 был идентифицирован как фермент, который метилирует четвертый лизин канонического гистона H3 (H3K4me1). В дальнейшем было обнаружено, что данный фермент метилирует и ряд негистоновых белков включая p53, рецептор эстрогена, p65, STAT3, pRB, SIRT1 и т. д. Мы обнаружили, что уровень экспрессии белка SETD7 значительно повышается по мере децидуализации эСК. Одновременно с этим мы наблюдали изменение морфологии и увеличение экспрессии важнейших факторов транскрипции: рецепторов прогестерона (PR-A/B) и эстрогена (ER- α), опосредующих активацию сети децидуальных генов. В условиях отсутствия SETD7 в клетках оба рецептора практически отсутствовали при индукции децидуализации, вместе с тем мы обнаружили нарушения в экспрессии ключевых децидуальных маркеров (PRL, IGFBP1).

Несмотря на то, что изначально SETD7 была открыта как гистоновая метилтрансфераза, мы не обнаружили SETD7 в ядре в процессе децидуализации эСК, белок был обнаружен в цитоплазме. Это открытие предполагает, что влияние SETD7 на децидуализацию вряд ли опосредовано метилированием гистона H3, а скорее связано с взаимодействием с негистоновыми мишенями, в частности, с ER- α . Экспрессия белка ER- α значительно снижается в условиях отсутствия SETD7, несмотря на то, что уровень мРНК одинаков при обоих условиях. Подобный результат уже был показан другой научной группой на клетках рака молочной железы. Эти данные позволяют предположить, что SETD7 влияет на стабильность белка ER- α , который отвечает за развитие децидуального ответа в клетках.

В настоящее время децидуализация понимается как процесс, в котором эСК изначально трансформируются в предецидуальные клетки, а затем расходятся на две различные субпопуляции: зрелые и стареющие децидуальные клетки. Мы обнаружили, что эСК с

нокаутом по SETD7 демонстрировали сниженную экспрессию всех зрелых децидуальных генов во время децидуализации (SCARA5, IL1R1 и PROK1) и повышенную экспрессию генов-маркеров старения CLU и DIO2, а также накопление SA- β -Gal. Мы определили SETD7 как критический регулятор дивергенции клеточной судьбы децидуализирующихся эСК, поскольку клетки, лишенные экспрессии SETD7, демонстрируют ускоренное старение и сниженную децидуальную реакцию.

Полученные нами результаты говорят о том, что SETD7 можно рассматривать как новый молекулярный регулятор децидуализации эСК, необходимый для правильного образования децидуальных субпопуляций.

СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ ГЕТЕРОЛОГИЧНОЙ ЭКСПРЕССИИ ВКУСОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ

**Копылова Е.Е.¹, Коваленко Н.П.¹, Кабанова Н.В.¹, Стронина Д.С.²,
Зейнаб Хабиб³, Рогачевская О.А.¹.**

¹Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ Пущинский научный
центр биологических исследований РАН, Пущино, Россия

²Федеральный исследовательский центр биотехнологии РАН, Институт биоинженерии,
Москва, Россия

³Пущинский филиал ФГБОУ ВО Российский биотехнологический университет
(РОСБИОТЕХ), Пущино, Россия

ekopylova_e@pbcra.ru

Рецепцию вкусовых стимулов осуществляют вкусовые клетки I, II, III типов, которые экспрессируют определенный набор рецепторов и ионных каналов, участвующих в распознавании химических молекул. У млекопитающих выделяют пять основных вкусовых ощущений: горький, сладкий, кислый, соленый и вкус аминокислот (умами). Во вкусовых клетках типа II детекция вкусовых стимулов обеспечивается вкусовыми рецепторами семейств TAS1 и TAS2, относящихся к рецепторам, сопряженным с G-белками (GPCR). К семейству TAS1 относят три белка – T1R1, T1R2 и T1R3. Экспериментально показано, что эти белки образуют функциональные гетеродимеры: T1R2/T1R3 – рецептор сладких веществ, T1R1/T1R3 – рецептор вкуса аминокислот.

Традиционно, для анализа функционирования GPCR используется гетерологичная система экспрессии с использованием плазмид, обеспечивающих транскрипцию мРНК целевого гена в культивируемых клетках. Изучение вкусовых рецепторов T1R в экспрессионной системе представляет определенные сложности в связи с большим размером целевого продукта (715-858 а.о.) и требованиями к корректному сворачиванию белка и формированию функциональных гетеродимеров на мембране клеток.

Для создания плазмидных конструкций, экспрессирующих транскрипты вкусовых рецепторов T1R1, T1R2 и T1R3 мыши, был выбран плазмидный вектор pAcGFP1-Nyg-N1, кодирующий ген зеленого флуоресцентного белка *acgfp1* в одной рамке считывания с соответствующим геном рецептора. Плазида также содержит ген устойчивости к селективному антибиотику, что в дальнейшем будет использовано для получения клеток со стабильной экспрессией рецептора. Для клонирования транскриптов была получена кДНК из тотальной РНК, выделенной из вкусовых почек мыши. Полноразмерные транскрипты генов T1R1, T1R2 и T1R3 были амплифицированы с помощью ПЦР с ген-специфичными праймерами, содержащими сайт инициации трансляции. Полученные для каждого гена плазмиды были использованы для временной трансфекции клеток НЕК293 с последующей оценкой локализации рецептора внутри клетки по флуоресцентному маркерному белку. Эффективность временной трансфекции была низкой и составила 5-10%, что возможно объясняется размером рецепторного белка, и, следовательно, генетического конструкта,

затрудняющим проникновение в клетки. С помощью конфокальной микроскопии было показано, что основная часть флуоресцентного сигнала ассоциирована с клеточной мембраной, что косвенно подтверждает правильность сборки рецептора. В дальнейшем планируется осуществить физиологические эксперименты для оценки функционирования рецептора и его способности активировать внутриклеточные сигнальные каскады в ответ на различные вкусовые стимулы.

Работы с животными были проведены в соответствии с требованиями Комиссии ИБК РАН ФИЦ ПНЦБИ РАН по биоэтике.

Работа поддержана грантом РФФИ № 25-24-00532.

ГОНОКОККОВЫЙ ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ОСТРОВ – КЛЮЧЕВОЙ МЕХАНИЗМ
ГОРИЗОНТАЛЬНОГО ПЕРЕНОСА ГЕНОВ И РАСПРОСТРАНЕНИЯ
АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ *N. GONORRHOEAE*

Кравцов Д.В., Шаскольский Б.Л., Грядунов Д.А.

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

solo13.37@yandex.ru

Гонорея, возбудителем которой является грамотрицательная бактерия *N. gonorrhoeae*, входит в число наиболее распространенных инфекций, передаваемых половым путем. Применение антибиотиков для терапии этой инфекции сопровождается быстрым развитием устойчивости, во многом обусловленным горизонтальным переносом генов и естественной компетентностью *N. gonorrhoeae* во всех фазах роста. Ключевую роль в этом процессе играет система секреции IV типа (T4SS), кодируемая генами гонококкового генетического острова (GGI). Благодаря этой системе *N. gonorrhoeae* способна секретировать хромосомную ДНК в окружающую среду, где та захватывается пилями другой клетки и встраивается в ее геном.

Был проведен анализ GGI в глобальной выборке в 14763 генома изолятов *N. gonorrhoeae*, собранных в 1996–2019 годах в 68 странах. В выборку были включены 48 геномов российских изолятов, секвенированных нами с использованием платформ Oxford Nanopore и Illumina MiniSeq (BioProject PRJNA768989). В рамках работы изучалось генетическое разнообразие GGI в мировой популяции, проводилось выявление ассоциаций между GGI и молекулярными типами из широко применяемых схем генотипирования *N. gonorrhoeae* NG-MAST и MLST, а также установление связи GGI с устойчивостью к противомикробным препаратам.

Результаты показали, что только 66% изолятов содержат GGI, при этом у 22% из них обнаружены повреждения в генах GGI, приводящие к утрате функциональности системы T4SS, то есть способности выделять ДНК. Большинство российских изолятов обладало поломками в критически важных генах *atfA* и *traG*, приводящими к потере функциональности GGI. Предложена модель, описывающая разделение глобальной популяции изолятов *N. gonorrhoeae* в соответствии с генным составом GGI и его функциональностью. Показано, что схемы молекулярного типирования MLST и NG-MAST позволяют сделать вывод о наличии GGI и его функциональности с точностью 83% и 91%, соответственно.

Сравнение распределения устойчивости к антимикробным препаратам между изолятами с функциональным, нефункциональным GGI и без него выявило статистически значимую связь ($p < 0,001$) функционального GGI с наличием хромосомных детерминант устойчивости к ципрофлоксацину, цефиксиму, тетрациклину и пенициллину. При этом плазмидная устойчивость к пенициллину и тетрациклину не коррелировала с GGI, что объясняется передачей этих плазмид через конъюгацию, а не через T4SS.

Таким образом, данные о наличии и функциональности GGI могут быть использованы для эпидемиологического мониторинга и прогнозирования развития антибиотикорезистентности в популяции *N. gonorrhoeae*.

**АНАЛИЗ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ, ВОВЛЕЧЕННЫХ
В рН-ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ РЕЦЕПТОРНОЙ ТИРОЗИНКИНАЗЫ РЕЦЕПТОРА,
ПОДОБНОГО РЕЦЕПТОРУ ИНСУЛИНА (IRR)**

Кривошеина Д.А.¹, Гавриленкова А.А.^{1,2}, Пяткина В.А.^{2,3}, Бочаров Э.В.^{1,2}, Деев И.Е.²

¹Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

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

³Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии –
МВА имени К.И. Скрябина, Москва, Россия

krivosheina.da@phystech.edu

Рецептор, подобный рецептору инсулина (IRR) – это рецепторная тирозинкиназа, которая активируется при щелочном внеклеточном рН и участвует в регуляции секреции бикарбоната почками. Однако детальный механизм его активации остается малоизученным. IRR состоит из трех ключевых доменов: внеклеточного, трансмембранного и цитоплазматического тирозинкиназного. Целью работы является исследование роли отдельных аминокислотных остатков во внеклеточном домене, влияющих на рН-чувствительность рецептора.

Для изучения роли внеклеточного домена в активации рецептора IRR нами была создана мутантная форма рецептора, содержащая замены R47A, K143A и S516A. Клетки линии НЕК293 трансфицировали плазмидными конструкциями, кодирующими мутантную форму IRR_RKS с этими заменами и форму рецептора дикого типа. После инкубации в среде с рН 7,4 и 9,4 клетки лизировали, а уровень активации рецептора анализировали методом вестерн-блота. Использовали антитела к фосфорилированной (активной) форме рецептора и антитела к С-концевому участку белка. Показано, что мутантная форма IRR_RKS (R47A/K143A/S516A) не активируется при рН 9,4 в отличие от дикого типа рецептора.

Результаты подтверждают, что аминокислотные остатки R47, K143 и S516 играют ключевую роль в рН-зависимой активации IRR. Дальнейшие исследования направлены на детальную характеристику каждого из них, что может способствовать пониманию механизма работы IRR и его потенциальной роли в физиологии почек и метаболических заболеваниях.

Генная инженерия была проведена при поддержке проекта Российского научного фонда № 23-74-00024. Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение 075-03-2025-662, проект FSMG-2025-0003).

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ АЛЛОСТЕРИЧЕСКОГО РЕГУЛЯТОРА
СУЛЬФИТРЕДУКТАЗЫ DSRD У АРХЕЙ РОДОВ CANDIDATUS *GEOCRENENECUS* И
CANDIDATUS *METHANODESULFOKORES*

Крылов К.И., Дёмин К.А.

Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского, Южный Федеральный
Университет, Ростов-на-Дону, Россия

kikrylov@sfedu.ru

Диссимиляционная сульфатредукция – сложный и разнообразный по необходимому для ее осуществления комплексу белков метаболический процесс. По разным оценкам, она возникла впервые до разделения древа жизни на архейный и бактериальный домены, либо была передана горизонтально от архейного к бактериальному предку сразу после разделения. Наиболее изученными сульфатредуцирующими археями являются представители рода *Archaeoglobus*, которые, в результате нескольких событий горизонтального переноса генов, заменили собственные сульфитредуктазы на бактериальные, в том числе приобрели аллостерический регулятор сульфитредуктазы DsrD, впервые возникший в домене бактерий. Среди других архей только у двух групп, известных по метагеномным данным, также представлен DsrD: археи родов-кандидатов *Geocrenenecus* и *Methanodesulfokores*. В данном исследовании был проведен филогенетический анализ последовательностей белков DsrD, а также конкатенированных последовательностей DsrAB данных архей.

Геномы *Geocrenenecus* (n=36) и *Methanodesulfokores* (n=2) были получены из базы данных assembly NCBI. Гены были определены с помощью Prodigal 2.6.3, после чего программа DiSCo, специфичная для поиска белков диссимиляционной сульфатредукции, была использована для поиска сульфитредуктаз. У 19/36 геномов *Geocrenenecus* был обнаружен как минимальный набор DsrABCMK+HdrA+QmoBC, так и белок DsrD. В обоих геномах *Methanodesulfokores* был обнаружен набор DsrABMK+HdrA+QmoBC+DsrD. С помощью алгоритма MAFFT производилось множественное выравнивание последовательностей DsrD и последовательностей DsrAB. Для выравнивания были отобраны последовательности соответствующих белков из родов *Geocrenenecus*, *Methanodesulfokores*, *Archaeoglobus*, а также ряда бактериальных сульфитредуктаз из филумов Bacillota и Desulfobacterota. С помощью программы trimal (опция «-automatic1») проводился тримминг выравниваний. Деревья были построены программой IQ-TREE v2.4.0. Для построения дерева по белку DsrAB, были применены следующие параметры «-m LG+R10 -bb 1000 -alrt 1000» и «-m LG -bb 1000 -alrt 1000» для белка DsrD.

Анализ полученных деревьев показал, что белок DsrD, по всей видимости, был приобретен археями родов *Geocrenenecus* и *Methanodesulfokores* от другого бактериального предка независимо от архей *Archaeoglobus*. В отличие от последовательностей DsrD, принадлежащих *Archaeoglobus*, последовательности *Geocrenenecus* и *Methanodesulfokores* кластеризовались с бактериальными DsrD белками 3 типа, характерными для спорообразующих бактериальных сульфатредукторов филума Bacillota (в частности, род

Desulfotomaculum). Дерево, построенное на основе последовательностей белка DsrAB продемонстрировало схожую топологию. Полученные данные позволяют говорить о независимом приобретении аллостерического регулятора сульфитредуктазы DsrD от других бактериальных предков видами родов *Geocrenenecus* и *Methanodesulfokores*. Геномы данных архей были реконструированы из метагеномов содержимого термальных ручьев (например, Great Boiling Spring, Невада, США). Можно предположить, что в сильно изменчивых условиях наземных термальных ручьев приобретение дополнительных механизмов регуляции экспрессии сульфитредуктазы DsrAB имело для *Geocrenenecus* и *Methanodesulfokores* селективное преимущество.

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства «Приоритет 2030» № СП-12-23-04.

ЭКСПРЕССИЯ РЕЦЕПТОРА КОНЕЧНЫХ ПРОДУКТОВ ГЛИКИРОВАНИЯ (RAGE)

**Крючкова А.К.¹, Гавриленкова А.А.^{1,2}, Охрименко И.С.¹,
Долотова С.М.^{1,2}, Бочаров Э.В.^{1,2}**

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

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

Kryuchkova.ak@phystech.edu

Рецептор конечных продуктов гликирования (RAGE) является паттерн-распознающим мембранным рецептором. RAGE способен связываться с конечными продуктами гликирования, такими как интегрины, мономеры и фибриллы бета-амилоидов. Активация RAGE связана с различными заболеваниями в том числе диабетом, раком и болезнью Альцгеймера, поэтому исследование данного рецептора может быть перспективным для разработки новых подходов к лечению заболеваний.

Известно, что данный рецептор существует в виде нескольких изоформ, например, полноразмерная и растворимая формы. При связывании с лигандом RAGE олигомеризуется и активируется, что приводит к активации провоспалительных факторов транскрипции и синтезу провоспалительных молекул. Однако на настоящий момент как полная структура, так и механизм активации RAGE не до конца изучены.

В данной работе были получены три генетические конструкции, содержащие изоформы RAGE (полноразмерный рецептор, внеклеточная часть рецептора и рецептор без цитоплазматической части) с Мус-Tag на С-конце рецептора. Трансфекцию клеток линии НЕК293 провели для каждой из конструкций. Для анализа экспрессии рецептора использовался метод Вестер-блот, окрашивание проводили антителами против Мус-tag. Все три конструкции экспрессировались в клетках и не приводили к преждевременной клеточной гибели. Это дает возможность получить линии клеток, конститутивно экспрессирующие все изоформы RAGE, для наработки и очистки рецепторов и дальнейшего структурного анализа.

Генная инженерия была проведена при поддержке проекта Российского научного фонда №23–74–00024. Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075–03–2025–662, проект FSMG-2024–0012).

УЧАСТИЕ МЕМБРАННО-СВЯЗАННЫХ БЕЛКОВ ТЕПЛОВОГО ШОКА В РЕГУЛЯЦИИ ПОДВИЖНОСТИ КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА T98G

Куркин А.С.¹, Лихоманова Р.Б.^{2,3}, Фофанов Г.К.³, Зиганшин Р.Х.⁴, Шевцов М.А.^{2,3}

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

²ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

³ФГБУ НМИЦ им. В.А. Алмазова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

⁴ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

andrey-k0@mail.ru

Мультиформная глиобластома является одной из наиболее агрессивных форм опухолей головного мозга и характеризуется высоким инвазивным потенциалом. Ключевым фактором в прогрессировании данного заболевания является повышенная подвижность опухолевых клеток, которая обеспечивает их инвазию в окружающую здоровую ткань головного мозга. Известно, что в опухолевых клетках наблюдается повышенная экспрессия белков теплового шока (HSP), которые специфически локализованы на плазматической мембране. Ранее нами было показано, что применение ингибиторов HSP70 приводит к снижению миграции и инвазии клеток глиобластомы. Таким образом, изучение взаимодействий не только HSP70, но и других возможных мембранных форм шаперонов, с белками, ответственными за клеточную подвижность, позволит выявить новые мишени для снижения уровня инвазии клеток.

Клеточная линия глиобластомы человека T98G была предоставлена Российской коллекцией клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Для детекции наличия шаперонов на мембране методом вестерн-блот анализа клетки предварительно разделяли на фракции – мембранную и цитоплазматическую, с помощью набора Mem-PER™ Plus Membrane Protein Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Результаты окраски показали, что мембрана клеток глиобластомы T98G характеризуется наличием таких шаперонов, как HSP60, HSP70, HSP90 и HSP110.

Для более глубокого понимания локализации HSP на мембране клеток T98G с помощью лизиса неионогенным детергентом и прерывистого центрифугирования в градиенте сахарозы выделили фракцию мембраны, обогащенную липидными рафтами, и провели их последующий хромато-масс-спектрометрический анализ. Результаты протеомного анализа подтвердили присутствие шаперонов HSP70 и HSP90 в липидных рафтах. При этом мы выявили, что HSP70 напрямую взаимодействует с белками, участвующими в ремоделировании цитоскелета, адгезии и миграции клетки: интегрином бета-1, немышечным миозином II и белками цепи тубулина бета-4В. Интересно, что HSP70 оказался также связан и с рецептором эпидермального фактора роста, который, как известно, оверэкспрессирован в опухолевых клетках и отвечает за их пролиферативную активность. Эти результаты свидетельствуют о том, что на мембране клеток глиобластомы человека T98G локализуется целый кластер шаперонов, которые могут напрямую или опосредованно участвовать в регуляции подвижности.

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ C2H2-ДОМЕНОВ ВО ВЗАИМОДЕЙСТВИИ
БЕЛКА CTCF С ХРОМАТИНОМ

**Ларионова Т. Д., Белова Е.В., Клименко Н.С., Максименко О.Г.,
Кырчанова О.В., Георгиев П.Г.**

Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

tt.larionova@gmail.com

Белок CTCF является ключевым архитектурным белком млекопитающих. Гомолог CTCF был найден у большей части животных, включая модельный организм *Drosophila melanogaster* (dCTCF). В структуре CTCF присутствуют 11 ДНК-связывающих доменов «цинковый палец» C2H2-типа (ZF), 5 из которых взаимодействуют с высококонсервативным 15 пн мотивом ДНК. В настоящее время точный механизм функционирования CTCF остается недостаточно изученным. Данная работа посвящена анализу роли кластера ZF CTCF во взаимодействии с хроматином у *Drosophila melanogaster*. Используя раннее выведенную в нашей лаборатории линию *D.melanogaster*, позволяющую заменять в геноме нативный dCTCF на мутантные варианты, мы экспрессировали dCTCF с заменой отдельных пальцев или их групп на аналогичные человеческие (hZF). Хотя аминокислотные последовательности «цинковых пальцев» у дрозофилы и человека похожи, замена групп ZF3-6 и ZF3-7 (но не ZF1-2 и ZF8-11) привела к наиболее сильным изменениям в морфологии и выживаемости дрозофил. С помощью анализа данных ChIP-seq линий с мутантными вариантами CTCF мы показали, что замены hZF3-6 и hZF3-7 приводят к значительному снижению связывания dCTCF с сайтами, ассоциированными с белком CP190. CP190 связывается с dCTCF в ядерных структурах, в которых происходит формирование запасов хроматиновых белков. Также CP190 связывается с большой группой архитектурных белков (включая dCTCF) на хроматине и формирует совместно с ними активно работающие промоторы и инсульторы. В результате замены отдельных «цинковых пальцев» и линкеров, которые их соединяют, было определено, что ZF6 и ZF7 и линкер между ними являются необходимыми для функциональной активности dCTCF. Полученные результаты показывают, что с помощью ZF3-7 CTCF человека и дрозофилы связываются с одинаковыми ДНК мотивами. Предполагается, что ZF6 и ZF7 узнают пока не охарактеризованный комплекс дрозофилы, который помогает правильной посадке белка CTCF на хроматин. Вероятно, у человека аналогичный комплекс также специфично узнает белок CTCF.

Работа выполнена за счет средств гранта РФФИ № 19-74-30026-П.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ ГОНОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ
NEISSERIA GONORRHOEAE В РОССИИ, 2015-2023

Ларкин А.А., Кандинов И.Д., Шаскольский Б.Л., Кравцов Д.В., Грядунов Д.А.

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

larkinatanat@yandex.ru

В 2023 году заболеваемость гонококковой инфекцией в России составила 7,8 случаев на 100 тыс. человек. Особое опасение вызывает стремительное распространение изолятов с устойчивостью к antimicrobial препаратам, в том числе к рекомендованным, цефтриаксону и азитромицину. Для молекулярного генотипирования гонококка, а также для выявления пандемически опасных клонов используется схема мультилокусного сиквенс-типирования (MLST), однако использование схемы MLST для быстрого и масштабного анализа больших выборок клинических изолятов *N. gonorrhoeae* в большинстве случаев является трудоёмким и нецелесообразным.

Целью данной работы была разработка нового метода молекулярного генотипирования гонококка, основанного на схеме MLST и являющегося дешевой и быстрой альтернативой. Задачи работы также включали получение характеристики современной российской популяции гонококка в период 2015-2023 годов, филогенетический анализ полученных MLST-генотипов, а также предсказание распространения детерминант антибиотикоустойчивости к цефтриаксону и азитромицину, ассоциированных с установленными MLST генотипами гонококка, в России на последующие пять лет.

Коллекция клинических изолятов *N. gonorrhoeae* была получена при сотрудничестве с ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России и включала 996 изолятов, собранных в период 2015-2023 годов. Проведено молекулярное генотипирование сформированной коллекции по протоколу MLST. Установлено 18 информативных однонуклеотидных полиморфизмов, позволяющих предсказать MLST-генотип гонококка, что легло в основу новой схемы типирования (mini-MLST). Разработаны олигонуклеотидные зонды и праймеры для идентификации информативных полиморфизмов на гидрогелевом ДНК-биочипе, что позволяет предсказать MLST-генотип гонококка с точностью до 98% и существенно сократить время анализа.

В российской популяции гонококка 2015-2023 годов доминировали MLST-генотипы 1594 (21,7%), 1901 (17,2%), 11177 (10,4%), 1892 (10,4%), 9363 (3,9%) и 10314 (3,4%). Генотип 1901 был ассоциирован с «мозаичным» аллелем *penA* – ключевой детерминантой устойчивости к цефтриаксону. Генотип 9363 был ассоциирован с присутствием «мозаичных» аллелей *mtrR* и *mtrD* – детерминант устойчивости к азитромицину. На долю пандемически опасных MLST 9363 и 1901 приходилось 3,2% и 1,2% выборки соответственно. Впервые были выявлены изоляты, характеризующиеся одновременным присутствием мозаичных *penA*, *mtrR* и *mtrD*. Два таких изолята были выделены в отдельную геногруппу MLST 10314. Прогноз распределения молекулярных детерминант устойчивости на 2025-2028 годы показал, что в среднем не менее 12% российской популяции гонококка будет содержать «мозаичные» аллели *penA*. К 2028 году доля изолятов, имеющих «мозаичные» аллели *mtrR* и *mtrD*, будет на уровне

18%. Элиминация ключевых детерминант устойчивости к азитромицину и цефтриаксону в российской популяции гонококка в ближайшее время маловероятна.

Проведенный анализ клинических изолятов *N. gonorrhoeae* с помощью разработанных ДНК-биочипов и схемы mini-MLST продемонстрировал высокую эффективность для генотипирования гонококка. Метод предсказания MLST с использованием 18 информативных полиморфизмов является простой и экономически эффективной альтернативой существующим схемам генотипирования, и позволяет упростить массовый эпидемиологический скрининг *N. gonorrhoeae*.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 24-25-20084.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ГЛУТАМАТЕРГИЧЕСКОЙ ОСИ У ДОМАШНЕГО КРОЛИКА:
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ СНИЖЕНИЯ АГРЕССИВНОСТИ
В ПРОЦЕССЕ ДОМЕСТИКАЦИИ

Леонов А.В., Косовский Г.Ю.

Научно-исследовательский институт пушного звероводства и кролиководства
имени В.А. Афанасьева, Родники, Россия

thelastmanintheworld@gmail.com

Изучение доместикиции и отбора на снижение агрессивности актуально для понимания эволюции социального поведения, нейробиологических основ адаптации к человеку, а также для разработки подходов к улучшению благополучия домашних видов. До 40% изменчивости поведенческих характеристик, включая агрессию и обучаемость, обусловлены генетически, с участием конвергентных молекулярных механизмов у разных видов. В ней важную роль выполняет изменчивость экспрессии генов глутаматергической оси, регулирующих синаптическую пластичность и нейрональную активность. Так, оказалось, что различия в экспрессии генов *grik3* и *gria2* ассоциированы с реактивной агрессией и аутоагрессией у млекопитающих, в частности, у мышей, собак, крупного рогатого скота. Обнаружено также, что размах изменчивости по их экспрессии существенно больше у хищника, американской норки (*Neogale vison*), по сравнению с травоядным, домашним кроликом (*Oryctolagus cuniculus*). Тем не менее, у домашнего кролика наблюдается выраженная изменчивость в агрессивном и аутоагрессивном поведении, приводящая к экономическим потерям при содержании. В этой связи целью настоящей работы был сравнительный анализ половой и породной специфичности экспрессии генов *grik3* и *gria2*.

Исследование выполнено на 8 кроликах пород «советская шиншилла» и «белый великан» (5 месяцев, оба пола). Из переднего отдела мозга отобрано по 100 мг ткани для анализа. Экстракцию тотальной РНК и синтез кДНК проводили коммерческим набором. Количественную ПЦР в реальном времени выполняли с использованием SYBR-green красителя. Праймеры для генов-мишеней *grik3*, *gria2* и референсного *hprt* (контроль стабильной экспрессии) разработаны в PrimerBlast. Условия амплификации оптимизированы по температуре и циклам. Экспрессию генов рассчитывали методом $2^{-\Delta Ct}$ в трёх биологических повторностях. Статистическую значимость различий ($p \leq 0.05$) оценивали в STATISTICA 10.0.

Сравнительный анализ экспрессии генов *gria2* и *grik3* у двух пород домашних кроликов выявил породоспецифичные особенности и половой диморфизм. У кроликов породы «советская шиншилла» средний уровень экспрессии *gria2* ($2,23 \pm 0,37$) был несколько ниже, чем у «белого великана» ($3,03 \pm 0,40$), так же, как и по экспрессии гена *grik3*, что может свидетельствовать о породных различиях в регуляции глутаматергической системы, и быть потенциально связано с более низкой агрессивностью или адаптивными поведенческими особенностями. Половой диморфизм в экспрессии *gria2* проявился противоположными тенденциями у исследуемых пород: у «советской шиншиллы» самцы демонстрировали пониженный уровень экспрессии по сравнению с самками, тогда как у «белого великана»

наблюдалась обратная картина. Такая вариабельность может коррелировать с поведенческой пластичностью, включая тревожность и агрессию, однако для подтверждения этой гипотезы требуются дополнительные исследования.

Выполненный анализ позволил выявить определенные тенденции к отличиям в экспрессии генов *gria2* и *grik3* у двух пород домашнего кролика, не смотря на историческую близость их генофондов в процессе их формирования, а также выраженную половую и внутривидовую изменчивость, потенциально связанную с уровнями тревожности и агрессивности.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ МИКРОЧИПОВ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ ДЛЯ ДИАГНОСТИРОВАНИЯ АЛЛЕРГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ

Логвиненко Е.А.

Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

logvinenko.ea@phystech.edu

Высокопроизводительные тест-системы на основе биологических микрочипов являются предметом научных исследований уже несколько десятилетий. Биологический микрочип представляет собой матрицу ячеек с иммобилизованными зондовыми молекулами, обладающими высокой специфичностью к соответствующей мишени в анализируемом биологическом образце. Молекулярные зонды могут быть различными: к примеру, нуклеиновые кислоты, гликаны, белки или иные лиганды. Благодаря широкому выбору молекулярных зондов и возможности одновременно анализировать большое количество образцов биочипы находят применение во многих клинических областях *in vitro* диагностики.

Было проведено тестирование прототипа тест-системы на основе биологического микрочипа, предназначенной для детекции аллерген-специфических IgE в крови пациентов: проведено сравнение результатов диагностики, полученных при помощи прототипа и при помощи тест-системы, которая зарегистрирована в Европе и используется в клинической практике. Обе тест-системы представляют собой набор из двадцати четырех ячеек с матрицами иммобилизованных белков аллергенов, в ячейки вносится сыворотка крови пациента, далее вносится раствор антител, ковалентно связанных с флуоресцентной меткой. Интенсивность флуоресценции в ячейках, в которых произошло связывание, фиксируется при помощи люминесцентного микроскопа. Различаются тест-системы методом иммобилизации аллергенов, деталями протокола проведения анализа, а также антителами с флуоресцентной меткой.

При помощи тест-систем были проведены анализы сывороток десяти пациентов, страдающих аллергиями. Прототип показал меньшую чувствительность по сравнению с зарегистрированным биочипом, ложноположительных результатов выявлено не было. Также был проведен эксперимент, в котором для зарегистрированной тест-системы использовался протокол анализа и раствор антител прототипа, и наоборот. В обоих случаях наблюдалось снижение чувствительности теста.

ПОИСК СИГНАЛЬНЫХ ПЕПТИДОВ В ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ СЕКРЕТИРУЕМЫХ БЕЛКОВ МИКРООРГАНИЗМОВ РОДА *PSEUDOMONAS*

Машенцева М.А.¹, Позднякова-Филатова И.Ю.²

¹Тульский государственный университет, Тула, Россия

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

marya.com2004@gmail.com

Секреция рекомбинантных белков в культуральную жидкость удешевляет их производство. Часто для получения белков в культуральной жидкости используют клетки мезофильных дрожжей *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*), однако для дрожжей характерно гипергликозилирование, что приводит к снижению функциональной активности некоторых рекомбинантных белков. Клетки бактерий могут служить альтернативной экспрессионной системой: в настоящий момент несколько компаний разработали системы на базе клеток *Bacillus subtilis*, информация о других коммерчески доступных экспрессионных системах в литературе отсутствует. Мы планируем разработать экспрессионную систему на базе клеток псевдомонад, как альтернативу *B. subtilis*, наличие широкого спектра штаммов-продуцентов повышает вероятность получения функционально активного препарата белка.

На первом этапе нам необходимо было выбрать сигнальный пептид, который является сигналом секреции. В базе данных BastionHub (дата обращения: 07.07.2024) размещены 364 белка псевдомонад, которые относятся к системам секреции T1SS, T2SS, T3SS и T6SS. Для того, чтобы локализовать сигнальный пептид в составе белка, мы использовали программы Phobius, SignalP-6.0 и PrediSi (дата обращения к программам 12.04.2025). Программа Phobius определила последовательности сигнальных пептидов для 39 белков, программа SignalP – для 23, программа PrediSi – для 29.

Для 18 белков последовательность сигнального пептида была определена всеми тремя используемыми программами: T2SS – CbpD (Q9I589), Eta (P11439), IMPa (Q9I5W4), PrpL (Q9HWK6), LipA (P26876), LipC (Q9HUZ7), PhoA (P35483), LoxA (Q9I4G8), PaAP (Q9HZQ8), PA2377 (Q9I1A2), EddA (Q9HXA3), PA4140 (Q9HWP1), PA2783 (Q9I060), GlpQ (Q9I6E6), PhoA2 (P35482), PA0689 (Q9I5N7), CbpE (A6V168), PhoA2 (Q02HI0); T3SS – HopAJ1 (Q889A9).

В дальнейшем мы планируем слить последовательность некоторых обнаруженных сигнальных пептидов с последовательностью GFP и определить эффективность экспорта белка в культуральную жидкость.

СОЗДАНИЕ МОДЕЛИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ВОЗРАСТНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЭНДОМЕТРИЯ

Мельник А.П., Дерябин П.И., Бородкина А.В.

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

amelnik20018@mail.ru

Возрастное снижение женской фертильности традиционно связывают с изменением гормонального фона, состоянием яичников и ухудшением качества ооцитов, что повышает вероятность появления генетически аномальных эмбрионов и неудач имплантации. В последнее время также рассматривается влияние эндометриального фактора на этот процесс. Изучение молекулярных и функциональных аспектов старения эндометриальных стромальных клеток (эСК), являющихся ключевым компонентом эндометрия, может помочь в разработке новых методов повышения эффективности вспомогательных репродуктивных технологий у женщин среднего и позднего репродуктивного возраста.

Наиболее очевидный способ исследования – сравнительный анализ эСК, полученных от доноров разных возрастных групп. Однако этот метод имеет технические сложности: во-первых, требует большой выборки здоровых доноров, а во-вторых, вариабельность менструального цикла затрудняет унификацию образцов биопсии. В качестве альтернативы была рассмотрена возможность использования моделей эпигенетического старения.

В данной работе применена модель на основе индуцибельной экспрессии редкощепящей эндонуклеазы I-PpoI, основанная на информационной теории старения. Согласно этой теории, возрастные изменения клеток происходят из-за постепенной эрозии эпигенетического ландшафта в процессе репарации ДНК. При восстановлении повреждений белки, поддерживающие структуру хроматина, перемещаются к участкам разрывов, что со временем приводит к их перераспределению. Это в последствии приводит к нарушению функционированию клеток, их идентичности и, в конечном итоге, старению. Эндонуклеаза I-PpoI вызывает двухнитевые разрывы в интронных участках генов, но ее преимущество в том, что она вызывает меньше мутаций по сравнению с другими методами, такими как CRISPR, химические агенты или радиация. Репарация этих разрывов приводит к перемещению белков к местам повреждений, вызывая эпигенетическое старение клеток *in vitro*.

Цель исследования заключалась в создании системы индуцибельной экспрессии I-PpoI и получение генетически модифицированной линии эСК для изучения возрастных изменений.

Первым этапом стала оптимизация кодонов кДНК I-PpoI для человека, так как изначально метод разрабатывался на мышинных клетках. Затем последовательность гена была собрана из коротких олигонуклеотидных последовательностей с помощью ПЦР и клонирована в лентивектор. Для индуцибельной экспрессии была разработана двухвекторная система, созданная методами молекулярного клонирования. Линия эСК получалась путем последовательной трансдукции: первый вектор содержал последовательность I-PpoI, перед промотором которой содержалась регуляторная последовательность Tet-operator. Эта

последовательность представляет собой сайт связывания белка репрессора TetR, кодирующийся во втором векторе. Благодаря такой системе экспрессия I-Pro1 активируется только при добавлении в среду клеток тетрациклина.

Таким образом, была получена система индуцибельной экспрессии редкоцепящей эндонуклеазы I-Pro1 и выведена линия генно-модифицированных клеток ЭСК для дальнейшего изучения возраст-зависимых изменений стромальных клеток эндометрия.

Работа поддержана грантом РФФ № 24-74-10002.

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ СОЕДИНЕНИЯ
ТИЕНО[3,2-Е]ПИРРОЛО[1,2-А]ПИРИМИДИНА СВЯЗЫВАЮТСЯ С АКТИВНЫМ
ЦЕНТРОМ БЕЛКА PARP-1 И ИНГИБИРУЮТ ЕГО ФЕРМЕНТАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ

Меркурьев А.В.¹, Егоров В.В.², Васин А.В.^{1,3}

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

²НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

³НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

merkuryev_av@mail.ru

Разработка новых терапевтических молекул для борьбы с онкологическими заболеваниями является актуальной задачей, требующей решения. Ранее соединения тиено[3,2-е]пирроло[1,2-а]пиримидина продемонстрировали эффективность и безопасность при моделировании опухолевых заболеваний в системах *in vivo*. В результате *in silico* моделирования было показано, что одной из их возможных мишеней является в том числе поли(АДФ-рибоза)полимераза-1 (PARP-1), которая играет ключевую роль в регуляции репарации ДНК. Нарушение активности PARP-1 связывают с малигнизацией клеток. При этом опухолевые клетки, несущие мутации в генах *BRCA1/2*, чувствительны к ингибированию ферментативной активности PARP-1. Хотя на рынке существуют лицензированные ингибиторы PARP-1 для терапии онкологических заболеваний, сложностью в их применении остается развитие у опухолевых клеток устойчивости к ним. Разработка новых соединений, способных ингибировать PARP-1, поможет в преодолении возникновения резистентности при подборе терапии.

В результате молекулярного докинга соединений тиено[3,2-е]пирроло[1,2-а]пиримидина (**9cb**, **10ic**, **11jc**) с PARP-1 было показано, что исследуемые соединения обладают сравнимыми значениями изменения свободной энергии связывания ΔG с контрольным соединением (**RPB**), применяемым в терапии. Следует отметить, что значения ΔG у проанализированных соединений значительно ниже при связывании с активным центром PARP-1 в сравнении с ДНК-связывающим доменом, что свидетельствует о специфичности связывания соединений. Было показано, что исследуемые соединения образуют ключевые связи с аминокислотными остатками, участвующими в ферментативной активности PARP-1. Из этого следует наличие потенциала **9cb**, **10ic**, **11jc** в эффективном и высокоспецифичном ингибировании ферментативной активности PARP-1.

В результате анализа ферментативной активности *in vitro* была показана способность исследуемых соединений к ингибированию PARP-1 при концентрациях ингибиторов порядка 0.1 мМ. С помощью нелинейной регрессионной модели была рассчитана полумаксимальная ингибирующая концентрация наиболее эффективного соединения **11jc** ($IC_{50} = 38 \mu M$).

Таким образом, соединения тиено[3,2-е]пирроло[1,2-а]пиримидина могут выступать эффективными и специфичными ингибиторами PARP-1 при подборе таргетной терапии рака.

Необходимы дальнейшие исследования кинетических и структурных параметров связывания рассматриваемых соединений с PARP-1.

Литература.

1. Gorbunova I. A. [и др.]. Design and one-pot synthesis of new substituted pyrrolo[1,2-a]thieno[3,2-e]pyrimidine as potential antitumor agents: *In vitro* and *in vivo* studies // *Bioorganic Chemistry*. 2024. (148). С. 107468.
2. Rogova A. [и др.]. Synthesis of thieno[3,2-e]pyrrolo[1,2-a]pyrimidine derivatives and their precursors containing 2-aminothiophenes fragments as anticancer agents for therapy of pulmonary metastatic melanoma // *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2023. (254). С. 115325.

АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ ХИТИНАЗЫ КАМЧАТСКОГО КРАБА

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

¹ФГБОУ ВО Тульский государственный университет, Тула, Россия

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

mininajulia2002@gmail.ru

Хитиназы – это гидролазы, катализирующие деградацию хитина. Хитинолитическая активность была обнаружена в гепатопанкреасе камчатского краба, однако к настоящему моменту данных о том, какой белок ее проявляет, нет. Мы идентифицировали в транскриптомных данных контиг, содержащий информацию о белке молекулярной массой 46.6 кДа, имеющим сходство с хитиназами из базы данных UniProtKB/Swiss-Prot. Лучшее совпадение – эндохитиназа бражника табачного (P36362): E-value 4e-105, покрытие 94%, идентичность 42.73%.

Мы смоделировали трехмерные структуры хитиназы камчатского краба и белков, схожих с ней, с помощью сервера AlphaFold Server. Для функционального анализа доменов использовали сервер InterPro. Хитиназа *Paralithodes camtschaticus* является членом семейства Glycosyl Hydrolase Family 18 и состоит из N-концевого хитин-гидролизующего домена (1 – 296 а.о.), хитин-связывающего домена 2 типа (346 – 398 а.о.) и C-концевого консервативного неупорядоченного участка, предсказанная последовательность которого частично перекрывается с хитин-связывающим доменом (393 – 423 а.о.)

Мы провели структурный анализ 28 белков из базы UniProtKB/Swiss-Prot и обнаружили, что все они относятся к 18 семейству, содержат сигнальный пептид на N-конце, хитин-связывающий домен на C-конце.

Хитиназа камчатского краба – это пищеварительный фермент и, теоретически, должна иметь сигнал секреции. Однако ни один из используемых нами серверов не предсказал сигнальный пептид в последовательности исследуемого фермента ни на N-конце, ни в другом месте. Мы обнаружили, что C-концевой консервативный неупорядоченный участок, функция которого неизвестна, богат незаряженными аминокислотами (преимущественно пролином). Пролин-богатые мотивы белков могут принимать участие в белок-белковых взаимодействиях, но в литературе не описано их участие в димеризации хитиназ, поэтому мы не исключаем, что C-концевой участок хитиназы камчатского краба выполняет иную роль, в том числе роль сигнала секреции.

СОЗДАНИЕ НОВОЙ ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ СУПЕРПРОДУКЦИИ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ

Михайлина А.О., Зюркалова Д., Костарева О.С.

ФГБУН Институт белка РАН, Пушино, Россия

alisamikhaylina@vega.protres.ru

Получение различных категорий белковых препаратов – одна из самых первостепенных задач в любой отрасли, где задействованы биохимические процессы. Создание эффективной, простой и экономически выгодной системы получения рекомбинантных белков имеет высокую степень значимости как в биотехнологической, так и в фундаментальной научной сфере. В большинстве своем лабораторные исследования для получения белков используют бактериальную систему гетерологичной экспрессии генов. Однако применение данной системы часто сопряжено с большими трудностями, связанными со свойствами некоторых целевых белков. Малостабильные белки в ходе суперпродукции могут образовывать нерастворимые тельца включения, агрегировать или подвергаться воздействию протеаз. Более того, некоторые из них могут быть токсичными для клетки и при суперпродукции негативно воздействовать на клетку. Наша работа направлена на то, чтобы модифицировать имеющуюся систему и упростить процесс получения и очистки рекомбинантных белков.

Нами создана система, в которой рекомбинантный белок может быть экспонирован непосредственно на поверхность клеток *Escherichia coli*, что позволит проводить очистку целевого белка в одну стадию. Конструкция, на основе системы Lpp-OmpA белка внешней мембраны, содержит гибридную последовательность кодирующую: сигнальный пептид липопротеина (Lpp) *E. coli*; фрагмент белка внешней мембраны OmpA, в качестве якорного белка; а также последовательность для химического отщепления целевого белка SNAC-tag (-GSHHW-); и участок для вставки гена рекомбинантного белка. Способ специфического расщепления с помощью Ni^{2+} аминокислотной последовательности -G[^]SHHW-, SNAC-tag, был описан сравнительно недавно. Применение этого метода избавит от дополнительного этапа очистки готового препарата от расщепляющего агента в отличие от методик с применением протеаз. Чтобы направить рекомбинантный белок на внешнюю мембрану *E. coli* в системе Lpp-OmpA последовательность целевого белка будет находиться на С-конце гибридной последовательности. Конструкции получены на основе вектора pET11a под контролем T7-промотора.

Предложенная нами модификация позволит значительно усовершенствовать систему наработки белков, которая на данный момент уже широко используется, расширить границы ее применения и существенно упростить процесс дополнительной очистки продукта.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 25-24-00331.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ МАКРОЦИКЛИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДНЫХ НА СТРУКТУРЫ ДНК МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Михеева Е.И.

Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

ei.mikheeva@yandex.ru

Макроциклические соединения амфифильной природы известны свойствами, благодаря которым могут рассматриваться в качестве агентов по доставке генетических конструкций. Кроме того, в ряде работ подчеркивалась терапевтическая значимость макроциклических производных, в частности соединений каликсаренового ряда, как потенциальных агентов, обладающих противоопухолевой активностью [1]. В рамках прикладных направлений остается нераскрытым аспект изменений в структуре таргетных молекул нуклеиновых кислот, включая различные ДНК-содержащие последовательности, после воздействия макроциклическими комплексами, в частности каликсареновыми производными, с получением визуального подтверждения на уровне изменения в структуре ДНК-дуплексов. В данном контексте, в данной работе в качестве основного метода был выбран метод атомно-силовой микроскопии в полуконтактном режиме для анализа биомолекул [2-4].

В рамках оценки потенциального воздействия каликсареновых соединений на структуру ДНК была использована модельная система синтезированной последовательности ДНК d(CGCGAATTGCGC)₂, известная как структура Додекамер Дрю-Дикерсона (ДДД). В результате было выявлено преимущественное образование кристаллических структур для пяти производных, а также тактоидных форм с поперечно-полосатой структурой. Сформирована библиотека АСМ-изображений, на основе которой построена зависимость распределения тактоидных структур в ряде анализируемых образцов. Ввиду образования агрегатов исследуемых биомолекул с мягкой поверхностью исследование и анализ специфических, так называемых тактоидных, структур были сопряжены с подбором индивидуальных параметров сканирования каждого из образцов, как следствие, данные изменения отразились на качестве изображений при распознавании специфических структур.

Таким образом, в работе продемонстрированы подходы в методологии анализа биомолекул на основе ДНК-содержащих последовательностей и исследованы основные изменения, определяемые на уровне топографии профиля ДНК-структур после взаимодействия с каликсареновыми соединениями, что сформировало основу для последующего определения основного механизма взаимодействия макроциклических комплексов с ДНК с расчетом силовых характеристик.

Литература.

1. Muley S. [et al.]. Calixarene-Guest Complexes: The Next Innovation in Delivery of Drugs and Biologics // *Adv. Therap.* 2024. V. 7(2400207).
2. Dubrovin E. Atomic force microscopy-based approaches for single-molecule investigation of nucleic acid-protein complexes // *Biophys Rev.* 2023. V. 15(5): 1015–1033.
3. Raveendran M. [et al.]. Rational design of DNA nanostructures for single molecule biosensing // *Nat Commun.* 2020. V. 11(1): 4384.
4. Kovaleva N. [et al.]. Kinetics of the Conformational Transformation between B- and A-Forms in the Drew-Dickerson Dodecamer // *ACS Omega.* 2020. V. 5(51): 32995–33006.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ШАПЕРОНОВ ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ ВЫХОДА РЕКОМБИНАНТНОЙ МЕДЬСОДЕРЖАЩЕЙ ОКСИДАЗЫ

Моисеева А.А.¹, Петракова М.П.², Егоров К.А.¹, Трубицин И.В.², Трубицина Л.И.²

¹Тульский государственный университет, Тула, Россия

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

anna.moiseeva002@gmail.com

Лакказы (КФ 1.10.3.2, пара-дифенол: кислород оксидоредуктазы) относятся к классу медьсодержащих оксидаз (МСО). Они часто встречаются в природе и участвуют в процессах окисления широкого диапазона субстратов, восстанавливая при этом молекулярный кислород до воды. В биотехнологии лакказы применяют во многих областях промышленности, в частности, в текстильной, целлюлозно-бумажной и пищевой. Однако производство лакказы из нативных источников не может удовлетворить растущий спрос рынка из-за низкого выхода и несовместимости стандартных промышленных процессов ферментации с условиями, необходимыми для роста многих микроорганизмов, из-за чего актуальной задачей является получение рекомбинантных лакказ.

Escherichia coli в первую очередь используется для производства рекомбинантных белков за счет ее быстрого роста, простоты манипуляций и экономической эффективности. К недостаткам использования *E. coli* относится частый неправильный фолдинг белков из-за их высокой скорости наработки (особенно это актуально для гетерологичных ферментов). Для устранения данного недостатка требуется наличие белков-шаперонов для правильного сворачивания белка.

Экспрессия гена МСО – *ht6* (идентификатор в NCBI: WP_012945341.1, предположительно, лакказа) из штамма галофильной археи *Haloterrigena turkmenica* ВКМ В-1734 проводилась в четырех штаммах клеток-хозяев *E. coli* (Origami B(DE3), BL21 Star (DE3), ArcticExpress (DE3), SHuffle). Также штаммы дополнительно были трансформированы тремя различными плазмидами с генами-шаперонами (pGro7, pKJE7, pG-KJE8). В качестве контроля использовали штамм, трансформированный только плазмидой с геном лакказы (таблица 1). Условиях индукции: рост культуры 15 часов при 15°C и 100 об/мин после внесения индуктора ИПТГ и сульфата меди.

Таблица 1. Получение рекомбинантной МСО (лакказа Ht6) при использовании разных штаммов клеток-хозяев *E. coli* и плазмид с шаперонами.

Штамм клеток-хозяев <i>E. coli</i>	Плазмида с шаперонами			
	pGro7	pKJE7	pG-KJE8	Без плазмиды
Origami B(DE3)	Есть наработка	Есть наработка	Есть наработка	Есть наработка
BL21 Star (DE3)	-	-	-	Есть наработка
ArcticExpress (DE3)	Есть наработка	Есть наработка	Есть наработка	Есть наработка
SHuffle	Есть наработка	-	-	-

Было установлено, что для получения рекомбинантной лакказы Ht6 с наибольшим выходом можно использовать клетки Origami B(DE3) с pKJE7, клетки ArcticExpress (DE3) с pGro7 и клетки Shuffle с pGro7. Лакказа Ht6 была очищена при помощи аффинной хроматографии. Фермент был способен окислять АБТС (типичный лакказный субстрат) в диапазоне pH 2,5-5,0. Максимальная скорость окисления АБТС наблюдалась при pH 3,0. Планируется продолжение работы по исследованию физико-химических свойств новой лакказы, а также по выявлению её биотехнологического потенциала.

Выводы: установлены оптимальные условия для получения новой архебактериальной лакказы Ht6; фермент получен в гомогенном состоянии; лакказа окисляла АБТС с максимальной скоростью при pH 2,5-3,5.

Работа поддержана грантом РФФ № 24-14-20013 и Комитетом Тульской области по науке и инноватике.

АНТИ-EGFR И АНТИ-CD133 АПТАМЕРЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ МАРКЕРОВ ОПУХОЛИ МОЗГА – ГЛИОБЛАСТОМЫ

**Моисеенко В.Л.^{1,2,3}, Антипова О.М.^{1,2,3}, Иванов Б.М.^{1,2}, Дзариева Ф.М.^{3,4}, Савченко Е.А.³,
Пронин И.Н.³, Павлова Г.В.^{3,4}, Копылов А.М.^{1,2,3}**

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

²Научно-исследовательский институт физико-химической биологии
имени А.Н. Белозерского, Москва, Россия

³Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии
им. ак. Н.Н. Бурденко, Москва, Россия

⁴Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

valerian.moiseenko@gmail.com

Аптамеры – это олигонуклеотиды, узнающие определённые мишени; аптамеры часто называют «химическими антителами». Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) – представляет собой значимый опухолевый маркер глиобластомы (ГБ), гетерогенной опухоли головного мозга человека. Маркер недифференцированных клеток, CD133, выбран как индикатор популяции опухолевых стволовых или прогениторных клеток. Разработка анти-EGFR и анти-CD133 аптамеров для детекции маркеров ГБ – это ключевая задача аптатераностики ГБ. Целью работы была оценка использования анти-EGFR и анти-CD133 аптамеров для детекции маркеров на клетках перевиваемых культур ГБ пациентов и для доставки терапевтического агента доксорубина.

В работе изучали известные анти-CD133 аптамеры: 2'-F-замещенные по пиримидин-нуклеотидам (2'FY-) РНК-аптамеры: A15, B19, и ДНК-аптамеры: Ap1M, Ap2, Cs1, Cs5; анти-EGFR аптамеры: известные 2'FY-РНК-аптамеры ME07, CL4, и ДНК-аптамеры U2, U31, а также авторские аптамеры - ДНК-аптамер GR20 и сконструированный с помощью компьютерного моделирования ДНК-аптамер G01.

Анти-EGFR аптамеры GR20 и G01 обладают вторичной структурой: в 1H ЯМР-спектрах присутствуют сигналы имино-протонов пар AT и GC. Методом интерферометрии биослоев определена аффинность анти-EGFR аптамеров и антител C225 к рекомбинантному внеклеточному домену EGFR человека (EGFR*): аптамеры уступали аптителам только в значениях констант скоростей ассоциации. С помощью анти-EGFR и анти-CD133 аптамеров можно детектировать эти маркеры на клетках перевиваемых культур из опухолей ГБ пациентов: Sus, G01, 90, 107 методом проточной цитофлуориметрии и флуоресцентной микроскопии. Как референс-клетки использованы стандартные линии: U87 для EGFR+ и Caco-2 для CD133+. Клетки культуры пациента Sus взаимодействуют с олигонуклеотидами необычным образом, поскольку у них отсутствуют мишени.

Доксорубин (ДОКСО) способен интеркалировать в оригинальную анти-EGFR аптамерную конструкцию с комплементарным олигонуклеотидом (АККО GR20) и обеспечивать цитотоксичность для клеток ГБ.



28-я Пушинская школа-конференция молодых ученых с
международным участием «Биология – наука XXI века»
Пушино, 21–24 апреля 2025 г.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2024-561 от 24.04.2024 г.)

СОЗДАНИЕ БИБЛИОТЕКИ ПРОМОТОРОВ С ПОМОЩЬЮ ПЦР СО СНИЖЕННОЙ ТОЧНОСТЬЮ И РАЗРАБОТКА ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СКРИНИНГОВОГО МЕТОДА ОЦЕНКИ ПРОДУКТИВНОСТИ ЭКСПРЕССИИ ДЛЯ ОТБОРА КЛОНОВ

Мухина Т.В., Бушлаева Е.А., Бочкарева М.Д., Хасаншина З.Р.

ЗАО «Фарм-Холдинг», лаборатория генной инженерии и ферментации,
Санкт-Петербург, Россия

Tatiana.Mukhina@geropharm.com

Введение. Создание белковых продуктов с минимальными затратами и максимальной эффективностью остается ключевой задачей биотехнологии. Основные направления разработки включают оптимизацию генно-инженерных элементов штаммов и условий культивирования. Одним из перспективных подходов для увеличения удельной продуктивности является промоторная инженерия, которая включает в себя модификацию последовательностей с использованием компьютерного моделирования или создание библиотек элементов путем внесения случайных мутаций.

В данной работе предлагается метод создания библиотеки промоторов с помощью полимеразной цепной реакции, насыщающего мутагенеза, фенотипической сортировки и секвенирования с целью увеличения удельной продуктивности наработки целевого продукта в штамме *E.coli*.

Создание библиотеки промоторов с помощью случайного мутагенеза (error-prone PCR) – это мощный инструмент для усиления экспрессии генов. Повышение уровня синтеза белка в клетках позволит обеспечить большой выход целевого продукта при неизменных затратах, что делает процесс производства белков более экономически выгодным.

Материалы и методы. На основе литературных данных выбран метод ПЦР со сниженной точностью для создания библиотеки с однонуклеотидными мутациями. После амплификации продукты ПЦР заклонированы в экспрессирующие векторы. Для скрининга клонов использован флуоресцентный белок GFP, закодированный в одной рамке считывания с целевым белком, что позволило анализировать экспрессию с помощью планшетного ридера. Продуктивность лучших клонов оценивалась наработкой целевого продукта в сочетании с полуколичественным методом оценки продуктивности, далее последовательности секвенировались методом Сэнгера.

Результаты и обсуждения. Разработан метод оценки силы экспрессии белка в штаммах *E. coli* с использованием генетических конструкций, где гены целевых белков слиты с геном флуоресцентного белка GFP. Экспрессия анализировалась с использованием планшетного ридера, что позволило одновременно сравнивать продуктивность 360 клонов, ускоряя скрининг библиотек генетических элементов.

В рамках метода Error-Prone PCR было получено более 200 клонов, но значимых изменений в экспрессии не выявлено. Для улучшения результатов планируется использование полимераз с более низкой точностью. По итогам оптимизации ПЦР для увеличения количества ошибок сделаны следующие выводы: дополнительное стрессирование полимеразы путем нагрева перед добавлением в мастер микс, использование избыточного количества циклов амплификации, уменьшение концентрации dATP, dGTP, увеличение концентрации dCTP, dTTP, увеличение концентрации Mg^{2+} , уменьшение Mn^{2+} снижает точность полимеразы.

БЕЛКИ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ КАСКАДОВ ПРИ ПОЧЕЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Наход В.И., Буткова Т.В., Копылов А.Т., Никольский К.С., Кайшева А.Л.

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

kardavaleriya@yandex.ru

Заболевания почек чрезвычайно распространены в современном мире, а их клинические проявления во многом схожи. Продолжительный период бессимптомного развития заболеваний затрудняет диагностику и как следствие, своевременный выбор эффективной стратегии лечения. Актуальным является поиск кандидатных маркеров, отвечающих строгим клиническим требованиям в контексте ранней диагностики почечных заболеваний.

В рамках исследования мы провели анализ состава белков и возможных протеоформ в образцах плазмы крови 75 участников, среди которых 51 пациент с установленным диагнозом урологического заболевания: мочекаменная болезнь, киста почки, рак почки; а также 24 условно-здоровых участника, которые составили группу контроля. Анализ биохимических показателей крови выполнялся с применением полуавтоматического анализатора «Торус 1200» (Москва, Россия). Протеомный анализ проводили на квадрупольном времяпролетном масс-спектрометре Xevo™ G2-XS Q-tof (Waters, Wilmslow, UK) в сочетании с хроматографической системой Acquity™ UPLC H Class Plus (Waters, Великобритания). Выявлены белки протеолитических каскадов крови CFB, SERPINA3, HPX, HRG, SERPING1, HBB, ORM2, CP, оказывающие наибольший вклад в развитие патологии, что позволило классифицировать группы больных с исследуемыми патологиями. В исследованных образцах выявлены фосфорилированные формы белков CFB, C4A/C4B, F2, APOB, TTR, NRAP, специфичных по отношению к группам больных почечными заболеваниями. Определена локализация посттрансляционной модификации в белке: координата, вторичная структура, структурный мотив, функциональный домен, возможная роль в формировании комплексов с природными белками-партнерами. Показано, что пептиды, содержащие модифицированные аминокислотные остатки, локализованы в интерфейсе связывания с белком партнером, либо вблизи сайта связывания.

Таким образом, представленные в исследовании белки, вероятно, могут быть ассоциированы с развитием почечных заболеваний и представляют интерес для дальнейшего анализа их медицинской значимости с большим числом участников и групп сравнений.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021 - 2030 годы) (№ 125020701771-5).

КЛОНИРОВАНИЕ И ГЕТЕРОЛОГИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГАЛЛАТНОГО ОПЕРОНА
PSEUDOMONAS PUTIDA KT2440 В КЛЕТКАХ *PSEUDOMONAS PUTIDA* PCL1760

Некрасов И.В.^{1,2}, Суханов А.Ю.², Валидов Ш.З.²

¹Казанский («Приволжский») федеральный университет, Казань, Россия

²ФИЦ КазНЦ РАН, лаборатория Молекулярно-генетических и микробиологических методов,
Казань, Россия

ilya_nekrasov_03@inbox.ru

Лигнин является перспективным источником ароматических соединений ввиду разнообразия ароматических соединений, входящих в его состав. Однако данное соединение ввиду высокой стабильности и разнообразия С-С и С-О связей трудно перерабатывается традиционными химическими методами. Одним из подходов для решения проблемы переработки лигнина является его биологическая трансформация с использованием рекомбинантных штаммов, в геном которых интегрированы гены катаболизма G-, H- и S-форм. Однако пути разложения S-форм лигнина приводят к образованию единственного производного – галловой кислоты.

В связи с этим данное соединение можно использовать в качестве источника углерода при создании рекомбинантного штамма на основе организма *Pseudomonas putida* PCL1760, что будет способствовать адаптации данного организма к лигнину. Целью данной работы является клонирование и изучение гетерологичной экспрессии галлатного оперона *Pseudomonas putida* KT2440 в штамме *Pseudomonas putida* PCL1760 для его дальнейшего использования в создании рекомбинантного штамма для биотрансформации лигнина и его производных.

Для этого ген *galA* и кластер *galBCD* были амплифицированы из выделенной ДНК *P. putida* KT2440 и интегрированы в вектор pJNTN-1 методом сборки по Гибсону с последующей трансформацией в клетки *P. putida* PCL1760 путём электропорации. Результаты ПЦР, рестрикционного анализа и секвенирования выделенной конструкции показали корректность вставки целевых генов в вектор pJNTN-1. Для проверки галлат-разрушающей активности на основе среды ВМ использовалась среда с добавлением кальция, магния и железа в качестве кофакторов и pH=6.7. Клетки были адаптированы к данной среде путём последовательного посева с жидкой LB. Определение остаточного количества галловой кислоты в среде определялось путём спектрофотометрического измерения продуктов окисления субстрата после инкубации с пероксидазой хрена.

Результаты экспериментов показали способность штамма перерабатывать галловую кислоту, поскольку спустя 24 и 48 часов наблюдалось статистически достоверное уменьшение субстрата в сравнении с отрицательным контролем (значения p-value 0.03826 и 0.04043 соответственно). Статистический анализ данных динамики роста *P. putida* PCL1760:pJNTN-1:GalABCD показал достоверное увеличение роста культуры трансформантов в сравнении с отрицательным контролем. Между кривой роста клеток и динамикой содержания галловой кислоты была определена достоверная сильная отрицательная корреляция со значением критерия Спирмена -0.99877. Таким образом, мы показали возможность экспрессии целевых

белков галлатного оперона в *P. putida* PCL1760 без утраты их функциональной активности, что позволяет использовать его для последующих работ по созданию штамма для биотрансформации лигнина.

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.)

СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ MIF КОМПЛЕКСОМ С ТАРТРАТОМ

Немчинова А.Р.¹, Соколов А.В.², Самыгина В.Р.¹

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

²ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

lera@crys.ras.ru

Фактор ингибирования миграции макрофагов (MIF) является мультифункциональным белком, принадлежащем к семейству цитокинов. MIF представляет собой гомотример с молекулярной массой 12,5 кДа в каждой субъединице. MIF проявляет активность в роли регулятора врожденного и адаптивного иммунитета, показывает антишаперонную активность, ферментативную активность нескольких классов – изомеразную, таутомеразную, тиолоксидоредуктазную. MIF обладает провоспалительной активностью, что делает его мишенью для поиска эффективных ингибиторов, которые могут служить прототипами противовоспалительных средств.

Структурные исследования MIF с различными лигандами и ингибиторами позволят детально изучить моду связывания лигандов и конформационные изменения каталитически важных аминокислотных остатков в результате связывания. Кроме того, активное исследование структур MIF впоследствии позволит более эффективно осуществлять молекулярный докинг низкомолекулярных соединений – потенциальных ингибиторов. Поскольку истинный субстрат MIF до сих пор неизвестен, изучение структуры с различными ингибиторами и потенциальными субстратами остается важной задачей.

В работе была проанализирована кристаллическая структура комплекса MIF с миметиком ингибитора тартратом, который был использован в качестве осадителя при кристаллизации. Набор дифракционных данных MIF комплексом с тартратом собран на станции синхротронного излучения BL41XU синхротрона Spring-8 (Хего, Япония). Структура комплекса MIF с тартратом решена с разрешением 1.16 Å. В структуре комплекса в области активного центра в каждой субъединице был идентифицирован тартрат-ион. Мода связывания схожа с модой связывания фермента MIF-2 гомологичного MIF. Также, благодаря околоатомному разрешению, был обнаружен новый сайт связывания, расположенный около аминокислотного остатка ASN6 в субъединице А. Установлено, что атом O11 тартрат-иона во вновь обнаруженном сайте образует водородную связь с атомом OD1 ASN97. Также обнаружено взаимодействие атома ND2 ASN97 через молекулу воды с атомом O3 тартрат-иона, расположенного N-концевого каталитически важного пролина в субъединице С.

Таким образом, получены данные о связывании тартрат-иона в двух сайтах MIF и взаимосвязи данных сайтов, что может представлять интерес для поиска новых ингибиторов фермента и выявления деталей функционирования фермента.

Работа выполнена в рамках госзадания Национального исследовательского центра «Курчатовский Институт».

ФОСФОРИЛИРОВАННЫЕ ФОРМЫ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ БЕЛКОВ СИСТЕМЫ
КОМПЛЕМЕНТА ПРИ РАКЕ ПОЧКИ: МОДЕЛИРОВАНИЕ И
ИССЛЕДОВАНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ

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

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

kirill.s.nikolsky@yandex.ru

Понимание молекулярных основ развития заболеваний почки открывает возможности создания новых подходов диагностики, поиска кандидатных биомаркеров, а также мишеней белковой природы для действия лекарственных средств. Киста почки, мочекаменная болезнь и рак почки чрезвычайно распространены в современном мире, при этом первые стадии заболеваний, которые наиболее эффективно поддаются терапии, протекают чаще всего бессимптомно. Учитывая высокую распространенность и тенденцию к увеличению числа заболеваний почки, исследования, направленные на выявление факторов риска, улучшение методов ранней диагностики и разработку новых терапевтических подходов, важны и актуальны.

В нашем исследовании с применением тандемного масс-спектрометрического анализа были выявлены фосфорилированные формы циркулирующих белков системы комплемента фактора В (CFB) (161-Ser) и фактора С4b (125-Thr) в образцах крови больных с патологией почки [1].

Выполнено молекулярное моделирование белковых комплексов CFB-C3a/3b и C4b-C4a в присутствии посттрансляционной модификации. Обе модифицирующие группы локализованы непосредственно в сайте связывания белков системы комплемента с белками-партнерами. С применением метода молекулярной динамики выполнен сравнительный анализ стабильности интактных комплексов и комплексов, содержащих протеоформу. Проведено исследование геометрических и термодинамических показателей комплексов, сформированных изучаемыми белками в интактной и фосфорилированной форме с природными партнерами; интерфейса связывания в присутствии посттрансляционного модифицирования.

Показано, что в присутствии модификации в формирование и стабилизацию комплексов вносят большой вклад полярные взаимодействия. Процесс фосфорилирования зачастую приводит к модулированию функции белка, локализация сайта модифицирования в интерфейсе связывания белков косвенно свидетельствует об изменении стабильности комплекса.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021 – 2030 годы) (№ 125020701771-5).

Литература.

1. Nikolsky K. S. [и др.]. Plasma proteome fingerprint in kidney diseases // *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2025. (11). С. 1494779.

ИНТЕГРИРОВАННЫЙ ПОДХОД К ИЗУЧЕНИЮ ГЕТЕРОГЕННОСТИ ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ ФАБРАЗИМА С ПРИМЕНЕНИЕМ МАСС- СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА НА РАЗЛИЧНЫХ УРОВНЯХ

Новикова П.М., Месонжник Н.В., Афонин М.Б.

Научно-технологический университет «Сириус», ресурсный центр аналитических методов,
Сириус, Россия

repin.polina@gmail.com

Болезнь Фабри (БФ) – заболевание из группы лизосомных болезней накопления, обусловленное дефицитом фермента α -галактозидазы А (α -Гал). Дефицит этого фермента приводит к накоплению гликофинголипидов, в основном глоботриазилцерамида (Gb3), в различных типах клеток, что вызывает тяжелые клинические проявления [1].

Лечение включает поддерживающую терапию и применение ферментозаместительной терапии с использованием агалсидазы альфа (α -Гал, Репбагал), которая производится с помощью генной инженерии в линии клеток человека, или агалсидазы бета (β -Гал, Фабразим), производимой с использованием технологии рекомбинантных ДНК в клеточной культуре яичника китайского хомячка (СНО)[2].

Целью данного исследования является разработка и применение интегрированного подхода для детального изучения гетерогенности гликозилирования рекомбинантного Фабразима с использованием масс-спектрометрического (МС) анализа на интактном, гликопептидном и олигосахаридном уровнях.

Инструментальный анализ проводили с использованием системы высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрическим детектором высокого разрешения (ВЭЖХ-МСВР) Bruker maXis 4G ETD. Гликопептидное картирование проводили в среде 100 мМ аммоний бикарбонатного буфера (рН 7.8) с использованием трипсина в соотношении 1:20 (белок:фермент). Перед протеолизом проводили восстановление дисульфидных связей и алкилирование свободных цистеинов. Пептиды разделяли с использованием колонки Premier Peptide ВЕН С18 (Waters, США), для анализа высвобожденных гликанов использовали набор RapiFluor (Waters, США), олигосахариды разделяли на аналитической колонке (Waters, США). Анализ молекулярных масс проводили в денатурирующих условиях.

Идентифицированные гликоформы комбинировались между собой с учетом числа сайтов гликозилирования для формирования набора возможных протеоформ. Подтверждены участки N-гликозилирования фабразима, локализующихся на остатках аспарагина N108, N161 и N184. В положении N108 преобладают трехантеннарные фукозилированные структуры с тремя остатками сиаловой кислоты, в положении N161 основными формами являются фосфорилированные олигоманнозные(Man7), N184 – бифосфорилированные олигоманнозные(Man 7).

Наличие идентифицированных форм N184 на пептидном уровне структур подтверждается данными анализа высвобожденных гликанов: идентифицировано более семи форм олигосахаридов, в профиле преобладают олигоманнозные и фосфорилированные формы.

Распределение молекулярных масс протеоформ варьировалось в диапазоне от 48 до 53 кДа, идентифицировано более 40 протеоформ Фабразима, представляющих собой комбинации гликанов различного состава, что отражает высокую степень гетерогенности гликозилирования. Наиболее выраженные протеоформы представлены комбинированными сиалированными и фосфорилированными формами олигоманнозных и биантеннарных гликанов.

Для обеспечения контроля качества и безопасности препарата необходимо использовать комплексные стратегии, позволяющие исследовать гликаны с разных сторон, учитывая их влияние на фармакокинетику, иммуногенность и биологическую активность. Проведенное исследование подчеркивает важность интегрированного подхода для основанного на использовании масс-спектрометрии высокого разрешения для детального анализа гетерогенности высокогликозилированного белка – рекомбинантного Фабразима.

Литература.

1. Raphael Schiffmann, Fabry disease, Handb Clin Neurol, 2015. – 132, - 231-248. doi: 10.1016/B978-0-444-62702-5.00017-2.
2. European Medicines Agency. Fabrazyme: summary of product characteristics [электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.emea.eu.int>, свободный. – Дата обращения: 13.01.2025.

РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ ЭКСПРЕССИИ РЕКОМБИНАНТНОГО
ПРО-ПАПАИНА В КЛЕТКАХ *E. COLI*

Новикова С.Д.¹, Рябова А.С.², Лепёхина О.В.², Бунеева Е.А.², Кондратьев М.С.³

¹Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

²Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

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

llan.novikkova@mail.ru

Папаин – монотиоловая цистеиновая эндопротеаза, получаемая в промышленности методами спиртового осаждения латекса дынного дерева *Carica papaya L.* или фракционирования взвеси млечного сока. Классические способы получения имеют ряд недостатков, включая трудоёмкость и длительность процесса, а также выход не чистого папаина. Современные методы направленной эволюции и инженерии белков позволяют получать чистые ферментные препараты в лабораторных условиях путём ускоренного синтеза и последующего отбора белковых молекул как с заданными, так и с усовершенствованными свойствами.

Изначально растение продуцирует папаин в виде его неактивного белка-предшественника – про-папаина, который в дальнейшем подвергается внутримолекулярному тиол-дисульфидному обмену с образованием активной формы фермента.

В ходе скрининга баз данных PDB, PubMed, а также ENA (European Nucleotide Archive) были изучены математические модели про-папаина, его физико-химические свойства, а также данные секвенирования кодирующей последовательности. Структурный анализ показал, что про-папаин содержит пептид, необходимый для правильного сворачивания зрелого фермента и пространственно-временной регуляции его протеолитической активности на начальных стадиях после экспрессии. Для химического синтеза гена был выбран природный аналог кДНК про-папаина с заданными свойствами.

Полученный синтетический ген белка-предшественника может быть экспрессирован в культуре клеток *Escherichia coli* путём создания рекомбинантной плазмиды на основе вектора pBR322. Плазмидный вектор pBR322 представляет собой ковалентно замкнутую кольцевую молекулу ДНК длиной 4361 пар оснований. Молекулярная масса составляет $2,83 \cdot 10^6$ Да. Плазида содержит гены устойчивости к ампициллину amp^R и тетрациклину tet^R , которые выполняют роль селективных маркеров. Наличие маркерных генов позволяет проводить скрининг бактериальных клеток с плазмидой на питательных средах в присутствии ампициллина и(или) тетрациклина.

Таким образом, методами биоинженерии реализуется возможность контролируемого получения высокоэффективного папаина для его применения в различных областях деятельности человека.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ПОЧВЕННЫХ МИКРОБНЫХ КОНСОРЦИУМОВ К УТИЛИЗАЦИИ ОРГАНОСУЛЬФОНАТОВ

Онасенко К.А., Дёмин К.А., Куликова Д.Б., Куликов М.П., Празднова Е.В.

Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского,
Южный Федеральный Университет, Ростов-на-Дону, Россия

konasenko@sfnedu.ru

Органосульфаты (ОС) широко распространены в окружающей среде как в качестве природных соединений, так и в качестве ксенобиотиков. Только микроорганизмы способны ферментативно расщеплять связи C-SO₃, а также обладают широким набором генов метаболизма ОС и их производных. Метаболические пути утилизации ОС и ассоциированное с ними микробное разнообразие изучены слабо. В данном исследовании был проведен функциональный и таксономический анализ метагеномов культивируемых почвенных микробных консорциумов в контексте способности утилизировать ОС.

Был проведён эксперимент по длительному культивированию микроорганизмов. Почвенный посев (Чернозём южный, Ботанический сад ЮФУ, Ростов-на-Дону) производился на три питательные среды: первая в качестве основного источника углерода содержала белки соевого молока, вторая – гуamat калия, третья – смесь ОС, таких как таурин, гептансульфоновая и метансульфоновая кислоты (наиболее распространенные в почвах ОС). Микроорганизмы культивировались в течение трёх недель. Смывы тотальной биомассы осуществлялись с пяти чашек в конце срока инкубации. ДНК тотальной биомассы выделялась с помощью набора ДНК-Экстран (Синтол, Россия) в соответствии с инструкцией. Секвенирование проводили на приборе MinION с использованием набора реагентов Rapid Sequencing Kit V14 в соответствии с рекомендациями производителя. Контроль качества чтений проводили с помощью программы NanoPlot v1.42.0, фильтрацию и отбраковку низкокачественных чтений - с помощью программы Filtrlong v0.2.1. Сборка прочтений в контиги осуществлялась с помощью программы MEGANIT, оценка таксономической принадлежности контигов проводилась с помощью программы CAT_pack и базы данных GTDB v.140. Поиск в метагеномах генов метаболизма ОС проводился с помощью программы diamond и собственных баз данных искомым последовательностей.

В результате эксперимента было установлено, что в метагеномах трёх сред содержание исследуемых генов, участвующих в метаболизме ОС, значимо не различается. В большом количестве обнаруживались гены таурин диоксигеназы (tauD), алкансульфат монооксигеназы (ssuD), сульфит оксидаз (SUOX, SoxAB, SoeABC), сульфоацетальдегид ацетилтрансферазы (xsc). Гены утилизации сульфолактата, изетионата и сульфохинозозы обнаруживались в единичных копиях или не обнаруживались вообще. Вне зависимости от источника углерода в среде гены данных ферментов обнаруживались в контигах определенного спектра таксонов. Так, tauD был распространен среди таких семейств как *Rhizobiaceae*, *Nocardioideaceae*, *Pseudomonadaceae*. У семейства *Rhizobiaceae* белок tauD наиболее широко был представлен на уровне родов *Ensifer* и *Rhizobium*. Белок ssuD также обнаружен у родов *Rhizobium*,

Agrobacterium и рода *Variovorax*, относящегося к семейству *Burkholderiaceae*. Ген SUOX был обнаружен в контигах *Arthrobacter* и *Paenarthrobacter*. Ген *xsc* выявлен у характерных почвенных представителей семейств *Micrococcaceae* и *Rhizobiaceae*. Гены утилизации ОС и гены окисления сульфита часто встречались в рамках одного оперона.

Результаты работы демонстрируют, что почвенные микроорганизмы обладают генетическим потенциалом к утилизации ОС и окислению сульфитных остатков в их составе. Наличие генов метаболизма ОС в реконструированных из метагеномов последовательностях не зависело от наличия в питательной среде самих соединений, что может говорить о широкой распространённости данной группы метаболических путей для почвенных микроорганизмов.

Работа поддержана Программой стратегического академического лидерства «Приоритет 2030» № СП-12-23-04.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СВЯЗЫВАНИЯ БЕЛКА CSPA ИЗ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* С ДНК И РНК: МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИНАМИКА И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ

Панкратова П.Ю., Леконцева Н.В., Никулин А.Д.

Институт белка РАН, Пущино, Россия

pankratova.p.y@gmail.com

В бактериях белковые РНК-шапероны играют ключевую роль в функционировании малых регуляторных РНК (мРНК), способствуя их взаимодействию с матричными РНК (мРНК). У *Mycobacterium tuberculosis* идентифицировано множество малых нетранслируемых РНК, которые предположительно участвуют в адаптации к иммунной системе человека и регуляции вирулентности, однако их функционирование остается малоизученным. В *M. tuberculosis* не обнаружены классические РНК-шапероны, такие как Hfq и ProQ, что указывает на возможные альтернативные механизмы взаимодействия мРНК с мРНК-мишенями. В качестве возможного посредника в этом процессе рассматриваются белки с доменом холодового шока CSD (CSP). Известно, что бактериальные белки этого семейства способны связываться с одноцепочечными ДНК и РНК, а также соответствовать некоторым свойствам РНК-шаперонов.

Цель нашей работы – определить, способен ли белок CspA из *M. tuberculosis* (MtbCspA) связывать одноцепочечные ДНК и РНК, а также шпилечные РНК. В работе использовали моделирование структуры белка MtbCspA, его комплексов с ДНК и РНК, проверка стабильности комплексов осуществлялась методом молекулярной динамики (MD) и экспериментальным методом по сдвигу электрофоретической подвижности (EMSA).

Было показано, что белок MtbCspA связывается с одноцепочечной ДНК не только в области β-листа белка, но и в области петли β4-β5, что несколько отличается от классического представления о взаимодействиях белков с доменом холодового шока и оцДНК. Белок MtbCspA также связывается с оцРНК, однако участок взаимодействия смещается в область петли β3-β4, где ключевую роль играют аминокислотные остатки Thr32, Thr37, Arg40 и Lys13, контактирующие преимущественно с атомами сахара-фосфатного остова РНК. Экспериментальная проверка стабильности комплексов методами MD и EMSA показали, что комплекс белка MtbCspA с оцРНК значительно менее стабилен, чем с оцДНК. Еще менее стабильны комплексы MtbCspA с шпилечными РНК. Несмотря на прогнозы докинга, полученные посредством сервиса HDOCK, MD расчёты показали низкую стабильность комплексов, а EMSA продемонстрировал отсутствие значимого связывания шпилечных РНК с белком. На основе полученных данных можно утверждать, что белок MtbCspA не может выполнять функции РНК-шаперона, однако может регулировать экспрессию генов на уровне транскрипции, связываясь с оцДНК.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФ № 24-24-00071.

РОЛЬ ЦИТОСКЕЛЕТНОГО БЕЛКА ZUXIN В МЕХАНОТРАНСДУКЦИИ
ТРАНСКРИПЦИОННОГО РЕГУЛЯТОРА YAP В ЭМБРИОНАЛЬНОМ РАЗВИТИИ
ШПОРЦЕВОЙ ЛЯГУШКИ

Паршина Е.А., Орлов Е.Е., Зарайский А.А.

ФГБУН Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

lena_parshina5@mail.ru

В настоящее время в научной литературе представлено ограниченное количество данных о взаимосвязи механотрансдукции, зависящей от уровня Zuxin, и биохимической передачи сигнала Yap. Эти данные указывают на возможную роль стресс-индуцированной реорганизации актина, осуществляемой Zuxin, в механотрансдукции YAP. Тем не менее, результаты проведенных исследований не дают четкого ответа на вопрос о влиянии Zuxin на распределение Yap между ядром и цитоплазмой, а также на регуляцию его активности. Более того, все исследования были выполнены на клеточных культурах, которые не способны полностью отразить сложность морфогенетических процессов, происходящих в развивающихся организмах.

Цель нашей работы заключалась в исследовании влияния Zuxin на сигнальные пути Yap в процессе эмбрионального развития лягушки *Xenopus laevis*. Данная система предоставляет возможность изучать изменения механических напряжений во времени и пространстве в физиологических условиях. Мы провели эксперименты по анализу соотношения фосфорилированной и активной форм Yap на различных стадиях развития эмбрионов шпорцевой лягушки с нокдауном и оверэкспрессией *zuxin*. В результате мы зафиксировали интересные изменения в соотношении Yap в зависимости от концентрации Zuxin. В контрольных эмбрионах с нормальным уровнем Zuxin общее количество белка Yap оставалось стабильным на всех стадиях, при этом уровень его фосфорилирования возрастал в процессе развития, что свидетельствует о снижении активности Yap-сигналинга. В зародышах с нокдауном Zuxin и в эмбрионах с оверэкспрессией Zuxin количество Yap на ранних стадиях развития было значительно ниже по сравнению с контрольными образцами, и только на стадии ранней нейрулы оно достигло уровней, сопоставимых с контролем. Мы предположили, что это может быть связано с изменениями уровня Zuxin, влияющего на транскрипцию Yap.

Эту гипотезу мы проверили с использованием количественного анализа методом ПЦР, однако значительных изменений в уровне мРНК *yap* по сравнению с контрольными образцами не было обнаружено. Это свидетельствует о том, что изменение уровня экспрессии Zuxin не влияет на транскрипцию *yap*, а наблюдаемые различия в количестве белка Yap возникают на уровне трансляции.

Изменения в количестве фосфорилированного pYap в образцах с нокдауном *zuxin* соответствовали тем, что были зафиксированы в контрольных образцах, чего нельзя было сказать об эмбрионах с оверэкспрессией Zuxin, у которых было зарегистрировано резкое снижение уровня pYap на стадии средней нейрулы.

Эти результаты предоставляют новое понимание взаимосвязи между *Zyxin*, механотрансдукцией и сигнальными путями *Yap*, открывая потенциальные аспекты роли *Zyxin* в регуляции активности *Yap* и механизмах биомеханической передачи сигнала в клетке.

Работа поддержана грантом РФФ № 23-74-01027.

БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ВОЗРАСТНОЙ МАКУЛЯРНОЙ ДЕГЕНЕРАЦИЕЙ В КОНТЕКСТЕ ИЗМЕНЕНИЯ ИХ ЭКСПРЕССИИ ПРИ СТАРЕНИИ

Пахомов А.А.¹, Карпова Н.С.²

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

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

a.pahomov.work@yandex.ru

Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) – одна из основных причин ухудшения зрения у людей старше 50 лет. На 2018 год в Российской Федерации было обнаружено около 319 тыс. новых случаев ВМД, и это число будет расти из-за увеличения продолжительности и улучшения уровня жизни людей. По прогнозам, количество людей с ВМД во всем мире к 2040 году будет составлять около 288 млн человек. Старение является одним из ключевых факторов риска в развитии ВМД, т.к. приводит к дисрегуляции разных систем организма и накоплению повреждений на разных уровнях организации, приводящих к развитию возраст-ассоциированных патологий. Целью работы было проведение анализа генов, ассоциированных с ВМД, и анализ их экспрессии при старении организма в базе данных полногеномных ассоциативных исследований GWAS Catalog, а также в базах String-DB и The Human Protein Atlas.

В ходе анализа были отобраны 32 гена, полиморфизмы которых имеют наибольшее количество ассоциаций с ВМД. Далее был проведен анализ белок-белковых взаимодействий данных генов с помощью базы данных String-DB (версия 12.0). Гены, не экспрессирующие белки (псевдогены, РНК-гены и длинные некодирующие последовательности), были исключены из анализа. В итоге, 7 генов (C2, C3, CFB, CFH, CFI, CFHR1, CFHR4) имели физические взаимодействия. Функции большинства из этих генов связаны с регуляцией альтернативного пути системы комплемента. После этого был проведен анализ на наличие корреляции между экспрессией РНК-транскриптов выявленных генов и возрастом с помощью базы данных The Human Protein Atlas (версия 24.0). Белки комплемента синтезируются в разных тканях, но преимущественно в печени, и потом попадают в системный кровоток, поэтому в анализ бралась эта ткань для оценки системного уровня комплемента, а также для сравнения ткань сетчатки в качестве места локальной активации комплемента. По критерию Колмогорова-Смирнова распределение во всех случаях отличалось от нормального, поэтому применялся показатель корреляции Спирмена. Во всех случаях, кроме гена C3, связь возраст-экспрессия не являлась статистически значимой (p -value > 0,05). В случае с C3, зависимость в печени была слабой отрицательной ($R_s = -0,14$, p -value = 0,03), а в сетчатке – слабой положительной ($R_s = 0,28$, p -value = 0,003).

Результаты работы частично согласуются с данными литературы о том, что повышенная активация системы комплемента при старении может играть важную роль в патогенезе ВМД. Система комплемента – один из основных факторов в патогенезе ВМД, и анализ данных с помощью GWAS Catalog и String-DB показал наличие связи между ВМД и

системой комплемента. Однако результаты анализа экспрессии генов с помощью The Human Protein Atlas оказались противоречивыми. Возможно, что количество РНК-транскриптов не отражает конечную концентрацию белков в стареющем организме. Помимо этого, образцы в базе данных были взяты из нормальных тканей без патологий, из-за чего сложно оценить уровень влияния полиморфизмов в регуляторных последовательностях или в генах комплемента на уровень их экспрессии при ВМД. Поэтому, требуется проведение дополнительных исследований по оценке экспрессии белков системы комплемента в стареющем организме и при наличии ВМД.

Работа выполнена в рамках гос. задания FGFU-2025-0007.

ИННОВАЦИОННЫЕ BIOTEХНОЛОГИИ: БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ ПОДХОД

Пивченко А.Р., Фоменко И.А.

Российский биотехнологический университет «РОСБИОТЕХ», Москва, Россия

pivchenkoar@mail.ru

В условиях современных вызовов продовольственной безопасности и устойчивого развития, оценка качества и определение биологической активности продуктов питания становится важной задачей для научного сообщества и пищевой промышленности. Одним из ключевых аспектов этой оценки является использование биоинформатических и протеомных методов, которые открывают новые возможности в понимании состава и свойств пищевых продуктов.

Биоинформатика основывается на доступе к большим объемам биологических данных. NCBI предоставляет доступ к обширным наборам данных, включая последовательности геномов, структуры белков и данные о генетической экспрессии, которые являются основой для проведения биоинформатических анализов и разработки новых биотехнологических решений. Инструменты биоинформатики играют ключевую роль в обработке и управлении обширными геномными и протеомными данными.

Ключевыми понятиями в биоинформатике являются фолдинг и докинг, представляющие динамическое моделирование в пространстве. Докинг используется для выявления гомологии между последовательностями нуклеотидов или белков, что позволяет идентифицировать консервативные области, имеющие функциональное значение. Фолдинг же описывает процесс сворачивания полипептидной цепи белка в уникальную трехмерную структуру, определяющую его функцию.

Протеомный анализ фокусируется на изучении белков, их структуры, функции и взаимодействий. Понимание протеома позволяет не только оценить питательную ценность, но и выявить функциональные свойства, такие как антиоксидантная активность, влияние на метаболизм и потенциал для профилактики различных заболеваний.

Микробный метаболизм является ключевым элементом в создании ферментированных продуктов. В связи с этим, изучение данных о метаболических путях, геномных последовательностях и построение стехиометрических моделей позволяет исследовать клеточные механизмы и устанавливать связи между генотипом и фенотипом.

Одним из основных методов анализа в протеомике является масс-спектрометрия (MS), которая позволяет идентифицировать и количественно оценивать белки. Гель-электрофорез, еще один важный метод, который применяется для разделения белков по размеру и заряду. Также стоит отметить секвенирование, позволяющее определять аминокислотную последовательность белков и изучать их функциональные особенности.

В последние годы активно применяется протеомный анализ для исследования таких значимых микроорганизмов, как *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Penicillium* и *Saccharomyces* и

др. Этот подход позволяет выявлять специфические белки, которые играют важную роль в качестве пищевых продуктов, а также анализировать биохимический потенциал штаммов.

Для обработки и интерпретации полученных данных используется специализированное программное обеспечение и базы данных. Биоинформатические инструменты помогают анализировать данные протеомного исследования, связывая идентифицированные белки с их функциями и биологическими путями. Это способствует глубокому пониманию клеточных процессов, помогает выявлять молекулярные мишени и оптимизировать биотехнологические процессы.

Литература.

1. Tan, Y. C. Bioinformatics approaches and applications in plant biotechnology / Y. C. Tan, A. U. Kumar, Y. P. Wong, A. P. K.Ling // Journal, genetic engineering & biotechnology. 2022 Vol.20 (1), 106. <https://doi.org/10.1186/s43141-022-00394-5>.

ОЦЕНКА ПРОФИЛЕЙ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК ПРИ ПОМОЩИ МЕТИЛЗАВИСИМОЙ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ GLAI

Погосян А.М., Золотаренко А.Д., Белопольская О.Б., Брускин С.А.

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

pogosyan@vigg.ru

Метилирование ДНК является одной из наиболее изученных эпигенетических модификаций, играющих ключевую роль в регуляции экспрессии генов и определении клеточных функций. В онтогенезе уровень метилирования части генов у человека динамически изменяется, влияя на профили экспрессии генов, что обуславливает возможность применения маркеров метилирования для оценки возраста индивидуумов.

Существует большое разнообразие молекулярно-генетических методов оценки возраста, каждый из которых имеет свои особенности и области применения. Наиболее распространенным методом поиска локусов, метилирование которых ассоциировано с возрастом, является анализ бисульфитно-конвертированной ДНК. Модифицированная ДНК анализируется на микрочипах или секвенированием, что позволяет охарактеризовать профили метилирования большого количества сайтов в геноме. Однако, такой анализ является достаточно дорогостоящим и не подходит для образцов с низким количеством ДНК.

Целью данного исследования стала разработка метода определения возраста по профилям метилирования ДНК без предварительной бисульфитной конверсии и с использованием небольшого количества исходного материала. Нами были разработаны методы оценки профилей метилирования, основанные на обработке ДНК метилзависимой эндонуклеазой Glai с последующим анализом при помощи количественной ПЦР, цифровой ПЦР либо секвенированием. На основе литературных данных были выбраны локусы в промоторных областях генов *ELOVL2*, *FHL2*, *PDE4C*, *ZNF423* и *CBLN4*, метилирование которых изменяется с возрастом.

Для оценки сходимости результатов была создана шкала, моделирующая образцы с различным уровнем метилирования. Проведенный анализ показал, что разработанные методы позволяют оценить степень метилирования выбранных сайтов. Анализ при помощи количественной ПЦР показал большой разброс результатов, поэтому решено было использовать цифровую ПЦР и анализ секвенированием. Следующим этапом работы станет анализ изучаемых локусов на донорских образцах различных возрастных групп.

Работа поддержана в рамках научной темы «Полногеномный эпигенетический анализ как основа разработки генетических технологий профилактики и терапии ковида» (FFRW-2023-0007) – регистрационный номер 123120500032-9.

DIPOLAR EPR SPECTROSCOPY OF FULLERENE AND PORPHYRIN SYMMETRIC PAIRS

Podarov R.A.^{1,2}, Kolokolov M.I.^{1,2}, Tretyakov E.V.³, Fedin M.V.¹, Krumkacheva O.A.¹

¹International Tomography Center Siberian Branch of Russian Academy of Sciences,
Novosibirsk, Russia

²Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia; ³N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry
Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

r.podarov@yandex.ru

In this work, we introduce for the first time a dipole electron paramagnetic resonance (EPR) approach for measuring distances in symmetric non-orthogonal photoexcited spin pairs. Previous research has effectively explored spin pairs consisting either of a photoexcited triplet state of a molecule paired with a stable radical, or two photoexcited triplet states of different natures. The subsequent phase involves examining a coupled system containing two photoexcited triplet states to potentially enhance the sensitivity of pulsed EPR techniques through the intensified hyperpolarized signal emanating from two identical components of the pair. Furthermore, such symmetrical systems are used as "nanometer molecular rulers" in biological systems, and also increasingly utilized in the efficient conversion of solar energy into electrical energy. Despite the theoretical efficiency limit of contemporary solar cells being only 34%, utilizing the singlet fission process in such symmetric spin pairs could elevate this efficiency to 44%. This increase is facilitated by the generation of two charge carriers rather than one, a process hindered by intersystem crossing (ISC) in spin pairs, which does not contribute to an efficiency gain in solar cells.

The aim of this work is to develop an approach for measuring nanometer-scale distances using electron paramagnetic resonance (EPR) in symmetric photoexcited spin pairs based on fullerene and porphyrin. The investigations were conducted using molecules of bisfullerene connected by a fluorinated linker, and pairs of chlorin e6 molecules in complex with human serum albumin.

The echo-detected spectra of the bisfullerene molecules revealed several noteworthy effects and distinctions compared to the monomeric form of PCBM. The spectrum of the bisfullerene was notably broader and featured a distinct set of spectral lines. Utilizing a theoretical framework that involves strongly interacting spins within fullerene pairs, coupled with considerably weaker dipolar interactions between the fullerenes, enabled the simulation of the echo-detected spectrum and the estimation of inter-fullerene distances using the point dipole approximation. Data derived from nutation experiments and subsequent modeling suggest that the formation of the two triplet states in the system under investigation occurs not via inter-combination conversion, but through the mechanism of singlet fission.

We proposed a methodology for measuring distances in symmetric photoexcited spin pairs using the relaxation-induced dipole modulation enhancement (RIDME) pulsed EPR technique. The experimental label spacing determined in bisfullerene aligns with estimates derived from ED spectrum modeling. Additionally, this approach enabled the first-time measurement of the distance between two binding sites of chlorin e6 with albumin. The RIDME technique has thus proven effective for probing nanometer-scale distances in symmetric photoexcited spin pairs, including applications in biological systems. This method utilizes the high quantum yield of photoexcited triplet states and overcomes a significant limitation of dipolar methods—the presence of a broad echo-detected spectrum.

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДОКИНГ КРАСИТЕЛЕЙ К АКТИНОБАКТЕРИАЛЬНЫМ ЛАККАЗАМ

Покровский А.В.¹, Абдуллатыпов А.В.^{1,2}

¹Тульский государственный университет, Тула, Россия

²Институт фундаментальных проблем биологии РАН – обособленное подразделение
ФИЦ Пушкинский научный центр биологических исследований РАН, Пушкино, Россия

azatik888@yandex.ru

Красители широко применяются в промышленности и являются одними из значимых загрязнителей окружающей среды. Сточные воды предприятий, на которых происходит окрашивание тканей, бумаги, упаковки, нуждаются в очистке от красителей, и это может достигаться различными путями – с помощью сорбции на носители, с помощью химического расщепления (окисления) и с помощью биологического окисления. Одними из ферментов, способных окислять две наиболее распространённые группы органических красителей – триарилметановые и азокрасители – являются лакказы (оксидазы, содержащие несколько ионов меди и способные окислять фенольные соединения). В частности, для нескольких лакказ из грибов и актинобактерий была экспериментально показана способность окислять азокраситель Конго красный (запрещён в нескольких странах, потенциальный канцероген) и триарилметановый краситель малахитовый зелёный.

В данной работе был проведён молекулярный докинг нескольких азокрасителей и триарилметановых красителей к серии моделей трёхмерной структуры лакказ актинобактерий, имеющихся во Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ). Этот подход позволил определить расчётные значения энергии Гиббса связывания и константы связывания. При этом было показано, что в среднем триарилметановые красители связываются сильнее, чем азокрасители, а из азокрасителей наибольшим сродством к лакказам обладал Конго красный. Что интересно, лакказа из *Catenuloplanes japonicus* ВКМ Ас-875, для которой окисление Конго красного было показано экспериментально, обладала наименьшей по модулю энергией связывания большинства других азокрасителей и триарилметановых красителей во всей выборке исследованных лакказ.

Результаты работы позволят выбирать из большого массива лакказ наиболее подходящие ферменты для экспериментальной проверки и практического применения в очистке промышленных стоков, содержащих красители.

Работа поддержана грантом РФФИ № 24-14-20013.

ИЗУЧЕНИЕ ЭВОЛЮЦИИ И КЛАССИФИКАЦИЯ СИСТЕМ РЕСТРИКЦИИ-
МОДИФИКАЦИИ СОДЕРЖАЩИХ ЭНДУКЛЕАЗУ РЕСТРИКЦИИ
СЕМЕЙСТВА RE_ALWI

Попова А.И.², Алексеевский А.В.², Русинов И.С.², Спирин С.А.^{1,2}

¹НИУ ВШЭ, Москва, Россия

²НИИ ФХБ им. Белозерского МГУ, Москва, Россия

diatrimma@mail.ru

Системы рестрикции-модификации (Р-М) – прокариотические системы, включающие в себя как минимум два фермента: сайт-специфическую эндонуклеазу рестрикции (ЭР) и сайт-специфическую ДНК-метилтрансферазу (МТазу) узнающих одну и ту же короткую последовательность ДНК. Они защищают клетку от чужеродной ДНК, внося вклад в выживаемость и разнообразие бактериальных сообществ[1].

Бактериофаги используют множество механизмов для ухода от систем рестрикции-модификации. Однако системы Р-М быстро эволюционируют, что приводит к постоянному противостоянию между бактериями и фагами. В связи с этим изучение эволюции Р-М систем становится крайне важным, так как это может быть полезным при применении фаговой терапии.

Материалом исследования являются 1124 систем Р-М, взятых из базы данных REBASE версии 408 (04.08.2024). Для отбора, систем использовались НММ-профили из банка Pfam, а именно, отбирались системы с одной или двумя МТазами, в которых профилями в эндонуклеазах рестрикции детектировались эволюционные домены семейства RE_AlwI. При этом находками считались все белки, где вес соответствующего профиля был выше рекомендуемого в Pfam порога.

Полученные нами эндонуклеазы рестрикции образуют системы ДНК метилтрансферазами различных семейств, таких как: DNA_methylase, N6_N4_Mtase, MethyltransfD12. Ранее в нашей группе была описана эволюция и сайты узнавания систем, содержащих одну ЭР семейства RE_AlwI и две МТазы MethyltransfD12. Цель данной работы: изучить эволюцию систем рестрикции-модификации, содержащих эндонуклеазу рестрикции семейства RE_AlwI и ДНК метилтрансферазы семейства N6_N4_Mtase.

Класс систем RE_AlwI_N6_N4_Mtase интересен крайней разнородностью по распространённости систем – содержит всего 20 систем, найденных в прокариотических организмах, относящихся к разным, неблизкородственным родам. Нами были отобраны 14

систем с двумя МТазами семейства N6_N4_Mtase и 5 – с одной МТазой того же семейства. В МТазе отобранных систем консервативные мотивы FxGxG и DPPY могут идти в разном порядке. В МТазе, у которых FxGxG расположен в N-концевой части, основным профилем может быть MethyltransfD12, но может быть и N6_N4_Mtase. В последнем случае профиль N6_N4_Mtase «рвётся»: его начальная часть выравнивается в белке после конечной.

Тем самым МТазы этих систем фактически относятся к двум разным семействам, различающимся циклической перестановкой субдоменов.

ЭР из систем с МТазами, относящихся к этим двум семействам, разделены на филогенетическом дереве. У МТаз, у которых домен FxGxG расположен в N-концевой части, часто в последовательности перекрываются находки профилей N6_N4_Mtase и MethyltransfD12. ЭР из систем с такими МТазами образуют отдельную кладу на дереве всех ЭР семейства RE_AlwI.

Так же нами было обнаружено, что часть систем класса RE_AlwI_N6_N4_Mtase содержат МТазу в которой детектировались эволюционные домены семейства MethyltransfD12. ЭР этих систем выделяются в отдельную кладу на филогенетическом дереве, построенном на основе выравнивания представителей кластеров ЭР, образующих системы с МТазами семейств: DNA_methylase, N6_N4_Mtase, MethyltransfD12.

Выводы, которые мы можем сделать по проделанной работе: класс RE_AlwI + N6_N4_Mtase разнородный не только по распространённости, но и по составу систем. Можно предположить, что он представляет собой несколько разных классов.

АКТИВАЦИЯ РЕЦЕПТОРА ИНСУЛИНА ХИМИЧЕСКИМИ МОДИФИКАЦИЯМИ БЕРБЕРИНОВ

Пяткина В.А.^{1,2}, Кривошеина Д.А.², Гавриленкова А.А.², Деев И.Е.³, Бочаров Э.В.²

¹Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии
имени К.И. Скрябина, Москва, Россия

²Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

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

snegyrkamao@gmail.com

Рецептор инсулина (IR) – трансмембранный тирозинкиназный рецептор, активируемый инсулином. Инсулиновый рецептор играет ключевую роль в регуляции гомеостаза глюкозы, нарушения в механизме работы данного рецептора могут привести к ряду клинических проявлений, в том числе сахарному диабету и онкологическим заболеваниям.

Берберин – изохинолиновый алкалоид, обладающий множеством фармакологических свойств. Текущие экспериментальные и клинические исследования выявили большой потенциал берберина в регуляции гомеостаза глюкозы и липидов, противоопухолевый и противовоспалительный эффекты. Механизм, лежащий в основе гипогликемического эффекта бербарина, остается в значительной степени неясным.

В Новосибирском институте органической химии им. Н.Н. Ворожцова были синтезированы 9-N производные берберина. Для проверки влияния данных соединений на активацию IR, нами была проведена трансфекция конструкцией, содержащей ген IR. Через двое суток клетки обработали исследуемыми веществами. Далее клетки лизировали. Клеточные лизаты анализировали методом вестерн-блота с антителами к фосфорилированной и общей форме рецептора. В результате было обнаружено, что сам берберин и производные под шифрами NV47, NV50, NV37 не приводили к активации рецептора инсулина. Производное берберина NV46 активировало рецептор инсулина, но в меньшей степени, чем природный лиганд.

Исходя из полученных данных, мы можем сделать вывод о том, что производное берберина NV46 является перспективным для дальнейших исследований и потенциального применения в медицине для лечения сахарного диабета.

Генная инженерия была проведена при поддержке проекта Российского научного фонда № 23-74-00024. Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение 075-03-2025-662, проект FSMG-2025-0003).

ИССЛЕДОВАНИЕ ЯДРЫШКОВОГО ОРГАНИЗАТОРА НА МИКРОХРОМОСОМАХ У ТРЕХ ВИДОВ ГАДЮК РОДА *VIPERA*

Редекоп И.В.¹, Спангенберг В.Е.^{1,2}

¹Институт общей генетики им Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия

²Научный центр зоологии и гидроэкологии НАН РА, Ереван, Армения

redekopila@gmail.com

Сравнительная цитогенетика рептилий за последние годы значительно расширила понимание изменчивости хромосом и эволюции кариотипов животных. Впечатляющее разнообразие кариотипов рептилий, с одной стороны, и нередко выявляемые сходные эволюционные тенденции внутри крупных таксонов, привлекают внимание к таким модельным группам животных.

Однако не всегда классические цитогенетические методы исследования соматических кариотипов достаточны для сравнительной цитогенетики. Например, кариотипы змей семейства *Viperidae* имеют очень консервативную и ярко выраженную бимодальную организацию. Эти кариотипы состоят из 8 пар макро- и 10 пар очень мелких и близких по длине микрохромосом. Такие микрохромосомы практически невозможно различать на классических митотических метафазных пластинках.

В данной работе мы использовали метод кариотипирования на основе синаптонемного комплекса (СК-кариотипирование) для исследования важного маркера кариотипа – ядрышкового организатора (ЯОР) у трех видов гадюк рода *Vipera*. Морфология и локализация данной структуры может быть использована в качестве важного видоспецифичного маркера в сравнительной цитогенетике гадюковых змей. Ранее методы анализа митотических метафазных хромосом не позволяли точно выявлять пары микрохромосом, несущие ЯОР.

У всех трех исследованных нами видов *Vipera berus*, *Vipera nikolskii* и *Vipera renardi* мы выявили один сигнал ЯОР в околоцентромерной области на одной из пар микрохромосом. Несмотря на очень близкие длины микрохромосом у трех видов, мы определили, что номера этих микрохромосом различны. У *V. berus* ЯОР находится на биваленте 17, тогда как у *V. nikolskii* и *V. renardi* ЯОР локализован на биваленте 15.

Стоит отметить, что *V. berus* и *V. nikolskii* рассматриваются разными специалистами как эволюционно более близкие виды. Даже морфологически они практически идентичны. Систематический статус *V. nikolskii* в качестве отдельного от *V. berus* вида, до сих пор вызывает споры. Наши данные о различиях в локализации ЯОР может быть дополнительным отличительным признаком этих двух видов рептилий.

В заключение стоит отметить, что метод СК-кариотипирования для точной локализации ЯОР на микрохромосомах может быть применен и на других изучаемых таксонах с выраженными бимодальными кариотипами: другие роды змей, некоторые роды рептилий, птиц.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Комитета по науке РА в рамках научного проекта № 32IRF-1F06 и Государственного контракта ИОГен РАН 0092-2022-0002.

ЭКСПРЕССИЯ МОЛЕКУЛ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ТРАНСПОРТА ПРИ ИНФЛАМЭЙДЖИНГЕ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЯИЧНИКА

Решетняк В.С., Пещеренко С.С., Панфилова А.С.

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

Санкт-Петербургский Научно-исследовательский Институт Фтизиопульмонологии МЗ РФ,
Санкт-Петербург, Россия

reshetnyak.vs@yandex.ru

Введение. Инфламэйджинг – это хроническая воспалительная реакция в организме, которая сопровождает возраст-ассоциированные патологические состояния. С возрастом избыточный синтез АТФ и нарушение антиоксидантной защиты приводят к развитию окислительного стресса и повреждению клеточных органелл. Митохондриальная дисфункция проявляется в избыточной экспрессии активных форм кислорода и свободных радикалов, что дополнительно ведет к поддержанию воспаления, замыкая круг. Для определения состояния митохондрий проводится исследование белкового профиля этих органелл. Комплекс мембранных молекул ТОМ обеспечивает транспорт белков в митохондрию. Tom20 распознает N-концевые сигнальные последовательности и обеспечивает импорт большинства ключевых белков в митохондриальный матрикс. Tom70 импортирует белки, связанные с метаболизмом и стрессовыми ответами. Целью исследования являлось определение экспрессии Tom20 и Tom70 как транспортных митохондриальных белков в модели инфламэйджинга фибробластоподобных клеток стромы яичника человека.

Материалы и методы. Исследование было проведено на первичной культуре фибробластоподобных клеток, выделенных из биоптата яичников. Клетки подвергались генотоксическому стрессу посредством воздействия УФ-излучения (253,7нм) для моделирования процесса инфламэйджинга. Идентификация биомаркеров проводилась методом ИЦХ с флуоресцентными метками DAPI и Alexa288. Для статистической обработки результатов использовался Microsoft Excel, сравнивали группы непараметрическим U-критерием Манна-Уитни, а нормальность распределения оценивали критерием Шапиро-Уилка ($p \leq 0,05$).

Результаты. Моделирование инфламэйджинга на первичной культуре фибробластоподобных клеток сопровождалось достоверным снижением экспрессии митохондриальных транспортных белков, так в группе контроля относительная экспрессия Tom20 составила 30 ± 27 , а в модели инфламэйджинга 10 ± 5 . Экспрессия Tom70 снизилась более существенно: с 23 ± 16 в норме до $0,69 \pm 1,14$ при индуцированном воспалении.

Обсуждение. Полученные результаты указывают на нарушение функциональности системы митохондриального транспорта. Экспрессия белка Tom20 демонстрирует высокую степень стабильности, что обусловлено его ключевой ролью в поддержании основных митохондриальных функций. В отличие от него, белок Tom70 проявляет повышенную чувствительность к изменениям клеточной среды, что связано с его участием в механизмах

адаптации к стрессовым воздействиям. Культуры клеток представляют собой перспективную экспериментальную модель для изучения механизмов инфламэйджинга, а также для тестирования эффективности геропротекторных препаратов и оптимизации их дозировок, являются более этически обоснованным и экономически целесообразным методом моделирования биологических процессов.

СОПОСТАВЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ И ГЕОГРАФИЧЕСКОЙ ПОДРАЗДЕЛЕННОСТИ КУЛЬТУР ЕЛИ ЕВРОПЕЙСКОЙ

Ржевский С.Г., Камалов Р.М., Петюренко М.Ю.

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

slavaosin@yandex.ru

Изучение и сохранение генетических ресурсов древесных растений остается актуальной задачей на фоне сокращения разнообразия природных лесных массивов. Одной из основных лесообразующих пород на территории России является ель, имеющая высокую хозяйственную ценность и существенное средообразующее значение.

Целью данного исследования являлся популяционно-генетический анализ образцов ели обыкновенной (*Picea abies* (L.) Н. Kars) различных происхождений: из Тосненского района Ленинградской области, Галичского района Костромской области и Солнечногорского района Московской области, относящихся к одному лесосеменному району. Данные объекты представлены в насаждении географических культур в Липецкой области.

Основной задачей являлось определение генетического расстояния между исследуемыми популяциями и его сопоставление с географическим расстоянием между источниками происхождения культур. Материал для генетической характеристики популяции был получен путем ПЦР-амплификации с микросателлитными маркерами к восьми локусам (Pa28, Pa36, Pa41, Pa_42, Pa59, UAPgAG105, UAPgCT144, UAPsTG25). Экстракция ДНК из хвои ели выполнялась с использованием коммерческого набора diaGene (Диаэм, Россия) со спин-колонками с сорбирующей мембраной. Для визуализации полученного препарата ДНК и определения степени его деградации проводили электрофорез в 2% агарозном геле с добавлением интеркалирующего красителя SYBR Safe. Для статистической обработки данных использовалась программа «GenALEx 6.5».

Результаты проведенного анализа приведены в таблице 1.

Таблица 1. Генетические и географические расстояния между исследуемыми популяциями.

Попарно сопоставляемые источники происхождения	Генетическое расстояние (по Нею)	Географическое расстояние, км
1-2 Тосненский-Галичский	1,358	667,85
1-3 Тосненский-Солнечногорский	0,706	516,95
2-3 Галичский-Солнечногорский	1,556	406,31

Сопоставление полученных данных выявило очень слабую корреляцию (порядка -0,14) генетических и географических расстояний между исходными популяциями. Следует отметить, что генетические расстояния между популяциями демонстрировали их

существенную генетическую подразделенность, но между собой различались в незначительной степени. Проведенный анализ показывает, что для исследуемых популяций генетическое родство популяционных выборок не находится в существенной зависимости от географического расстояния между пунктами происхождения древесной породы. В то же время, отмечено существенное генетическое разнообразие по микросателлитным локусам внутри одного лесосеменного района.

Исследование проведено в рамках реализации госзадания по теме «Совершенствование методов лесосеменного районирования на основе комплексного молекулярно-генетического и фенотипического подхода».

ПОВЫШЕНИЕ ВЫХОДА РЕКОМБИНАНТНОГО МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА ДЛЯ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Рыбалкина А.А.¹, Мелик-Пашаев И.Д.¹, Евменов К.С.^{1,2,3}

¹Общеобразовательная автономная некоммерческая организация «НОВАЯ ШКОЛА»,
Москва, Россия

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

³Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова
(Сеченовский Университет), Москва, Россия

konstantin.evmenov@n.school

Рекомбинантный белок TFAM (Mitochondrial Transcription Factor A) представляет значительный интерес для исследователей благодаря своей ключевой роли в поддержании и транскрипции митохондриальной ДНК. Этот белок участвует в регуляции энергетического метаболизма, клеточного гомеостаза и связан с такими процессами, как старение, нейродегенеративные заболевания и онкология. Изучение TFAM открывает перспективы для разработки новых терапевтических стратегий, однако его широкое применение в исследованиях ограничено сложностями в получении достаточного количества высококачественного белка. Существующие протоколы наработки TFAM часто характеризуются низкой эффективностью, что делает оптимизацию этого процесса важной научной задачей.

В данной работе мы сосредоточились на улучшении описанных ранее методов наработки рекомбинантного TFAM. Для этого был проведен скрининг условий экспрессии, включая подбор оптимальной температуры, времени индукции и состава культуральной среды. В результате удалось достичь значительного увеличения выхода белка. Полученный белковый препарат демонстрирует стабильность и функциональную активность, что подтверждает успешность проведенной оптимизации.

Полученные результаты имеют важное значение для дальнейших исследований TFAM, включая изучение его структуры, функций и взаимодействий. Оптимизированный протокол позволяет получать достаточное количество высококачественного белка, что открывает новые возможности для фундаментальных и прикладных исследований в области митохондриальной биологии и медицины. В перспективе планируется масштабирование процесса и применение TFAM в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, что может способствовать разработке новых терапевтических подходов для лечения заболеваний, связанных с нарушением митохондриальной функции.

Работа поддержана благотворительным фондом «Дар».

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЕЛКОВ EIF4E ПАСЛЕНОВЫХ С НЕТРАНСЛИРУЕМОЙ ОБЛАСТЬЮ ПРЕДСТАВИТЕЛЯ ПОТИВИРУСОВ

Сабсаби Н.С.^{1,2}, Андрейцев В.В.^{2,3}, Никонов О.С.², Колесникова В.В.², Никонова Е.Ю.²

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

²ФГБУН Институт белка РАН, Пушино, Россия

³Пушинский филиал ФГБОУ ВО Российский биотехнологический университет
(РОСБИОТЕХ), Пушино, Россия

nss2003@list.ru

Вирусные инфекции растений представляют серьезную угрозу сельскому хозяйству, снижая урожайность и ухудшая качество плодов. Потивирусы (Potyviridae) – одна из самых вредоносных групп растительных вирусов, поражающих пасленовые культуры, такие как томаты, картофель и табак. Особый интерес представляет вирус желтой мозаики пшеницы (WYMV), относящийся к роду Бимовирусов семейства Potyviridae. WYMV, в отличие от типичных потивирусов, поражает злаковые культуры, имеет двухкомпонентный геном, представленный двумя одноцепочечными кодирующими РНК (+).

Несмотря на структурные отличия, для WYMV, как и для других потивирусов, характерна VPg-зависимая инициация трансляции. Однако этот механизм может быть ограничен из-за отсутствия необходимых клеточных факторов, конкуренции с каноническим путем трансляции или нарушений в модификации VPg, влияющих на его способность взаимодействовать с факторами инициации.

В условиях клеточного стресса или активации защитных механизмов, каноническая инициация трансляции может подавляться, что вынуждает вирус искать альтернативные пути синтеза белка. Одним из таких механизмов является IRES-зависимая инициация трансляции, широко используемая другими РНК-вирусами. До недавнего времени считалось, что потивирусы не обладают этим механизмом, однако последние исследования выявили наличие IRES-подобных структур в 5'-нетранслируемых областях их РНК. Это открывает новые перспективы для более глубокого понимания механизмов вирусной трансляции и разработки устойчивых сортов растений.

В ходе данной работы была проанализирована 5'-НТО вируса желтой мозаики пшеницы, выбран предполагаемый участок, соответствующий IRES-подобной структуре, сконструированы праймеры для наработки этого фрагмента РНК. Была проведена транскрипция *in vitro*, оптимизированы ее условия транскрипции и РНК получена в препаративных количествах. Для проверки связывания с предполагаемым IRES были получены несколько изоформ фактора инициации трансляции eIF4E. Полученные белки и РНК будут использованы для анализа сдвига электрофоретической подвижности, что позволит подтвердить способность факторов eIF4E связываться с вирусной РНК, а также предположить их возможную роль в альтернативной инициации трансляции.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда: грант № 24-44-04007.

КОНСТРУИРОВАНИЕ БИБЛИОТЕКИ ПРОМОТОРОВ *KLUYVEROMYCES LACTIS*,
ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ РАЗНЫЙ УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ЦЕЛЕВЫХ ГЕНОВ

Садовникова У.В., Мухина М.А., Матросова Е.В.

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

uliana_sadovnikova@agri.ru

Несмотря на то, что в течение последних 35 лет дрожжи *Kluyveromyces lactis* являются популярными платформами для производства рекомбинантных белков, очень ограниченное число эндогенных промоторов *K. lactis* используется для экспрессии гетерологичных генов в промышленности. Самым распространенным из них является сильный лактозо/галактозо-индуцибельный промотор *LAC4*. Однако, не всегда повышенная индуцибельная экспрессия оптимальна для целевого гена, и подбор промотора нужной силы крайне важен при конструировании штамма-продуцента.

Для сравнительного анализа были выбраны эндогенные промоторы *K. lactis*, аналогичные тем, которые широко используют в различных дрожжевых экспрессионных системах: конститутивные промоторы генов *TEF1*, *TDH2*, *PGK1*, *TPH1* и лактозо-/галактозо-индуцибельные промоторы генов *LAC4* и *GAL1*. Уровень экспрессии с изучаемых промоторов определяли по синтезу белка уEGFP в клетках штаммов *K. lactis*, содержащих хромосомные транскрипционные слияния соответствующего промотора с репортерным геном уEGFP. В качестве родительского штамма для интеграции экспрессионных кассет уEGFP использовали NRRL Y-1140 *gal80Δ*, производный штамма дикого типа NRRL Y-1140, в котором ген *GAL80* был инактивирован для предотвращения белок-белкового взаимодействия Gal80p с активатором транскрипции лактозо-галактозо-индуцибельных промоторов Gal4p и, как следствие, для снятия глюкозной репрессии с промоторов *LAC4* (P_{LAC4}) и *GAL1* (P_{GAL1}). Уровень экспрессии с P_{LAC4} и P_{GAL1} был также измерен в штамме NRRL Y-1140 на разных источниках углерода (глюкоза и галактоза).

По результатам проведенных экспериментов максимальный уровень продукции белка уEGFP был достигнут при экспрессии уEGFP с промотора *LAC4* (P_{LAC4}) в штамме NRRL Y-1140 *gal80Δ* при росте на глюкозе в качестве источника углерода. Интересно, что экспрессия уEGFP под контролем P_{LAC4} в штамме NRRL Y-1140 при росте на галактозе в качестве источника углерода была заметно ниже, чем в штамме NRRL Y-1140 *gal80Δ*, что говорит, вероятно, об остаточной репрессии Gal4p белком Gal80p даже в присутствии галактозы.

При экспрессии репортерного гена с промотора *TEF1* (P_{TEF1}), уровень продукции уEGFP оказался выше, чем при экспрессии с остальных конститутивных промоторов, а также индуцибельного P_{GAL1} . Минимальной силой среди исследованных промоторов, согласно полученным результатам, обладал конститутивный промотор *TPH1* (P_{TPH1}). По снижению уровня экспрессии промоторы распределились следующим образом: $P_{LAC4} > P_{TEF1} > P_{GAL1} \geq P_{TDH2} > P_{PGK1} > P_{TPH1}$.

Таким образом, впервые было проведено сравнение уровня экспрессии, обеспечиваемой рядом перспективных эндогенных промоторов *K. lactis*. Полученную библиотеку промоторов можно использовать для оптимальной экспрессии целевых генов.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КОМПЛЕКСА SMC *UREAPLASMA PARVUM* С ДНК

Сапожникова А.П., Запрягаева Е.Ю., Кудрявцева М.А., Хасанова А.А.,
Румянцева Н.А., Ведяйкин А.Д.

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

sapogniktos@gmail.com

Белковые комплексы SMC (Structural Maintenance of chromosome) играют важную роль в пространственной организации хромосом эукариот, архей и бактерий. Среди таких комплексов у бактерий обнаружены комплексы Smc-ScpAB, MukBEF, MksBEF, которые участвуют в процессах компактизации, сегрегации, репарации, ДНК, а также системы Wadjet, ответственные за защиту бактерий от чужеродной ДНК. Структура различных комплексов SMC схожая и представляет собой кольцеобразную структуру, состоящую из димера Smc, клейзина и регуляторных белков типа KITE/NAWK. Мономеры Smc обладают АТФазным доменом, который способен регулировать активность комплекса SMC, в т.ч его открытие/закрытие и ДНК-транслокационную активность, лежащую в основе экстрезии петель. Стоит отметить, что белок Smc некоторых бактерий способен связываться с ДНК без участия клейзина и регуляторных белков. Например, белок Smc *Bacillus subtilis* в условиях *in vitro* взаимодействует преимущественно с однопонтевой ДНК, тогда как его близкий гомолог, белок SMC *Ureaplasma parvum* в аналогичных условиях взаимодействует с двупонтевой ДНК. Таким образом, механизмы работы белков SMC могут значительно отличаться даже у близких гомологов из различных организмов, что подчёркивает необходимость их дальнейшего изучения.

U. parvum относится к классу *Mollicutes*, который представляет высокий интерес для фундаментальной и прикладной науки. Эти микроорганизмы рассматриваются в роли «минимальной клетки», поскольку их геном, вероятно, включает в основном гены, критически необходимые для выживания. В их числе присутствуют гены, кодирующие белки комплекса SMC, что говорит о высокой значимости этих комплексов и их функций в клетке.

В рамках данного исследования были изучены свойства комплекса SMC *U. parvum* и его взаимодействие с ДНК в условиях *in vitro*. Белок Smc был успешно наработан в клетках *E. coli* и очищен методом металл-аффинной хроматографии с использованием смолы Ni-NTA. Активность белка Smc *U. parvum* проверили методом смещения электроподвижности EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay), который показал, что данный белок успешно связывается с ДНК и это взаимодействие усиливается с увеличением концентрации АТФ. Этим же методом выяснили, что высокие концентрации KCl и NaCl ингибируют взаимодействие SMC с ДНК, причём KCl ингибирует сильнее, чем NaCl. В свою очередь, MgCl₂ необходим для связывания SMC с ДНК, однако высокие концентрации также ингибируют взаимодействие SMC с ДНК.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-74-10022.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ УБИКВИТИНЛИГАЗЫ MKRN3 В НЕЙРОНАХ МЫШИ И ЧЕЛОВЕКА

Сидорова В.Н.¹, Гусева Е.А.^{1,2}, Згода В.Г.³, Донцова О.А.^{1,2}, Сергиев П.В.^{1,2}

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

²Центр наук о жизни Сколковского института науки и технологий, Москва, Россия

³Институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича, Москва, Россия

vera1904sdrv@gmail.com

MKRN3 принадлежит к семейству E3 убиквитинлигаз Makorin, все члены которого содержат РНК-связывающие C3H-домены цинковых пальцев и RING-домен. Высокий уровень экспрессии *MKRN3* наблюдается в дугообразном ядре гипоталамуса. Мутации в гене данного белка ассоциированы с рядом заболеваний, в том числе с преждевременным половым развитием. Известно, что *MKRN3* ингибирует активаторы полового созревания, однако конкретные механизмы действия остаются малоизученными.

Для изучения функций и обнаружения мишеней убиквитинирования *MKRN3* в нашей лаборатории были созданы две трансгенные линии мышей: нокаутная по *Mkrm3* и экспрессирующая мутантный укороченный *MKRN3*. Также мы создали две линии клеток нейробластомы человека: нокаутную по *MKRN3* и со сверхэкспрессией *MKRN3*.

С помощью иммуноблоттинга мы продемонстрировали на мышинной модели, что *Mkrm3* экспрессируется в гипоталамусе в начале пубертатного периода. Проанализировав протеомы гипоталамусов мышей в момент начала полового созревания, мы выявили влияние *MKRN3* на уровни ионных каналов, регулирующих мембранный потенциал, а также белков, вовлеченных в везикулярный транспорт и SRP-зависимую транслокацию в эндоплазматический ретикулум (ЭПР). На основе этих результатов можно предположить, что *MKRN3* регулирует наступление пубертатного периода, влияя на секрецию медиаторов полового созревания.

В ходе протеомных исследований на клеточных линиях среди белков, совыделяющихся с *MKRN3*, мы обнаружили компоненты рибосомы и транспортные белки, связанные с ЭПР. При изучении локализации *MKRN3* в клетке мы установили, что он распределен в цитоплазме и накапливается в области ЭПР. Также мы показали, что при выделении клеточного ЭПР *MKRN3* присутствует в полученных фракциях.

Согласно результатам проведенных нами экспериментов по ко-иммунопреципитации, *MKRN3* напрямую связывается с белком Р-стебля большой субъединицы рибосомы (RPLP0). Мы подтвердили взаимодействие *MKRN3* с рибосомой, в частности с большой субъединицей, с помощью разделения рибосомальных фракций в сахарозных градиентах. При этом интересно, что наибольшее количество *MKRN3* соосаждается с фракцией дисом. С помощью протеомного анализа мы охарактеризовали данную фракцию и обнаружили, что в ней повышен уровень ингибитора трансляции IFRD2 и понижен уровень фактора созревания большой субъединицы ZNF622 по сравнению с фракциями полисом и моносомы. Далее мы исследовали влияние *MKRN3* на сборку рибосом: было обнаружено, что в клеточной линии

со сверхэкспрессией *MKRN3* увеличено количество полисом. Также мы наблюдали накопление большой субъединицы в клеточной линии с нокаутом по *MKRN3* при добавлении ингибитора протеасомы. Эти результаты указывают на возможное участие *MKRN3* в рибофагии. Также мы показали, что нокаут *MKRN3* приводит к снижению количества убиквитинированных белков во фракции моносомы в отсутствие ингибитора протеасомы. Эти данные позволяют предположить, что среди белков трансляционного комплекса имеются мишени убиквитинирования *MKRN3*.

Работа поддержана грантом РФФ № 24-14-00048.

ПОЛУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИОННЫХ ВЕКТОРОВ
ДЛЯ НАРАБОТКИ ИЗОФОРМ БЕЛКА eIF4E ТОМАТА

**Скрылев В.И.^{1,2}, Колесникова В.В.¹, Никонова Е.Ю.¹, Андрейцев В.В.^{1,3},
До Ф.Т.⁴, Никонов О.С.¹**

¹ФГБУН Институт белка РАН, Пушкино, Россия

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

³Пушинский филиал ФГБОУ ВО Российский биотехнологический университет
(РОСБИОТЕХ), Пушкино, Россия

⁴Институт биотехнологии Вьетнамской академии наук и технологий, Ханой, Вьетнам

Mr.skryliov2013@yandex.ru

Эукариотический фактор инициации трансляции 4E (eIF4E) способен связывать кэп (7-метил-гуанозин) на 5'-конце эукариотической мРНК, а также является компонентом комплекса инициации трансляции eIF4F. eIF4E у большинства организмов представлен семейством белков. Белки семейства eIF4E растений мало изучены. Известно, что eIF4E таких растений, как картофель, табак, томат, пшеница, арабидопсис и т.д., является мишенью для растительных вирусов семейства потивирусы. Однако механизм их взаимодействия неизвестен. Определение структуры eIF4E в свободном виде и в комплексе с вирусным белком позволит придумать способ борьбы с этими вирусами.

Синтез рекомбинантных эукариотических белков в бактериальной системе является повсеместно используемой технологией. С помощью получения кДНК, проведения ПЦР, реакций рестрикции и лигирования можно быстро получить экспрессионные вектора. После получения плазмиды необходимо провести подбор штамма-продуцента и условий индукции синтеза белка.

В ходе нашего исследования был проведен анализ доступных векторов и известных методов клонирования. На основе этого анализа был произведен дизайн праймеров. Были получены ампликоны генов белков семейства eIF4E томата. Произведено клонирование нуклеотидных последовательностей генов белков семейства eIF4E томата в *E.coli* и проведен отбор положительных клонов. Таким образом были получены экспрессионные вектора для наработки 3 изоформ белка eIF4E томата.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда: грант № 24-44-04007.

ИЗУЧЕНИЕ СИГНАЛЬНОГО КАСКАДА *MtWOX9-1* КАК ПЕРСПЕКТИВНОГО ИНДУКТОРА СОМАТИЧЕСКОГО ЭМБРИОГЕНЕЗА

Смирнов К.В.¹, Творогова В.Е.², Тихонович И.А.¹, Лутова Л.А.²

¹Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии,
Пушкин, Россия

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

kirill.vad.smirnov@gmail.com

Получение растений, несущих рекомбинантную ДНК, является одним из основных вызовов генетики растений. Однако на настоящий момент протоколы трансформации разработаны лишь для некоторых представителей растительного царства. Можно выделить два основных барьера, которые необходимо преодолеть для стабильного получения трансгенных растений того или иного вида. Первым из них является трансформируемость, т.е. процесс встройки рекомбинантной ДНК в геном растения. К основным подходам для решения данной проблемы можно отнести подбор и оптимизацию метода доставки. В случае последнего также может быть осуществлен подбор штамма и/или трансформируемого экспланта. Вторым барьером является регенерируемость, которая необходима для получения полноценного растения из единичных трансформированных клеток экспланта. Одним из способов регенерации растения в условиях *in vitro* является индукция каллусообразования и затем соматического эмбриогенеза (СЭ), процесса, при котором из соматических клеток развиваются эмбриониды, проходящие основные стадии зиготического эмбриогенеза, а затем формируют полноценное растение. Одним из подходов к повышению способности растения к СЭ является использование морфогенетических регуляторов – транскрипционных факторов, повышающих способность к регенерации. Благодаря данному подходу стала возможна трансформация целого ряда сельскохозяйственно значимых однодольных.

Таким образом, поиск новых морфогенетических регуляторов является перспективным направлением, результаты прогресса в котором могут найти свое применение как в фундаментальных исследованиях, так и в биотехнологии, для регенерации растений с редактированным геномом. Ранее, в ходе изучения СЭ на модельном представителе семейства *Fabaceae*, *Medicago truncatula*, нашей группой был обнаружен ген *MtWOX9-1*, который повышает способность к СЭ не только у высокоэмбриогенной линии R108, но и у линии 108-1, для которой этот процесс при культивации в условиях *in vitro* в норме не свойственен.

Участники сигнального каскада, стоящего за процессом СЭ, на настоящий момент, известны лишь частично, в связи с этим целью нашей работы стало изучение партнеров, непосредственно взаимодействующих с *MtWOX9-1*, а также генов, с промоторными областями которых он связывается в каллусах *Medicago truncatula* в ходе СЭ. Для данного исследования мы решили использовать методы коиммуннопреципитации (CoIP) и иммунопреципитации хроматина с последующим секвенированием (ChIP-Seq).

В связи с тем, что данные методы ранее никогда не использовались на каллусах люцерны, в первую очередь мы решили получить модельную систему, состоящую из растений

со сверхэкспрессией GFP с разной локализацией: GFP без специфической локализации, GFP с локализацией в эндоплазматическом ретикулуме, и GFP с ядерной локализацией. С использованием данной модельной системы мы отработываем протоколы выделения тотального белка и белка из ядер с последующей иммунопреципитацией для каллусов люцерны линии R-108.

Работа поддержана грантом РФФ № 25-26-00218.

МОБИЛЬНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ, СПЕЦИФИЧЕСКИ ЭКСПРЕССИРУЕМЫЕ НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ЖИЗНЕННОГО ЦИКЛА ТРЕМАТОД

Смолянинова А.Р.¹, Соловьева А.И.^{1,2}

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

²Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург, Россия

sar28sir14@gmail.com

Диспергированные повторяющиеся элементы составляют до 60% генома эукариот. К ним относят мобильные элементы (МЭ), или транспозоны, – фрагменты ДНК, потенциально способные перемещаться и копироваться в геноме. Они обеспечивают пластичность генома, вносят изменения в структуру и активность генов, участвуют в эпигенетической регуляции и являются предшественниками некодирующих РНК. Изучение экспрессии МЭ необходимо для понимания их влияния на фенотип организма. Сложные жизненные циклы (ЖЦ) паразитических организмов, например, трематод, демонстрируют фенотипическую пластичность, однако данных об их регуляции довольно мало. Мы предполагаем, что транскрипты транспозонов могут участвовать в этой регуляции. Цель настоящей работы – выявить общие паттерны дифференциальной экспрессии МЭ у трематод *Fasciola gigantica*, *Shistosoma mansoni* и *Himasthla elongata* на трёх стадиях их жизненных циклов: редии, церкарии и метацеркарии.

В рамках работы создана объединенная база МЭ на основе доступных геномов четырех видов трематод: *H. elongata* (наши данные), *F. gigantica*, *Fasciola hepatica* и *S. mansoni*. Проведён биоинформатический анализ транскриптомных данных стадий редии (у *S. mansoni* – спороцисты), церкарии и метацеркарии (у *S. mansoni* – шистосомулы) с помощью пакета sleuth в программной среде R. В результате построили тепловые карты дифференциальной экспрессии МЭ *H. elongata*, *F. gigantica* и *S. mansoni*, провели сравнительный анализ и определили набор повторов, общих у трех видов трематод. Далее к ним подобрали праймеры и провели экспериментальную проверку данных *in silico* методом ПЦР в реальном времени на кДНК трематоды *H. elongata*.

По результатам биоинформатического анализа транскриптомных данных были выделены МЭ и другие повторы (семейства RTE-BovB, Pao, Penelope, CR1, Gypsy, CMC-En, Helitron, rRNA, SINE/5S, Unknown, а также Satellite), которые дифференциально экспрессировались у всех анализируемых трематод. Экспериментальная проверка с помощью ПЦР в реальном времени подтвердила сходный характер дифференциальной экспрессии выбранных МЭ на трех стадиях ЖЦ *H. elongata*. Особый интерес представляют МЭ HE_619Unknown, HE_139LINE/RTE и псевдоген HE_203rRNA, которые имеют одинаковый профиль экспрессии у *H. elongata*, *F. gigantica* и *S. mansoni*. Как показали результаты экспериментальной проверки, уровень экспрессии МЭ HE_619Unknown и HE_139LINE/RTE выше на стадии церкарии, а псевдоген HE_203rRNA демонстрирует высокий уровень экспрессии на стадии редии, что соотносится с расчетными данными. Консервативный характер экспрессии этих МЭ делает их перспективными мишенями для изучения механизмов регуляции ЖЦ трематод и разработки стратегий их инактивации.

Работа поддержана грантом РФФИ № 23-74-01060.

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФЕРМЕНТА ЦЕЛЛЮЛАЗА
(*CEL7465*) С ЦЕЛЬЮ ПОВЫШЕНИЯ ЕЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ

Смолянова Н.А.^{1,2}, Гараева Н.С.², Агбоигба Э.Э.К.³, Трахтманн Н.В.³, Валидов Ш.З.³,
Иваньков А.И.⁴, Рогачев А.В.⁴, Усачев К.С.², Тошаков С.В.², Патрушев М.В.²,
Лаврик И.Н.², Юсупов М.М.², Никулин А.Д.¹

¹Институт белка РАН, Пушино, Россия

²НИЦ Курчатовский институт, Москва, Россия

³ФИЦ Казанский научный центр РАН, Казань, Россия

⁴МФТИ, Долгопрудный, Россия

smolyanova_natulya@mail.ru

Высокоэффективные и стабильные ферменты являются одним из ключевых факторов, обуславливающих экономическую эффективность современных биотехнологических процессов. Наиболее востребованными в настоящее время являются ферментные препараты, используемые для конверсии растительной биомассы в продукты с повышенной добавленной стоимостью, а также ферменты, используемые в пищевой промышленности, например, белки, способные расщеплять растительные полисахариды (альфа-амилазы, целлюлазы, пектиназы). В рамках данной работы на основе анализа метагеномных данных сообществ термальной скважины Бираганг (Респ. Северная Осетия-Алания) был идентифицирован ген новой неописанной целлюлазы *cel7465*. Анализ аминокислотной последовательности *Cel7465*, и таксономический анализ метагеномного контига, несущего этот ген, показали, что он относится к новой, некультивируемой бактерии порядка *Fimbriimonadales*. Ген был амплифицирован с метагеномной ДНК и клонирован в экспрессионный вектор pET28a. Целлюлаза 7465, полученная в результате экспрессии в клетках *Escherichia coli*, была обнаружена в растворимой форме. Для очистки целлюлазы использовали метод металл-хелатной хроматографии на Ni-NTA сорбенте с последующим этапом очистки методом эксклюзионной хроматографии. Очищенный фермент был охарактеризован *in vitro* на субстрате карбокси-метил целлюлозе и показано, что фермент обладает высокой активностью при повышенных температурах в широком диапазоне pH. С целью получения данных о размерах и форме белковой молекулы, а также поиска оптимальных условий для кристаллизации белков фермент *Cel7465* проанализировали методом малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР). Данные МУРР обрабатывали в пакете программ ATSAS. Полученная 3D модель электронной плотности имеет глобулярную форму с параметрами радиуса гирации $R_g = 21.65 \text{ \AA}$. Рассчитанная структура *Cel7465* в программном пакете AlphaFold3 имеет размеры $54 \text{ \AA} \times 51 \text{ \AA} \times 50 \text{ \AA}$, что сопоставимо с наблюдаемой экспериментальной плотностью ($R_{\max} = 62.8 \text{ \AA}$). Разработанный протокол позволяет перейти к следующему этапу структурных исследований методом рентгеноструктурного анализа.

Исследование выполнено в рамках соглашения № 075-15-2024-630 о предоставлении из федерального бюджета гранта в форме субсидии в целях реализации научного проекта под руководством привлекаемого ведущего ученого.

КАК БЫТЬ САМЦОМ БЕЗ Y: НЕОРДИНАРНЫЙ МЕЙОЗ У *ELLOBIUS LUTESCENS*

Соколов В.О.¹, Баклушинская И.Ю.², Тамбовцева В.Г.²,
Богданов А.С.², Матвеевский С.Н.¹

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия

²Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

seva.meerkat@mail.ru

Горная слепушонка *Ellobius lutescens* – настоящий генетический и хромосомный феномен среди млекопитающих. Этот постоянно обитающий под землей грызун отличается от большинства млекопитающих нечетным числом хромосом ($2n=17$) и необычной системой половых хромосом (X0 у обоих полов, Y хромосома и ген *Sry* отсутствуют). Как именно определяется пол у данного вида – остается загадкой [1].

Ранее электронно-микроскопически было показано, что единственная X хромосома самцов *E. lutescens* ведёт себя необычно – в мейозе она визуализируется как унивалент (нет гомолога), в отличие от X хромосом большинства млекопитающих. На стадии пахитены X хромосома *E. lutescens* выглядит утолщенной, иногда видны несколько осей, ее часть может формировать характерные микроизгибы («шпильки») [2].

Использование иммуноцитохимического метода с применением коммерческих антител к структурным белкам SYCP3 и HORMAD1 позволило нам установить, что X-хромосома у *E. lutescens* представляет собой осевой элемент с утолщениями вдоль его длины; это было ранее показано нами лишь с помощью одного из маркеров, SYCP3 [3]. Однако в текущем исследовании удалось выявить в некоторых сегментах X-оси иммуносигналы белка центрального элемента синаптонемных комплексов (СК) – SYCP1, что может предполагать наличие сайтов самосинапсиса.

Кроме того, в хроматине, который окружает единственную X, были обнаружены иммуносигналы белка SUMO-1 и протеинкиназы ATR, а также гистонов ubH2A и γH2AFX . Все эти белки участвуют в формировании неактивной структуры хроматина. Иначе это состояние именуют «мейотической инактивацией половых хромосом», характерной для самцов млекопитающих. X-хромосома у самцов горных слепушонок формирует типичное «половое тельце», смещенное на периферию мейотических ядер, аналогично тому, что наблюдается у самцов млекопитающих с XY.

Таким образом, несмотря на ряд уникальных мейотических паттернов, X-хромосома самцов *E. lutescens* ведёт себя схожим образом с XY хромосомами самцов других млекопитающих, что может свидетельствовать о консервативных эволюционных механизмах поведения половых хромосом в данной группе животных.

Литература.

1. Bakloushinskaya I., Matveevsky S. Unusual ways to lose a Y chromosome and survive with changed autosomes: a story of mole voles *Ellobius* (*Mammalia, Rodentia*). *OBM Genetics*, 2018, 2(3): 1-17.
2. Kolomiets O.L., Vorontsov N.N., Lyapunova E.A., Mazurova T.F. Ultrastructure, meiotic behavior, and evolution of sex chromosomes of the genus *Ellobius*. *Genetica*, 1991, 84: 179-189.
3. Matveevsky S., Kolomiets O., Bogdanov A., Hakhverdyan M., Bakloushinskaya I. Evolution in Mole Voles *Ellobius* (*Cricetidae, Rodentia*): Bizarre Sex Chromosomes, Variable Autosomes and Meiosis. *Genes* (Basel), 2017, 8(11): 306.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ МЕТИЛ- β -ЦИКЛОДЕКСТРИНА С ЛИПИДНЫМИ КОМПОНЕНТАМИ МЕМБРАН КЛЕТОК КРОВИ

Соколова Л.О.¹, Калаева Е.А.¹, Кондратьев М.С.^{1,2}, Артюхов В.Г.¹

¹Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

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

lyudmila.sokolova.94@mail.ru

Известно, что М β ЦД при сближении с клеточной мембраной способен захватывать и экстрагировать холестерин из холестерол-содержащих участков плазмалеммы. Однако вопросы о возможностях взаимодействия М β ЦД с другими липидными компонентами мембран остаются малоизученными. Решение данной задачи представляет собой теоретический и практический интерес, поскольку позволяет разработать подход к выявлению роли отдельных липидов в функционировании мембраны клетки в целом.

Для анализа особенностей связывания таких липидов как холестерол, фосфатидилхолин и сфингомиелин с метил- β -циклодекстрином использовали метод молекулярного докинга.

Подготовку структур для докинга выполняли по схеме для Autodock Vina. Были рассчитаны аффинности (энергии связывания) молекул холестерола, фосфатидилхолина и сфингомиелина (лиганды) с метил- β -циклодекстрином (рецептор).

В ходе моделирования на поверхности молекулы М β ЦД было обнаружено 9 потенциальных сайтов связывания для холестерола, фосфатидилхолина и сфингомиелина. Энергия связывания холестерина с М β ЦД составила $-3,4$ ккал/моль (сайт связывания № 1), фосфатидилхолина с М β ЦД – $-3,8$ ккал/моль (сайты связывания № 1-4), сфингомиелина с М β ЦД – $-2,3$ ккал/моль (сайты связывания № 1-3).

Результаты расчетов показывают, что М β ЦД способен неселективно связывать холестерин, фосфатидилхолин и сфингомиелин. Однако для оценки его экстрагирующей способности по отношению к определенным липидам в составе мембраны требуется учитывать особенности микроокружения и характер взаимодействия с соседними молекулами

Таким образом, методом молекулярного докинга были проанализированы параметры связывания М β ЦД с ключевыми липидами мембран клеток крови. Результаты расчетов позволяют говорить о возможности экстрагирования определенных типов липидов из мембраны с целью выявления их роли в процессе жизнедеятельности клетки.

ВЛИЯНИЕ АНТИБИОТИКА СТРЕПТОМИЦИНА НА ИНИЦИАЦИЮ ТРАНСЛЯЦИИ ПРОКАРИОТ В УСЛОВИЯХ ВАРИАТИВНОСТИ СТРУКТУРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ мРНК

Спиридонова З.А.^{1,2}, Федотов В.Р.^{1,3}, Касацкий П.С.¹, Полесскова Е.В.^{1,4},
Конева А.Л.^{1,4,5}, Виноградова Д.С.¹

¹Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия

²Санкт-Петербургский государственный технологический институт,
Санкт-Петербург, Россия

³Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

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

⁵НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

spiridonova_zh@npi.nrcki.ru

Стрептомицин является одним из хорошо изученных антибиотиков, действующих на процесс трансляции. Связываясь с 30S субъединицей рибосомы, он стимулирует возникновение ошибок декодирования на стадии элонгации [1]. В 1970 году было показано, что стрептомицин вызывает диссоциацию инициаторного комплекса [2]. Только спустя почти полвека было выдвинуто предположение о влиянии стрептомицина на инициацию прокариотической трансляции через нарушение расположения инициаторного фактора 3 (IF3) на платформе 30S субъединицы рибосомы [3]. Однако детальный механизм действия антибиотика на стадии инициации трансляции не известен.

В рамках данной работы была использована модельная система для изучения инициации трансляции *in vitro* в *E. coli* [4] в присутствии стрептомицина. Используя современные методы флуоресцентной спектроскопии, было показано действие антибиотика на стадию инициации в зависимости от изменений в 5'-нетранслируемой области мРНК.

Стрептомицин стимулирует образование 70S инициаторного комплекса в присутствии мРНК, содержащей вторичные структуры в 5'-нетранслируемой области. Антибиотик не оказывает влияния на скорость и эффективность позиционирования инициаторной тРНК в Р сайте рибосомы в условиях образования инициаторного комплекса при наличии структурированных областей на мРНК со свободной энергией сворачивания в пределах от –13 ккал/моль до –17 ккал/моль в области последовательности Шайна-Дальгарно и стартового кодона.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 23-74-10088.

Литература.

1. Demirci H. et al., Nat Commun, 2013.
2. Modolell J. et al., Proc Natl Acad Sci., 1970.
3. Chulluncuy R. et al., Antibiotics, 2016.
4. Vinogradova D. et al., PloS Biology, 2020.

ГЕН АМИЛАЗЫ ИЗ МЕТАГЕНОМА ГОРЯЧИХ ИСТОЧНИКОВ:
КЛОНИРОВАНИЕ, ЭКСПРЕССИЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ

Сулейманова Э.Р.¹, Юсупова А.Ф.¹, Клочкова Е.А.¹, Тошаков С.В.²,
Валидов Ш.З.¹, Трахтман Н.В.¹

¹Федеральный исследовательский центр Казанского научного центра РАН, Казань, Россия

²НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

elya.suleymanova.85@mail.ru

Одним из востребованных в промышленности термофильных ферментов является альфа-амилаза, которая способна гидролизовать α -1,4-гликозидные связи в молекулах полисахаридов с образованием глюкозы, мальтозы и декстринов. Амилазы широко используются в пищевой промышленности (при производстве алкоголя, в хлебопечении, пивоварении), в бумажной промышленности, текстильной промышленности, комбикормовой промышленности, а также при производстве моющих средств. При анализе последовательностей ДНК метагеномов щелочных, горячих (49°C на выходе) источников (Кармадонское ущелье, Кавказ) была выявлена нуклеотидная последовательность, содержащая структурный ген предполагаемой амилазы (*aa2889*). Фрагмент ДНК, содержащий ген амилазы (*aa2889*) был клонирован в экспрессионные вектора на базе рЕТ (Т7) системы. В результате генетических манипуляций были получены конструкции, содержащие ген амилазы *Aa2889*, под контролем Т7 промотора и 6-His-таг на С- (рЕТ28a) или N-конце (рЕТ-GB1) протеина, а также получен генетический конструктор, в котором природный сигнальный пептид был заменен на *pelB* сигнальную последовательность для секреции в клетках *E. coli* (рЕТ22b). Полученными рекомбинантными плазмидными ДНК был трансформирован штамм *E. coli* BL21(DE3) *rLys* и проведена первичная селекция клеток на амилолитическую активность на чашках с селективной средой, содержащих крахмал с добавлением ИПТГ. В ходе данного эксперимента клоны, содержащие рЕТGB1-*aa2889* и рЕТ22b-*aa2889* рекомбинантные плазмиды показали амилолитическую активность. В случае плазмиды рЕТ28a-*aa2889* амилолитическая активность не была показана. Экспрессионный анализ отобранных таким образом конструкций (рЕТGB1-*aa2889* и рЕТ22b-*aa2889*) показал, что значительная часть протеина в обоих случаях оказалась в нерастворимой фракции (inclusion body). В обоих случаях мы наблюдали ферментативную амилазную активность в бесклеточном лизате. Было продемонстрировано, что наличие дополнительных аминокислотных остатков на N-конце протеина препятствовали его связыванию с сорбентом в ходе металло-хелатной хроматографии. Экспрессия гена с заменой последовательности сигнального пептида в составе вектора рЕТ22b (6His-хвост на С-конце протеина) позволила получить незначительное количество очищенного растворимого белка, секретированного в культуральную жидкость с высокой специфической активностью (12,7 Ед/мг). Также были проведены эксперименты по определению оптимальных условий работы амилазы *Aa2889*, в ходе которых было показано, что оптимум температуры для активности данного фермента находится между 45 и 60°C, а оптимальные значения рН районе 8.5 – 9.0.

Исследование выполнено в рамках соглашения № 075-15-2025-012 о предоставлении из федерального бюджета гранта в форме субсидии в целях реализации научного проекта под руководством привлекаемого ведущего ученого.

СРАВНЕНИЕ АКТИВНОСТИ НАТИВНЫХ И МУТАНТНЫХ ФОРМ О-ДЕМЕТИЛАЗ СЕМЕЙСТВА CYP255A ПО ОТНОШЕНИЮ К 4-АЛКИЛГВАЯКОЛАМ И СИРИНГОЛУ

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

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-деметилования монолигнинолов является использование цитохромных P450 ароматических О-деметилов семейства CYP255a. Они отщепляют СН₃-группу с образованием формальдегида и свободной ОН- группы на ароматическом кольце.

Однако нативные формы О-деметилов CYP255a имеют ограниченное количество ароматических субстратов, с которыми они могут эффективно работать. При этом монолигнинолы могут иметь различные радикалы по разным положениям, часть из которых затрудняет связывание субстрата активным центром. Сейчас известно несколько белков семейства CYP255a, 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 CYP255a, которая сможет эффективно проводить реакцию с различными монолигнинолами.

Для этого было проведено сравнение аминокислотных последовательностей и пространственных моделей белков GcoA, AgcA и SyoA, также проводился докинг с рядом субстратов: гваякол, сирингол 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 pET-GB1 и экспрессировали в *E. coli* BL21 с индукцией IPTG. Также белки О-деметилазы и редуктазы были попарно собраны в векторе pJNTN-L, конструкция использовалась для экспериментов *in vivo*. Из субстратов использовались гваякол, 4-метилгваякол, 4-пропилгваякол и сирингол.

Работа нативных и мутантных белков оценивалась качественно по изменению цвета субстрата при окислении и количественно с помощью ВЭЖХ. В результате было показано, что мутантные формы, например, AgcA F166I V294A, по сравнению с диким типом показывает большую эффективность конверсии всех четырех субстратов. Предполагается, что такой белок позволит целевому штамму (*P. putida* KT2440) использовать лигниновые

мономеры в качестве источников углерода, что способствует решению проблемы деградации лигниновых отходов.

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.).

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ БЕЛКА TAFD В СБОРКЕ ТАТ – ФИМБРИЙ

Топилина М.Ю., Галева А.В., Сюткин А.С., Пятибратов М.Г.

ФГБУН Институт белка РАН, Пушино, Россия

topilina.lena@bk.ru

У галоархеи *Haloarcula hispanica* были обнаружены тонкие нитевидные поверхностные структуры, названные Тат-фимбрии, основным структурным компонентом которых является белок TafA, секретируемый с помощью твин аргининового пути транслокации (Тат-путь).

Белок TafD (НАН_0243) принадлежит к суперсемейству S24 и S26 LexA/сигнальных пептидаз, которое включает мембраносвязанные протеазы, которые расщепляют N-концевой сигнальный пептид мембраносекретирующих белков. TafD содержит четыре предсказанных трансмембранных участка и два домена, расположенных снаружи цитоплазматической мембраны. Консервативные остатки, ответственные за пептидазную активность, расположены в N-концевом домене. Функция C-концевого домена остается невыясненной.

Поскольку ген сигнальной пептидазы *tafD* находится в непосредственной близости к гену *tafA*, который кодирует белок TafA, было предположено, что TafD может участвовать в процессинге TafA. Для проверки этой гипотезы был получен мутантный штамм $\Delta tafD$, лишенный гена *tafD*. Экспериментальная проверка штамма $\Delta tafD$ с помощью электронной микроскопии и электрофореза показала, что полученный штамм не способен синтезировать Тат-фимбрии.

Для детекции белка TafA в клеточных лизатах были использованы специфические поликлональные антитела против рекомбинантного белка TafA, полученного с помощью экспрессии в *E. coli*. Иммуноблоттинг с использованием этих антител выявил присутствие TafA в родительских клетках исходного штамма, но не в мутантах $\Delta tafD$. Вместо этого детектировалась полоса с меньшей электрофоретической подвижностью. Мы предположили, что эта полоса может соответствовать непроцессированной форме белка TafA, сохранившей сигнальную последовательность. В отсутствие сигнальной пептидазы TafD непроцессированный белок TafA не может секретироваться из цитоплазмы и накапливается внутри клеток. Таким образом, удаление гена *tafD* предотвращает процессинг TafA в его функциональную форму, тем самым предотвращая его участие в сборке Тат-фимбрий.

В экспериментах по комплементации гена *tafD*, он был повторно введен в мутантный штамм $\Delta tafD$ с помощью экспрессирующей плазмиды, в результате чего синтез белка TafA и Тат-фимбрий был восстановлен. Иммуноблоттинг с использованием антител, специфичных к TafA, выявил в штамме с комплементацией гена *tafD* наличие как процессированной, так и непроцессированной форм белка TafA, что подтверждает роль сигнальной пептидазы TafD в процессинге TafA и его ключевую роль в синтезе Тат-фимбрий.

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

СОВМЕСТНАЯ РАБОТА ФАКТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ В РЕГУЛЯЦИИ
ГУМОРАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Ульянова Ю.А.¹, Гасса М.^{1,2}, Степанов Н.Г.^{1,3}, Качаев З.М.¹, Шидловский Ю.В.^{1,3}

¹Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

²Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

³Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия

julipolunina1999@gmail.com

Drosophila melanogaster служит удобной модельной системой для изучения врожденного иммунного ответа благодаря высокой степени консервативности механизмов, регулирующих этот процесс, среди различных биологических видов, включая человека. В этом процессе ключевую роль играет семейство транскрипционных факторов NF-κB, которые активируют экспрессию генов антимикробных пептидов (АМП) через сигнальные пути IMD и Toll. Однако, помимо NF-κB, в регуляции генов АМП участвуют и другие транскрипционные факторы (ТФ), такие как FOXO, AP-1 (dJun, dFos) и представители семейства GATA (serpent, rannier, GATAd). Совокупность взаимодействий указанных белков друг с другом и с ДНК в конечном счете определяет паттерн экспрессии АМП-генов.

Цель исследования заключается в систематическом изучении взаимодействия транскрипционных факторов на уровне всего генома в условиях активации иммунного ответа. Основные задачи включают получение антител к транскрипционным факторам, создание модельной системы активации иммунного ответа путем инкубации клеток линии S2 (Schneider 2) с инактивированной бактериальной культурой, измерение уровней экспрессии генов АМП с помощью qPCR, оценку связывания транскрипционных факторов с промоторами генов АМП методом иммунопреципитации хроматина (ChIP), а также создание карт распределения факторов транскрипции по геному.

Для получения антител были созданы ДНК-конструкции, кодирующие эпитопы транскрипционных факторов, которые использовались для трансформации клеток *E. coli*. Белковые экстракты, выделенные из этих клеток, применялись для иммунизации кроликов. Для активации иммунного ответа клетки S2 инкубировали с инактивированной культурой *E. coli* в течение 2 часов или ночи. Уровень мРНК генов АМП измеряли с помощью qPCR. Для анализа связывания транскрипционных факторов с промоторами генов АМП использовали метод ChIP. Кроме того, методом РНК-интерференции проводили нокдаун генов транскрипционных факторов, после чего оценивали уровень экспрессии генов АМП и обогащение NF-κB в их промоторных областях.

В ходе работы были получены антитела к факторам транскрипции FOXO, dJun, serpent, rannier, GATAd. Проанализированы изменения привлечения этих факторов транскрипции к промоторам генов АМП при раннем и позднем иммунном ответе. Изучены эффекты от нокдаунов ТФ на экспрессию генов АМП и на привлечение NF-κB/Relish к промоторам этих генов.

Полученные результаты позволяют глубже понять механизмы регуляции врожденного иммунного ответа у *Drosophila melanogaster* и могут быть применены для исследования аналогичных процессов у человека.

Работа поддержана грантом РФФ № 23-14-00348.

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ ДВУЦЕПОЧЕЧНОЙ РНК,
ГЕТЕРОЛОГИЧНО ЭКСПРЕССИРОВАННОЙ В БАКТЕРИЯХ
В *ESCHERICHIA COLI* HT115(DE3)

Фадеев Р.Р., Долгих В.В.

Всероссийский институт защиты растений, Санкт-Петербург, Россия

fadeeff.rusln@gmail.com

Явление РНК-интерференция (РНКи) было описано 1998 году и привлекло внимание исследователей, работающих в области функциональной геномики, медицины, ветеринарии и защиты растений. Механизм РНКи заключается в подавлении экспрессии генов, путём попадания в клетки двуцепочечных молекул РНК (дцРНК), комплементарным генам-мишеням. Соответственно, в борьбе с вредителями и паразитами данное свойство используется для отключения жизненно важных генов. Разительным отличием от применения консервативных химических веществ является специфичность. Правильно подобрав участки гена-цели, распространённые дцРНК будут воздействовать лишь на избранный объект, не причиняя вреда другим живым существам. В сельскохозяйственной практике использование методов РНКи и молекул дцРНК наиболее актуально в случае нежелательности применения химических препаратов (закрытый грунт, пчеловодство и т.д.). Поскольку наиболее недорогим и эффективным подходом для получения значительных количеств дцРНК является их биосинтез в бактериях с последующим выделением и очисткой, оптимизация различных этапов этого процесса имеет важное практическое значение.

В предлагаемом сообщении будут представлены данные о влиянии нуклеотидного состава молекул дцРНК на их стабильность и количественный выход при различных способах экстракции из клеток *E. coli* HT115(DE3). Для получения экологически безопасных препаратов будет предложен подход, основанный на разделении гетерологичных эффекторных молекул дцРНК и бактериальной ДНК (плазмидной и хромосомной) с использованием хроматографии на гидроксилпатите.

Исследование выполнено при поддержке РФФ, № 23-16-00247.

ХОНДРОЦИТЫ В УСЛОВИЯХ ИНФЛАМЭЙДЖИНГА: МОДЕЛИРОВАНИЕ И АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ SOD1, SOX9, AGGREGAN

Федорина А.И.^{1,2}, Белова Ю.И.^{1,2}, Панфилова А.С.^{1,2}

¹ФГБУ Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии
Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

²АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский Институт биорегуляции и геронтологии»,
Санкт-Петербург, Россия

alyon.fedorina@mail.ru

Заболевания опорно-двигательной системы, прогрессирующие с возрастом, остаются основной причиной инвалидизации и ухудшения качества жизни населения. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) информировала о том, что различными болезнями опорно-двигательного аппарата (ОДА) на данный момент страдает от 60 до 80% населения мира. Возрастные заболевания все чаще связывают с инфламэйджингом – увеличением количества сенесцентных клеток, которое способствует перманентному воспалению в организме. Одой из главных причин дегенерации хряща считается дисбаланс катаболических и анаболических процессов. В молодом возрасте регенеративные механизмы обеспечивают относительно быстрое и эффективное восстановление поврежденных тканей. С возрастом увеличивается количество сенесцентных клеток в области травмы или деструкции, которые секретируют SASP-фенотип. Также клетки могут изменять свой фенотип с исходного на сенесцентный. Вызванная факторами SASP провоспалительная среда ведет к глубокой дегенерации хряща, к дальнейшей деформации костей, а в конечном счете - к потере функции хряща и увеличению скорости процесса деструкции, и очень болезненному прогрессированию заболевания. Моделирование состояния старения хондроцитов человека, особенно в условиях *in vitro*, позволяет детальнее исследовать механизмы, лежащие в основе старения и дегенерации тканей, а также могут дать толчок для разработки новых подходов эффективной терапии и оценку эффективности лекарственных препаратов.

Цель работы: моделирование инфламэйджинга на первичной культуре реберных хондроцитов человека с дальнейшим анализом экспрессии биомаркеров: супероксиддисмутаза SOD1, фактор транскрипции SOX9 и основного компонента внеклеточного матрикса хрящевых тканей Aggrecan иммуноцитохимическим (ИЦХ) методом исследования.

Моделирование инфламэйджинга осуществлялось ультрафиолетовым облучением длиной волны 253,7 нм (лампа Philips TUV 8 Вт, Нидерланды) монослоя клеток. Статистическая обработка проводилась с помощью Microsoft Excel, RealStatistics. Группы между собой сравнивали с помощью непараметрического критерия U-критерия Манна-Уитни. Для установления нормальности распределения использовали критерий Шапиро-Уилка. Достоверными отличия считали при $p \leq 0,05$.

Методом ИЦХ было установлено изменение экспрессии SOD1, SOX9 и Aggrecan. Исследование SOD1 показало, что среднее значение относительной экспрессии и стандартной

ошибки среднего в группе контроля составило $15,61 \pm 8,94$, а в группе хондроцитов с инфламэйджингом уменьшилась - $0,75 \pm 0,48$. Анализ SOX9 показал аналогичную тенденцию, так как в группе контроля по данному маркеру среднее значение относительной экспрессии было $38,9 \pm 7,94$, а при инфламэйджинге снизилось до $17,80 \pm 11,26$. Экспрессия Aggrecan в контроле составила $1,09 \pm 0,05$, а при инфламэйджинге $0,81 \pm 0,61$. Полученные данные свидетельствуют о выраженной тенденции к угнетению экспрессии всех трёх исследуемых маркеров в условиях инфламэйджинга, что отражает ухудшение функционального состояния хрящевой ткани и может ассоциироваться с развитием дегенеративных заболеваний, связанных с патологией ОДА. Биомаркеры SOD1, SOX9 и Aggrecan могут быть использованы для прогностической оценки процесса хрящевой дегенерации и для анализа эффективности лечения.

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ ВИРУСНОГО ШАПЕРОНИНА AR9 ПРИ СВЯЗЫВАНИИ С НУКЛЕОТИДАМИ МЕТОДОМ КРИОГЕННОЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

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

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

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

Nikita.ok20@yandex.ru

Шаперонины – это класс молекулярных шаперонов или белков теплового шока, ответственных за корректное восстановление третичной и четвертичной структуры белков в АТФ-зависимой манере. Шаперонины делятся на две группы. Шаперонины первой группы найдены в прокариотах, хлоропластах и митохондриях и представляют собой комплексы из двух состыкованных «спина к спине» 7-субъединичных колец. Они функционируют в паре с кошаперонинами, которые как крышка прикрывают внутреннюю полость шаперонина. Шаперонины второй группы найдены в эукариотах и функционируют без кошаперонинов, и «крышка» для инкапсулирования белка-субстрата формируется альфа-спиралями их апикальных доменов. Недавние исследования показали, что некоторые вирусы бактерий (бактериофаги) кодируют собственные шаперонины, имеющие свои отличительные 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 gp228. Согласно предшествующим исследованиям апо форма шаперонина AR9 обладает C7 симметрией. Функционирование шаперонина AR9 является АТФ-зависимым, поэтому целью работы было получение криоЭМ структуры его комплексов как с АТФ, так и с АДФ и АМФ. Комплексы получали добавлением соответствующего нуклеотида к образцу непосредственно перед витрификацией.

Набор изображений с образцов был собран с использованием криогенного электронного микроскопа Titan Krios (РЦ Нанозонд, НИЦ «Курчатовский институт»). Полученные изображения были обработаны в программном пакете CryoSPARC. Для комплекса с АТФ после предварительной обработки была получена КриоЭМ карта с разрешением 3.2 Å. С использованием функции Reference based motion correction CryoSPARC разрешение было улучшено до 2,5 Å, что значительно выше, чем для ранее опубликованной структуры апо формы шаперонина AR9 [1]. На КриоЭМ карте 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. Структура комплекса с АТФ уточнена с использованием программ Coot и Phenix. Благодаря высокому разрешению удалось установить нарушение C7 симметрии, наблюдаемой в апо форме. Также получены КриоЭМ

карты для комплексов шаперонина AR9 с АДФ и АМФ, с разрешением 3.38 Å и 3.37 Å, соответственно. Ведется дальнейшая работа по улучшению разрешения КриоЭМ карт и получения структур данных комплексов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 23-74-00021. Улучшение разрешения криоЭМ карты комплекса шаперонина AR9 с АТФ выполнено в рамках тематического плана НИЦ «Курчатовский Институт».

Литература.

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

ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ И УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ
ГЕНОВ *SLPAL5* В ЛИСТЬЯХ РАСТЕНИЙ ТОМАТА
В ОТВЕТ НА ПРАЙМИРОВАНИЕ NaCl

Филюшин М.А., Щенникова А.В., Кочиева Е.З.

Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

michel7753@mail.ru

Чувствительность к солевому стрессу томата (*Solanum lycopersicum* L.) является одной из причин снижения урожайности культуры. Одним из подходов к решению данной проблемы считается прайминг рассады томата растворами хлорида натрия, что способно стимулировать солеустойчивость за счет эпигенетических модификаций в геноме растения. У растений регуляция NaCl-устойчивости связана, в числе прочего, с содержанием полифенолов и активностью L-фенилаланин-аммоний-лиаз (PAL), которые определяют первую стадию фенилпропаноидного пути. Целью нашего исследования стал анализ изменения количества фенольных соединений и экспрессии генов группы *PAL5* в ответ на засоление в листьях растений томата четырех сортов: устойчивых (Отрадный, Гном) и чувствительных (Фонарик, VS-342-18) к NaCl. Растения в стадии 8-10 листьев подвергали воздействию солевого стресса (100 мМ NaCl). Листья опытных и контрольных растений отбирали спустя 1, 6 и 24 ч после начала стресса и определяли в них содержание фенолов и экспрессию генов *PAL5*.

Было обнаружено, что через 1 ч стресса только листья сорта Отрадный (наиболее солеустойчивый) отличались активным накоплением фенольных соединений (в ~2 раза опережая контроль), тогда как к концу стресса уже все сорта характеризовались существенным (в ~1.4–4.7 раза) повышением количества фенолов. При этом концентрация фенолов, достигнутая сортом Отрадный к 1 ч стресса, сохранялась на протяжении 24 ч воздействия. Оба чувствительных к соли сорта показали сходные паттерны изменения концентрации фенолов при стрессе. Анализируемая группа генов *PAL5* включала четыре гена *PAL*, высоко гомологичных гену *PAL5* (Solyc09g007910). Было выявлено, что динамика экспрессии данных генов при воздействии стресса индивидуальна для каждого из четырех генотипов томата. Наиболее солеустойчивый сорт Отрадный характеризовался некоторым снижением уровня экспрессии *PAL5* к 1 ч стресса, после чего (6 и 24 ч) экспрессия *PAL5* снова выросла. Сходная динамика была продемонстрирована другим устойчивым сортом Гном. У чувствительных сортов профиль экспрессии *PAL5* отличался, напротив, повышением к 1 ч, снижением к 6 ч и повторным повышением к 24 ч.

В результате были выявлены различия между сортами в паттерне накопления фенолов и экспрессии ключевых генов фенилпропаноидного пути *PAL5*, и эти различия могут быть ассоциированы со степенью солеустойчивости растений томата.

Работа выполнена при поддержке РФФ (грант № 24-16-00043) и Министерства науки и высшего образования РФ.

ВЛИЯНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *RSFS* НА РОСТ КУЛЬТУРЫ АГЕНТА
БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЗАЩИТЫ *PSEUDOMONAS PUTIDA* PCL1760

Фукалова А.А.¹, Мифтахов А.К.²

¹Казанский федеральный университет, Казань, Россия

²Лаборатория молекулярно-генетических и микробиологических методов,
Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр
Российской академии наук», Казань, Россия

fukalova.anastacia@yandex.ru

RsfS – фактор гибернации, подавляющий трансляцию микроорганизмов за счет нарушения связывания субъединиц рибосом с целью снижения энергозатрат клеток на синтез белка для выживания в неблагоприятных условиях среды. *Pseudomonas putida* PCL1760 способен бороться с корневой гнилью томатов, вызванной *Fusarium oxysporum f. sp. radicum-lycopersici* ZUM2407. Исследование механизма гибернации рибосом с использованием RsfS может послужить основой для создания инструментов, увеличивающих сроки хранения биопрепаратов, полученных на основе штамма-агента биологического контроля. Целью работы явилось изучение влияния индуцированной экспрессии гена *rsfS* на рост культуры *P. putida* PCL1760.

Были использованы плазмидные векторы: pJEM2:*rsfS* – опыт; pJEM2:*gfp* – контроль. Поскольку синтез белка GFP в контрольном образце предполагает повышенную нагрузку на синтетический аппарат клеток, что может исказить полученные результаты, в ходе работы была получена конструкция pJEM2:*gfp-stop*. Для этого были разработаны праймеры, содержащие дополнительный нуклеотид T, приводящий к образованию стоп-кодона в GFP. В результате экспрессии в таком случае образуется белок, содержащий 15 аминокислотных остатков – более корректный контроль. Амплифицировали вектор pJEM2:*gfp* с использованием данных праймеров. Фрагмент ДНК обрабатывали T4 полинуклеотидкиназой и T4 лигазой. Полученной конструкцией, а также векторами pJEM2:*rsfS* и pJEM2:*gfp* трансформировали клетки *Escherichia coli* S17.1. Для получения штаммов *P. putida* PCL1760 с исследуемыми плазмидами в составе использовали трансконъюгативный перенос с помощью клеток *E. coli* S17.1.

Влияние экспрессии гена *rsfS* на рост *P. putida* PCL1760 определяли как на твердой, так и на жидкой средах. Капли (10 мкл) ночных культур (ОП₆₀₀ = 1) исследуемых штаммов высевали на поверхности агаризованной среды LB_{Кан}, Ам_п с добавлением 0,2% L-рамнозы в одном случае, в другом – без добавления индуктора синтеза. Результаты фиксировали после 24 часов инкубации при 30 °С. На среде с добавлением L-рамнозы у колоний с плазмидой pJEM2:*rsfS* наблюдалось замедление роста. Без добавления индуктора синтеза колонии не имели фенотипических различий.

Ночные культуры (ОП₆₀₀ = 0,1) выращивали в жидкой среде VM_{Ам_п, Кан} с добавлением 0,2% L-рамнозы. Фиксировали оптическую плотность образцов каждые 30 минут на протяжении 28 часов при 30°C на спектрофотометре при длине волны 600 нм. На основании

данных строили графики, отображающие степень влияния экспрессии *rsfS* на рост бактерий. Для подтверждения наличия статистических различий использовали тест Тьюки. Ингибирование роста опытного образца RsfS наблюдалось после 10 часов инкубации. Показатели оптической плотности в последней точке измерения образца RsfS в 1,8 раз меньше, чем образца GFP-STOP. Так, полученная в ходе работы контрольная конструкция pJEM2:*gfp-stop* не вызвала замедления роста псевдомонад, что позволяет исключить влияние посторонних факторов и подтверждает специфическую функцию экспрессии гена *rsfS*.

Таким образом, индуцированная экспрессия *rsfS* специфически ингибирует рост *P. putida* PCL1760. Использование механизма гibernации может помочь увеличить сроки хранения таких биопрепаратов, что способствует их более широкому применению и повышению эффективности биологических методов защиты растений.

МЕЖБЕЛКОВЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С УЧАСТИЕМ КОМПЛЕКСОВ SMC
BACILLUS SUBTILIS И *UREAPLASMA PARVUM*

**Хасанова А.А., Румянцева Н.А., Сапожникова А.П., Кудрявцева М.А.,
Запрягаева Е.Ю., Ведяйкин А.Д.**

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

hasanova_aizilya@mail.ru

Белковые комплексы SMC (от англ. Structural maintenance of chromosomes, далее в тексте – комплексы SMC) играют ключевую роль в поддержании пространственной структуры хромосом. Эта группа белков присутствует, вероятно, у всех прокариот и эукариот, и её представители играют важную роль в широком спектре процессов: конденсации хромосом, их сегрегации, транскрипционном подавлении целых хромосом, а также в рекомбинации и защите от чужеродной ДНК. Исследование бактериальных комплексов SMC позволит раскрыть молекулярные механизмы компактизации и сегрегации ДНК в процессе клеточного деления бактерий, что может быть использовано в будущем для создания новых антибактериальных агентов.

В *Bacillus subtilis* комплексы SMC включают в себя три ключевых компонента: Smc – основной структурный белок, образующий димер, ScpA – белок-клейзин, связывающий димер Smc, и ScpB – вспомогательный белок, регулирующий работу комплекса. Тем не менее, кроме трех ключевых компонентов, в работе этого комплекса могут участвовать и другие белки, однако соответствующие межбелковые взаимодействия не изучены. *Ureaplasma parvum* – бактерия из класса молликут (*Mollicutes*), представители которого характеризуются уменьшенным размером генома, отсутствием клеточной стенки и упрощенной организацией клеток. В *U. parvum*, вероятно, комплекс SMC устроен проще, чем в других бактериях, что подтверждается меньшими размерами субъединиц комплекса. Вероятно, с комплексом SMC взаимодействует меньшее число белков, чем в других бактериях, однако это требует экспериментальной проверки.

Целью работы является поиск белков, взаимодействующих с комплексами SMC *B. subtilis* и *U. parvum*. В ходе экспериментов был использован метод со-осаждения с применением кросс-сшивок с последующим анализом белковых комплексов с использованием электрофореза в полиакриламидном геле (SDS-PAGE) и масс-спектрометрии методом пептидного фингерпринтинга. Для проведения двугибридного анализа были отобраны белки, предположительно взаимодействующие с комплексом SMC: PolA (ДНК-полимераза I), TopA (топоизомераза I), Ffh и FtsY (GTP-связывающие белки, участвующие в секреции белков в составе комплекса SRP (signal recognition particle)). В результате проведенного исследования были выявлены различия в характере межбелковых взаимодействий комплексов SMC бактерий *B. subtilis* и *U. parvum*.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-74-10022.

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ДЛЯ ПРОДУКЦИИ ШАПЕРОНОВ HSP70
В КЛЕТКАХ *S. CEREVISIAE*

Цветков А.А., Матвеев А.Г., Барбитов Ю.А., Журавлева Г.А.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

st096303@student.spbu.ru

Молекулярные шапероны отвечают за правильную укладку белков в клетке. Ряд заболеваний связан с неправильной укладкой белков, в частности, с наличием в клетках амилоидных агрегатов (болезнь Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона). Для понимания механизмов образования и наследования амилоидных агрегатов удобным модельным организмом являются дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, у которых обнаружены прионы – факторы белковой наследственности, при которых происходит передача белковой конформации в ряду поколений. Поддержание прионов напрямую связано с соотношением уровней шаперонов в клетке. Понимание молекулярной стороны этих процессов может лечь в основу для разработки протоколов терапии протеинопатий.

Наиболее распространёнными и консервативными шаперонами являются члены семейства Hsp70, среди которых у дрожжей выделяют подсемейство Ssa, включающее четыре белка (Ssa1, Ssa2, Ssa3 и Ssa4). Ранее попытки получения рекомбинантных белков Hsp70 в бактериальных системах экспрессии оказались малоэффективными. В связи с этим мы поставили задачу оптимизировать условия наработки шаперонов Hsp70 в клетках дрожжей *S. cerevisiae* для последующего изучения их *in vitro*. Последовательности генов этих белков были клонированы в векторы с сильным конститутивным промотором *TEF1* таким образом, чтобы гены *SSA* оказались в одной рамке считывания с гистидиновой меткой.

Известно, что линии дрожжей могут различаться по содержанию шаперонов. Нами был протестирован ряд штаммов, имеющих генетический фон S288C или 74-D694 (Петергофская генетическая линия), в которых были представлены в различных сочетаниях такие факторы как делеции вакуолярных протеаз *prb1Δ* и *pep4Δ* и наличие прионов [*PSI*⁺] и [*PIN*⁺], способных секвестрировать шапероны. В результате анализа относительного уровня продукции шаперонов Ssa1 и Ssa1-21 в разных штаммах и на разных фазах роста культур клеток мы отобрали штаммы *prb1Δ*-BY4741 и уАО121 при росте до логарифмической фазы для дальнейшего анализа.

Производство некоторых шаперонов, включая Ssa1, увеличивается в клетке при повышении температуры. Мы выращивали штаммы *prb1Δ*-BY4741 и уАО121 при 30 °C, 37 °C и 42 °C и выяснили, что наибольший уровень продукции His₆-Ssa1 и His₆-Ssa1-21 наблюдается в штамме *prb1Δ*-BY4741 при 30 °C, а повышение температуры сказывалось только на продукции нативных Hsp70.

Бедность среды по углероду и азоту также может индуцировать стрессовые реакции в клетках. В результате культивации дрожжей в среде SC и солевой минимальной среде Min, мы обнаружили, что в среде Min уровень продукции шаперонов несколько ниже, зато при

культивации в среде SC при визуализации с помощью иммуноблоттинга лизатов дрожжей с помощью антител к Hsp70, наблюдалась дополнительная полоса меньшего размера, что может свидетельствовать о протеолизе, в связи с чем в дальнейшем использовали среду Min.

Шапероны Ssa2, Ssa3 и Ssa4 также были успешно наработаны при тех же условиях. После чего мы смогли оптимизировать метод очистки белка Ssa1 из дрожжевых клеток, что в дальнейшем может быть использовано для очистки других шаперонов.

Работа выполнена с использованием оборудования ресурсного центра «РМиКТ» СПбГУ. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 23-74-01121.

**ГИПЕРЭКСПРЕССИЯ Р-ГЛИКОПРОТЕИНА КАК ОСНОВНОЙ МЕХАНИЗМ
ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ К КАРФИЛЗОМИБУ У КЛЕТОК
МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ**

Черкасова А.И., Моисеева Н.И., Лалетина И.О., Калабина К.В., Щербакова Е.А.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва, Россия

a-cherkasova2000@mail.ru

Карфилзомиб (cfz) – ингибитор протеасом второго поколения, который является постоянным компонентом в терапии рецидивов множественной миеломы (ММ). Целью настоящего исследования является изучение механизмов формирования лекарственной устойчивости к cfz в клетках ММ АМО-1/CFZ. Сотрудниками НИИ Канцерогенеза была получена сублиния АМО-1/CFZ ($IC_{50} = 249.2 \pm 24.5$ nM), которая в 46 раз устойчивее клеточной линии АМО-1 ($IC_{50} = 5.4 \pm 1.1$ nM). Также было определено, что cfz является субстратом Р-гликопротеина (Р-gp), и способствует повышению его экспрессии как на уровне мРНК (определено методом РТ-ПЦР), так и на уровне белка (определено методом Вестерн-блоттинга), что приводит к развитию устойчивости к данному ингибитору протеасом. Методом МТТ-теста было определено, что элакридар – ингибитор Р-gp – способствует возвращению чувствительности миеломных клеток к cfz на уровень исходных клеток АМО-1. По результатам исследования был сделан вывод о том, что гиперэкспрессия Р-гликопротеина является основным механизмом развития устойчивости к cfz у клеток АМО-1/CFZ, а для изучения молекулярных механизмов, приводящих к этому, необходимы дальнейшие исследования.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ, проект № 24-25-00491.

РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНА *CENH3* КАК СТРАТЕГИЯ СОЗДАНИЯ ГАПЛОИНДУКТОРОВ ТОМАТА (*SOLANUM LYCOPERSICUM* L.)

Черняев К.А.^{1,2}, Фомичева М.Г.²

¹МИРЭА – Российский технологический университет, Москва, Россия

²ФГБНУ Федеральный научный центр овощеводства, Одинцово, Россия

skdw12345@gmail.com

Ускоренное получение селекционного материала для создания конкурентноспособных сортов и гибридов овощных культур является одной из важнейших задач современного сельского хозяйства. Среди наиболее перспективных технологий, способных значительно ускорить селекционный процесс, являются технологии удвоенных гаплоидов (ДН-технологии), такие как гиногенез и андрогенез. Данные технологии позволяют сократить время создания родительских линий до одного поколения, при этом получаемые линии являются полностью гомозиготными. Однако, несмотря на успешное применение этих технологий для многих культур, в том числе и для овощных, для томата технология получения удвоенных гаплоидов не была разработана. Альтернативной и перспективной в данном направлении является получение гаплоидных растений с использованием гаплоиндукторов – линий растений, при скрещивании с которыми происходит элиминация их собственного генома и формирование гаплоидов с геномом второго родителя. Создание гаплоиндукторов может производиться с помощью геномного редактирования гена *CENH3*, играющего ключевую роль в формировании центромер. Различные мутантные варианты гена *CENH3* показали эффективность в гаплоиндукции *Arabidopsis thaliana*, *Triticum aestivum*, *Zea mays*.

Данная работа направлена на получение гаплоиндуктора томата с помощью геномного редактирования гена *CENH3* с применением технологии CRISPR/Cas Base editing. Для реализации работы были подобраны антоциановые сорта томата с видимой пигментацией в проростках для дальнейшей агробактериальной трансформации. Антоциановая окраска служит визуальным маркером, позволяющим отбирать гаплоидные растения по отсутствию пигментации в результате элиминации генома антоцианового гаплоиндуктора томата. Был проведен анализ и выравнивание нуклеотидных и аминокислотных последовательностей гена *CENH3* различных видов сельскохозяйственных растений для определения наиболее консервативных участков, так как редактирование консервативных участков, согласно литературным данным, приводило к более эффективной гаплоиндукции в семенах *Arabidopsis thaliana*. Были подобраны гидовые РНК для нацеливания на консервативные участки *CENH3* с учетом окна дезаминирования и метрик эффективности работы гидовой РНК, проведен дизайн и молекулярное клонирование гидовых РНК в плазмидные векторы, содержащие компоненты системы редактирования, белок Cas, цитозиновою дезаминазу и направляющие РНК.

Разработанные генно-инженерные конструкции позволят получить гаплоиндуктор томата, что откроет новые возможности для селекции этой культуры и создания полностью гомозиготных линий томата. Это поспособствует существенному сокращению сроков выведения новых сортов и гибридов, и повысит эффективность селекционных программ.

РЕГУЛЯЦИЯ мРНК ГИСТОНОВ С ПОМОЩЬЮ НОНСЕНС-ОПОСРЕДОВАННОГО РАСПАДА

Чех Д.С.¹, Болихова А.К.^{2,3,4}, Сергиев П.В.^{2,3,4}

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
биологический факультет, Москва, Россия

²Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

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

⁴Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
химический факультет, Москва, Россия

chekh.daria@gmail.com

Гистоны – это высококонсервативные белки, играющие ключевую роль в организации хроматина и регуляции его структуры у эукариот. Эти белки формируют основную часть нуклеосом – структурных единиц хроматина, состоящих из ДНК, обернутой вокруг гистоновых октамеров. Экспрессия гена HIST1H4H, кодирующего репликационно-зависимый гистон H4C8, строго контролируется клеточным циклом. Нарушение этого контроля связано с развитием рака и репродуктивными дисфункциями.

В данной работе мы исследовали один из потенциальных механизмов деградации матричной РНК (мРНК) гистона H4C8 – нонсенс-опосредованный распад (*nonsense-mediated decay, NMD*). NMD может инициироваться в первом раунде трансляции при наличии комплекса сращивания экзонов (*Exon Junction Complex, EJC*), который после сплайсинга остается закрепленным на мРНК на расстоянии 50–55 нуклеотидов ниже стоп-кодона.

Анализ данных высокопроизводительного секвенирования показал изменение уровня сплайсированных в 3' untranslated region (3' UTR) транскриптов гена HIST1H4H под воздействием ингибитора трансляции – циклогексимида. Это позволило нам выдвинуть гипотезу о возможной роли NMD в их разрушении: мы предположили, что NMD способствует деградации мРНК гистона H4C8, содержащих сплайсированные 3' UTR.

С помощью метода RT-qPCR мы изучили изменения в количестве мРНК гистона H4C8 после воздействия циклогексимида на клетки HeLa S3. В результате был зафиксирован рост количества мРНК H4C8 и, в частности, продуктов сплайсинга в 3' UTR.

Up-frameshift suppressor 1 homolog (UPF1) – ключевой фактор NMD, связывающий мРНК и инициирующий её деградацию через взаимодействие с другими белками NMD-комплекса. Поэтому для более точного изучения механизма мы провели нокдаун UPF1 с помощью siRNA и оценили количество мРНК с помощью RT-qPCR.

Наши результаты свидетельствуют о потенциальной роли NMD в контроле мРНК гистона H4C8, что расширяет представление о механизмах посттранскрипционной регуляции гистоновых мРНК и их возможном влиянии на организацию хроматина и поддержание стабильности генома.

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

БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ПРОФАГОВОГО РАЗНООБРАЗИЯ В ГЕНОМАХ БАКТЕРИЙ РОДА *METHYLOCOCCUS*

Чигирева А.А.^{1,4}, Резайкин А.В.^{2,3}, Низовцева И.Г.², Коренская А.Е.¹

¹НПО Биосинтез, Москва, Россия

²Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина,
Екатеринбург, Россия

³Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург, Россия

⁴Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

chigireva.alina03@mail.ru

Профаги, являясь мобильными генетическими элементами в геномах бактерий, играют важную роль в их эволюции и могут оказывать влияние на стабильность биотехнологических процессов. На сегодняшний день идентификация и определение функционального статуса профагов в бактериальных геномах представляет собой важную биоинформатическую задачу, сложность которой обусловлена разнообразием форм профагов – от интактных индуцибельных последовательностей до нежизнеспособных фрагментов, образовавшихся в результате делеций, вставок и генетических перестроек, так и ограниченным пулом консервативных профаговых генов, которые могли бы служить надежными профаговыми сигнатурами.

Для решения указанной задачи в рамках данного исследования был разработан комплексный биоинформационный конвейер для поиска и анализа профаговых последовательностей.

Первый этап включал параллельное использование четырех биоинформатических программ: PHASTEST, Phigaro, VIBRANT и PhiSpy, для предсказания потенциальных профаговых последовательностей в исследуемых неаннотированных бактериальных геномах. Каждый алгоритм применял различные методы, включая поиск гомологии с известными вирусами и анализ геномных характеристик.

На втором этапе перекрывающиеся и близкие профаговые области были объединены, а низкокачественные регионы отсеяны на основе ряда критериев: (1) профаговая последовательность идентифицирована более чем одним алгоритмом поиска; (2) размер последовательности более 10 тысяч пар нуклеотидов; (3) последовательность включает более 10 специфических для профагов генов; (4) получил среднюю и выше оценку алгоритмами PHASTEST или VIBRANT; (5) включает специфические для профагов сайты прикрепления (*attR*, *attL*).

Третий этап включал верификацию и коррекцию границ объединенных профаговых областей с использованием программы CheckV для оценки качества и попарного выравнивания с неинфицированным геномом бактерии аналогичного вида с помощью ProgressiveMauve. Этот шаг позволял уточнить границы профагов на основе анализа блоков синтении между областью расположения профага и бактериальным геномом.

В контексте бактерий рода *Methylococcus* разработанный биоинформационный конвейер позволил выделить в геномах шести штаммов 12 потенциальных профаговых областей. Дальнейший филогенетический и сравнительный геномный анализ полученных последовательностей, с помощью биоинформатических алгоритмов VICTOR, VIRIDIC, ViPTree, PharoKka и Clinker охарактеризовал их генетическое разнообразие, филогенетические связи и функциональный состав генов.

Результаты данного исследования значительно углубляют текущее понимание генетического разнообразия и биологических свойств бактериофагов, инфицирующих виды *Methylococcus*. Разработанный конвейер может быть использован для рутинного мониторинга профагов в полногеномных последовательностях промышленных штаммов (при наличии хорошей геномной сборки), что имеет важное значение для обеспечения стабильности биотехнологических процессов.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-24-00454.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ УСТОЙЧИВОСТИ *OZOBRANCHUS JANTSEANUS* К ЭКСТРЕМАЛЬНЫМ УСЛОВИЯМ

Шарипова Д.И.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

shr.diliara@gmail.com

В ходе исследования молекулярных механизмов устойчивости *Ozobranchus jantseanus* к экстремальным условиям был проведен комплексный анализ транскриптомных данных. Эта паразитическая пиявка обладает уникальной способностью переносить мгновенное замораживание и длительное хранение при -80°C без предварительной адаптации, а процесс восстановления активности после оттаивания занимает менее 20 минут. Для понимания механизмов, лежащих в основе такой устойчивости, использовался биоинформатический анализ, включающий предобработку ридов, сборку транскриптома, анализ экспрессии генов и функциональную аннотацию.

На первом этапе была проведена очистка данных секвенирования, включающая удаление низкокачественных ридов и адаптерных последовательностей с помощью Trimmomatic, а контроль качества осуществлялся с использованием FastQC. De-novo сборка транскриптома выполнялась с Trinity, что позволило реконструировать полный набор транскриптов без наличия референсного генома. Выравнивание ридов на собранный транскриптом проводилось с использованием Bowtie2, а оценка уровней экспрессии выполнялась с помощью Kallisto, что обеспечило точную количественную характеристику экспрессии на разных стадиях замораживания и оттаивания.

Дифференциальный анализ экспрессии проводился с использованием DESeq2 и edgeR для выявления генов, активность которых изменялась под влиянием экстремальных температур. Функциональная аннотация выполнялась с помощью BLAST, InterProScan и EggNOG-mapper, а обогащение по биологическим процессам оценивалось с использованием GOseq.

Сборка транскриптома позволила идентифицировать 185 758 транскриптов, соответствующих 115 152 предполагаемым генам. Средняя длина транскрипта составила 780 нуклеотидов, медианное значение – 445, а N50 – 1247, что указывает на значительное количество коротких последовательностей. Анализ ExN50 продемонстрировал снижение значений на высоких Ex, свидетельствующее о преобладании низкоэкспрессированных транскриптов, что также подтвердилось распределением экспрессии.

Сравнительный анализ транскриптома показал значительное увеличение экспрессии генов, связанных с ингибированием и регуляцией пептидаз (GO:0030414, GO:0061134). Эти белки преимущественно локализируются во внеклеточном пространстве и, вероятно, участвуют в процессах восстановления тканей после замораживания. В отличие от других организмов, обладающих криоустойчивостью, *O. jantseanus* не экспрессирует известных антифризных белков, что указывает на альтернативные механизмы защиты.

Среди 100 наиболее активно экспрессируемых транскриптов 20% составляют продукты генов, специфичных для рода *Ozobranchus*, а 5% имеют открытую рамку считывания. Это позволяет предположить, что часть молекулярных адаптаций к экстремальным условиям связана с ранее неизвестными белками. Кроме того, обнаружена зависимость устойчивости пиявки от метаболических факторов: известно, что кратковременное голодание значительно снижает её способность переносить замораживание, что указывает на возможное влияние компонентов крови черепахи-хозяина.

Высокая экспрессия пептидазных ингибиторов и регуляторов предполагает их роль в защите и восстановлении после экстремального воздействия. Дальнейший функциональный анализ белков и метаболические эксперименты помогут глубже понять эти процессы и их потенциальное применение в биотехнологии и медицине.

ВЛИЯНИЕ МИКОРИЗАЦИИ НА МЕТАБОЛОМ И ТРАНСКРИПТОМ РАСТЕНИЯ-
ХОЗЯИНА В МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ
“*MEDICAGO LUPULINA* + *RHIZOPHAGUS IRREGULARIS*” В УСЛОВИЯХ РАЗНОЙ
ОБЕСПЕЧЕННОСТИ ФОСФОРОМ

Юрков А.П.¹, Крюков А.А.¹, Кудряшова Т.Р.¹, Косульников Ю.В.¹, Горенкова А.И.¹,
Ковальчук А.И.¹, Беляева А.И.¹, Романюк Д.А.¹, Пузанский Р.К.²,
Богданова Е.М.², Шишова М.Ф.³

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

²Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук,
Санкт-Петербург, Россия

³Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

ap.yurkov@arriam.ru

Известно, что грибы арбускулярной микоризы (АМ) играют важную роль в развитии наземных экосистем вследствие их ростстимулирующей способности, усиления фосфорного питания растений, повышения адаптивных способностей растений к стресс-факторам среды биотической и абиотической природы. Между тем, для успешного создания биопрепаратов на их основе необходимы детальные знания о механизмах развития эффективного АМ-симбиоза. Этих сведений до сих пор недостаточно. В связи с этим целью настоящего исследования было оценить влияние эффективного штамма RCAM00320 *Rhizophagus irregularis* на развитие высокоотзывчивой на микоризацию линии MIS-1 *Medicago lupulina* в условиях различной обеспеченности фосфором доступным для питания растений (Рд). С применением газовой хроматографии – масс-спектрометрии с использованием хроматографа Agilent 6850 с капиллярной колонкой Rxi-5Sil (Restek), квадрупольного масс-селективного детектора Agilent 5975 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) проведен анализ метаболитных профилей корней растений, инокулированных и неинокулированных грибом АМ в ключевые фазы развития растения. Идентифицировано около 400 метаболитов, из которых 14 выделены в качестве маркеров развития эффективного АМ-симбиоза в условиях низкого и среднего уровня Рд в субстрате. Впервые обнаружены негативные регуляторы развития АМ-симбиоза. РНК выделяли с использованием реагента RNeasy (MRC, Cincinnati, OH, USA). Качество РНК оценивали с использованием системы TapeStation 4150 (Agilent, Santa Clara, CA, USA), качество было высоким. Секвенирование библиотек проведено на платформе Illumina HiSeqXTen (San Diego, CA, USA) компанией Macrogen (Seoul, Republic of Korea). С применением массового анализа концов кДНК (Massive Analysis of cDNA Ends, MACE-Seq) проведен анализ транскриптов более 44000 генов люцерны. С помощью программы eggNOG-mapper получены группы геной онтологии (GO). Для функциональной аннотации генов использовался онлайн-инструмент MapMan4. Анализ обогащения GO проведен с использованием теста Колмогорова-Смирнова. Показано, что микоризация приводила к существенному изменению транскриптомных профилей как в условиях низкого, так и среднего уровня Рд. Число дифференциально экспрессируемых при микоризации генов

составило более 3500. Суммируя данные метаболомного и транскриптомного анализов, следует заключить, что микоризация позитивно регулирует биосинтез углеводов, липидов и белков. В условиях низкого уровня Рд в субстрате микоризация оказывала наиболее существенный эффект на развитие растения-хозяина, приводя к адаптации к данному стресс-фактору.

Работа поддержана грантом РФФ № 22-16-00064-П.

ПОИСК СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ, СВЯЗАННЫХ С АГРЕССИВНОСТЬЮ РАКА ЭНДОМЕТРИЯ

Якупова А.М.¹, Девятияров Р.М.^{1,2}, Гусев О.А.^{1,2}

¹Институт фундаментальной медицины и биологии КФУ, Казань, Россия

²Juntendo University, Токио, Япония

yakupova.adelya.m@gmail.com

Актуальность. Рак эндометрия (РЭ) является одним из наиболее распространенных типов рака у женщин. Несмотря на прогресс в ранней диагностике и лечении заболевания, агрессивные формы РЭ остаются сложными для терапии и характеризуются высоким уровнем смертности. Поиск и изучение молекулярных механизмов, отвечающих за тяжелое течение РЭ, представляют актуальную научную задачу, решение которой является ключевым фактором для разработки новых стратегий лечения.

Цель. Выявление сигнальных путей, ассоциированных с агрессивностью РЭ, и их роли в прогрессировании заболевания.

Материалы и методы. В исследовании были использованы образцы тканей рака эндометрия, полученные от пациенток с гистологически подтвержденным диагнозом. Образцы включали опухоли 1, 2, 3 и 4 стадий (по классификации FIGO). Изучение профилей экспрессии генов было проведено методом CAGE с секвенированием на платформе Illumina. Полученные данные были обработаны с помощью биоинформатических методов, включающих анализ качества данных, аннотацию, поиск значимых различий в экспрессии генов, анализ взвешенных сетей коэкспрессии генов, а также анализ обогащения по функциональной принадлежности генов, активность которых была ассоциирована со стадиями прогрессирования заболевания.

Результаты и обсуждение.

1) Выявлены ключевые сигнальные пути, такие как Wnt, значимо активированные в агрессивных формах РЭ.

2) Было обнаружено повышение экспрессии генов, отвечающих за устойчивость к химиотерапии (CT45).

3) Установлены потенциальные биомаркеры агрессивности ответственные за эпителиально-мезенхимальный и мезенхимально-эпителиальный переходы в опухолевой ткани (GPATCH4, NLE1, DDX31, DDX1, MTERF3, KRR1).

Секция 2

«КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ»

ВЛИЯНИЕ МЕТАБОЛИТОВ ЦИКЛА ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ НА
ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ, ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ МИТОХОНДРИЙ И АКТИВАЦИЮ
СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ В МОДЕЛИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОГО ШОКА *IN VITRO*

Андрианова Н.В.¹, Буян М.И.^{1,2}, Черкесова К.С.^{1,3}, Брезгунова А.А.¹,
Певзнер И.Б.¹, Плотников Е.Ю.¹

¹НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

²Факультет биоинженерии и биоинформатики,
МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³Биологический факультет, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

andrianova@belozersky.msu.ru

Геморрагический шок представляет собой опасное состояние, возникающее вследствие массивной кровопотери и приводящее к нарушению кровоснабжения тканей. Из-за недостатка питательных веществ и кислорода при этом страдают жизненно важные органы, в частности, мозг, почки и печень. При геморрагическом шоке митохондрии, являющиеся центральными органеллами в процессах энергетического метаболизма, претерпевают патологические изменения, приводящие к повреждению компонентов электрон-транспортной цепи, нарушению окислительного фосфорилирования и избыточному образованию реактивных форм кислорода. Это, в свою очередь, индуцирует в органах окислительный стресс, активацию митохондриально-зависимых апоптотических сигнальных путей и усугубляет полиорганную недостаточность. В настоящее время разрабатываются новые подходы терапии геморрагического шока и последующих осложнений, прежде всего направленные на быстрое восстановление биоэнергетического статуса клеток.

Целью данной работы был анализ чувствительности клеток мозга, почек, печени и кровеносных сосудов к депривации по разным метаболическим субстратам, а также оценка эффективности применения метаболитов цикла трикарбонных кислот для предотвращения гибели клеток при моделировании геморрагического шока в условиях *in vitro*.

Эксперименты проводили на четырех типах клеток, в частности, первичной культуре астроцитов головного мозга крысят, а также перевиваемых линиях эпителиальных клеток почки (NRK-52E), клеток печени (LX-2) и эндотелия сосудов (EA.hy926). Была протестирована чувствительность клеток к недостатку различных метаболических субстратов (глюкозы, аминокислот). Кроме того, в нормальных условиях и на фоне депривации были изучены эффекты применения интермедиатов цикла трикарбонных кислот (сукцинат, фумарат). В ходе работы оценивалась жизнеспособность клеток, трансмембранный потенциал митохондрий и структура митохондриального ретикулума, а также активация сигнальных путей, ассоциированных с гибелью или пролиферацией клеток.

Было показано, что недостаток разных метаболических субстратов приводит к гибели исследуемых клеток, что делает такую модель удобным способом изучения геморрагического шока в условиях *in vitro*. Добавление сукцината, как в нормальных условиях, так и при

депривации повышало жизнеспособность клеток, прежде всего мозга и почек, более чем в 2 раза. Применение фумарата также повышало жизнеспособность клеток, но менее эффективно. В нормальных условиях инкубация клеток почек и печени с сукцинатом снижала трансмембранный потенциал митохондрий, а при депривации, наоборот, увеличивала его. Таким образом, применение метаболитов цикла трикарбоновых кислот существенным образом влияет на жизнеспособность клеток жизненно важных органов как в норме, так и в модели геморрагического шока, что может реализоваться через восстановление энергетического статуса клеток и поддержание функционирования их митохондрий.

Работа поддержана грантом РФФ № 24-75-10013.

РАЗРАБОТКА ПЛАЗМИДНЫХ КОНСТРУКЦИЙ И ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ
БЕЛКОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К
КАЛЬЦИТОНИН ГЕН-РОДСТВЕННОМУ ПЕПТИДУ

Артёмова Е.Н., Шумков М.С., Армянинова Д.К., Гончаренко А.В.

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

e.n.artemova02@gmail.com

В ряде исследований было установлено, что ключевую роль в развитии мигрени играет кальцитонин ген-родственный пептид (Calcitonin Gene-Related Peptide, CGRP). Подавление биологической активности CGRP позволяет эффективно купировать или даже предотвращать приступы мигрени. На основании этого были разработаны препараты – моноклональные антитела (мАТ) к CGRP, эффективность которых уже продемонстрирована в ряде клинических испытаний.

Несмотря на все преимущества, производство подобных препаратов в России отсутствует. В связи с этим разработка мАТ для лечения мигрени, а также создание технологии их получения на отечественных предприятиях по сей день являются актуальными задачами.

На предыдущих этапах работы мы собрали экспрессионные плазмидные конструкции, несущие вставку гена целевого пептида, и получили экспрессионные системы для синтеза рекомбинантного CGRP, представляющие собой суспензионные культуры *E. coli* BL21(DE3), трансформированные созданными плазмидами. Также, провели серию экспериментов, по результатам которых отобрали экспрессионные системы, наиболее продуктивные в отношении синтеза целевых белков.

Целью данной работы стала экспрессия и очистка целевых белков для дальнейшего проведения иммунизации мышей.

Мы отработали методику выделения рекомбинантных белков SUMO-CGRP (CGRP, слитый с убиквитин-подобным белком-модификатором (Small Ubiquitin-like Modifier, SUMO)) и CGRP-СtxB (CGRP, слитый с β -субъединицей холерного токсина (Cholera toxin β -subunit, СtxB)) из бактериальной культуры с помощью металл-хелатной хроматографии. С целью удаления низкомолекулярных соединений, а также замены элюирующего буфера на натрий-фосфатный буфер (PBS) провели диализ полученных после хроматографической очистки растворов белков через мембрану, отсекающую молекулы с молекулярной массой более 14 кДа. Качество выделения белков подтверждали с помощью денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле (SDS-PAGE).

Посредством внутрибрюшинной инъекции мышей линии BALB/c иммунизировали раствором очищенного SUMO-CGRP с полным адьювантом Фрейнда. Бустерную иммунизацию провели рекомбинантным SUMO-CGRP с неполным адьювантом Фрейнда. Третью иммунизацию осуществляли посредством введения мышам раствора очищенного белка CGRP-СtxB без адьюванта.

Мы получали CGRP в виде слитых белков с целью увеличения его экспрессии в *E. coli*, а также для повышения иммуногенности CGRP, которая может быть снижена ввиду его малых размеров (4 кДа). Использование химерной конструкции с CtxB, обусловлено необходимостью селекции плазматических клеток специфичных именно к CGRP-компоненту слитого белка, а также адьювантными свойствами CtxB, позволяющими не применять при вакцинации дополнительные «усилители» иммунного ответа.

На следующих этапах работы мы планируем получить эукариотические клетки-продуценты моноклональных антител к CGRP методом гибридомной технологии.

Так как полученная в результате иммунизации поликлональная сыворотка содержит антитела и к целевому пептиду – CGRP, и к слитым с ним белкам – SUMO и CtxB – проведем селекцию полученных гибридом, отбирая те, которые образуют антитела специфичные непосредственно к CGRP.

ИССЛЕДОВАНИЕ ТОКСИЧНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА
БИОПСИЙНОМ МАТЕРИАЛЕ ВОЗБУДИМЫХ ТКАНЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
СИСТЕМ ИХ ЖИЗНЕОБЕСПЕЧЕНИЯ И РАЗРАБАТЫВАЕМЫХ ТЕСТ-ПЛАТФОРМ

Бакуменко С.С.^{1,3}, Джабраилов В.Д.¹, Турчанинова Е.А.¹, Слотвицкий М.М.^{1,2,3},
Цвеляя В.А.^{1,2,3}, Агладзе К.И.^{1,2}

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

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

³Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

bakumenko.ss@phystech.edu

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ), включая ишемическую болезнь сердца (ИБС), остаются основной причиной смертности в большинстве экономически развитых стран мира. Одной из ключевых проблем является аритмогенность, которая может быть вызвана не только прямым воздействием на ионные каналы, но и другими механизмами, включая изменения механических свойств клеточных мембран [1]. Современные методы оценки кардиотоксичности лекарственных соединений, такие как тесты на удлинение интервала QT, не учитывают всех факторов риска, особенно в условиях патологий ССЗ. Это приводит к недостаточной эффективности клинических рекомендаций и повышению риска госпитализаций, 11,5% которых связаны с неправильно подобранным лечением. В связи с этим инициативы, такие как CIPA (Comprehensive *in vitro* Proarrhythmia Assay), призывают к разработке новых подходов для оценки кардиотоксичности, учитывающих не только норму, но и вариации патологий [2].

Целью исследования является разработка методов оценки токсичности лекарственных соединений на биопсийном материале возбудимых тканей с использованием атомно-силовой и конфокальной микроскопии, а также оптического картирования. Изучались вещества, включая азобензолы, спирты, рефралон, циклофосфамид и фотосенсибилизатор Азо-Таб. Основное внимание уделялось изучению изменений механических свойств клеточных мембран под воздействием различных веществ. Для измерения жесткости мембран использовалась атомно-силовая микроскопия (АСМ, JPK NanoWizard 3) в режиме *force modulation* с анализом *lock-in amplitude* сигнала [3]. Метод апробирован на клетках рака молочной железы линий MDA-MB-231 и MCF-7, где обнаружены качественные различия в жесткости мембран между родительскими линиями и клетками, подвергшимися воздействию. Упругость мембраны фибробластов после добавления азобензолов увеличилась на 10–20%. Эти изменения коррелировали с данными оптического картирования, где наблюдалось повышение вероятности возникновения волн-реентри, указывающее на потенциальную аритмогенность соединений.

Проведенное исследование демонстрирует перспективность использования атомно-силовой микроскопии в сочетании с конфокальной микроскопией и оптическим

картированием для оценки токсичности лекарственных соединений. Перспективным направлением является создание комплексной тест-платформы с системами жизнеобеспечения для длительного поддержания жизнеспособности биопсийного материала, что позволит проводить более глубокие исследования.

Работа выполнена при поддержке гранта Госзадания МФТИ FSMG-2023-0015.

Литература.

1. *Johnson B. et al.* Mechanisms of drug-induced arrhythmogenicity // *Nature Reviews Cardiology*. – 2020. – Vol. 17. – P. 1-13.
2. *White E. et al.* Comprehensive *in vitro* Proarrhythmia Assay (CIPA): implications for drug development // *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. – 2018. – Vol. 94. – P. 1-10.
3. *Green F. et al.* Atomic force microscopy in cell biology: methods and applications // *Methods in Molecular Biology*. – 2019. – Vol. 1886. – P. 1-15.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ИНФЛАМЭЙДЖИНГА НА КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЕ
ХОНДРОЦИТОВ КАК ПРОТОТИП ПАТОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА
ПРИ ОСТЕОАРТРИТЕ

Белова Ю.И.

Санкт-Петербургский Научно-исследовательский институт Фтизиопульмонологии,
Санкт-Петербург, Россия

bi.day.eddie@gmail.com

Введение. Остеоартрит – заболевание, в основе которого лежит поражение всех компонентов сустава – хряща, субхондральной кости, синовиальной оболочки, связок, сухожилий и мышц. Считалось, что развитие остеоартрита связано именно с износом суставного хряща, и лишь в последние годы данное заболевание стали рассматривать как сочетание травмы и воспаления. Инфламэйджинг – хроническое низкоуровневое воспаление, которое считается одним из ключевых факторов, влияющих на процессы приобретения клетками сенесцентного фенотипа. Развитие инфламэйджинга приводит к активации сигнального пути NF-κB, повышению уровня провоспалительных сигнальных молекул, что создает благоприятные условия для усиления окислительного стресса, который, в свою очередь, наносит ущерб митохондриям. Митохондриальная дисфункция при инфламэйджинге играет центральную роль в ускорении дегенеративных изменений клеток. Нарушение дыхательной цепи в митохондриях приводит к снижению выработки АТФ и увеличению продукции активных форм кислорода (АФК), повышающих уровень воспаления. Митохондриальная дисфункция нарушает способность клеток к пролиферации, влияет на метаболический гомеостаз клетки и способствует поддержанию воспаления.

Цель: оценить уровень экспрессии сигнальных молекул при моделировании инфламэйджинга на первичной культуре реберных хондроцитов человека.

Материалы и методы: для исследования использовалась моделирование инфламэйджинга путем генотоксического стресса (воздействие УФ-излучения от лампы Philips TUV 8 Вт (Philips, Нидерланды) с длиной волны 253,7 нм) на первичной культуре хондроцитов, выделенных из биоптата реберного хряща. Определялась экспрессия маркеров p65, прохибитина и ki-67 иммуноцитохимическим флуоресцентным методом. Статистическую обработку проводили в Microsoft Excel с помощью надстройки RealStatistics. Для сравнения групп использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Нормальность распределения оценивалась критерием Шапиро–Уилка. Различия считали достоверными при $p \leq 0,05$. Результаты представлены в виде среднего и стандартной ошибки среднего ($M \pm m$).

Результаты. При иммуноцитохимическом исследовании экспрессии прохибитина в первичной культуре хондроцитов было обнаружено, что среднее значение относительной площади экспрессии в контрольной группе составляло $7,95 \pm 2,02$, в то же время экспрессия достоверно снижалась после воздействия генотоксического стресса и развития инфламэйджинга – $3,49 \pm 0,72$. Экспрессия маркера пролиферативной активности клеток – ki-67 в контрольной группе составляла $33,79 \pm 9,63$, в группе после воздействия УФ-излучения

достоверно снизилась до $11,22 \pm 1,57$. Экспрессия p65 из семейства транскрипционных факторов NF-кВ достоверно повышается в экспериментальной группе и составляет $48,81 \pm 16,1$ по сравнению с контрольными значениями – $9,8 \pm 5,31$.

Обсуждение. Приобретение сенесцентного фенотипа и развитие инфламэйджинга изменяет экспрессию сигнальных молекул в первичной культуре хондроцитов. Снижение экспрессии прохибитина и ki-67, а также повышение экспрессии p65 свидетельствует о динамическом старении клеток в культуре и эффективности выбранного метода для моделирования инфламэйджинга. Результаты исследования свидетельствуют о возможности рассмотрения прохибитина и p65 как потенциальных молекулярных маркеров динамики проводимой терапии остеоартрита.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ИНСУЛИНОМЫ КАК ВОЗМОЖНЫЙ ПОДХОД К ПРОИЗВОДСТВУ ИНСУЛИНА: МЕТОДОЛОГИЯ КОНТРОЛЯ УРОВНЯ ГОРМОНА И НАПРАВЛЕННОЕ ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК

Борзова П.А.¹, Сергеев Г.И.¹, Ератова Л.В.², Винокуров А.Ю.^{1,2}

¹БУ ОО ДО «Дворец пионеров и школьников им. Ю.А. Гагарина», Орел, Россия

²ОГУ им. И.С. Тургенева, Орел, Россия

glebchemist@mail.ru

Сахарный диабет (СД) ежегодно уносит жизни 1,5 миллионов человек. При этом статистика смертности неумолимо растет, а заболеваемость доходит до 30%. СД также страшен своими осложнениями – приводит к потере зрения, ангиопатии, нефропатии, гангренам. Больные СД (в частности, 1 типа) зависимы от инъекций инсулина – гормона, регулирующего обмен углеводов в организме, синтез которого нарушается при СД. Современные методы производства инсулина далеки от совершенства: дорогие, но при этом негуманные и зачастую дающие продукт, вызывающий иммунный ответ (выделение из поджелудочной железы животных), либо требующие дополнительной обработки после основного этапа синтеза (генно-инженерный метод), что стимулирует поиск альтернатив.

Клеточные культуры инсулином – модели β -клеток человека ввиду своей способности секретировать инсулин. По нашей гипотезе, они могут выступать как источник инсулина ввиду относительной простоты культивирования, а также получения человеческого гормона. В качестве модельного объекта своей работы мы используем культуру RINm5f. Культивирование клеток RINm5f осуществляется на среде на основе RPMI-1640 с содержанием глюкозы 2 г/л и глутамином с добавлением пирувата натрия, фетальной бычьей сыворотки и смеси пенициллина и стрептомицина

На первом этапе работы нам было необходимо найти относительно простой и недорогой метод контроля инсулина в ростовой среде. За основу был использован метод электрофореза в полиакриламидном геле. Проверку его эффективности проводили с применением фармацевтического препарата «Биоинсулин» с содержанием инсулина 100 МЕ/мг. Из различных подходов к окрашиванию гелей был использован метод по V. Neuhoff, подразумевающий фиксацию геля раствором трихлоруксусной кислотой, с последующей обработкой раствором, содержащим кумасси ярко-синего R-250, сульфат аммония и этанол в течение 24 часов и отмывкой раствором аналогичного состава без красителя. Стандартный протокол электрофореза в денатурирующих условиях не дал положительных результатов ввиду того, что инсулин уже обладает низкой молекулярной массой, а обработка бета-меркаптоэтанолом и кипячение приводит к разрыву дисульфидных связей, и как следствие, еще большему уменьшению молекулярной массы белка. Переход к методу без проведения денатурации позволил визуализировать пробы инсулина с порогом чувствительности – 10 МЕ/мг. Используя в качестве проб среду после культивирования инсулиномы, однозначных результатов не было получено, что означает концентрацию инсулина в среде, не превышающую порог чувствительности метода. Для преодоления проблемы нами было

принято решение сконцентрировать инсулин в среде посредством осаждения ацетатом цинка (0,1 М) с последующим центрифугированием, декантацией и растворением осадка в 0,4 М уксусной кислоте, что позволило добиться достаточной для выявления концентрации инсулина.

Задачей следующего этапа нашей работы является оценка подходов к повышению выхода гормона. Анализ механизмов высвобождения инсулина из клеток, а также метаболизма инсулиномы, предложены походы на основе применения повышенного уровня глюкозы, аминокислот, стимулирующего глибенкламидом. Первичные эксперименты по изучению ростовой среды после различных вариантов культивирования свидетельствуют о высокой эффективности первых двух подходов.

Работа выполнена в рамках проекта «Сириус.Лето: начни свой проект. 2024/2025».

УВЕЛИЧЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ К ТРАНСДУКЦИИ AAV9 С ПОМОЩЬЮ ЭКЗОГЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРОВ К ВИРУСНОЙ ЧАСТИЦЕ

Борисова А.А., Панова А.В., Шмидт А.А., Дженкова М.А., Васильева С.Г., Егорова Т.В.

Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

boriso08@yandex.ru

Векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV) представляют собой перспективные инструменты доставки терапевтического гена для генной терапии из-за их широкого тканевого тропизма, непатогенной природы и низкой иммуногенности. Среди различных серотипов AAV особое внимание привлекает аденоассоциированный вирус серотипа 9 (AAV9). Он демонстрирует высокий уровень трансдукции *in vivo*, обладает повышенным тропизмом к мышцам и способностью преодолевать гематоэнцефалический барьер, что расширяет возможности его применения в лечении заболеваний центральной нервной системы, мышечных и сердечных нарушений.

Однако, несмотря на высокую эффективность AAV9 в трансдукции клеток *in vivo*, его способность трансдуцировать клеточные линии *in vitro* ограничена. Это создаёт препятствия для разработки генотерапевтических препаратов и их тестирования на клеточных моделях.

В нашей работе для увеличения уровня трансдукции AAV9 *in vitro* был использован подход повышения экспрессии рецепторов к вирусной частице в клетках. На основе литературного анализа были выбраны два рецептора к AAV9 – KIAA0319L, SDC4, а также GPR108 – белок, который непосредственно взаимодействует с капсидом вирусной частицы и способствует эффективной трансдукции вируса на этапах после проникновения в клетку. Кодированные последовательности данных рецепторов были клонированы в векторы с репортерной системой (tdTomato) и использованы для трансфекции клеточной линии HEK293T для оверэкспрессии выбранных рецепторов. Трансфицированные клетки были инфицированы AAV9, кодирующим репортерный ген GFP, благодаря которому оценивался уровень трансдукции методом проточной цитофлуориметрии.

Было показано, что экзогенная экспрессия KIAA0319L повышает эффективность трансдукции AAV9, увеличивая как долю трансдуцированных клеток, так и интенсивность флуоресценции трансгена GFP. Оверэкспрессия KIAA0319L в клеточной линии HEK293T привела к увеличению доли трансдуцированных клеток в 1,6 раза и интенсивности флуоресценции трансгена GFP в 3,8 раз. Оверэкспрессия SDC4 и GPR108, в свою очередь, не показала статистически значимого повышения уровня трансдукции AAV9.

Таким образом, экзогенная экспрессия рецептора KIAA0319L существенно повышала уровень трансдукции AAV9 в клетках линии HEK293T. Полученные результаты могут служить основой для создания эффективных клеточных моделей для тестирования генотерапевтических препаратов на основе AAV9.

**ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ
ДОКСОРУБИЦИНА, ДОСТАВЛЯЕМОЙ В ВИДЕ НАНОАЭРОЗОЛЯ
В МОДЕЛИ «ЛЁГКОЕ НА ЧИПЕ»**

**Вакарина Л.Д.¹, Скрышников К.С.², Тайлаков М.Е.³, Брысякин Е.Р.⁴, Антонова О.Ю.³,
Кочеткова О.Ю.³, Канев И.Л.³**

¹Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королёва,
Самара, Россия

²ПушГЕНИ – филиал РОСБИОТЕХ, Пушино, Россия

³Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушино, Россия

⁴Научно-исследовательский институт скорой помощи имени Н. В. Склифосовского
Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

liya.vakarina@mail.ru

Аэрозоли, содержащие липосомальную форму лекарства, демонстрируют высокую эффективность как по сравнению с другими способами введения в организм, так и по сравнению с аэрозолями из чистого лекарства. Методом ультразвукового диспергирования получены липосомы из смеси липидов ДПФХ, ДПФГ и холестерина в молярном соотношении 2:1:2, содержащие 0,1% раствор доксорубина гидрохлорида и имеющие размер 207 ± 48 нм. Эффективность включения препарата в липосомы составила 74%. Методом электрораспыления с частичной газофазной электронейтрализацией липосомы переведены в форму положительно заряженного наноаэрозоля. Средний размер аэрозольных частиц составил 71 ± 17 нм, массовая концентрация аэрозоля 0,74 мкг/л. Для сравнения по аналогичной методике были переведены в форму аэрозоля липосомы, содержащие 0,1% раствор глюкозы. Средний размер аэрозольных частиц составил в данном случае 69 ± 16 нм, массовая концентрация аэрозоля 0,45 мкг/л. Проводилось осаждение полученных аэрозолей на поверхность монослоя частично экспонированных на воздух клеток аденокарциномы человека A549 в электрическом поле в модели “лёгкое на чипе”. После 2 дней культивирования жизнеспособность клеток была оценена методом флуоресцентной микроскопии. Параметр выживаемости рассчитывался как отношение количества живых клеток в образце к количеству живых клеток в контроле, не обработанном аэрозолем. Выживаемость клеток A549 после осаждения аэрозольной формы липосом с доксорубицином в течение 5 минут составила $9,8 \pm 2,1\%$. Количество отдельных аэрозольных частиц, осажденных на 1 клетку за время опыта, составило $\sim 4 \cdot 10^7$. Выживаемость при осаждении липосом с раствором глюкозы в аналогичных условиях составила $94,3 \pm 23,3\%$. Высокая эффективность доставки липосомальной формы доксорубина в виде аэрозоля на поверхность модельного легочного эпителия с сохранением противоопухолевой активности позволит в перспективе использовать технологию получения заряженного наноаэрозоля лекарств для терапии легочных форм онкологических заболеваний.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 23-25-00478.

ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫЙ БИОСЕНСОР ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА НУРЕР КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ N-АЦЕТИЛЦИСТЕИНА

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

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

rinettaj@gmail.com

N-ацетилцистеин (ацетильное производное цистеина, АЦЦ, NAC) – широко используемое лекарственное соединение, известное в клинической практике с середины прошлого столетия. В терапии NAC используется в качестве муколитического агента и антидота при отравлении парацетамолом. Фундаментальные исследования часто объясняют эти и многие другие оздоровительные и цитопротекторные эффекты NAC его антиоксидантной функцией. В то же время, несмотря на огромное количество исследований, проведенных в этой области, механизм действия NAC до сих пор остается не ясен. Существующие концепции предполагают наличие нескольких возможных механизмов: 1) непосредственной элиминации активных форм кислорода за счет NAC, (2) восстановления дисульфидных связей окисленных белков клетки, (3) стимуляции синтеза глутатиона, (4) конверсии NAC в сероводород. Однако, недостаток подходящих аналитических методик затрудняет прижизненное исследование изменений редокс-параметров в клетках.

Недавно разработанные в нашей лаборатории проточно-цитометрические методы дают нам возможность использовать биосенсор перекиси водорода НуРер в качестве репортерного белка, измерение динамики окисления/восстановления которого позволяет оценить различные редокс-параметры в живых клетках, в том числе активность их антиоксидантных систем. В настоящей работе созданные методики были использованы для изучения антиоксидантной активности NAC с использованием модельной линии клеток карциномы шейки матки человека HeLa, постоянно экспрессирующей цитоплазматическую версию белка НуРер. Согласно существующим литературным данным, в *in vivo* исследованиях максимальная концентрация, достигаемая в плазме крови, не превышает 1,5 миллимоля, в то время как в *in vitro* исследованиях преимущественно используются концентрации NAC, составляющие десятки миллимолей. В связи с этим в рамках данной работы были применены концентрации 1 и 10 миллимолей NAC, соответственно.

В первую очередь, анализируя флуоресцентный сигнал НуРер, мы показали, что тестируемые концентрации NAC не оказывают влияния на базальный цитоплазматический редокс-гомеостаз. Далее, исследуя динамику восстановления НуРер после H₂O₂-индуцированного окислительного стресса, мы продемонстрировали отсутствие вклада NAC в обеих используемых концентрациях в дисульфид-редуктазную активность клетки. Анализируя динамику окисления НуРер в условиях окислительного стресса, мы выявили стимуляцию пероксидазной активности клеток, но только в случае высокой концентрации NAC. При этом увеличение пероксидазной активности сопровождалось значимой

апрегуляцией генов, кодирующих элементы глутатион-зависимой антиоксидантной системы. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что эффект терапевтических концентраций NAC, вероятно, не связан с прямым антиоксидантным действием данного лекарственного соединения, а выявление механизмов работы NAC требует более детальных исследований.

Работа поддержана грантом РФФ № 21-74-20178 (Продление).

РАЗРАБОТКА УПРОЩЁННОГО ПРОТОКОЛА ИММУНОМЕЧЕНИЯ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ БИООБЪЕКТОВ

**Внукова А.А.¹, Багров Д.В.¹, Семина С.Е.², Якупова Р.Д.³, Ивин Ю.Ю.³,
Ковпак А.А.³, Пиняева А.Н.³**

¹Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В.
Ломоносова, Москва, Россия

²Department of Physiology and Biophysics, University of Illinois Cancer Center,
University of Illinois College of Medicine, Chicago, IL, USA

³ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия

biochem.fan@ya.ru

Иммуномечение позволяет решить проблему идентификации белоксодержащих объектов, исследуемых с помощью просвечивающей электронной микроскопии. Суть метода заключается в выявлении специфичных антигенов на поверхности образца с помощью всего лишь двух основных реагентов: антител и используемых для проявления связывания конъюгатов на основе наночастиц золота. Однако, иммуномечение редко применяют на практике, так как оно представляет собой трудоёмкую процедуру, занимающую 3–5 часов.

Методика иммуномечения включает блокировку поверхности альбумином для минимизации неспецифического связывания с последующим нанесением антител против целевого антигена и конъюгата. Каждый этап сопровождается отмывкой одномолярным фосфатно-солевым буфером. Завершающим этапом является окрашивание уранилацетатом для повышения контрастности образца. Результаты оценивают путём вычисления нормированной специфичности, которая отражает эффективность связывания конъюгатов с биообъектом с учётом доли его площади на снимке.

Нам удалось адаптировать методику и сократить её длительность до ~2 часов за счёт уменьшения времени наиболее продолжительных шагов – инкубации, блокировки и отмывки. В качестве проявляющего агента использовали конъюгаты коллоидного золота с белком А. Наша методика была использована для исследования двух образцов – инактивированного вируса полиомиелита типа I штамма Sabin и внеклеточных везикул из среды культивирования клеток MCF7. Доля специфического связывания равна 93% для вирусов и 86% для везикул. Нормированная специфичность связывания конъюгатов с вирусными частицами и с везикулами составила $3,7 \pm 0,5$ и $14,8 \pm 6,4$ соответственно, что свидетельствует о высокой избирательности связывания, превышающей случайное распределение.

Адаптированная методика демонстрирует высокую специфичность иммуномечения при значительном сокращении времени проведения анализа. Упрощённый протокол повышает практическую ценность методики, делая её удобной для применения в исследованиях широкого круга биологических объектов.

Исследование выполнено в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова.

ФОРМИРОВАНИЕ ОСТЕОКОНДУКТИВНЫХ КОМПОЗИТНЫХ СКАФФОЛДОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИКАПРОЛАКТОНА ДЛЯ ИНЖЕНЕРИИ КОСТНОЙ ТКАНИ

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

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

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

golubchikovdo@my.msu.ru

Новое поколение биоматериалов для восстановления повреждений костной ткани реализует подходы, основанные на интеграции синтетического материала (скаффолда) в естественный процесс костного ремоделирования вплоть до полного восстановления тканей. При этом, ключевым фактором оценки функциональной активности биodeградируемых композитных материалов будет являться не только скорость резорбции и замещения на нативные ткани, но и остеокондуктивность, способствующая прорастанию новообразованной костной ткани и васкуляризации, а также остеоиндуктивность – способность материала повышать активность формирования нативной костной ткани (стимуляция остеогенеза).

В рамках доклада будет представлен новый трехстадийный метод формирования трехмерных скаффолдов на основе термопластичных полимеров (поликапролактон) с узким температурным рабочим окном (температурный диапазон между температурой размягчения и деструкции), а также будет обсуждаться значительное преимущество разработанного метода в сравнении с традиционно используемой технологией термоэкструзионной 3D печати. В качестве фосфатной дисперсной фазы был предложен стабилизированный аморфный фосфат кальция (АФК), более растворимый в сравнении с широко применяемыми гидроксипатитом и трикальцийфосфатом. Проблема стабилизации аморфного фосфата легла в основу еще одной стадии работы, посвященной исследованию зависимости индукционного периода кристаллизации АФК от устойчивости комплекса с Ca^{2+} для выбранного анионного ингибитора кристаллизации в гидроксипатит. В частности, в данной работе был исследован эффект ряда карбоксилатных анионов с различной дентантностью.

Помимо оптимизации состава разработанного композита было исследовано влияние модификации композита в кислотной и щелочной средах, а также сделан вывод о потенциальных механизмах модификации поверхности. Было исследовано изменение жесткости, которая является ключевым фактором, определяющим эффективность остеогенной дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток (МСК), а также шероховатости поверхности, регулирующей количество адгезионных сайтов для клеток.

Для данного состава композитных материалов (поликапролактон-аморфный фосфат кальция) впервые была произведена оценка биосовместимости на основе экстракционного и контактного теста на цитотоксичность. Было определено отсутствие негативного влияния модифицированной дисперсной фазы АФК на метаболическую активность МСК и повышенная адгезия клеток на поверхности композита.

Таким образом, в данной работе представлены новые подходы к созданию персонализированных скаффолдов на основе нового поколения пористых композитных материалов, содержащих фосфаты кальция в качестве дисперсной фазы, для стимуляции остеогенеза за счет модификации поверхности и повышенной растворимости фосфатного компонента.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 23-79-10103.

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ МИКРОВОЛОКНИСТЫХ МАТЕРИАЛОВ С
КОНТРОЛИРУЕМОЙ УЛЬТРАСТРУКТУРОЙ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОСПИННИНГА

Грачев В.А.¹, Тайлаков М.Е.², Антонова О.Ю.², Кочеткова О.Ю.², Канев И.Л.²

¹Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королёва,
Самара, Россия

²Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушино, Россия

grachev273@gmail.com

Создание скаффолдов со структурой, способной ускорять и направлять рост клеток, является актуальной задачей тканевой инженерии и регенеративной медицины. В исследованиях по данной тематике широко применяются волокнистые материалы, получаемые методом электроспиннинга. Важной характеристикой процесса изготовления таких материалов является возможность контроля взаимной ориентации получаемых микроволокон. Существуют многочисленные методики получения материалов из ориентированных микро- и нановолокон, основанные на осаждении на проводящие подложки либо металлические рамки. Однако, частым недостатком подобных конструкций являются затруднения с отделением волокон от коллектора и загрязнение слоя волокон материалом подложки. Также невозможно получение многослойных материалов из параллельных волокон, что связано с накоплением заряда на поверхности полимера, приводящему к нарушению структуры последующих слоев из-за их электростатического отталкивания. Перспективным способом решения данных проблем является осаждение волокон на вращающийся проволочный коллектор с периодической нейтрализацией заряда на получаемых волокнах с помощью генератора аэроионов противоположного знака. В данной работе была экспериментально продемонстрирована возможность получения материалов из свободных ориентированных микронных волокон из поликапролактона и полилактид-когликолида на вращающемся заземленном рамочном коллекторе. Растворы полимеров распылялись из металлической фильеры при фиксированном значении давления, создаваемого посредством насоса. Периодически процесс электрораспыления приостанавливался и полученный слой волокон обрабатывался аэроионами. Определены оптимальные концентрации полимеров, скорости вращения коллектора и параметры электронеутрализации. Полученные волокна имеют диаметр $1,2 \pm 0,2$ мкм (полилактид-когликолид, 66 кДа) и $0,7 \pm 0,3$ мкм (поликапролактон, 80 кДа). Высокая степень ориентации полученных волокон была подтверждена методом анализа углового распределения микрофотографий полученных материалов. В ходе предварительных *in vitro* испытаний полученных материалов с культурой кератиноцитов человека HaCaT показана высокая (95,5%) биосовместимость и продемонстрирована эффективная клеточная адгезия на поверхности волокон. Материалы, состоящие из параллельных волокон, позволяют направлять рост клеток в макромасштабе, что может найти применение при создании нейроимплантатов, ускоряющих процесс регенерации нервной ткани, тканевых эквивалентов кожи, а также разработке прототипов биоинтерфейсов.

**ПОЛИМЕРНЫЕ ЧАСТИЦЫ НА ОСНОВЕ PLGA-PEG С СОВМЕСТНОЙ
ИНКАПСУЛЯЦИЕЙ ВОРИНОСТАТА И ДОКСОРУБИЦИНА ДЛЯ ТЕРАПИИ РАКА
МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА**

**Гуляев И.А., Сокол М.Б., Моллаева М.Р., Клименко М.А., Яббаров Н.Г.,
Чиркина М.В., Никольская Е.Д.**

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

Gulyaev.I.A@yandex.ru
elenanikolskaja@gmail.com

В настоящее время остается актуальной проблема множественной лекарственной устойчивости рака молочной железы человека, возникающей с высокой частотой после проведения стандартной неoadъювантной химиотерапии. Также существуют ограничения борьбы с вышеуказанным заболеванием, связанные с отсутствием эффективных методов фармакотерапии.

Согласно литературным данным, деконденсация хроматина, вызванная применением ингибиторов гистондеацетилаз (HDACi), может усиливать действие цитотоксических препаратов. Результаты клинических испытаний фазы I показали, что применение HDACi вориноста (SAHA) в сочетании с антрациклиновым антибиотиком доксорубицином (DOX) является эффективным, перспективным и безопасным для терапии солидных опухолей.

Цель настоящей работы заключалась в получении и анализе полимерных частиц на основе сополимеров молочной и гликолевой кислот (PLGA) и модифицированного полиэтиленгликолем PLGA (PLGA-PEG) с совместным инкапсулированием цитотоксического препарата (доксорубицина) и ингибитора гистондеацетилаз (вориноста) для терапии рака молочной железы.

Для получения полимерных частиц PLGA применялся метод двойного эмульгирования с последующим упариванием растворителя. Для оптимизации технологии получения наносомальной формы DOX и SAHA применялись трехфакторные, трехуровневые планы Бокса-Бенкена. Было исследовано влияние количества PLGA, объема дихлорметана и концентрации поливинилового спирта на размер частиц и общее содержание SAHA. Были определены оптимальные параметры, позволяющие получать НЧ, обладающие минимальным размером и наибольшим общим содержанием SAHA.

На основе разработанной технологии получения полимерных частиц PLGA/PLGA-PEG было подобрано значение оптимальной загрузки DOX. Полученные частицы обладали средним размером 211 нм, ζ -потенциалом -25.4 мВ, общим содержанием SAHA 1.75 масс.% и DOX – 0.13 масс.% (соотношение, проявляющее максимальный синергетический эффект).

Результаты анализа гемолитической активности указывают на безопасность внутривенного введения полимерных частиц PLGA/PLGA-PEG, содержащих SAHA и DOX как при моно-, так и при совместной инкапсуляции активных фармацевтических субстанций в диапазоне концентраций 0,1–1,0 мг/мл.

Была показана способность комбинированных полимерных частиц ингибировать рост клеток на 2D и 3D моделях клеток рака молочной железы человека линий MCF-7, SKBR-3 и MDA-MB-231.

Для оценки интернализации полимерных частиц, содержащих SAHA/DOX, использовали совместное включение данных лекарственных веществ и флуоресцентной метки Cy5.5 (NP-SAHA-DOX-Cy5.5). Окраску ядер клеток проводили красителем Hoechst 34580. Было определено, что полимерные частицы эффективно интернализируются клетками.

Работа поддержана грантом РФФИ № 22-25-00293, <https://rscf.ru/project/22-25-00293/>

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТА МИОТИВ (MYOTIVE) ПРИ ИНДУЦИРОВАННОЙ КАРБОПЛАТИНОМ МОДЕЛИ АПЛАСТИЧЕСКОЙ АНЕМИИ У МЫШЕЙ СВА

Далевич Р.А.^{1,2}, Холина А.В.^{1,2}, Дьяченко И.А.^{1,2}, Аршинцева Е.В.³, Пушкин С.Ю.³

¹Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (Филиал ГНЦ ИБХ РАН), Пушино, Россия

²Пушинский филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)» (ПушГЕНИ – филиал РОСБИОТЕХ), Пушино, Россия

³ООО «Эмульсии медицинские», Серпухов, Россия

dalevich@bibch.ru

Объект исследования: препарат Миотив производства ООО «Эмульсии медицинские», содержащий водный раствор полуксамера P188.

Предмет исследования: влияние на медуллярное кроветворение при апластической анемии у мышей СВА.

Цель исследования: изучение дозозависимого эффекта Myotive при индуцированной апластической анемии у мышей линии СВА.

Описательная часть. В качестве стимулятора апластической анемии применялся цитостатик карбоплатин. Введение проводилось однократно внутрибрюшинно в дозе 100 мг/кг.

Тестируемый препарат (Myotive) вводился перорально через зонд в дозах 10, 100 и 500 мг/кг. Контрольным животным вводилась вода для инъекций в том же объеме и аналогичным образом.

В каждой группе шесть мышей получали лечение в течение 7 дней, а остальные шесть мышей - в течение 21 дня.

На 8-й и 22-й дни эксперимента шести мышам из каждой группы вводили внутримышечную анестезию препаратом Телазол/Ксиланит® и умерщвляли с помощью терминального забора крови из хвостовой полой вены.

Заключение. При моделировании апластической анемии, количество эритроцитов, гемоглобина и ретикулоцитов в течение 21-го дня находились на сниженном уровне, что свидетельствует о развитии слабой анемии. В группах мышей, получавших Myotive в дозах 10, 100 и 500 мг/кг, прослеживался дозозависимый эффект, выраженный в увеличении количества эритроцитов, гемоглобина и ретикулоцитов. Myotive может стать терапевтическим средством, нацеленным на поддержание необходимого количества форменных элементов крови при апластической анемии. Потенциально эффект Myotive может быть полезен в качестве поддерживающей терапии при использовании цитостатиков.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ПЭГИЛИРОВАННЫХ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ГРАФЕНА НА КЛЕТОЧНУЮ ЛИНИЮ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ MCF-7 ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ БИК-ИЗЛУЧЕНИЯ

Долгих М.Д.^{1,2}, Бочкова М.С.^{1,2}, Тимганова В.П.², Усанина Д.И.^{1,2}, Заморина С.А.^{1,2}

¹Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

²Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, лаборатория клеточной
иммунологии и нанобиотехнологии, Пермь, Россия

d019ikhmary@yandex.ru

По данным ВОЗ рак молочной железы является самым распространённым видом рака у женщин в 157 из 185 стран. Кроме того, он является основной причиной смертности от опухолевых заболеваний среди женщин во всём мире. Вариантами лечения данного заболевания являются хирургическое удаление опухоли, лучевая терапия, а также назначение лекарственных препаратов, включая гормональную терапию, химиотерапию или таргетную биологическую терапию. Однако перечисленные подходы могут сопровождаться нежелательными побочными эффектами, в том числе рецидивами и возникновением лекарственной устойчивости. Для преодоления данных трудностей предлагается использовать наноматериалы в качестве агентов таргетной, фотодинамической, фототермической, хемодинамической терапии. Подобные методы позволяют избежать многих побочных эффектов традиционных методов лечения. Среди наноматериалов интерес вызывает графен, который представляет собой аллотропную модификацию углерода с двумерной структурой и обладает высокой теплопроводностью. Уникальная теплопроводность графена в сочетании со способностью интенсивно поглощать излучение в ближнем инфракрасном (БИК) диапазоне позволяет использовать материалы на его основе, в том числе оксид графена, для фототермической терапии опухолей путём гипертермии. Кроме того, совместимость наночастиц оксида графена со здоровыми тканями и доступность расположения рака молочной железы для БИК-терапии также делают эту стратегию терапии опухоли достаточно перспективной.

Целью исследования являлось изучение влияния ПЭГилированных наночастиц оксида графена на жизнеспособность и апоптоз клеток MCF-7 под воздействием БИК-излучения.

Клеточную линию MCF-7 культивировали с наночастицами оксида графена (Ossila Ltd, Великобритания), покрытыми линейным и разветвлённым полиэтиленгликолем (лП-ОГ и рП-ОГ). Размер наночастиц составлял 100-350 нм, а их конечная концентрация равнялась 5, 25 и 50 мкг/мл. Спустя 24 часа после взаимодействия клеток MCF-7 с наночастицами пегилированного оксида графена их облучали БИК-светом (использовали лампу Hydrosun-750). Через сутки измеряли температуру в культуральной среде, а также на проточном цитофлуориметре (CytoFLEX S) оценивали уровень синглетов (одиночных клеток), адгезию/поглощение оксида графена, жизнеспособность клеток и их апоптоз (ранний, поздний, общий), а также количество клеток.

В ходе эксперимента было установлено, что при увеличении концентрации частиц лП-ОГ увеличивалась температура культуральной среды под воздействием БИК-лучей, достигая 46°C. Кроме того, увеличивался уровень адгезии / поглощения этих наночастиц. Кроме того, под воздействием БИК-лучей частицы лП-ОГ дозозависимо увеличивали уровень раннего апоптоза клеток MCF-7 и этот же эффект наблюдался для уровня общего апоптоза, достигая значений, сопоставимых с лекарственным препаратом камптотецином (0,15 мкМ). Установлено, что наночастицы лП-ОГ в концентрации 50 мкг/мл снижали уровень синглетов (одиночных клеток) как при воздействии БИК-лампы, так и без её влияния. лП-ОГ в использованных концентрациях, не влияет на жизнеспособность и количество клеток MCF-7. рП-ОГ не оказывает воздействия на исследуемые нами опухолевые клетки.

Таким образом, влияние наночастиц ПЭГилированного оксида графена на опухолевые клетки рака молочной железы MCF-7 человека зависит от таких параметров, как концентрация и тип полиэтиленгликоля (ПЭГ), которым покрыты наночастицы. Модификация наночастиц оксида графена открывает перспективы для терапии рака молочной железы под воздействием БИК-лучей. В частности, наночастицы оксида графена, покрытые линейным полиэтиленгликолем, представляют большой интерес для дальнейших исследований в области фототермической терапии опухолей.

САМООБНОВЛЕНИЕ И КЛОНОГЕННОСТЬ ЕДИНИЧНЫХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЫШИ КАК ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАИВНОГО СОСТОЯНИЯ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ *IN VITRO*

Ерофеева Е.Д., Абдыев В.К.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития
им. Н.К. Кольцова, лаборатория клеточной биологии, Москва, Россия

erofeeva.zhenya@gmail.com

Плюрипотентность – это способность клетки к самообновлению и дифференцировке во все типы клеток трех зародышевых листков (эктодермы, мезодермы, энтодермы), кроме клеток внезародышевых органов. Плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) являются источником дифференцированного клеточного материала для исследовательских моделей, регенеративной медицинской терапии, в связи с чем актуально глубокое понимание состояния плюрипотентности и контроля дифференцировки ПСК.

Из внутренней клеточной массы пре-имплантационной бластоцисты мыши получают эмбриональные стволовые клетки мыши (мЭСК). Для мЭСК характерны непрерывное самообновление, формирование химер после введения мЭСК в бластоцисту, глобальное гипометилирование генома, экспрессия наивных транскрипционных факторов, куполообразная форма колоний, быстрый клеточный цикл по сравнению с терминально-дифференцированными клетками и способность к самообновлению из единичной клетки. Условия с двумя ингибиторами (2i) в присутствии Лейкемия-Ингибирующего Фактора LIF (2i/LIF) – ингибитором MEK/ERK и ингибитором GSK3b-киназы – формируют “ground state”-наивное состояние плюрипотентности мЭСК. В исторически первых условиях культивирования в присутствии эмбриональной сыворотки FBS и LIF (FBS/LIF) для мЭСК характерны распластанная морфология колоний, повышенная экспрессия маркеров дифференцировки, сниженная способность к формированию химер после их подсадки в бластоцисты, сниженная наивность.

Было показано, что именно во время G1-фазы клеточного цикла ПСК чувствительны к сигналам дифференцировки. При воздействии ретиноевой кислотой во время G1-фазы мЭСК дифференцируются в клетки эпибласта, при этом во время G1-фазы в них повышается экспрессия механосенсора *Yap*. Взаимосвязь клеточного цикла с состоянием и биомеханическими свойствами плюрипотентных стволовых клеток малоизучена, а существующие исследования противоречат друг другу. Исследование взаимоотношений участников клеточного цикла с компонентами комплексов адгезии к внеклеточному матриксу, цитоскелета и состоянием плюрипотентности представляет большой интерес.

Целью нашего исследования было охарактеризовать клоногенность единичных эмбриональных стволовых клеток мыши при сохранении наивного состояния плюрипотентности в условиях 2i/LIF и FBS/LIF на желатине и матригеле.

Мы показали, что в условиях 2i/LIF на матрикеле и желатине мЭСК демонстрируют наивное состояние плюрипотентности, клоногенность из единичных клеток, образуют компактные куполообразные колонии. Мы обнаружили, что при адгезии мЭСК к инертному матриксу желатину происходит реорганизация цитоскелета, увеличивается экспрессия маркеров плюрипотентности и снижается экспрессия маркеров дифференцировки.

Мы синхронизировали клеточный цикл мЭСК в условиях 2i/LIF при сохранении наивной плюрипотентности на G1-фазе с помощью гидроксимочевина. Мы проследили и охарактеризовали профиль экспрессии генов плюрипотентности, фокальной адгезии и дифференцировки вовремя перехода популяции мЭСК с G1-на S-фазу. При переходе мЭСК с G1- на S-фазу клеточного цикла повышается экспрессия маркеров плюрипотентности *Nanog*, *Yap*, маркера фокальной адгезии *Vinculin*, ламинина *Lamc1*, *Dusp6*. При этом в течение S-фазы снижается уровень *Oct4*, *Dusp6*, *Cdh1*. Таким образом, мы показали взаимосвязь между клеточным циклом и факторами плюрипотентности, дифференцировки и клеточной адгезии.

РАЗРАБОТКА АКТИВНОЙ РАНЕВОЙ ПОВЯЗКИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ХИТИНСОДЕРЖАЩИХ ОТХОДОВ НЕРЫБНЫХ ОБЪЕКТОВ ПРОМЫСЛА

Игонин Д.Ю.¹, Иголина И.Н.²

¹Государственный Университет Просвещения, Москва, Россия

²Федеральное государственное бюджетное научное учреждение ВНИРО, Москва, Россия

6454341@list.ru

Актуальность. Данная работа относится к естественно-научному разделу фундаментальных наук, в частности к биологии, химии, медицине, экологии. Рассматривается проблема использования отходов нерыбных объектов промысла для создания активной раневой повязки, обладающей антимикробной активностью.

Цель работы. Использование хитинсодержащих отходов нерыбных объектов промысла для создания активной раневой повязки, обладающей антимикробной активностью.

Задачи работы.

- изучить актуальность проблемы использования хитинсодержащих отходов нерыбных объектов промысла с экологической точки зрения;
- изучить актуальность создания активной раневой повязки, обладающей антимикробной активностью посредством анализа рынка препаратов-аналогов;
- изучить возможность использования хитинсодержащих отходов нерыбных объектов промысла для создания активной раневой повязки, обладающей антимикробной активностью;
- изготовить хитозановые пленки и экспериментально подтвердить их сорбционные и антимикробные свойства.

Описание работы.

В данной работе произведен поиск решения экологической проблемы использования хитинсодержащих отходов нерыбных объектов промысла (далее ХО). Предложено использование ХО в качестве сырья для производства хитозана (далее ХТЗ), направляемого на создание активных раневых повязок.

Проведены исследования сорбционных и антимикробных свойства хитозановых пленок разной влажности, изготовленных при разной температуре. Выявлено, что температура формирования пленок практически не влияет на их сорбционные свойства. Следовательно, процесс получения пленок ХТЗ может быть осуществлен при повышенных температурах без ущерба для их сорбционных свойств. Обнаружены антимикробные способности хитозановых пленок. Установлено, что чем ниже влажность пленки, тем ниже ее бактерицидная активность.

Анализ литературы показал, что перспективным направлением дальнейшего исследования будет модифицирование хитозановых пленок альдегидами, для улучшения эксплуатационных свойств (влагостойкость, прочность), понижения цитотоксического индекса. А также разработка мягких лекарственных форм для удобства при использовании.

Результаты работы.

– изучена с экологической точки зрения проблема использования хитинсодержащих отходов нерыбных объектов промысла и выявлена необходимость поиска путей ее решения;

– изучен рынок ранозаживляющих препаратов, обладающих антимикробной активностью. Выявлен дефицит и необходимость их создания, особенно активных раневых повязок;

– проведен патентный поиск, изучены отечественные и зарубежные литературные источники по возможности использования производных хитина для создания активной раневой повязки, обладающей антимикробной активностью;

– изготовлены хитозановые пленки и экспериментально подтверждены их сорбционные и антимикробные свойства. Оптимальный пленочный образец – образец №1, изготовленный при $T = 22^{\circ}\text{C}$ и влажностью $W = 22 \text{ мас.}\%$

Выводы. Проведенный анализ сорбционных и антимикробных свойств разработанных материалов свидетельствует о перспективности применения хитозановой пленки, изготовленного их ХО, в качестве активной раневой повязки, обладающей антимикробной активностью.

МОРФОЛОГИЯ НЕЙТРОФИЛОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ СЫВОРОТКИ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИЕЙ

Иноземцев В.А., Сергунова В.А.

Научно-исследовательский институт общей реаниматологии имени В.А. Неговского
Федерального научно-клинического центра реаниматологии и реабилитологии (ФНКЦ РР),
Москва, Россия

va.inozemcev@physics.msu.ru

Нейтрофилы играют ключевую роль в иммунном ответе, особенно при инфекционных и воспалительных процессах. Изучение их функционального состояния под воздействием различных биологических сред, таких как сыворотка крови, представляет значительный интерес для понимания патогенеза инфекций и сепсиса. В данном исследовании оценивалось влияние сыворотки крови здоровых доноров, пациентов с локализованной инфекцией и пациентов с сепсисом на нейтрофилы здоровых доноров с помощью классической широкопольной флуоресцентной микроскопии и атомно-силовой микроскопии (АСМ). Нейтрофилы инкубировали с сывороткой трех групп пациентов: (1) здоровых доноров, (2) пациентов с локализованной инфекцией и (3) пациентов с сепсисом. Для оценки морфологии использовали флуоресцентную микроскопию. Для анализа топографии поверхности нейтрофилов применяли АСМ.

Флуоресцентная микроскопия не выявила существенных различий в морфологии нейтрофилов между группами. Данные классической АСМ также не указывали на явное влияние сыворотки на клетки. Однако метод Peak Force QNM показал, что адгезия была единственным параметром, по которому наблюдались различия между группами. Этот результат свидетельствует о тонких изменениях в состоянии мембран нейтрофилов, которые невозможно обнаружить традиционными методами. Этот результат подтверждает, что высокочувствительные методы анализа механических свойств, такие как Peak Force QNM, могут помочь в изучении клеточных реакций на биологические факторы.

КОМПОНЕНТЫ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ СЕНЕСЦЕНТНЫХ МСК НАРУШАЮТ
PI3K СИГНАЛЬНЫЙ КАСКАД, СПОСОБСТВУЯ РАЗВИТИЮ
ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ И ПОДАВЛЕНИЮ АДИПОГЕНЕЗА

**Каменков С.С.¹, Чечехин В.И.¹, Зиновьева А.А.¹, Бахчинян Е.¹, Ефименко А.Ю.^{1,2},
Кулебякин К.Ю.^{1,2}, Тюрин-Кузьмин П.А.¹, Чечехина Е.С.¹**

¹Факультет фундаментальной медицины Медицинского научно-исследовательского
института, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

²Центр регенеративной медицины Медицинского научно-исследовательского института,
МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

kams200303@gmail.com

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) жировой ткани – постнатальные стволовые клетки, принимающие участие в регуляции обновления и поддержании гомеостаза жировой ткани. Помимо способности к пролиферации и дифференцировке, МСК обладают секреторной активностью, в том числе посредством продукции внеклеточных везикул (ВВ). Одним из ключевых регуляторов пролиферации и дифференцировки МСК является инсулин. С возрастом чувствительность МСК к инсулину снижается, что приводит к нарушению обновления жировой ткани. При этом МСК приобретают секреторный фенотип, ассоциированный со старением (SASP). Факторы, секретируемые в составе SASP и переносимые в том числе с помощью ВВ, способны снижать чувствительность клеток к инсулину и приводить к нарушению адипогенеза. Целью данной работы было изучение механизмов, ответственных за изменение активности инсулинового каскада в результате воздействия паракринных факторов в составе ВВ.

МСК человека были получены от доноров 2 групп – >65 и <45 лет, которые были обозначены как «Сенесцентные» и «Молодые» соответственно. Воздействие ВВ на инсулиновый сигнальный каскад оценивали после 24 часовой обработки ВВ с предварительной депривацией в бессывороточной среде. Для оценки экспрессии белков использовали лизат тотальной популяции клеток. Измерение уровня белка проводили с помощью вестерн-блоттинга с нормировкой на GAPDH и винкулин.

С помощью вестерн-блоттинга нами было показано повышение уровня p-Akt и p-Erk в молодых клетках после добавления ВВ сенесцентных МСК. В результате анализа состава ВВ сенесцентных клеток, нами было выявлено повышение уровня содержания микроРНК, регулирующих экспрессию белка-ингибитора инсулинового каскада PTEN. Несмотря на это, далее мы показали повышение уровня PTEN в популяции молодых клеток после воздействия ВВ сенесцентных клеток. С помощью иммуноцитохимического окрашивания нами было показано, что наблюдаемое повышение белка PTEN происходит в ядре. Методом иммуноблоттинга с разделением ядерной и цитоплазматической фракций методом высаливания было подтверждено, что повышение уровня PTEN происходило в основном за счёт белка в ядерной фракции

Таким образом, в нашей работе было показано повышение уровня активации канонических PI3K/Akt и MAPK/Erk инсулиновых сигнальных каскадов, связанное с паракринным влиянием молекул в составе ВВ сенесцентных клеток. Это объясняет снижение чувствительности МСК к инсулину и развитие инсулинорезистентности в ответ на воздействие ВВ. Несмотря на повышенное содержание в составе ВВ сенесцентных клеток микроРНК, регулирующих PTEN, нами было показано увеличение уровня белка за счет его ядерной фракции. В ядре данный белок выполняет функции остановки клеточного цикла и поддержания генетической стабильности. Вероятно, это является адаптационным механизмом, направленным на остановку пролиферации и дифференцировки при старении.

Работа поддержана грантом РНФ #19-75-30007 Фундаментальные проблемы регенеративной медицины: регуляция обновления и репарации тканей человека (<https://rscf.ru/project/19-75-30007/>).

КИСЛОТНО-ОСНОВНОЙ ДИСБАЛАНС КАК ФАКТОР МОДИФИКАЦИИ ФОРМЫ И СТРУКТУРЫ ЭРИТРОЦИТОВ

Кандрашина С.С., Сергунова В.А.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии» «Научно-исследовательский институт общей реаниматологии имени В.А. Неговского», Москва, Россия

snezhanna.lyapunova@yandex.ru

Совершенствование условий хранения эритроцитов представляет собой важную задачу в трансфузиологии, так как от этого напрямую зависит эффективность переливания крови. Одним из основных параметров, определяющих сохранность и функциональную активность эритроцитов в процессе хранения, является уровень pH среды. В качестве альтернативы традиционным растворам предлагается применение щелочных растворов, которые могут более эффективно поддерживать физиологическое состояние эритроцитов, замедляя процессы их деградации. Однако оптимальный уровень pH для максимального сохранения качества эритроцитов до сих пор окончательно не установлен, что подчеркивает необходимость дальнейших научных исследований в этой области.

Целью работы было провести сравнительный анализ структурных изменений эритроцитов при варьировании pH среды от щелочных до кислых значений.

Для экспериментов *in vitro* использовали эритроциты от 9 здоровых доноров. Для приготовления суспензий 75 мкл эритроцитов добавляли к 1 мл PBS с определенным уровнем pH. В исследовании использовали pH 6.4, 7.4, и 8.4. Все суспензии инкубировали при постоянной температуре 25°C в течение 30 минут и 7 часов. Для анализа изменения морфологии эритроцитов, структуры поверхности их мембран, цитоскелета и модуля упругости использовали атомно-силовые микроскопы NTEGRA Prima и NTEGRA BIO (NT-MDT, Москва, Россия). Уровень внутриклеточных ROS оценивался с помощью метода сканирующей ион проводящей микроскопии.

После 30 минут инкубации в растворе при pH 6.4 наблюдалось снижение числа дискоцитов в 1.6 раза ($p = 0.00216$) и увеличение числа эхиноцитов в 8 раз ($p = 0.00193$) по сравнению с контрольной группой (pH 7.4 30 мин), где изменений не наблюдалось. При pH 8.4 количество эхиноцитов увеличилось в 3.8 раза. После 7 часов хранения при pH 6.4 и pH 8.4 характеристики наноструктуры мембраны ($L1$, $L2$, $h1$, $h2$) увеличились, что свидетельствует о значительных изменениях в мембранной структуре эритроцитов. Количество пор в цитоскелете уменьшилось после 7 часов хранения в 2.6 и 1.7 раза при pH 6.4 и 8.4 соответственно, а длина пор увеличилась в 1.7 и 1.4 раза ($p < 0.01$), что связано с реорганизацией цитоскелета. Примечательно, что для pH 6.4 была характерна кластеризация филаментов цитоскелета, а для pH 8.4 наоборот они становились тоньше и наблюдалось больше разрывов филаментов. Модуль Юнга (E) после 30 минут инкубации при pH 7.4 составил 4.1 ± 1.6 кПа, при pH 6.4 он увеличился в 2 раза ($p < 0.0001$), а при pH 8.4 – в 1.85 раза ($p < 0.0001$). Через 7 часов хранения при pH 6.4 и 8.4 модуль Юнга увеличился в 1.1 и 1.2 раза

соответственно, а для образца при рН 7.4 модуль Юнга в 1.2 раза выше, чем в контроле. Уровень внутриклеточных ROS после 30 минут инкубации при рН 6.4 и 8.4 статистически не отличались, однако их значение было значительно выше, чем в контрольной группе при рН 7.4 ($p < 0.05$). После 7 часов инкубации уровень ROS увеличился в 2 раза при рН 6.4 и 8.4, а при рН 7.4 – в 1.7 раза по сравнению с 30-минутной инкубацией в растворе при рН 7.4.

Исследование показало, что изменения кислотно-основного баланса среды приводят к схожим изменениям в структуре эритроцитов в процессе хранения. Интересно, что после 7 часов хранения структура цитоскелета изменялась по-разному: при рН 6.4 наблюдается кластеризация элементов цитоскелета, а при рН 8.4 – их истончение и разрывы. Полученные результаты позволят разработать более эффективные стратегии хранения эритроцитов, что повысит безопасность и эффективность гемотрансфузий.

СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ В-ГЕКСОЗАМИНИДАЗЫ А

Каюмова Б.Р.^{1,2}, Царегородцева Т.С.^{1,2}, Губайдуллина А.А.^{1,2}, Шаймарданова А.А.^{1,2},
Соловьева В.В.^{1,2}, Ризванов А.А.^{1,2}

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

²НИЛ OpenLab Генные и клеточные технологии, Казань, Россия

bkaumova@inbox.ru

Введение. В мире насчитывается более 7000 редких (орфанных) заболеваний, из которых 80% являются наследственными. По предварительным данным, около 320 миллионов людей по всему миру страдают от редких наследственных заболеваний. Одной из главных задач является разработка новых методов их лечения, среди которых выделяются генная и клеточная терапия. Низкое распространение GM2-ганглиозидозов (от 1 до 100 000 до 1 500 000 в зависимости от болезни), высокая степень инвалидности у детей и отсутствие эффективных методов терапии делают эту группу заболеваний приоритетной для генно-инженерных подходов.

Исходя из этих данных, была поставлена цель оценить ферментативную активность β-гексозаминидазы А после введения генетически изменённых рекомбинантных аденоассоциированных вирусов, которые кодируют кДНК генов HEXA и HEXB человека. Результаты исследования позволят оценить эффективность данного метода лечения GM2-ганглиозидоза.

Материалы и методы. В работе были исследованы линии первичных эмбриональных клеток почки человека HEK293. Клетки HEK293 и AAV293 культивировали в полной питательной среде DMEM/F12 при 37 С во влажной атмосфере с 5 % содержанием CO₂. Для получения рекомбинантного AAV-HEXA-HEXB проводили кальций-фосфатную ко-трансфекцию пакующей линии клеток HEK293. Аденоассоциированные вирусы AAV-HEXA и AAV-HEXB получали с помощью AAV helper-free system (Cat. №240071, Agilent technologies). Через 48 часов после трансдукции в кондиционированной среде генетически модифицированных клеток HEK293T анализировали ферментативную активность HexA с использованием флуоресцентного субстрата MUGS.

Результаты. Генетическая модификация клеток приводит к сверхэкспрессии генов *HEXA* и *HEXB* и увеличению ферментативной активности HexA в кондиционированной среде более чем в 8 раз, сравнительно с контрольными клетками.

Заключение. Полученные данные позволяют предположить безопасность и эффективность разработанного метода клеточно-опосредованной генной терапии GM2-ганглиозидозов.

ДИНАМИКА ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ И ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ БЕЛКОВ МАЛЫХ ГТФАЗ СЕМЕЙСТВА RHO В ПРОЦЕССЕ РЕПЛИКАТИВНОГО СТАРЕНИЯ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Копылова А.А.¹, Лукачева А.В.², Бобков Д.Е.²

¹Санкт-Петербургский Технологический Институт (Технический Университет),
Санкт-Петербург, Россия

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

angelinakop77@icloud.com

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) – мультипотентные клетки, способные к самообновлению и дифференцировке, что делает их перспективными объектами для применения в регенеративной медицине. Однако их использование ограничено репликативным старением (РС), которое сопровождается остановкой клеточной пролиферации, изменением морфологии, подвижности клеток и активности их сигнальных путей [1]. Малые ГТФазы Rho (RhoA, Rac1, Cdc42) регулируют цитоскелет и миграцию клеток, а изменение их экспрессии и локализации влияют на функциональность МСК. Изучение этих изменений при РС поможет углубить фундаментальные знания о механизмах РС и повысить регенеративный потенциал МСК.

Цель работы: провести анализ экспрессии генов RhoA, Rac1 и Cdc42, а также изучить динамику ядерно-цитоплазматического распределения этих ГТФаз и в процессе РС клеток линии MSCWJ-1.

С помощью метода ПЦР в реальном времени мы оценили относительную экспрессию генов RhoA, Rac1 и Cdc42 в клетках MSCWJ-1 на 12-м, 15-м, 26-м, 30-м и 36-м пассажах. Результаты показали, что в процессе РС МСК происходит снижение экспрессии генов RhoA и Rac1, при этом экспрессия гена Cdc42 наоборот увеличивается. Анализ ядерно-цитоплазматического распределения Rho ГТФаз проводили с помощью методов иммунофлуоресцентного окрашивания и конфокальной микроскопии. MSCWJ-1 выращивали на покровных стеклах и фиксировали на разных стадиях РС. Фиксированные клетки окрашивали первичными антителами против RhoA, Rac1 и Cdc42, затем вторичными антителами с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 488. Для визуализации актинового цитоскелета и ядра клетки окрашивали родамин-фаллоидином и Hoechst 33342, соответственно. Динамику ядерно-цитоплазматического распределения оценивали по колокализации белков с ядром и F-актином [2]. Результаты показали, что в ходе репликативного старения МСК наблюдается снижение ядерной локализации RhoA и Rac1, тогда как Cdc42, напротив, накапливается в ядре.

Таким образом, результаты данного исследования расширяют представления о молекулярных механизмах репликативного старения МСК и указывают на важность дальнейших исследований регуляторной роли Rho ГТФаз. Полученные данные могут быть полезны для разработки новых стратегий повышения регенеративного потенциала МСК, а

также для поиска мишеней в терапевтических подходах, направленных на замедление клеточного старения.

Литература.

1. Weng Z. et al. Mesenchymal stem/stromal cell senescence: hallmarks, mechanisms, and combating strategies //Stem Cells Translational Medicine. – 2022. – Т. 11. – №. 4. – С. 356-371.
2. Bobkov D. et al. The RhoA nuclear localization changes in replicative senescence: new evidence from *in vitro* human mesenchymal stem cells studies //Biocell. – 2022. – Т. 46. – №. 9. – С. 2053-2058.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА В ПРИСУТСТВИИ РЕСВЕРАТРОЛА И ЦИКЛОАСТРАГЕНОЛА

Корпусова Е.И., Сараджи Н.Г., Наквасина М.А.

Воронежский государственный университет Воронеж, Россия

elizaveta.korpusova03@mail.ru

Перспективными биогенными соединениями, проявляющими противовоспалительное, антивозрастное, противоопухолевое, кардио- и нейропротективное, иммуномодулирующее действие, являются ресвератрол и циклоастрогенол. Эффекты этих биогенных агентов опосредуются целым рядом сигнальных молекул и транскрипционных факторов клеток (сиртуины, киназы, p53 и др.). Однако эти плеiotропные соединения имеют бифазный характер действия: их цитопротекторные и цитотоксические эффекты существенно зависят от диапазона концентраций, а клиническое применение сдерживается недостатком сведений о клеточно-молекулярных механизмах действия и возможном канцерогенном потенциале.

Исследованы изменения уровня продукции активных форм кислорода (АФК) и оксида азота, внутриклеточного кальция и количественных показателей процессов клеточной гибели лимфоцитов человека, модифицированных воздействием пероксида водорода (10^{-5} моль/л) и УФ-света (254 нм, 1510 Дж/м^2) в присутствии ресвератрола (10^{-7} , 10^{-5} моль/л) и циклоастрогенола (10^{-8} , 10^{-5} моль/л). Установлено, что циклоастрогенол (10^{-8} , 10^{-5} моль/л) и ресвератрол (10^{-7} , 10^{-5} моль/л) инициируют по сравнению с контролем (свободные модифицированные клетки) снижение уровня АФК и цитозольного кальция, повышение концентрации монооксида азота в лимфоцитах в условиях воздействия пероксида водорода и УФ-света. Обнаружено статистически значимое снижение количества апоптотических клеток после УФ-облучения в присутствии циклоастрогенола (10^{-8} моль/л) по сравнению с таковым для свободных фотомодифицированных иммуноцитов. На основании анализа собственных экспериментальных и литературных данных предложены схемы возможного цитопротективного эффекта ресвератрола и циклоастрогенола по отношению к лимфоцитам. Результаты исследований полезны при обсуждении вопросов, связанных с выявлением механизмов клеточной смерти и разработки подходов к её регулированию.

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ МИТОТИЧЕСКОГО ИНДЕКСА В ПРОЦЕССЕ РЕГЕНЕРАЦИИ У ПЛАНАРИЙ ТРЕХ ВИДОВ

Кузнецов Г.В.

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

Mansurg999@yandex.ru

Планарии характеризуются высокой регенерационной способностью – данные животные способны восстановить утраченную голову за несколько дней. Регенерацию планарий обеспечивают необласты – особые стволовые клетки планарий.

Работа направлена на изучение цитологических особенностей процесса регенерации у планарий трех видов – *Girardia tigrina*, *Schmidtea mediteranea*, *Polycelis tenuis*. Рассматривалось изменение числа делящихся клеток (митотический индекс, МІ) в динамике процесса регенерации.

Животным проводили резекцию головного отдела и оставляли регенерировать. На 0 (т.е. сразу после резекции головного отдела), 1, 2, 3, 5, 7 и 10 дни регенерации отбирали по 10 особей на каждую временную точку. У регенерирующих планарий отсекали участок регенерационной бластемы в головном отделе тела. Контролем служили фрагменты тканей, отсеченные на границе предварительно отсеченного головного участка тела в 0-й день. Полученные образцы тканей лизировали до диссоциации тканей на отдельные клетки; далее вносили краситель Hoechst 33342, связывающийся с ДНК-содержащими структурами; после окрашивания в суспензию вносился фиксатор. Полученную клеточную суспензию наносили на предметное стекло. Исследования проводили с помощью микроскопа Leica DM6000B. Результатом исследования стали полученные значения митотического индекса на ~1000 клеток в исследуемом препарате. Митотический индекс высчитывался по формуле:

$$MI = \frac{(P + M + A + T)}{N} * 100$$

Где: N – общее число рассмотренных клеток; P , M , A , T – число наблюдаемых профаз, метафаз, анафаз и телофаз соответственно.

Фаза митоза, в которой находилась клетка в момент фиксации, определялась визуально, под микроскопом, по характерным признакам окрашенных ДНК-содержащих структур.

В ходе изучения клеточных препаратов было обнаружено, что динамика изменения митотического индекса у планарий *G. tigrina*, *S. mediteranea* и *P. tenuis* имеет аналогичный паттерн для всех трех видов, несмотря на различия в точных значениях величины МІ. Величина МІ контрольных образцов составляет 0,89/0,81/0,92 для *G. tigrina*, *S. mediteranea* и *P. tenuis* соответственно. Изменения происходят следующим образом: на 1 день регенерации число клеток в митозе увеличивается (1,12/1,27/1,19); на 2 день – снижается, но остается выше, чем у контрольных (не регенерировавших) особей (1,03/1,11/1,08); на 3 день – снова увеличивается, достигая своих максимальных значений (1,2/1,37/1,19). После, на 5

(0,96/1,08/1,05) и 7 (0,89/0,94/1,04) дни регенерации, значение митотического индекса продолжает снижаться. В случае планарий *G. tigrina* и *S. mediteranea* на 10 день регенерации величины МІ возвращаются к значениям контрольного (0-го) дня (0,88/0,82 соответственно). В случае планарий *P. tenuis* на 10 день регенерации значение величины МІ незначительно превышает значения контрольного (0-го) дня (1,02 против 0,92).

Исследование клеточной суспензии тканей планарий в разные дни регенерации показало, что митотический индекс у планарий *Girardia tigrina*, *Schmidtea mediteranea*, *Polycelis tenuis* в течение всего процесса регенерации изменяется по сходному паттерну. Это говорит о том, что с цитологической точки зрения процесс регенерации у планарий разных видов протекает идентично; а фундаментальный механизм регенерации одинаков и подчиняется схожим принципам. Результаты выполненной работы могут быть использованы для углубления познаний в области цитологических особенностей и механизмов явления регенерации.

БИОРЕЗОРБИРУЕМАЯ ОСТЕОИНДУКТИВНАЯ КЕРАМИКА НА ОСНОВЕ СМЕШАНОКАТИОННЫХ СИЛИКОГЕРМАНАТОФОСФАТОВ ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ

Леонтьев Н.В., Евдокимов П.В., Путляев В.И.

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

nleontev@inorg.chem.msu.ru

Регенеративный подход считается перспективным направлением в разработке материалов биомедицинского назначения. В области остеопластических материалов для данного подхода характерен акцент на ускорении процессов интеграции, растворения имплантата и ремоделирования нативной кости, чему способствуют остеоиндуцирующие свойства материала, выполняющего роль пористой матрицы. Рост остеоиндуктивности может быть достигнут внедрением в состав кальцийфосфатного керамического каркаса дополнительных макро- и микроэлементов помимо основных (кальция, фосфора, кислорода), что позволяет а) стабилизировать полиморфные модификации с оптимальным уровнем резорбции, б) обеспечить поступление в организм биоактивных элементов и, тем самым, специфически активировать именно те процессы, которые связаны с остеогенезом.

Остеокондуктивность материала, а именно содействие прорастанию костной ткани внутрь объема имплантата, образованию сети кровеносных сосудов, поддержание адгезии и пролиферации клеток, обеспечивается благодаря архитектуре взаимосвязанных макропор, созданной с помощью стереолитографической 3D-печати.

Таким образом, представлены результаты стереолитографического формования остеоиндуктивной биокерамики со сложной макропористой архитектурой на основе смешаннокаатионных силикогерманатофосфатов состава $(Ca, Mg, Sr, Na, K, Cu, Zn)_a(PO_4, SiO_4, GeO_4)_b$, включающих остеоиндуктивные элементы в позициях структуры глазерита. Каждый элемент сложного состава предлагаемого материала имеет четко определенное назначение. Повышенная конфигурационная энтропия используемых твердых растворов, обусловленная многоэлементным составом, позволяет стабилизировать высокотемпературные полиморфы глазерита ($a = 2, b = 1$), обладающие значительной резорбируемостью. Быстрое охлаждение от $1500\text{ }^\circ\text{C}$ приводит к стабилизации также высокотемпературных полиморфов глазеритоподобных структур нагельшмидтита ($a = 7, b = 4$) и карнотита ($a = 5, b = 3$). Рост эффективности стабилизации достигается усложнением элементного состава. В системах $CaMPO_4 - Ca_2XO_4$ ($M = Na, K; X = Si, Ge$) наблюдаются расширяющиеся поля высокотемпературных твердых растворов со структурой глазерита ($a = 2, b = 1$).

Исследования острой цитотоксичности материалов показали, что глазеритные керамики на основе простых силикогерманатофосфатов, а также на основе составов, включающих более 8 элементов, способствуют активной пролиферации клеток фибробластов. Оценка растворения керамик в модельных экстремальных растворах показала, что скорость растворения материалов увеличивается с усложнением их химического состава, что обеспечивает более быстрое высвобождение остеоиндуктивных ионов. Полученные результаты подтверждают перспективность рассмотренных материалов для создания высокорезорбируемых костных имплантатов.

Работа поддержана грантом РФФИ № 22-19-00219.

СОЗДАНИЕ ГЕЛЯ НА ОСНОВЕ СШИТОЙ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ И ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЯ ДЛЯ 3D КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК

Мамонова О.В.^{1,2}, Ивановская Е.В.^{1,2}

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

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук, Москва, Россия

tamonovaolha@yandex.ru

Разработка биосовместимых материалов для культивирования клеток является актуальной задачей на сегодняшний день. 3D культивирование активно применяется в тканевой инженерии и может потенциально применяться для создания модели опухоли *in vitro*, что позволит проводить более качественные испытания лекарственных препаратов. Гели на основе сшитой гиалуроновой кислоты (ГК) и полиэтиленгликоля (ПЭГ) биосовместимы и стабильны, а их структура не препятствует пролиферации и миграции клеток, что позволяет использовать их в качестве искусственного внеклеточного матрикса.

В данной работе были подобраны оптимальные концентрации сшитой дивинилсульфоном ГК и ПЭГ с целью создания композитного геля для 3D культивирования, а также проверена цитотоксичность полученных гелей с помощью МТТ-теста. Для определения оптимальных концентраций полимеров, при которых образуются клеточные агрегаты, использовалась культура НЕК293 (клетки эпителиальной ткани почки эмбриона человека), выращенная в гелях с концентрациями ГК и ПЭГ от 2 до 50 мг/мл. Образование агрегатов определялось визуально при помощи световой микроскопии и цифровой камеры Levenhuk. На основе полученных результатов была оценена цитотоксичность оптимальных гелей по отношению к НЕК293. МТТ-тест проводился в течение трех суток без замены среды, а выживаемость фиксировалась путем определения оптической плотности гелей каждые 24 часа при длине волны 520 нм. Контрольные образцы культивировались в среде DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium).

Культивирование НЕК293 в присутствии композитных гелей позволило определить концентрации, при которых образуются агрегаты клеток: 5, 10, 15, 20 мг/мл для ПЭГ6000 и 1.68, 2.4, 3.6, 4.8 мг/мл для сшитой ГК (Novacutan BioPro) в среде DMEM. В этих концентрациях с помощью световой микроскопии были обнаружены самые большие клеточные агрегаты от 100 до 200 мкм. По результатам МТТ-теста в течение трех суток выживаемость НЕК293, выращенных в гелях, не уменьшалась, что говорит об отсутствии цитотоксичности и возможности газообмена в полимерных гелях. Также по росту значений оптической плотности можно сделать вывод, что полученные гели не препятствуют пролиферации клеток. Самые высокие показатели выживаемости были получены при культивировании в геле с содержанием 10 мг/мл ПЭГ и 2,4 мг/мл ГК. Результаты исследования продемонстрировали, что гели на основе сшитой ГК и ПЭГ могут быть использованы для культивирования клеток в виде агрегатов, что может позволить создать модель для 3D культивации.

СОХРАННОСТЬ ФИБРИЛЛЯРНЫХ БЕЛКОВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПОСЛЕ ЭКСТРАКЦИИ РАСТВОРИМОГО КОМПОНЕНТА

Мелик-Пашаев А.Э.

Государственный научный центр Российской Федерации Институт медико-биологических
проблем Российской Академии наук, Москва, Россия

amelikpashaev@yandex.ru

В настоящее время децеллюляризованные внеклеточные матриксы (дц-ВКМ) активно используются в качестве субстратов для культивирования, улучшая пролиферацию, дифференцировку и поддержание жизнеспособности различных типов клеток.

Структуры ВКМ представлены нерастворимыми фибриллярными волокнами и растворимым аморфным компартментом, включающим гликопротеины и протеогликаны. Фибриллы ВКМ отвечают за передачу механических сигналов микроокружения, а аморфная часть представлена регуляторными молекулами. Существуют способы выделения и повторного использования растворимого компонента, но отсутствуют данные о влиянии экстракции этой составляющей на структуру фибриллярных компонентов. Целью настоящей работы было сравнить нативные и оставшиеся после удаления аморфной части фибриллярные структуры ВКМ на разных сроках культивирования мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (МСК).

МСК 6 пассажа, полученные из тканей пупочного канатика человека, культивировали 5, 7 и 10 суток. Для децеллюризации клеточные пласты инкубировали в смеси Тритон X100 (0,5%) и NH₄OH (20 мМ) в PBS, удаление клеток контролировали микроскопически. Экстракцию аморфного компонента проводили мочевиной (2М) и NaCl (150 мМ) в течении 48 часов при 4° С. Препараты исходного и экстрагированного дц-ВКМ окрашивали пикросириусом красным для выявления коллагеновых белков. Микроскопию дц-ВКМ проводили в режиме светового поля с последующим захватом изображений в микроскопе Nikon Eclipse TiU. Для количественной характеристики параметров фибрилл полученные изображения анализировали с помощью компьютерных программ: Matlab RunTime V9.5 (плагин CT-Fire V3.0 Beta) и ImageJ 1.54 (плагины OrientationJ и TWOMBLLI_v1). Статистический анализ выполняли с помощью программы GraphPad Prism 9 XML Projec.

Значения геометрических параметров коллагеновых белков возрастало в процессе культивирования МСК. Показано статистически значимое увеличение длины и ширины волокон, а также общей площади, занятой ВКМ, на 7 и 10 день относительно 5 суток. Оценка параметров сложности структуры выявила резкое уменьшение лакунарности фибриллярных структур после 5 суток. Параметры неоднородности и числа окончаний достигают максимальных значений на 7 сутки, что может свидетельствовать об уплотнении матрикса с увеличением времени культивирования. Достоверных отличий в количественных характеристиках коллагеновых белков в исходных и экстрагированных дц-ВКМ не выявлено.

Полученные результаты позволяют заключить, что удаление аморфного компонента с помощью мочевины не влияет на сохранность фибриллярных структур ВКМ, продуцируемого МСК.

Работа была выполнена за счет гранта Российского научного фонда № 23-15-00062.

РАЗРАБОТКА ГЕНЕТИЧЕСКИ ИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ С ЦЕЛЬЮ
ТРАНСДУКЦИИ ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК МАКРОФАГОВ
СВИНЕЙ ЛЕНТИВИРУСНЫМИ ВЕКТОРАМИ

Моисеенко Д.С.¹, Чернышев Р.С.¹, Карагяур М.Н.², Иголкин А.С.¹

¹Федеральный центр охраны здоровья животных, Владимир, Россия

²Институт регенеративной медицины, Москва, Россия

moiseenko_ds@arriah.ru

Введение. Генная инженерия – биотехнологическая наука, направленная на изменение генома вирусов и живых организмов (бактерий, растений, животных и других) путем инсерции чужеродного генетического материала или делеции существующих генов молекулярными методами.

В 2017 году Takenouchi T. с соавторами получили иммортализованные линии почечных макрофагов свиней. Для их создания использовались две генно-инженерные конструкции (лентивирусные вектора третьего поколения, кодирующие Т-антиген вируса SV40 и теломеразу свиней), которыми трансдуцировали первично-трипсинизированную культуру клеток макрофагов почки свиньи. В 2018 году Quy Van Chanh Le с соавторами трансдуцировали альвеолярные макрофаги с помощью Т-антигена вируса обезьян SV40 и человеческой теломеразы. В результате чего авторам удалось создать две линии иммортализованных макрофагов.

Сущность метода – трансформация клеток, связанная с экспрессией Т-антигена, и преодоление лимита Хейфлика (+30-40 пассажей) при высокой теломеразной активности. В результате серии клонирований авторам удалось получить перевиваемую линию клеток.

Ввиду отсутствия эффективных и безопасных вакцин против АЧС, специфическая профилактика остается невозможной. В связи с этим высокочувствительные диагностические исследования занимают весомую долю в стратегии противоэпизоотических мероприятий. Для своевременного контроля в распространении АЧС молекулярная эпизоотология имеет большое значение, объектом которой являются вновь выделяемые изоляты вируса, где культура клеток выступает в качестве модели для репродукции вируса. Процесс получения первичной культуры клеток не обладает технологичностью, трудозатратный и дорогостоящий, возникает потребность в создании чувствительной перевиваемой линии клеток.

В связи с этим была поставлена цель: выбор и разработка генно-инженерных конструкций (рекомбинантных плазмид) для трансфекции перевиваемой линии клеток эмбриональной почки человека (НЕК-293Т) с целью синтеза лентивирусных частиц, кодирующих Т-антиген SV-40 и человеческую теломеразу (hTERT).

Материалы и методы. *Плазмиды.* Вектор (трансферная плазида) для синтеза лентивирусных частиц третьего поколения, несущий ген человеческой теломеразы (hTERT) и названный pVLT-EF1a-hTERT-puroR, был любезно предоставлен старшим научным

сотрудником Института регенеративной медицины МНОЦ МГУ, к.биол.н. Карагяуром М.Н. Также были предоставлены плазмиды для сборки лентивирусных частиц: pRSV-Rev (регуляторная); pMDLgpRRE (упаковочная); pMD2-VSVGmut (оболочечная).

Для получения трансферной плазмиды, несущей Т-антиген, синтезировали нуклеотидную последовательность, кодирующую большой Т-антиген вируса SV40 и содержащую сайты рестрикции (EcoRI и SalI) на 5' и 3' концах соответственно, на аутсорсинге в ООО «ДНК-Синтез» (Москва). В качестве вектора использовали плазмиду pVLT-EF1a-hTERT-puroR, которую подвергали рестрикции EcoRI и SalI, тем самым удаляя ген hTERT. Очистку линейаризованного вектора и вставки из 1%-ного агарозного геля осуществляли с помощью набора «QIAquick Gel Extraction Kit» (Qiagen, Германия). Расщепленный вектор и вставку большого Т-антигена вируса SV40 лигировали по липким концам с использованием T4-лигазы (ThermoFisher Scientific, США). Трансформация бактериальных клеток *E. coli* (штамм XL1-Blue, НПО «Евроген», Москва) лигазной смесью осуществлялась методом «теплового шока». Наличие ожидаемой вставки подтверждали рестрикционным анализом клонов рекомбинантной плазмиды pVLT-EF1a-largeTSV40-puroR.

Лентивирусный вектор 3-го поколения. Селективным маркером для клонирования трансгенных культур выбрана устойчивость клеток к антибиотику пурамицин. С целью сборки лентивирусных частиц (ЛВЧ) осуществляли трансфекцию суточного монослоя перевиваемой линии клеток эмбриональной почки человека HEK293T четырьмя плазмидами (pVLT-EF1a-largeTSV40-puroR или pVLT-EF1a-hTERT-puroR; pRSV-Rev; MDLgpRRE; pMD2-VSVGmut). Трансфекцию проводили методом липофекции с помощью набора «Lipofectamin 3000» (Invitrogen, США) согласно рекомендациям производителя. Контроль трансфекции осуществляли по экспрессии репортерного гена в клетках (использовали плазмиду PCI-neo-RFP) путем детекции красного флуоресцентного белка с помощью флуоресцентной микроскопии.

Результаты и обсуждение. Выбранный нами лентивирусный вектор включал в себя гены gag и pol. В третьем поколении лентивекторов использовали четыре плазмиды: несущая гены gag и pol (pMDLgpRRE); регуляторная, экспрессирующая белок rev (pRSV-Rev); плазида оболочки, экспрессирующая гликопротеин G вируса везикулярного стоматита (VSV-G); трансферная, содержащая трансген, фланкированный сигналами 3' и 5'-LTR. Трансферная плазида кодировала сигналы LTR, ψ-сигнал упаковки (Tat) служил активатором и усилителем транскрипции вирусных генов. Делеции в U3-участке 3'LTR позволили получить самоинактивирующийся вектор (SIN), предотвращающий энхансерную активность этих участков, снижая вероятность активации протоонкогенов при интеграции трансгена в геном, а также иницируя трансляционную инактивацию потенциально пакующихся вирусных геномов в трансдуцированной клетке. Rev способствовала импорту вирусных транскриптов в ядро. Для повышения безопасности использования лентивекторной системы ген белка Rev был встроен в отдельную плазмиду. Также достигнута независимость от Tat заменой промоторного региона в 5'-LTR в плазмиде с трансгеном на сильный промотор цитомегаловируса (CMV).

Валидность собранных плазмид проведена с помощью рестрикционного анализа.

В качестве контроля трансфекции произведена проверка флуоресцентного свечения на культуре клеток НЕК293Т. Микроскопия показывала, что трансфицированные клетки активно накапливали флуоресцентные белки.

Заключение. В ходе представленной работы была сконструирована эукариотическая система экспрессии лентивирусных векторных частиц, несущих Т-антиген вируса SV-40 и человеческую теломеразу (hTERT). На основании этих данных можно утверждать, что выбранные нами рекомбинантные плазмиды пригодны к использованию для трансдукции первичных культур клеток с целью получения чувствительных иммортализованных линий, что является целью наших дальнейших работ.

ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ТРОЛОКСА, ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ, ИНДРАЛИНА И ВИННОЙ КИСЛОТЫ НА РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫЙ ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС КЛЕТОК ЛИНИИ A549

Московский А.А.^{1,2}, Ромодин Л.А.¹

¹Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна, Москва, Россия

²Национальный исследовательский ядерный университет МИФИ, Москва, Россия

moskowsky.sch858@yandex.ru

Одним из ключевых эффектов биологического действия ионизирующего излучения является интенсификация процессов окислительного стресса. В этой связи перспективным представляется поиск радиозащитных веществ среди антиоксидантов.

В ходе представленной работы было изучено влияние тролокса, янтарной кислоты и водорастворимой формы табельного радиопротектора индралина, содержащей винную кислоту, на выраженность радиационно-индуцированного окислительного стресса в культуре клеток аденокарциномы лёгкого человека линии A549.

Выраженность процессов радиационно-индуцированного окислительного стресса была определена как отношение интенсивности флуоресценции дихлорфлуоресцеина (DCF), характеризующей содержание активных форм кислорода (АФК), к интенсивности флуоресценции Hoechst-33342, характеризующей число клеток в пробе. В ячейки планшета мы вносили по 25 тыс. клеток с последующей 12-часовой инкубацией, после которой следовало внесение в культуру изучаемых веществ, 2-часовая инкубация с ними, воздействие рентгеновского излучения в дозе 8 Гр, затем – окрашивание DCF и Hoechst-33342, отмывка от красителей и новое внесение изучаемых веществ с последующей инкубацией в течение часа. После этого была зарегистрирована интенсивность флуоресценции на длинах волн 460 нм (возбуждение на 355 нм) и 520 нм (возбуждение на 480 нм). Рабочие концентрации изучаемых веществ составили 0,1, 0,5, 1 и 2 мМ.

Инкубация клеток в растворах янтарной кислоты и, в особенности, тролокса способствовала статистически значимому снижению содержания АФК по сравнению с облучённым контролем. Таким образом, данные вещества могут проявлять некоторое радиозащитное действие. Однако здесь следует отметить, что при увеличении концентрации тролокса, в микромолярных концентрациях снижающего содержание АФК в облучённых клетках до уровня, статистически значимо более низкого, чем в интактных клетках, до 2 мМ, содержание АФК в клетках выросло. Это мы объясняем типичным для многих антиоксидантов свойством в некоторых условиях проявлять прооксидантный эффект за счёт, например, интенсификации реакции Фентона, восстанавливая железо в клетках до двухвалентной формы.

Винная кислота показала достаточно слабый антиоксидантный эффект. Однако наиболее интересным является увеличение уровня АФК при росте концентрации индралина: обладающий существенным радиопротекторным эффектом на организменном уровне индралин на уровне клеток может проявлять радиосенсибилизирующее действие. Это открывает перспективы разработки новых подходов к лучевой терапии онкологических заболеваний.

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ ТКАНЕЙ С
ПОМОЩЬЮ ТКАНЕВО-ИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ НА ОСНОВЕ
БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

**Образумова З.В.¹, Яровой А.С.¹, Робустова С.Д.¹, Турчанинова Е.А.¹, Булкина А.М.³,
Цвеляя В.А.^{1,2,3}, Прилепский А.Ю.³**

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

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

³Национальный исследовательский университет ИТМО, Россия

obrazumova.zv@phystech.su

Ожоги являются глобальной проблемой общественного здравоохранения, по оценкам ВОЗ, ежегодно в мире происходит 11 миллионов ожоговых травм всех типов, 180 000 из которых приводят к летальному исходу. Репарация поврежденных тканей при ожогах остается актуальной проблемой современной медицины, что связано с нарушением пролиферации клеток дермального слоя, медленного восстановления и образованием рубцов [1]. В последние годы бактериальная целлюлоза (БЦ) привлекает внимание как перспективный биоматериал для регенерации тканей благодаря своей биосовместимости [2] и нетоксичности. Этот непирогенный природный полимер обладает высокой механической прочностью и сложной фибриллярной пористой структурой [3]. Показано, что благодаря гидрофильности БЦ может притягивать фибробласты к очагу поражения, ускоряя регенерацию тканей [4]. Исследование влияния БЦ на процессы заживления тканей после ожогов может открыть новые возможности для улучшения методов и комфортности лечения и ускорения восстановления пациентов.

Цель настоящего исследования заключалась в комплексном анализе влияния различных морфологических форм бактериальной целлюлозы (БЦ) на процессы репаративной регенерации эпителиальной и соединительной тканей у лабораторных крыс в условиях экспериментально смоделированных термических ожогов. В рамках данной работы было проведено культивирование неонатальных фибробластов сердца крысы и эмбриональных фибробластов крысы на поверхности нативной БЦ, БЦ, модифицированной ультразвуком. В дополнение было проведено сравнение адгезии двух типов клеточных культур с дополнительным покрытием БЦ с помощью белка фибронектина и без такого покрытия. Было проведено несколько серий экспериментов на крысах, в ходе которых сравнивались контрольная группа, действие нативной БЦ и БЦ, обработанной ультразвуком, а также влияние культивированных на БЦ эмбриональных фибробластов крысы и неонатальных фибробластов сердца крысы на эффективность восстановления тканей. Все образцы БЦ были получены в результате культивирования *K. xylinus* В-12431 и предоставлены Университетом ИТМО.

Проведенные эксперименты показали, что применение бактериальной целлюлозы ускоряет процесс регенерации тканей по сравнению с контрольной группой. Однако БЦ,

обработанная ультразвуком, демонстрировала лучшую адгезию клеток. Было изучено влияние различных форм бактериальной целлюлозы на регенерацию тканей крыс после ожогов. Это исследование открывает перспективы для разработки инновационных и персонализированных биоматериалов в регенеративной медицине и комбустологии.

Литература.

1. Jeschke, M., Van Baar, M., Choudhry, M., Chung, K., Gibran, N., Logsetty, S. Burn injury // *Nature Reviews Disease Primers*. – 2020. – Vol. 6. – DOI: 10.1038/s41572-020-0145-5.
2. Bulkina A., Prilepskii A. Bacterial cellulose: Is it really a promising biomedical material? // *Carbohydrate Polymers*. 2025. Vol. 123427. DOI: 10.1016/j.carbpol.2025.123427.
3. Prilepskii A., Nikolaev V., Klaving A. Conductive bacterial cellulose: From drug delivery to flexible electronics // *Carbohydrate Polymers*. 2023. Vol. 120850. DOI: 10.1016/j.carbpol.2023.120850.
4. Харченко А.В., Ступак В.В. Бактериальная наноцеллюлоза как пластический материал для закрытия дефектов твердой мозговой оболочки: обзор литературы // *Хирургия позвоночника*. 2019. Т. 16. № 3. С. 62–73. DOI: <http://dx.doi.org/10.14531/ss2019.3.62-73>.

**НОВЫЙ КОМПЛЕКС ПЛАТИНЫ (II) ИНДУЦИРУЕТ НЕАПОПТОТИЧЕСКИЕ
МЕХАНИЗМЫ ГИБЕЛИ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА**

Парамонова А.В.¹, 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

a.v.paramonova@urfu.ru

В настоящее время актуальна проблема токсичности противоопухолевых препаратов, которые вызывают множество побочных эффектов. В связи с этим существует необходимость в разработке и анализе новых противоопухолевых соединений с повышенной эффективностью и низкой токсичностью. Перспективным направлением на данный момент является синтез комплексов платины (II), действующих на опухолевые клетки через неапоптотические механизмы.

На основании этих данных была поставлена цель: изучить влияние нового соединения платины (II) на жизнедеятельность культивируемых опухолевых клеток человека, а именно провести оценку общей цитотоксичности, индукции апоптоза и активности клеточного деления. Далее оценить уровень выработки активных форм кислорода (АФК) и перекисное окисление кардиолипина в клетках под действием исследуемого соединения, а также изучить его влияние на потенциал митохондриальной мембраны ($\Delta\Psi_m$) и на ключевые биологические маркеры регулируемой неапоптотической клеточной смерти. Полученные данные позволят судить о перспективности исследуемого комплекса платины (II) в качестве потенциального противоопухолевого агента.

Анализ общей цитотоксичности *in vitro* проводили с помощью МТТ-теста на клетках карциномы легкого (A-549), гепатоцеллюлярной карциномы (HepG2), глиобластомы (A-172 и T98G) и почки эмбриона человека (HEK-293). Оценка индукции апоптоза осуществляли с помощью окрашивания клеток аннексином V-FITC и пропидием йодидом (PI). Пролиферативную активность клеток оценивали с помощью Click-iT EdU-555. Определение трансмембранного потенциала митохондрий ($\Delta\Psi_m$), выработки активных форм кислорода и изучение перекисного окисления кардиолипина в митохондриях проводили с использованием красителей JC-1, H₂DCFDA и MitoCLox соответственно. Влияние комплекса платины (II) на биологические маркеры регулируемой неапоптотической клеточной смерти изучали с помощью вестерн-блоттинга и ПЦР в реальном времени.

Исследуемый платиновый (II) комплекс обладает выраженной противоопухолевой активностью в отношении клеток A-172, в то время как нормальные клетки HEK-293 сохраняют свою жизнеспособность на более высоком уровне. В результате оценки индукции апоптоза, активности клеточного деления и изучения $\Delta\Psi_m$ установили, что исследуемое соединение не вызывает активизации механизмов апоптоза и блокировки репликации ДНК, но значительно снижает потенциал митохондриальной мембраны. Стоит отметить, что в присутствии антиоксиданта (N-ацетилцистеин) исследуемое соединение не оказывает влияния

на $\Delta\Psi$ m. Исследуемый комплекс значительно повышает выработку АФК, а также вызывает перекисное окисление кардиолипина в клетках глиобластомы. Полученные данные с учетом результатов оценки уровня экспрессии маркеров регулируемой неапоптотической клеточной смерти могут говорить о влиянии на клетки через окислительные механизмы.

Исследуемое соединение платины (II), предположительно, вызывает гибель клеток глиобластомы A-172 в результате окислительного стресса. При этом, в отличие от цисплатина, не вызывает блокировки репликации ДНК и активизации механизмов апоптоза. Полученные результаты указывают на перспективность поиска новых комплексных соединений платины (II), обладающих противоопухолевой активностью.

Работа поддержана грантом РФФ № 23-23-0037.

БЕЛОК NONO КАК ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ МИШЕНЬ В MYCN-АМПЛИФИЦИРОВАННЫХ НЕЙРОБЛАСТОМАХ

Погодаева С.С.¹, Милетина О.О.¹, Антипова Н.В.², Кучур О.А.^{1,2}

¹ФГАОУ ВО Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

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

pogodaeva@scamt-itmo.ru

Нейробластома (НБ) – гетерогенная эмбриональная злокачественная опухоль, включающая более 5-ти клеточных подтипов. Один из наиболее агрессивных подтипов – адренергический – характеризуется повышенной копийностью гена *MYCN*, усиленной экспрессией характерных транскрипционных факторов (*ASCL1*, *PHOX2A/B*, *GATA3*, *HAND2* и др.) и устойчивостью к терапии. Для лечения опухолей, отличающихся транскрипционной дерегуляцией, может быть применен таргетный подход: подавление так называемых *мастер-регуляторов*. В *MYCN*-амплифицированных НБ таким регулятором является *NONO*. Известно, что *NONO* способен контролировать сборку транскрипционных комплексов на суперэнхансерах и опосредовать работу регуляторного кора (CRC, core regulatory circuit), модулирующего активность генов *PHOX2B*, *HAND2*, и др. Его подавление может дестабилизировать механизмы транскрипции, что делает опухолевые клетки уязвимыми к химиотерапии.

Чтобы изучить роль *NONO* в выживаемости НБ, нами была проведена серия экспериментов с применением ауранофина (ингибитор TrxR1 и *NONO*) и siRNA к генам в составе CRC. При воздействии ауранофином (0,5-2 мкМ) на адренергические клеточные линии Kelly и IMR-32 наблюдалось повышение экспрессии генов *MYCN*, *HAND2*, *PHOX2A* и *PHOX2B* в 4-5 раз при одновременном падении активности *NONO* в 2-3 раза. Эффект наблюдался на ранних временных точках, 2-6 часов, и ослабевал через 24 часа. Анализ клеточного цикла с помощью проточной цитометрии продемонстрировал повышенную фракцию клеток (~40%) в апоптотической фазе subG1 при комбинации siHAND2 / siNONO и 0.5 мкМ ауранофина. Наконец, анализ колониеобразования показал, что siRNA-опосредованное подавление *HAND2*, *PHOX2B* либо *NONO* снижает способность клеток Kelly образовывать колонии на 65%, 70% и 80%, соответственно, эффект усиливается ауранофином. В линии нейробластомы SK-N-AS (нормальная копийность *MYCN*) и фибробластов HS5 аналогичных изменений не наблюдалось. Таким образом, сочетание химического ингибирования *NONO* и генетического подавления членов комплекса CRC приводит к снижению опухолевого потенциала и гибели клеток *MYCN*-амплифицированной нейробластомы.

Полученные нами результаты показывают, что *NONO* – перспективная мишень для терапии НБ с aberrантным состоянием *MYCN*. Дальнейшие исследования будут направлены на подробное описание механизмов, за счет которых реализуется специфическая гибель клеток, обусловленная подавлением *NONO*, выяснение роли гена *MYCN* в наблюдаемых эффектах; также планируется поиск новых регулируемых *NONO* терапевтических мишеней из кора CRC.

Работа поддержана грантом РФФ № 24-15-00097.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ НАНОЧАСТИЦ ТЕЛЛУРА НА МИГРАЦИЮ И ПРОДУКЦИЮ АФК В НЕСКОЛЬКИХ ОПУХОЛЕВЫХ ЛИНИЯХ

Рогачев В.В., Туровский Е.А.

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

vladimirrogachev6@gmail.com

В авангарде борьбы с опухолями все чаще оказываются наночастицы неблагородных металлов. Среди них особо выделяются наночастицы селена, демонстрирующие впечатляющую противоопухолевую активность. Теллур, соседствующий с селеном в периодической таблице, может обладать схожими биологическими свойствами. Наночастицы теллура, полученные методом "зеленого синтеза", уже показали значительный противораковый потенциал. В связи с этим, мы решили исследовать противоопухолевую активность наночастиц теллура, синтезированных методом лазерной абляции.

На первом этапе мы получали наночастицы теллура размером 10 и 100 нм методом лазерной абляции.

Для оценки влияния наночастиц на клетки мы использовали следующие клеточные линии: рака молочной железы человека (MCF-7), гепатоцеллюлярной карциномы человека (HepG2), нейробластомы человека (SH-Y5) и фибробластов мыши (L929).

Влияние синтезированных наночастиц на миграцию клеток MCF-7, HepG2, SH-Y5 и L929 изучали с помощью скарификационного теста. Клетки культивировали до образования монослоя, после чего кончиком на 10 μ l от микропипетки наносили два перпендикулярных линейных повреждения. Затем вносили наночастицы теллура различных размеров и концентраций и регистрировали изменения с интервалом в 24 часа.

Кроме того, для изучения влияния наночастиц на продукцию активных форм кислорода (АФК) в данных клеточных линиях, в культуры добавляли зонд H₂DCFDA, чувствительный к перекиси водорода (H₂O₂), и с помощью спектрофотометрии регистрировали изменение базального и индуцированного наночастицами уровня АФК в хроническом и остром экспериментах с различными концентрациями наночастиц теллура разного размера.

Скарификационный тест выявил примечательное подавление миграции клеток рака молочной железы и гепатоцеллюлярной карциномы под воздействием 100 нм наночастиц теллура. Эффект проявлялся в концентрациях 1 и 5 мкг/мл, снижая подвижность злокачественных клеток примерно на 30% и 40% соответственно. Примечательно, что на линиях нейробластомы и фибробластов мыши существенных изменений не наблюдалось. В то же время, добавление наночастиц теллура диаметром 10 нм приводило к ещё более выраженному замедлению миграции клеток гепатоцеллюлярной карциномы (приблизительно на 60%) при тех же концентрациях. В контрольных группах, где добавлялись эквивалентные объемы буфера, значимого влияния на миграцию клеток выявлено не было.

В остром эксперименте мы зафиксировали резкий всплеск продукции активных форм кислорода (АФК) в клетках гепатоцеллюлярной карциномы, подскочивший в 2-8 раз по сравнению с контрольными значениями. Однако в условиях хронического воздействия существенных отклонений от контроля выявлено не было. Примечательно, что в остальных исследованных клеточных линиях значимых изменений в генерации АФК не наблюдалось.

Полученные данные позволяют предположить высокую специфичность противоопухолевого воздействия наночастиц теллура в отношении клеток гепатоцеллюлярной карциномы.

Работа выполнена в рамках Госзадания ГЗ № 075-00607-25-00.

РАЗРАБОТКА КОМПОЗИТОВ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ С БЕЛКОВО-ПЕПТИДНЫМИ ФРАКЦИЯМИ ИММУННЫХ ОРГАНОВ ЖИВОТНЫХ, ОЦЕНКА ПЕРСПЕКТИВ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ

Румянцева Н.Д.¹, Федулова Л.В.²

¹Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский политехнический университет», Москва, Россия

²ФГБНУ «Федеральный центр пищевых систем имени В.М. Горбатова» РАН,
Москва, Россия

nadyarun@mail.ru

Проблема недостаточной эффективности существующих перевязочных материалов, антисептиков и антибиотиков, способных предотвратить вторичную инфекцию или стимулировать регенерацию тканей сегодня особенно актуальна. Одним из наиболее перспективных материалов является бактериальная целлюлоза (БЦ), представляющая собой наноматериал, имеющий тонкую трехмерную сетчатую структуру, обладающий высокой прочностью, гидрофильностью, биосовместимостью и принципом регенерации тканей, что делает ее идеальной для применения в медицине.

Целью данной работы является разработка композита с использованием БЦ и белково-пептидных комплексов иммунных органов *Sus scrofa*.

Для создания платформы использована БЦ, синтезируемую продуцентом штамм *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 (ВКПН 10546), культивируемый стационарно на стандартной среде HS при температуре 20 ± 1 °C в течении 7 суток.

В качестве активного компонента использован белково-пептидный комплекс иммунных органов *Sus scrofa* молекулярной массой менее 30 кДа.

В ходе работы был создан композит. Проведены сравнительные тесты эффективности включения белково-пептидных комплексов в целлюлозу при разной концентрации натрия хлорида в растворе, использовании разных стабилизаторов, с разной толщиной и весом пленок БЦ. Был найден оптимальный метод оценки содержания белка в композите – при помощи окрашивания азотнокислым серебром по методике Блума, гравиметрическим методом определена степень набухания пленок – 2,5% в контрольных пленках БЦ и 15,75% в оптимальном варианте композита. Это позволило выявить оптимальные параметры для создания композита.

Следующим этапом работы было проведение теста на цитотоксичность и пролиферации клеток. Для чего линию клеток дермальных фибробластов кожи человека HdFb (d290), полученную из ЦКП ИРБ РАН, культивировали в условиях CO₂-инкубатора (Boxun, Китай) при температуре 37 ± 1 °C, относительной влажности более 80%, 5% углекислого газа на пластиковой адгезионной посуде (мультилуночные планшеты) питательной среде ИГЛА MEM (Панэко, Россия) с 10% фетальной бычьей сыворотки (Servisebio, Индия). Для оценки

численности выросших клеток применялась световая (ЛОМО, Россия) и флуоресцентная (Carl Zeiss, Германия) микроскопия с применением красителя Hoechst 33342 (Servicebio, Индия).

Количество фибробластов на пленках БЦ, содержащей белково-пептидный комплекс в 5,6 раз превышало количество фибробластов на чистых контрольных пленках БЦ.

Полученные результаты указывают на перспективность использования белково-пептидной смеси для стимуляции пролиферации фибробластов, в дальнейшем планируется проведение ряда экспериментов по ранозаживлению с созданным композитом на лабораторных животных для подтверждения его эффективности.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ВОЗДЕЙСТВИЯ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ
РАЗНОГО КАЧЕСТВА НА ПРОЦЕССЫ ГИБЕЛИ КЛЕТОК НА МОДЕЛИ
ПЕРЕЖИВАЮЩИХ ТКАНЕЙ

Смирнова А.Н.^{1,2}, Шестакова В.А.^{2,3}, Якимова А.О.³, Клабуков И.Д.^{1,2},
Комарова Л.Н.², Шегай П.В.¹

¹ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Обнинск, Россия

²Обнинский институт атомной энергетики – филиал Национального исследовательского
ядерного университета «МИФИ», Обнинск, Россия

³МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России,
Обнинск, Россия

filimonowa.af@gmail.com

Использование экспериментальных моделей в области радиобиологии и оценки эффективности новых источников ионизирующего излучения (протоны, тяжелые ионы, комбинированное излучение радионуклидов) традиционно ограничено клеточными культурами, лабораторными животными, а также в последнее время клеточными сфероидными культурами (тумороидами). Использование данных моделей не является в полной мере физиологически релевантным (клеточные культуры), не позволяет отслеживать реакцию в динамике (лабораторные животные), либо отличается гетерогенностью и отсутствием релевантного микроокружения (клеточные сфероиды). Все вышеуказанные модели не могут оценивать количественно возникновение вторичных возбуждений при облучении. Модель переживающих тканевых срезов толщиной 200 мкм позволит в полной мере оценить получаемые результаты при облучении с использованием методов флуоресцентного окрашивания. Ввиду различной клеточной гибели (апоптоз, некроз и т.д.) мы можем окрашивать ткани после облучения и оценивать появление новых возбуждений на пути всего трека.

Настоящее исследование направлено на исследование динамики внутриклеточных процессов, сопровождающих гибель нормальных и опухолевых тканей в тканевых срезах при воздействии ионизирующего излучения различного качества.

В рамках настоящей работы впервые были получены результаты по типам клеточной гибели, происходящих в нормальных и опухолевых клетках печени крыс под действием ионизирующего излучения различного качества, и изменениях состава и свойств клеточного микроокружения с использованием метода конфокальной флуоресцентной микроскопии на Leica DMI 4000 CS (стандартные красители 7-AAD, EthD-1, Calcein-AM). Проведена обработка и анализ снимков тканевых срезов в ImageJ показали, что при облучении альфа-излучением в дозах 4 Гр и 80 Гр процент площади, занятый мертвыми клетками, составлял 45,81 и 58,66 соответственно, в то время как при облучении бета-излучением в дозах 4 Гр и 80 Гр процент площади занятый мертвыми клетками составлял уже 53,38 и 78,49 соответственно.

Применяли метод проточной цитофлуориметрии клеток, выделенных из тканевых срезов с оценкой клеточного состава по мембранным маркерам апоптоза (Caspase 3 и Caspase-9, а также антиапоптотического маркера BCL-2), некроптоза (RIPK1, RIPK3 и MLKL), ферроптоза (ACSL4, FSP1/AIFM2 и NRF2) и партанатоза (PARP-1) на проточном цитофлуориметре с функцией сортирования FACS Aria III. Отсутствие внеклеточного матрикса позволило количественно оценить маркеры и клеточные субпопуляции.

Были получены различия, они потенциально позволяют таргетно стимулировать активацию клеточной гибели опухолевых клеток, и активировать репарацию нормальных клеток.

В связи с этим использование переживающих тканевых срезов (тканевые культуры) нормальных и опухолевых тканей является физиологически релевантной моделью, позволяющих проводить как прижизненные, так и морфологические исследования эффектов воздействия ионизирующих излучений и химиотерапевтических лекарственных средств.

СОЗДАНИЕ МОДЕЛЕЙ ИНСУЛИН-СЕКРЕТИРУЮЩИХ КЛЕТОК
ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ МЫШИ С ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫМИ
ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМИ МАРКЕРАМИ

Старкова Д.С., Ковалицкая Ю.А.

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

dsstarkova@yandex.ru

При развитии диабета I или II типа, центральным звеном патогенеза выступают β -клетки поджелудочной железы. Поэтому ключом к профилактике и терапии диабета является изучение механизмов регуляции синтеза и секреции инсулина β -клетками островков Лангерганса. Выделить чистую культуру β -клеток из лабораторных животных невозможно, поскольку островки Лангерганса представляют собой гетерогенное клеточное образование. В последние годы появляется все больше доказательств, что существует высокая степень гетерогенности среди β -клеток по чувствительности к глюкозе, секреции инсулина, способности к пролиферации и статусу созревания, которые можно разделить на подтипы. Эти факторы указывают на то, что исследования необходимо проводить на уровне отдельных клеток. Создание трансгенных животных, у которых β -клетки экспрессируют флуоресцентный белок под контролем тканеспецифичного промотора, поможет решить проблему выделения чистой культуры β -клеток из лабораторных животных.

Целью данной работы является дизайн и получение генетической конструкции, обеспечивающей маркирование инсулин-секретирующих клеток мыши и апробирование ее эффективности на клетках инсулиномы мыши MIN6.

В качестве промотора с подтвержденной тканеспецифичной экспрессией был выбран промотор гена *PDX-1*. Продукт этого гена рассматривается как «мастер-регулятор» дифференцировки и функционального состояния β -клеток, вовлеченный в том числе в контроль продукции пре-проинсулина. Фрагмент ДНК, кодирующий промоторную область гена *PDX-1*, был амплифицирован с геномной ДНК мыши. Полученный фрагмент клонировали в плазмиду pAcGFP1-Hyg-N1 по сайту рестрикции *SmaI* в MCS перед последовательностью гена *AcGFP1*. Двухцепочечный линейный продукт рестрикции плазмиды pProm-Pdx1-AcGFP1-Hyg-N1 эндонуклеазой *NcoI*, содержащий промотор гена *PDX-1*, последовательность гена *AcGFP1* и сайт полиаденилирования, использовали для трансфекции клеток MIN6, с последующим сортированием по флуоресценции. Вставка фрагмента Prom-Pdx1-AcGFP1 в геном клеточной линии MIN6 была подтверждена ПЦР.

В данной работе были получены клеточные линии на основе MIN6, обладающие высоким уровнем флуоресценции, что подтверждает возможность использования данной конструкции для создания трансгенной животной модели, позволяющей визуализировать и отбирать β -клетки.

КОНЦЕНТРАЦИОННАЯ ЗАВИСИМОСТЬ ВЛИЯНИЯ ГАМК НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ МИОЦИТОВ МЛЕКОПИТАЮЩЕГО В КУЛЬТУРЕ

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

Понимание процессов развития скелетной мускулатуры (миогенеза) важно не только для фундаментальной биологии, но и для современной регенеративной медицины, поскольку является основой для разработки новых и усовершенствования уже используемых технологий, применяемых в клинике. Особое внимание в настоящее время уделяется исследованию механизмов регуляции миогенеза, в том числе и со стороны эндогенных сигнальных молекул, включая нейромедиаторы, такие как ацетилхолин и гамма-аминомасляную кислоту (ГАМК). Ранее нами было показано, что в миоцитах и формирующихся миотрубках *in vitro* присутствует значительное количество ГАМК. В раннем постнатальном развитии уровень аминокислоты в мышечной ткани значительно снижается, вплоть до уровня, не идентифицируемого методами иммуногистохимии. В экспериментах *in vitro* было выявлено угнетающее действие высоких концентраций ГАМК (миллимолярный диапазон) на процесс слияния миоцитов в миотрубки. При этом, данных о влиянии аминокислоты на процесс пролиферации миоцитов до сих пор получено не было, что и предопределило проведение настоящего исследования.

Целью работы стала оценка влияния широкого диапазона концентраций ГАМК на развитие первичной культуры миоцитов, полученной из новорожденных крысят. Оценивали митотический индекс (МИ, соотношение делящихся клеток к общему количеству клеток) и результаты теста на жизнеспособность на 2-е сутки культивирования. Нами были использованы следующие концентрации ГАМК: 10^{-10} М, 10^{-8} М, 10^{-6} М, 10^{-4} М и 10^{-2} М. Методами иммуногистохимии оценивали наличие рецепторов к ГАМК.

Установлено, что МИ миоцитов в среде с ГАМК в концентрации 10^{-10} М, 10^{-8} М не имеет достоверных отличий от контрольных значений. Однако, культивирование в среде с аминокислотой в концентрации 10^{-6} М приводило к увеличению МИ на 14%. При повышении концентрации ГАМК до 10^{-4} М и 10^{-2} М наблюдалось, наоборот, снижение МИ по отношению к контролю на 36% и 30%, соответственно. Рецепторы к ГАМК методами иммуногистохимии в культуре миоцитов не были выявлены. Жизнеспособность культивируемых клеток по результатам МТТ-теста не уменьшалась ни в одной из используемых нами концентраций ГАМК.

Таким образом, мы можем заключить, что влияние ГАМК на процесс пролиферации культуры миоцитов имеет разнонаправленный характер: усиление пролиферации при использовании низкой концентрации и угнетение - при высокой концентрации. Эффект

аминокислоты не сказывается на жизнеспособности миоцитов и не опосредуется рецепторами. Высказано предположение, что эффект ГАМК на процесс пролиферации связан с влиянием аминокислоты на энергетический обмен в клетке.

Работа поддержана грантом РФФ № 25-24-00201.

СОЗДАНИЕ НАНОСТРУКТУР НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДОВ ЖЕЛЕЗА, ВКЛЮЧАЮЩИХ СЫВОРОТОЧНЫЙ АЛЬБУМИН, ФОЛИЕВУЮ КИСЛОТУ И АНАЛОГ СОМАТОСТАТИНА

**Торопцева А.В.¹, Горобец М.Г.¹, Тунгусов Д.С.¹, Хачатрян Д.С.^{1,3}, Абдуллина М.И.¹,
Шалупов А.И.¹, Градова М.А.², Бычкова А.В.¹**

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

²Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН,
Москва, Россия

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

stropdiva@yandex.ru

Магнитные наночастицы оксидов железа (МНЧ) активно используются в качестве основы для гибридных наноструктур, поскольку обладают широким спектром диагностических и терапевтических применений, включающих гипертермию, магнитно-резонансные исследования и адресную доставку лекарств (ЛВ).

Введение в биологические жидкости и/или *in vivo* материалов, не обладающих биосовместимым покрытием, приводит к адсорбции белков плазмы крови с образованием «белковой короны», которая предопределяет свойства наноструктуры. Создание покрытия, основным компонентом которого является человеческий сывороточный альбумин (ЧСА), может позволить предотвратить нежелательную адсорбцию компонентов крови, увеличить стабильность систем и снизить токсичность некоторых ЛВ.

Одним из приоритетных направлений нанофармацевтики считается активный транспорт ЛВ *in vivo* (рецептор-опосредованный транспорт). В рамках настоящей работы в качестве нацеливающих лигандов были выбраны фолиевая кислота (ФК) и аналог соматостатина (пептид состава Тур (Вос)-Phe-D-Trp-Lys (Вос)-Thr-OMe) (аССТ), поскольку при различном типе онкогенеза наблюдается гиперэкспрессия соответствующих рецепторов соматостатина и фолиевой кислоты.

Нашей научной группой был разработан подход, при котором реализуется ковалентное включение остатка фолиевой кислоты в гибридную систему посредством реакции ЧСА с NHS-эфиром ФК (мФК). Конъюгация мФК с предварительно адсорбированным на поверхности МНЧ альбумином показала себя наиболее перспективной стратегией, поскольку образуемое покрытие характеризовалось целостностью (или сплошностью) и, в то же время, наноструктура была агрегативно устойчива в течение недельного хранения.

Указанный подход также был осуществлен для нековалентного связывания аССТ с альбуминизированными частицами с применением иного растворителя. Гидродинамический диаметр систем анализировали при помощи метода динамического светорассеяния (ДСР), оценка связывания аССТ была проведена с применением спектрофотометрии, подтверждение связывания проводилось методом детекции скорости образования 2,3-диаминофеназина в ходе окисления гидроксил-радикалами в результате взаимодействия поверхности МНЧ и

пероксида водорода. Полученные данные приводились в виде значения V/V_0 , где V_0 – скорость образования 2,3-диаминофеназина в образце без ЧСА и аССТ.

Альбуминизированные частицы характеризовались: диаметром 192 ± 19 нм при наличии пептида и 173 ± 20 нм без него, снижением V/V_0 с $\sim 76\%$ до $\sim 62\%$ при добавлении пептида. В то же время, МНЧ без покрытия характеризовались: диаметром 184 ± 17 нм при наличии пептида и 158 ± 19 нм без него, снижением V/V_0 с $\sim 100\%$ до $\sim 86\%$ при добавлении аССТ.

Исследования по созданию гибридных наносистем проводятся при финансовой поддержке Российского научного фонда № 22-75-10150, <https://rscf.ru/project/22-75-10150/>. Работа выполнена с использованием научного оборудования ЦКП «Исследовательский химико-аналитический центр НИЦ «Курчатовский институт» и ЦКП «Новые материалы и технологии» ИБХФ РАН.

ПЕРОКСИДАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ В КУЛЬТУРАХ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ
СТВОЛОВЫХ/СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ H₂O₂-
ИНДУЦИРОВАННОГО ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

Усатых А.А., Люблинская О.Г., Иванова Ю.С., Гурьев Н.А.

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

andrew.usatih@yandex.ru

Пероксид водорода (H₂O₂) является одним из наиболее физиологически-значимых представителей семейства активных форм кислорода (АФК). Хотя это соединение долгое время считалось лишь токсичным побочным продуктом окислительного метаболизма, в последние десятилетия стала очевидной его физиологическая и регуляторная функция. Вместе с тем, избыточное накопление H₂O₂ приводит к окислительному стрессу. Справляться со стрессом помогают ферментативные системы антиоксидантной защиты клеток, обеспечивающие пероксидазную активность – утилизацию избытка H₂O₂. Ключевыми ферментативными системами, поддерживающими пероксидазную активность клеток, являются пути, контролируемые тиоредоксином (Trx) и глутатионом (GSH). Несмотря на то, что, в целом, принципы организации Trx- и GSH-зависимых ферментативных систем известны, до сих пор без ответа остаются ключевые вопросы – как в клетках человека распределены роли между этими системами при индукции окислительного стресса и меняется ли это распределение в условиях разной окислительной нагрузки на клетки. В настоящей работе мы отвечаем на эти вопросы, используя модель культивируемых мультипотентных стволовых/стромальных клеток человека (МСК). Методическая основа работы – разработанный нами протокол, позволяющий с помощью НуPer, генетически-кодируемого биосенсора H₂O₂, оценивать при индукции внешнего окислительного стресса пероксидазную активность клеток.

В результате проведённых экспериментов показано, что в условиях внешнего H₂O₂-индуцированного стресса, пероксидазная активность в культурах МСК зависит от окислительной нагрузки на клетки. При индукции слабого стресса, пероксидазная активность оказывается максимальной и постепенно снижается при увеличении концентрации внеклеточной H₂O₂ в диапазоне 15-40 мкМ. При этом, нарушений клеточной пролиферации и целостности ДНК в культурах МСК, переживших стресс, не наблюдается. При более высоких концентрациях внеклеточной H₂O₂ (40-100 мкМ), пероксидазная активность клеток не изменяется; через сутки после индукции стресса обнаруживаются разрывы ДНК и накопление клеток в S-фазе пролиферативного цикла, сопровождающееся остановкой пролиферации МСК. При ингибировании Trx- и GSH-зависимых ферментативных систем показано, что Trx-зависимые пути вносят значительный вклад в пероксидазную активность клеток при концентрациях внеклеточной H₂O₂ в диапазоне 15-40 мкМ, в то время как при более высоких концентрациях H₂O₂ активность этих путей истощается. GSH-зависимые пути вносят вклад в пероксидазную активность клеток при любых протестированных окислительных нагрузках.

Таким образом, полученные в работе данные позволяют предположить, что в культурах МСК человека Ttx-зависимая пероксидазная активность критически важна при индукции слабого окислительного стресса и, возможно, является основным фактором защиты от H₂O₂-индуцированной генотоксичности.

Работа поддержана грантом РФФИ № 21-74-20178.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СЛАДКОГО БЕЛКА ТАУМАТИНА II ДЛЯ МАСКИРОВКИ ГОРЬКОГО ВКУСА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СУБСТАНЦИЙ

Фирсов Г.А.

Медицинский институт Российского университета дружбы народов, Москва, Россия

george.firsov@yahoo.com

К числу вспомогательных веществ, используемых в производстве лекарственных препаратов, относятся корригенты вкуса. Известно, что примерно 2/3 лекарственных субстанций имеют горький вкус, часто очень сильный. Горький вкус препаратов создаёт определённые проблемы при их практическом применении, в первую очередь, в педиатрии и гериатрии. Таким образом, разработка лекарственных препаратов с приемлемым вкусом является обязательной для современной фармакологии. Самым распространённым методом коррекции вкуса является маскировка горького вкуса с помощью подсластителей, однако их использование имеет ряд ограничений. В частности, имеется информация о потенциальной токсичности многих распространённых синтетических подсластителей. Таким образом, задача поиска новых и совершенствование методов использования уже известных подсластителей остаётся по-прежнему актуальной.

Тауматин II является белком, обладающим сильным сладким вкусом, он примерно в 3000 раз слаще сахарозы. Помимо сладкого вкуса, тауматин II обладает исключительной термостабильностью в средах с низким рН; эти свойства обусловили интерес к нему как к натуральному низкокалорийному заменителю сахара. В настоящее время тауматин II одобрен для использования в ЕС как пищевая добавка E957 и в США как вспомогательное фармацевтическое вещество (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2009, USA). Однако в научной литературе до сих пор отсутствуют данные об использовании тауматина для производства лекарственных препаратов. Важно отметить, что в России уже разработаны технологии получения рекомбинантных сладких белков, в т.ч. тауматина II.

Целью нашего исследования было изучение способности тауматина к маскировке горького вкуса лекарственных субстанций. Анализ вкуса изучаемых субстанций проводили методом слепого теста. В экспериментах были использованы такие распространённые горькие субстанции, как дротаверин, левирацетам, парацетамол, кофеин и димедрол. К водному раствору субстанций добавляли тауматин II в концентрации от 0,25 до 25 мкМ, далее дегустаторы оценивали горечь полученных растворов. Концентрации субстанций в растворах были предварительно подобраны так, что бы вызвать у дегустаторов ощущение сильного горького вкуса.

Полученные данные показали, что тауматин II возможно использовать для маскировки горького вкуса лекарственных субстанций; оптимальной является его концентрация в диапазоне 10,0 – 25,0 мкМ в зависимости от субстанции. В этих концентрациях тауматин полностью маскировал вкус левирацетама, парацетамола и кофеина. Эти субстанции не вызывали послевкусия и снижения чувствительности к вкусам, и маскирующий эффект тауматина был особенно хорошо выражен. Использование тауматина для коррекции вкуса

субстанций, вызывающих в высоких концентрациях неприятное послевкусие и потерю чувствительности к вкусам (дротаверин и димедрол), также возможно. В экспериментах с этими веществами тауматин снижал горечь растворов до слабо ощутимого уровня. Интересно, что при низких концентрациях тауматина (0,5 – 1,0 мкМ) отмечалось усиление горького вкуса. Это обусловлено способностью тауматина в низких концентрациях действовать в качестве усилителя вкуса. Проведённые нами эксперименты показали возможность использования тауматина II в качестве вспомогательного вещества для маскировки горького вкуса лекарственных субстанций.

ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ АНТИМИКРОБНОЙ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ ПРИ ОПТИЧЕСКОМ ПРОСВЕТЛЕНИИ КОЖИ

Шарабарина Т.В., Сурков Ю.И., Серебрякова И.А., Генин В.Д., Тучина Е.С.

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

tanuha290902@gmail.com

Антимикробная фотодинамическая терапия (АФДТ) демонстрирует хорошие результаты при поверхностном применении для лечения заболеваний кожи и слизистых. Биологические ткани характеризуются слабым поглощением с высокой рассеивающей способностью в видимом и ближнем ИК-диапазоне спектра. Целью данного исследования было изучить возможность повышения эффективности АФДТ с помощью метода оптического просветления при действии оптического просветляющего агента (ОПА). Объектом исследования служил метициллин-устойчивый клинический штамм *S. aureus 11*. Микроорганизмы выращивали при температуре 37 °С на универсальных питательных средах.

В качестве источника света использовали светодиод с максимумом спектра испускания на длине волны $\lambda=428.5$ нм и плотностью мощности 7.7 мВт/см². Источник располагали над экспериментальным планшетом на расстоянии 5 см. Во всех экспериментах режим излучения был непрерывным. Время облучения составляло 5, 10, 15 мин.

Исследования на животных проводились в соответствии с Международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с использованием животных (CIOMS, 1985 г.) и были одобрены местным этическим комитетом Саратовского государственного медицинского университета (протокол №2 от 16.09.2022).

АФДТ и оптические измерения проводили *ex vivo* с использованием предварительно полученных кожных лоскутов от здоровых белых лабораторных крыс. Бактериальную культуру предварительно выращивали в течение 24 ч при температуре 37°С, рабочая концентрация в PBS составляла 10⁸ микробных клеток (м.к.) в 1 мл. В качестве фотосенсибилизатора использовали водный раствор порфирина Zn-TBut3PyP в концентрации 0.03 мкг/мл. В качестве ОПА использовали смесь глицерина, ДМСО и воды в объемных долях 70% : 5% : 25%, соответственно. На кожные лоскуты со стороны эпидермиса наносили 0.05 мл ОПА, по истечении 15 минут остатки ОПА аккуратно удаляли. Обработанные образцы кожи накладывали на лунки полистирольного 96-луночного планшета, содержащего чистые суспензии бактерий или смеси с Zn-TBut3PyP. По окончании времени облучения бактериальные суспензии в объеме 20 мкл помещали в лунки плоскодонного полистирольного планшета, содержащие 100 мкл 0.5% пептона для дальнейшей инкубации и спектрофотометрической регистрации численности.

Показано, что АФДТ на суспензию клеток приводит к сокращению числа клеток *S. aureus 11* на величину 2.2-5.2 lgКОЕ/мл. При воздействии через кожный лоскут эффективность ожидаемо падала, снижение выживаемости было на уровне 1.7-3.9 lgКОЕ/мл.

Однако использование ОПА позволяло в достаточной мере улучшить эффективность воздействия благодаря снижению рассеяния в кожной ткани и соответственно повышению интенсивности облучения суспензии. Начиная с 10 мин световой экспозиции, эффективность АФДТ через кожный лоскут достоверно не отличается от прямого воздействия света на суспензию клеток. При этом снижение числа клеток происходило на величину 2.9-4.9 lgKOE/мл.

Таким образом, использование технологии оптического просветления биоткани способно повысить эффективность антимикробной фотодинамической терапии. Для доказательства была использована модель *ex vivo*, позволяющая достоверно контролировать изменение численности бактериальных клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 25-24-00370 от 28.12.2024 г.

ОЦЕНКА ВОССТАНОВЛЕНИЯ ДЕФЕКТОВ СУСТАВНОГО ХРЯЩА КОЛЕННОГО СУСТАВА КРЫС С ПОМОЩЬЮ РЕБЕРНЫХ АУТОГРАФТОВ

Шелег С.А., Куренкова А.Д.

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

sheleg_s_a@staff.sechenov.ru

Дефекты гиалинового хряща коленного сустава вследствие его ограниченного регенеративного потенциала могут приводить к прогрессированию остеоартрита и инвалидизации. В клинической практике применяют такие методы восстановления хрящей, как мозаичная хондропластика и аутологичная трансплантация хондроцитов. Однако данные подходы ограничены необходимостью забора материала из неповрежденных участков артикулярного хряща. Альтернативным источником донорского гиалинового хряща может являться реберный хрящ. Целью работы стала разработка протокола хондропластики с помощью реберного аутографта на модели дефекта коленного сустава крысы. Для закрепления трансплантатов в дефекте использовали фибриновый клей, содержащий реберные хондроциты или без них.

В первой части работы с помощью механо-ферментативного метода были получены реберные хондроциты крысы. Проточная цитометрия выявила, что первичная культура на 99,91% состояла из Sox9 позитивных клеток, соответствуя высокой чистоте популяции. Оценку жизнеспособности различных концентраций реберных хондроцитов, замешанных с фибриновым клеем, проводили через 3 часа после инкапсулирования, а также через сутки культивирования. Плотность клеток 250 кл/мкл была определена как оптимальная и использовалась далее в экспериментах *in vivo*.

В модели локального повреждения суставного хряща колена крысы проводили трансплантацию аутологичного реберного графта. Интеграция трансплантата с окружающим дефект хрящом обеспечивалась фибриновым гелем с реберными хондроцитами или без них. В качестве контроля использовали дефект коленного сустава без трансплантата и ложноперированный сустав. Сравнительная оценка интеграции трансплантата и структуры новообразованной ткани в группах проводилась с помощью компьютерной томографии через 1, 6 и 12 месяцев после операции, а также гистологического и иммуногистохимического анализа через 1 и 6 месяцев. С помощью микроКТ было показано, что хрящевые графты визуализировались в суставе через 1, 6, 12 месяцев после операции. При этом конгруэнтность сустава сохранялась даже через 12 месяцев, несмотря на развитие возрастного артроза. Различия в интеграции трансплантата между группой животных с бесклеточным фибриновым гелем и группой фибринового клея с клетками не были статистически значимыми. Однако стоит отметить, что через 1 месяц в группе фибринового клея без клеток наблюдалось разрастание синовиальной мембраны (синовит) в 2 случаях из 5, а при использовании клея с клетками этого не наблюдали ни в одном из образцов. У контрольных животных с дефектом без трансплантата синовит также наблюдали в половине случаев. Методом

иммуногистохимического окрашивания во всех трансплантатах было показано сохранение маркеров гиалинового хряща коллагена II типа и Sox9 и отсутствие маркера фиброза коллагена I типа во всех группах, что говорит о сохранении структуры реберного хряща через 1 и 6 месяцев. При этом у всех животных с интегрированных графтом наблюдали восстановление конгруэнтности поверхности сустава, в то время как в контроле дефект не был заполнен тканью через 1 месяц, а через 6 месяцев новообразованная ткань по характеристикам была ближе к фиброзному, а не гиалиновому хрящу.

Таким образом, метод мозаичной хондропластики с помощью графта из ребра может быть перспективным подходом для реконструкции дефектов суставов, поскольку он обладает сходным составом, способен восстанавливать поверхность хряща и нести механическую нагрузку.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 23-75-01066.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ИНТЕГРАЦИИ НЕБОЛЬШИХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ
ПРИ РЕДАКТИРОВАНИИ ГЕНОМА С ПОМОЩЬЮ МИНИАТЮРНОЙ НУКЛЕАЗЫ
Un1Cas12f1

Шептий В.В.^{1,2}, Золотаренко А.Д.², Брускин С.А.²

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

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

v.sheptiy2002@mail.ru

Технология редактирования генома CRISPR/Cas находит широкое применение в генной инженерии, научных исследованиях и терапевтических разработках. Наиболее изученной и широко используемой является нуклеаза SpCas9. В отличие от нее, недавно открытая нуклеаза V-F типа Un1Cas12f1, имеет меньший размер, узнает альтернативный PAM-сайт и генерирует двуцепочечные разрывы ДНК с липкими концами, что делает ее перспективным инструментом для редактирования генома клеток млекопитающих, в том числе человека. Есть множество работ по оценке эффективности нокаута генов и редактирования оснований с помощью миниатюрной нуклеазы Cas12f1, однако нет достаточного количества данных о применимости этой нуклеазы для редактирования генома с внесением целевых последовательностей путем репарации на основе гомологичной рекомбинации, что может быть перспективным, учитывая образование липких концов при разрезании.

Для оценки применимости данной нуклеазы к введению целевых последовательностей с небольшими плечами гомологии (меньше 25пн) нами была разработана мультиплексная система CRISPR/Un1Cas12f1 с парами направляющих РНК для удаления целевых фрагментов ДНК и одноцепочечными (оц-) и двуцепочечными (дц-) донорными последовательностями. Оценка наличия и эффективности целевых интеграций донорных последовательности в геном проводилась двумя способами. ПЦР анализ показал наличие целевых интеграций в геном клеток НЕК293Т во всех четырех целевых сайтах. Для количественной оценки эффективности редактирования был проведен Ampli-Seq анализ (со смеси трансфицированных клеток без сортировки). Эффективность редактирования для наиболее активной пары направляющих РНК составила 6,2%, а эффективность интеграции составила от 0,08 до 0,019% для дц-доноров и от 0,001 до 0,019% для оц-доноров.

Таким образом, проведенная работа впервые показала применимость компактной нуклеазы Un1Cas12f1 для интеграции небольших доноров и перспективность ее использования в качестве нового инструмента для направленного редактирования генома.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОСОВМЕСТИМОСТИ ДВУХКОМПОНЕНТНЫХ ГЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ АЛЬГИНАТА НАТРИЯ С КСАНТАНОВОЙ КАМЕДЬЮ И ГИДРОКСИПРОПИЛМЕТИЛЦЕЛЛЮЛОЗОЙ

Яковский Д.С.^{1,2}, Давыдова Г.А.²

¹Пушкинский филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)», Пушкино, Россия

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия

yackowskay@mail.ru

На данный момент приоритетным направлением в области регенеративной медицины считается исследование и разработка биоактивных материалов на основе природных полимеров, обеспечивающих восстановление структуры тканей за счет стимуляции пролиферативной и миграционной активности клеток. Высокую эффективность в данной области показали биополимеры растительного происхождения, способные взаимодействовать друг с другом на молекулярном уровне, что также усиливает их биоактивные свойства. Целью настоящего исследования являлось изучение влияния состава и соотношения компонентов двухкомпонентных гелей на основе альгината натрия, гидроксипропилметилцеллюлозы (ГПМЦ) и ксантановой камеди на их реологические характеристики и воздействие на метаболическую активность мезенхимальных стромальных клеток человека, выделенных из пульпы зуба (DPSC).

Измерения вязкости растворов были проведены на колебательном вискозиметре при температуре 37°C. В результате было выявлено положительное отклонение от линии аддитивности в исследуемых смесях альгинат натрия/ГПМЦ в диапазоне содержаний ГПМЦ 20 – 80% и в диапазоне содержаний ксантановой камеди 70 – 90% для смесей ксантановая камедь/альгинат натрия в 2% гелях. Данное отклонение свидетельствует о взаимодействии звеньев полимерных цепочек в указанных диапазонах концентраций.

Исследование воздействия различных соотношений составляющих композитных гелей и отдельных компонентов на метаболическую активность клеток DPSC проводили методом МТТ-теста, основанного на восстановлении бесцветной соли тетразолия (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид, МТТ) митохондриальными и цитоплазматическими дегидрогеназами живых метаболически активных клеток с образованием голубых кристаллов формазана, растворимого в диметилсульфоксиде. Согласно полученным данным все образцы линейки альгинат натрия/ГПМЦ не проявляли угнетающего действия на клетки. В растворах ксантановая камедь/альгинат натрия образцы с соотношениями 70 – 90% ксантановой камеди и 1%-ный раствор ксантановой камеди достоверно отличались от контроля, значительно снижая метаболическую активность клеток DPSC.

Установлена корреляция снижения метаболической активности клеток DPSC с реологическими характеристиками гелей разного состава.

Работа выполнена по ГЗ № 075-00223-25-00.

Секция 3

«МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ»

ИЗУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ЭНДОЛИЗИНОВ

Абдуллаева С.Д., Васина Д.В., Антонова Н.П., Григорьев И.Г.

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии
имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения
Российской Федерации, Москва, Россия

sofa.abd25@gmail.com

В настоящее время лечение системных бактериальных инфекций может быть затруднено из-за распространения антибиотикорезистентности, особенно среди грамотрицательных бактерий группы ESKAPE, таких как *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.* Терапия препаратами на основе бактериофагов и их литических ферментов (эндолизинов) является одним из перспективных способов борьбы с этой проблемой. Однако, эндолизины демонстрируют неудовлетворительные фармакокинетические параметры (ФК) при системном введении (короткий период полувыведения), в связи с чем возникает необходимость улучшения ФК, в частности, путем белковой инженерии. В данной работе эндолизин LysAp22-SMAP, содержащий поликатионный пептид, повышающий антибактериальную активность, был дополнительно модифицирован двумя типами альбумин-связывающих пептидов (Lys-ABP1 и Lys-ABP2), обладающими высоким сродством к альбуминам животных (мыши, кролики, человек) и за счет этого снижающими протеолиз молекул в лизосомах, а также введением в структуру гомодимеризационного домена HDD (Lys-HDD), приводящего к увеличению размера молекулы белка и снижению скорости фильтрации через почечные каналы.

Ферменты были получены биотехнологически путем экспрессии в клетках *Escherichia coli* и дальнейшей хроматографической очистки. Для исследования их стабильности в сыворотках крови мыши, кролика и человека был проведен вестерн-блот анализ. Белки вносили в не инактивированную сыворотку и отбирали пробы сразу после внесения, а также через 5, 15, 30, 60 и 120 минут. В качестве положительных контролей использовали модифицированные ферменты, LysAp22-SMAP и LysAp22 без пептида в буферном растворе, а в качестве отрицательного контроля - сыворотки без внесенного белка.

Результаты эксперимента показали, что происходит увеличение стабильности за счет внесенных генетических модификаций, в отличие от LysAp22-SMAP, который деградирует до LysAp22 в течение 2 ч. Эндолизины Lys-ABP1 и Lys-ABP2 остаются стабильными в сыворотке крови кролика и человека, сохраняя более 50% целостности в течение 2 ч. Lys-HDD стабилен во всех сыворотках и практически не деградирует в течение 2 ч. Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что эндолизины Lys-ABP1, Lys-ABP2, Lys-HDD являются перспективными молекулами для дальнейшего фармакокинетического исследования на животных и последующей разработки инъекционных препаратов для лечения системных бактериальных инфекций, вызываемых штаммами грамотрицательных бактерий.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-74-01068, <https://rscf.ru/project/23-74-01068/>

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДНК-СОДЕРЖАЩИХ БАКТЕРИОФАГОВ *CRONOBACTER*

Азнабаева З.А., Муталлапова Г.И., Федорова М.С., Тризна Е.Ю., Каюмов А.Р.

Казанский Федеральный (Приволжский) Университет, Казань, Россия

kipytrik@gmail.com

На сегодняшний день неграмотное использование антибиотиков в различных отраслях медицины и сельского хозяйства привело к развитию у бактерий устойчивости к антимикробным препаратам. Бактерии группы ESKAPE обладают высокой вирулентностью и устойчивостью к традиционным антибиотикам. Бактерия *Cronobacter sakazakii* – один из представителей данной группы и причина развития и распространения различных внутрибольничных, трудно поддающихся лечению инфекций. В связи с сокращением эффективных антибиотиков, необходим поиск альтернативных подходов противомикробной терапии. На сегодняшний день одним из перспективных подходов к терапии данных инфекций является использование бактериофагов – естественных вирусов бактерий. Бактериофаги как отдельно, так и в синергизме с антибиотиками демонстрируют высокую эффективность при лечении инфекций, вызванных *C. sakazakii*, поэтому являются многообещающим подходом противомикробной терапии. В данном исследовании проводились поиск и выделение из естественных водоемов Республики Башкортостан, Республики Татарстан, а также сточных вод г. Казани бактериофагов, вирулентных в отношении *C. sakazakii*. Была проведена оценка видоспецифичности бактериофагов в отношении различных представителей семейства *Enterobacteriaceae*. Эксперименты показали высокую литическую активность выделенных бактериофагов в отношении бактерий *C. sakazakii*, *Salmonella enterica*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*. Таким образом, новые бактериофаги *C. sakazakii* проявили поливалентные свойства с высокой литической активностью в отношении бактерий семейства *Enterobacteriaceae*. В дальнейшем планируется идентификация, характеристика и оценка штаммоспецифичности бактериофагов, а также возможность повышения эффективности традиционных антибиотиков при сочетанном использовании с бактериофагами *Cronobacter*, а также идентификация и получение новых эндолизинов данных бактериофагов.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения задания в сфере научной деятельности. Проект № FZSM2022-0017.

ОСОБЕННОСТИ ВОСПРИИМЧИВОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ В ГРИБКОВО-БАКТЕРИАЛЬНЫХ СООБЩЕСТВАХ

Айзатуллина Л.М., Миронова А.В., Тризна Е.Ю., Каюмов А.Р.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего
образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Россия

aizatullina14@mail.ru

Традиционно многие исследования инфекционных агентов были направлены на изучение клеток монокультур. В последнее время активно изучаются смешанные сообщества, в том числе биопленки, состоящие из бактерий и микромицетов. Такие консорциумы, как правило, ассоциированы с развитием более тяжелых форм заболеваний из-за повышения устойчивости микроорганизмов в их составе к антимикробным препаратам, что обусловлено как протекторными свойствами матрикса биопленки, так и метаболическими взаимодействиями внутри смешанного сообщества. Целью работы являлось оценить особенности восприимчивости микроорганизмов к антимикробным препаратам в грибково-бактериальных сообществах.

Конфокальная микроскопия показала, что в составе грибково-бактериальной культуры все исследованные бактерии предпочтительно располагаются в нижних слоях биопленки, следовательно, можно ожидать протекторное действие для бактериальных клеток за счет диффузного барьера со стороны *C. albicans*. Матрикс смешанных биопленок *C. albicans* с грамположительными *S. aureus* и *E. faecalis* характеризовался более низкой проницаемостью для ципрофлоксацина, при этом проницаемость для гентамицина не изменялась. Однако, чувствительность *S. aureus*, *E. faecalis* к ципрофлоксацину в моновидовой биопленке была ниже, чем в биопленке *S. aureus* – *C. albicans*, *E. faecalis* – *C. albicans* соответственно. Наоборот, в смешанном сообществе *C. albicans* с грамотрицательными *K. pneumoniae*, *E. coli* и *P. aeruginosa* проницаемость матрикса биопленки для ципрофлоксацина повышалась, в то время как восприимчивость бактерий к антибиотику падала. Также в смешанных биопленках *C. albicans* с грамотрицательными бактериями снижалась проницаемость для гентамицина и цефтазидима, хотя антибактериальная активность препаратов не снижалась. Эти факты свидетельствуют о существенном влиянии метаболитов кандиды на восприимчивость бактерий к фторхинолону и необходимости учитывать данный аспект при лечении смешанных инфекций.

Таким образом, восприимчивость бактерий к противомикробным препаратам меняется в условиях смешанного грибково – бактериального сообщества, что необходимо учитывать при поиске наиболее эффективных стратегий лечения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 24-14-00194).

ПОЛУЧЕНИЕ МУТАНТНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ

**Акбирова А.Ф.^{1,2}, Ушмаева У.А.^{1,2}, Идрисова Л.Т.^{1,2}, Орипова А.А.^{1,2}, Коляденко И.А.¹,
Селиханов Г.К.^{1,2}**

¹Передовая Инженерная Школа ИТМО, Альметьевск, Россия

²Альметьевский Государственный Технологический Университет ВШН,
Альметьевск, Россия

akbirovaarina@gmail.com

Янтарная кислота (ЯК) является важным соединением, широко используемым в химической, фармацевтической и пищевой промышленности благодаря своим уникальным свойствам. Она обладает антиоксидантными, противовоспалительными и детоксикационными свойствами, а также применяется в качестве промежуточного продукта при производстве полимеров и других химических соединений. В связи с этим, повышение эффективности её производства представляет собой актуальную задачу современной биотехнологии.

Традиционно ЯК получают химическим путем, однако этот метод имеет ряд недостатков, таких как высокая стоимость сырья, сложность процесса и негативное влияние на окружающую среду. Альтернативный подход заключается в использовании биологических методов, основанных на применении микроорганизмов-продуцентов. Одним из перспективных направлений является создание модифицированных микроорганизмов, которые обладают повышенной способностью к синтезу ЯК.

Методы традиционного химического синтеза янтарной кислоты сопровождаются значительными недостатками, среди которых высокая стоимость сырья, сложность технологических процессов и значительное негативное влияние на окружающую среду. В качестве альтернативы традиционным методам рассматриваются биологические подходы, основанные на применении микроорганизмов продуцентов янтарной кислоты. В том числе возможен вариант использования целлюлозосодержащих отходов в качестве перспективного сырья для получения янтарной кислоты благодаря своей возобновляемости и экологической чистоте. Особое внимание уделяется разработке генетически модифицированных штаммов, которые обладают повышенной способностью к производству янтарной кислоты и способны конвертировать целлюлозосодержащие отходы отраслей промышленности в этой ценный конечный метаболит.

Целью данного исследовательского проекта является разработка эффективных мутантных форм микроорганизмов, способных производить янтарную кислоту.

Для создания высокоэффективных мутантных микроорганизмов используются методы физического и химического мутагенеза, такие как ультрафиолетовое облучение и обработка этилметансульфонатом (EMS). Были разработаны протоколы для культивирования штаммов продуцентов, потенциально способных синтезировать янтарную кислоту, а также продолжается работа над улучшением стратегий отбора высокопроизводительных штаммов.

Результаты исследований приведут к существенному улучшению биотехнологических процессов и разработке экологически чистых и экономически обоснованных методов получения янтарной кислоты.

КУЛЬТИВИРУЕМЫЕ ГРИБЫ ОТДЕЛОВ ASCOMYCOTA И BASIDIOMYCOTA ИЗ
ЛИШАЙНИКОВ РОДОВ *CETRARIA*, *FLAVOCETRARIA*, *CLADONIA* И *STEREOCAULON*

Акопджанян А.В.^{1,2}, Панкратов Т.А.¹

¹Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН,
Москва, Россия

²Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики»,
Москва, Россия

hakobjanyanarmen0@gmail.com

Из лишайников *Cetraria islandica*, *Flavocetraria nivalis*, *Cladonia stellaris*, *Cladonia arbuscula*, *Stereocaulon vesuvianum* и *Stereocaulon paschale*, распространенных в северных территориях России, выделены культуры грибов, относящиеся к двум отделам – Ascomycota и Basidiomycota. Общая численность колебалась в пределах 10^2 - 10^5 КОЕ в 1 грамме сухого таллома. Среди выделенных видов преобладали представители патогенных грибов, заражающих как растения, так и насекомых, а также два вида, описанных как патогены человека. Выделенные культуры были представлены уже известными видами родов *Phoma*, *Cadophora*, *Tolyprocladium*, *Penicillium*, *Beauveria*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Vishniacozyma*, *Sydowia*, *Oidiodendron*, *Thelebolus*, *Filobasidium*, а также новыми для науки видами родов *Ballistosporomyces*, *Bannoa*, *Microsporomyces*.

Грибы рода *Cadophora* и *Cladosporium* могут быть фитопатогенами, в составе рода *Phoma* так же встречается множество фитопатогенных грибов, в том числе существует вид, паразитирующий на лишайниках, а дрожжи рода *Sydowia* могут вызывать оппортунистические инфекции человека. Грибы рода *Oidiodendron* могут влиять на метаболизм и поглощение азота растениями, а *Filobasidium* – быть продуцентами липаз, в редких случаях вызывать менингит, становясь патогеном.

Литературные данные подтверждают синтез выделенными из лишайников видами грибов ряда антибиотиков и экзополисахаридов, потенциально применимых в сельскохозяйственной и медицинской биотехнологии. В частности, выделенные нами грибы *Tolyprocladium inflatum* являются продуцентами циклоспоринов, а их телеоморфа является патогеном насекомых. Грибы рода *Beauveria* также способны паразитировать на насекомых. Дрожжи родов *Aureobasidium*, *Microsporomyces* могут быть источниками ценных экзополисахаридов.

Работа поддержана грантом РНФ № 25-24-00195 «Грибы в кустистых и листоватых лишайниках России: таксономическое разнообразие и биоцидная активность».

ВЫЯВЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ЦИРКУЛЯЦИИ АТИПИЧНОГО ПЕСТИВИРУСА СВИНЕЙ (*PESTIVIRUS SCROFAE*) В СВИНОВОДЧЕСКИХ ХОЗЯЙСТВАХ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Аноятбекова А.М., 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

aafshona@mail.ru

Атипичный пестивирус свиней (АПС) – РНК содержащий вирус рода *Pestivirus*, семейства *Flaviviridae*, впервые был обнаружен в 2015 году в США. Согласно новой классификации таксономии вирусов, АПС обозначается как *Pestivirus scrofae*. К вирусу восприимчивы домашние свиньи и кабаны. Заражение происходит вертикальным и горизонтальным путем. У поросят вирус вызывает конгенитальный тремор типа А-II. На сегодняшний день показано широкое распространение вируса в странах Европы, Азии и в США. Целью нашего исследования было изучение циркуляции АПС в популяции домашних свиней свиноводческих хозяйств Российской Федерации (РФ).

В ходе выполнения работы было исследовано 2630 образцов отобранных от свиней различных возрастных групп в период 2020–2024 гг. Образцы были получены из 24 свиноводческих хозяйств, расположенных в 14 регионах РФ. Экстракцию РНК из образцов проводили набором для выделения РНК/ДНК «РибоПреп» согласно инструкции производителя. Детекцию генома АПС проводили методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени с диагностическими праймерами и зондом описанными Kauffman и соавторами в 2019 г. Синтез кДНК проводили с использованием набора реагентов для обратной транскрипции «ОТ-1» (Синтол) согласно инструкции производителя. Секвенирование участков генома NS2-NS3 проводили по Сэнгеру. Филогенетический анализ проводили в программе MEGA 7.0. с использованием метода максимального правдоподобия на основе модели General Time Reversible (GTR). Вирусовыделение проводили в перевиваемых культурах клеток СПЭВ и SIPS.

Результаты проведенных исследований показали, что АПС циркулирует в 12 свиноводческих хозяйствах, расположенных в восьми регионах РФ: Красноярский Край, Республики Бурятия и Мордовия, Томская, Московская, Белгородская, Курская, и Псковская область. Общий процент распространенности вируса в популяции домашних свиней исследуемых хозяйств составил 8.8%. В хозяйствах Центральных и Северо-Западных регионов Европейской части России отмечен более высокий уровень выявления вируса. Так, самый высокий показатель обнаружения АПС наблюдалось в хозяйстве Белгородской области (25,3%), Псковской и Курской областей (16,7%). Самые низкие показатели выявления наблюдались в образцах, полученных из хозяйств Томской области и хозяйства из Республики Бурятия: 3,1% и 1,6%, соответственно. При изучении временного распространения вируса, установлено, что АПС циркулирует в стадах свиней, по крайней мере, с 2020 года.

Филогенетический анализ показал, что российские изоляты отличаются друг от друга и распределяются по трем кластерам. Изоляты из Красноярского края, Белгородской, Томской, Курской областей и Республики Бурятия имеют высокую нуклеотидную идентичность (94,3–98,8%) со штаммами из Венгрии, в то время как изоляты из Московской и Псковской областей имеют высокую нуклеотидную идентичность (89,2–94,3%) со штаммами из США. Изолят из Республики Мордовия имеет высокую нуклеотидную идентичность (97,1%) со штаммом из Южной Кореи. *In vitro* исследования выявили репликацию штамма Belgorod 151 в перевиваемой культуре клеток СПЭВ.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 23-76-01080 «Изучение циркуляции эмерджентного атипичного пестивируса свиней в свиноводческих хозяйствах Российской Федерации».

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТА ЗВЕРОБОЯ ОБЫКНОВЕННОГО

Аскерова А.Ф., Керимова Г.М., Бекетов Д.М.

Российский биотехнологический университет, Москва, Россия

askarina25@mail.ru

Рост антибиотикорезистентности требует разработки новых антимикробных средств, включая препараты на основе природных соединений. Особый интерес представляет изучение антимикробных свойств экстракта зверобоя, содержащего флавоноиды, обладающие антимикробными свойствами. Целью настоящего исследования является оценка антимикробной активности экстрактов зверобоя и сравнение её с антимикробной активностью перекиси водорода.

Для экстракции флавоноидов из травы зверобоя («ФармаЦвет», Россия) были применены следующие методы: мацерация, экстракция на аппарате Сокслета и ультразвуковая экстракция. В качестве экстрагентов использовались этанол (96%, 70% и 50%), гексан (70%) и дистиллированная вода при соотношении сырья к экстрагенту от 1:5 до 1:100. Содержание флавоноидов определялось методом дифференциальной спектрофотометрии согласно ОФС.2.5.0015.15 «Зверобоя трава» ГФ РФ XIV изд. Антимикробную активность экстрактов оценивали диско-диффузионным методом.

Максимальное содержание флавоноидов (4,21% масс./масс.) было достигнуто при ультразвуковой экстракции с 70% этанолом (соотношение сырья и экстрагента 1:100). Водный экстракт, полученный методом мацерации при аналогичных условиях, показал снижение выхода целевых соединений в 2,3-6,9 раза (0,61-1,86%), что обусловлено ограниченной экстракционной способностью полярных растворителей для флавоноидных комплексов. Диско-диффузионный метод выявил видовую специфичность антимикробной активности экстрактов. Экстракт, полученный с помощью аппарата Сокслета (96% этанол, 1:5) проявил активность в отношении *Staphylococcus aureus* 209P ATCC 6538P (зона ингибирования 13,7 мм). Ультразвуковые экстракты 70% этанола ингибировали рост *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 25922 и *Klebsiella aerogenes* ATCC 13048 (зоны ингибирования варьировались от 5,1 до 8,25 мм). Отсутствие корреляции между содержанием флавоноидов и антимикробным эффектом указывает на вклад сопутствующих метаболитов – терпеноидов и фенолокислот, чья экстракция зависит от параметров обработки исходного сырья. Сравнительный анализ антимикробной активности растительных экстрактов с контрольным агентом (3% H₂O₂, зона ингибирования 15-26,5 мм) показал, что растительные экстракты демонстрируют 38-54% эффективности относительно перекиси водорода.

Результаты исследования свидетельствуют об ограниченной эффективности экстрактов зверобоя в качестве моноагентов, однако имеются перспективы для создания комбинированных препаратов синергического действия.

АПРОБАЦИЯ МЕТОДОВ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВИРУСА СКРУЧИВАНИЯ ЛИСТЬЕВ КАРТОФЕЛЯ

Башкирова И.Г.

ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений», р.п. Быково, м.о. Раменский, Россия

bashkirova@mail.ru

Вирус скручивания листьев картофеля (*Polerovirus PLRV*, PLRV) принадлежит к роду *Polerovirus*, семейству *Solemoviridae*. Данный род ранее относился к семейству *Luteoviridae*, а в 2021 году был включен в семейство *Solemoviridae* [1]. Вирус имеет широкий круг растений-хозяев, большинство которых относятся к семейству Пасленовые, Амарантовые, Крестоцветные, Портулаковые и Маревые [2]. Для выявления и идентификации вируса необходимо использовать апробированные методы диагностики. В исследованиях проводили отработку методов ИФА и ПЦР для диагностики вируса скручивания листьев картофеля в растительном материале с помощью коммерческих наборов. Для ИФА использовали наборы 2 фирм – Bioreba (Швейцария), Loewe (Германия), для ПЦР в режиме «реального времени» использовали тест-системы отечественных компаний ООО «Синтол» и ООО «АгроДиагностика», для классической ПЦР – праймеры PLRV-Fm/PLRV-Rm [3] с реакционным миксом «5x Mas^{DP}Mix – 2025» (ЗАО «Диалат Лтд», Россия).

Специфичность коммерческих наборов определяли путем внесения РНК близкородственных и других вирусов, поражающих картофель: PLRV, PVS, PVM, PVY, PVX, PVA, PVV, PYDV, PMTV, PVT, PYV, PAMV, APMoV, APLV-Col-2, APMMV/APLV-Hu, PerMV и TSWV.

У наборов для выявления PLRV методом ИФА отмечена достаточно высокая специфичность. Перекрестных реакций между изолятами нецелевых вирусов не установлено. Результаты тестирования показывают, что среднее значение экстинкции исследуемых изолятов у набора Bioreba было равно 0,072 оптической единицы (о.е.), а у Loewe – 0,141 о.е. Следует отметить, что в современных наборах фирм Bioreba, Loewe используется фосфатаза, которая придает более интенсивную окраску в ходе реакции.

Результаты тестирования отечественных тест-систем методом ПЦР-РВ показали, что они обладают высокой специфичностью по отношению к целевому виду. Неспецифичной реакции с другими микроорганизмами не отмечено. Оценка чувствительности тест-систем отечественного производства для идентификации вируса скручивания листьев картофеля показала, что пределом прохождения целевой реакции было разведение образца средней зараженности в 10^4 раз. Это является важным при исследовании растительного материала с низкой концентрацией вирусной инфекции.

Помимо этого, в работе проведена отработка специфичных праймеров PLRV-Fm/PLRV-Rm для диагностики вируса скручивания листьев картофеля. Отмечено, что при проведении опыта с градиентом температур 48 °С, 51 °С, 54 °С, 57 °С, 60 °С, 63 °С получен необходимый продукт амплификации, равный 336 п.н. Для дальнейших исследований

выбрана температура 54°C для реакции, с целью оптимизации проведения лабораторного исследования по тестированию других вирусов картофеля. Перекрестных реакций между изолятами вирусов картофеля не выявлено.

Литература.

1. Sömera M. et al. ICTV virus taxonomy profile: Solemoviridae 2021 // The Journal of General Virology. 2021. Vol. 102 (12).
2. Kumari P. et al. Inhibition of potato leafroll virus multiplication and systemic translocation by siRNA constructs against putative ATPase fold of movement protein // Scientific reports. 2020. Vol. 10 (1). P. 1-11.
3. Singh R.P. et al. Detection of potato leafroll virus in single aphids by the reverse transcription polymerase chain reaction and its potential epidemiological application // Journal of Virological Methods. 1995. Vol. 55 (1). P. 133-143.

СОВМЕСТНОЕ НЕПРЕРЫВНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ВЫСОКОГАЛОТОЛЕРАНТНЫХ
БАКТЕРИЙ *HALOMONAS UTAHENSIS* С БАКТЕРИЯМИ *BACILLUS LICHENIFORMIS* И
LYSINIBACILLUS MACROIDES

Бубнова Д.В., Калёнов С.В.

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

darya.bubnova2001@mail.ru

Экстремально галофильные и высокогалотолерантные бактерии представляют собой группу микроорганизмов, которые способны развиваться в условиях высокой солености, и нашедшие в последнее время применение в биотехнологии в качестве продуцентов различных биологически активных веществ. В связи с особенностями среды их обитания в литературе обычно предлагается проводить культивирование таких микроорганизмов на производстве в нестерильных условиях. Однако для исключения риска вытеснения исходной культуры и заражения патогенными микроорганизмами, необходимо в модельных опытах подробнее исследовать взаимодействие между культурой-продуцентом и другими микроорганизмами, способными выживать в данных условиях.

Объектами настоящего исследования являлись высокогалотолерантные бактерии *Halomonas utahensis*, а также бактерии *Bacillus licheniformis* и *Lysinibacillus macroides*, не являющиеся галофильными микроорганизмами.

Целью исследования являлось изучение динамики роста и развития галофильных микроорганизмов, стратегий их адаптации при изменении параметров среды, а также сравнение выживаемости культур галофильных и негалофильных микроорганизмов при их совместном непрерывном культивировании.

Эксперимент проводили в стеклянном лабораторном биореакторе с рабочим объемом 1 л. Для культивирования использовали стандартную питательную среду, содержащую 250 г/л NaCl, триптон, дрожжевой экстракт. При подготовке посевного материала культивирование *Halomonas utahensis* проводили в колбах на среде того же состава в течение нескольких дней при температуре 38 °С, а *Bacillus licheniformis* и *Lysinibacillus macroides* культивировали на среде LB в течение 20 часов при 30 °С. В биореактор вносили 1 л питательной среды и стерилизовали 30 мин при 121 °С. После охлаждения производили засев посевным материалом (10% об.). Биомассу *Halomonas utahensis* сначала накапливали в периодическом режиме в течение нескольких дней, затем производили засев *Bacillus licheniformis* и через сутки включали проток питательной среды через биореактор $D = 0,035 \text{ ч}^{-1}$. Культивирование проводили при освещении и 38 °С. Через двое суток степень разбавления доводили до $D = 0,07 \text{ ч}^{-1}$. Через неделю после внесения *Bacillus licheniformis* вносили 3-ю культуру, *Lysinibacillus macroides*, и также устанавливали проток сначала $D = 0,035 \text{ ч}^{-1}$, а затем $D = 0,07 \text{ ч}^{-1}$. После основного эксперимента в стерильных условиях продолжали культивирование в нестерильных условиях. Общее время культивирования составило 3 недели. В процессе непрерывного культивирования на каждом этапе отбирали пробы. Количественный учет

микроорганизмов производили с использованием микрометода Коха, а также проводили микроскопирование и окраску по Граму.

Бактерии *Bacillus licheniformis* и *Lysinibacillus macroides*, которые подавляются в условиях высокой солености, способны расти в среде с высоким содержанием NaCl в условиях хемостата совместно с *Halomonas utahensis*. Предполагается, что это происходит благодаря осмопротекторам, синтезируемым высокогалотолерантными бактериями *Halomonas utahensis*. Также установлено, что более высокая степень разбавления ($D = 0,07 \text{ ч}^{-1}$) в хемостате способствует увеличению концентрации *Bacillus licheniformis* и *Lysinibacillus macroides*.

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БАКТЕРИЙ РОДА
BRADYRHIZOBIUM ДЛЯ РАЗРАБОТКИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ИНОКУЛЯНТА

Бунеева Е.А.¹, Мавродина К.С.¹, Черенков Д.А.^{1,2}, Рязанов А.Н.², Жогов А.Ю.³

¹Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

²Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свёклы и сахара
им. А.Л. Мазлумова, Воронеж, Россия

³Мелитопольский государственный университет, Мелитополь, Россия

buneeva5katerina@yandex.ru

Соя является одной из распространенных высокобелковых культур, для выращивания которой главной проблемой является обеспечение полноценного азотного питания. Помимо применения минеральных удобрений, которые, нарушают природный баланс почв и негативно влияют на окружающую среду, аграрии внедряют обработку биопрепаратами, в том числе микробиологическими инокулянтами. По литературным данным, инокуляция семян сои позволяет повысить урожайность на 15-30%. В период вегетации сои важное значение имеет образование клубеньков, которое зависит от активности симбиотических азотфиксирующих микроорганизмов. Самыми изученными среди них являются бактерии рода *Bradyrhizobium*. Однако, данные микроорганизмы имеют низкую приживаемость на обработанных семенах, что может быть частично компенсировано за счет повышения титра живых клеток в инокулянте. Вместе с тем, в стандартных условиях культивирования, как правило, не удается достичь высокой концентрации клеток. Таким образом, целью нашей работы являлась оптимизация процесса культивирования симбиотических бактерий рода *Bradyrhizobium* и проверка их жизнеспособности на инокулированных семенах.

В качестве объектов исследования нами были выбраны бактерии *Bradyrhizobium elkanii* и *Bradyrhizobium japonicum*, выделенные из клубеньков сои. Идентификацию микроорганизмов проводили с использованием микробиологических методов и секвенирования. Для подбора оптимального состава питательной среды культивировали микроорганизмы на субстратах с разными источниками углерода: маннит, мальтоза, сахароза, глюкоза, лактоза и глицерин. По оценке интенсивности роста штриха определили, что симбиотические бактерии лучше всего растут на среде с маннитом и хуже на среде с глицерином и лактозой. На подобранном субстрате по выходу сухой биомассы определили оптимальную температуру культивирования (30°C) и pH (7,0). Оптимальную продолжительность выращивания бактерий определяли с помощью построения кривых роста. Так, стационарная фаза у *Bradyrhizobium elkanii* и *Bradyrhizobium japonicum* наступала через 120 часов после начала культивирования. Титр бактерий достигал 2×10^9 КОЕ/мл. Полученную культуральную жидкость наносили распылением на семена сои, которые в дальнейшем хранили при комнатной температуре. Количество жизнеспособных микроорганизмов определяли с помощью посева смывов с инокулированных семян на агаризованную питательную среду, подсчета КОЕ и микроскопирования. Определили, что титр бактерий на поверхности семян в течение 30 суток хранения снижается до 5×10^7 КОЕ/мл. На основании

проведенных исследований можно сделать вывод, что для повышения жизнеспособности исследуемых микроорганизмов необходимо использовать соответствующий протектор.

Таким образом, мы подобрали питательную среду и оптимальные условия культивирования бактерий рода *Bradyrhizobium*. Результаты исследований могут быть использованы для разработки нового микробиологического инокулянта для семян сои.

УНИКАЛЬНЫЕ НУКЛЕОТИДНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ В ГЕНОМАХ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ МОНИТОРИНГА ШТАММОВ

Валиахметов Э.Э.^{1,2}, Валидов Ш.З.¹

¹ФИЦ Казанский научный центр РАН, Казань, Россия

²Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

emlvaliakhmetov@yandex.ru

Детекция штаммов является важной задачей при оценке их распространения, а также при учете коммерчески используемых микроорганизмов. Наиболее простым, недорогим и одновременно точным методом детекции является ПЦР. Главной проблемой при разработке методов мониторинга отдельных штаммов, основанных на ПЦР, является поиск высокоспецифичных генетических маркеров для детекции. Целью данной работы было найти уникальные штамм-специфичные нуклеотидные последовательности, пригодные для создания системы мониторинга штаммов.

Поиск уникальных фрагментов проводился в геноме штамма *P. putida* PCL1760. На первом этапе применялся алгоритм КЕС, основанный на методе перекрестного выравнивания и последовательного исключения К-меров, сгенерированных из последовательностей целевого и близкородственных геномов. Данный анализ позволил выявить в геноме 5 последовательностей заданной длины от 120 до 200 п.о. Уникальность участков проверялась методом локального выравнивания в BLAST (blastn); 4 из 5 анализируемых фрагментов продемонстрировали значительную гомологию с уже известными последовательностями и были исключены.

Далее отобранная последовательность длиной 161 п.о. была картирована на аннотированный геном штамма PCL1760. При анализе генетического окружения выявленного потенциально-уникального участка было обнаружено, что он расположен в спейсерном регионе между генами двух сайт-специфичных интеграз, предположительно, в составе профага длиной около 29000 п.о. Последовательности данных интеграз и самого профага часто встречаются в геномах представителей рода *Pseudomonas*, однако в случае штамма *P. putida* PCL1760 в данном регионе обнаруживается еще и уникальный участок. Так как данный фрагмент расположен внутри последовательности профага, его возникновение может являться результатом перестроек последовательности данного мобильного элемента.

Для проведения кПЦР были разработаны олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентный зонд TaqMan. Для проверки разработанных праймеров и подтверждения уникальности выявленных фрагментов проводили кПЦР с образцом ДНК штамма PCL1760, образцом тотальной ДНК, выделенной из почвы, а также с ДНК, выделенной из почвы, в которую были добавлены клетки штамма *P. putida* PCL1760. В результате, в образце ДНК, выделенной из почвы, значимой амплификации не наблюдалась, в остальных образцах детектировали высокий уровень амплификации. С помощью серийных разведений ДНК штамма получены стандартные кривые амплификации, позволяющие проводить его количественный анализ.

Таким образом, обнаруженные уникальные последовательности позволяют специфично детектировать штамм *P. putida* PCL1760 в почвенном микробном сообществе. Описанный подход может быть применен и для других микроорганизмов.

Работы выполнены в рамках Государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН.

ВЛИЯНИЕ ЛИПОПЕПТИДА *SrfA* НА АНТАГОНИСТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ
BACILLUS SUBTILIS IV3 В БОРЬБЕ С ФИТОПАТОГЕННЫМИ МИКРОМИЦЕТАМИ

Васильева Ю.А., Мамчур А.А., Данилова Ю.В.

Казанский («Приволжский») федеральный университет, Казань, Россия

vasileva891@mail.ru

Ризобактерии, стимулирующие рост растений (PGPR), в частности представители рода *Bacillus*, формируют биоплёнку на корнях сельскохозяйственных культур, что способствует адаптации хозяина к различным условиям окружающей среды и защищает его от фитопатогенов. Это обусловлено биоконтрольными свойствами, такими как конкуренция за питательные вещества и пространство, прямое подавление патогенных микроорганизмов и активация механизмов индуцированной системной устойчивости (ISR) растений. Циклический липопептид сурфактин является ключевым противомикробным агентом, продуцируемым бактериями *Bacillus*, и оказывает влияние на подвижность, образование биоплёнки и колонизацию корней, а также на начальное взаимодействие с растением-хозяином. Амфифильные свойства данного вещества обеспечивают высокую метаболическую активность и противогрибковую эффективность, что приводит к разрушению клеточных мембран и гибели клеток фитопатогенов. Бациллярный сурфактин легко взаимодействует с растительными клетками и может служить элиситором иммунного ответа ISR, однако механизмы этого процесса остаются малоизученными. В связи с этим исследование направлено на изучение антагонистической активности штамма *Bacillus subtilis* IV3 с редуцированным опероном *SrfA* по отношению к фитопатогенным грибам для определения роли сурфактина в индукции системной устойчивости.

В рамках исследования применялся ризосферный изолят *B. subtilis* IV3. С помощью технологии CRISPR/Cas9 была создана генетическая конструкция pVYs07.23, которую внедрили в клетки бацилл методом химической трансформации. Для подтверждения делеции оперона *SrfA* провели ПЦР-анализ, показавший уменьшение длины геномного локуса с 20 953 н.п. до 1583 н.п. Антагонистическая активность штаммов *B. subtilis* IV3 и мутанта $\Delta srfABC$ по отношению к таким значимым фитопатогенам, как *Alternaria* sp., *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* и представителей рода *Fusarium*: *F. solani* и *F. oxysporum* DR40 и DR 57 исследована с использованием метода агаровых блоков на протяжении 7 суток. В результате исследования обнаружено, что почвенный изолят *B. subtilis* IV3 подавляет рост всех шести изученных фитопатогенных микромицетов. Зоны ингибирования составили: *Alternaria* sp. – 43%, *B. cinerea* – 45%, *R. solani* – 28%, *F. solani* – 71%, *F. oxysporum* DR40 – 48% и DR57 – 41%. Мутант с делецией по оперону *SrfA* продемонстрировал потерю антагонистической активности в отношении грибов, так как зона подавления роста не наблюдалась – мицелий полностью покрывал колонию.

Таким образом, делеция оперона циклического липопептида сурфактина приводит к потере антагонистической активности против микромицетов *Alternaria* sp., *B. cinerea*, *R. solani*, *F. solani*, *F. oxysporum* DR40 и DR 57, что указывает на его ключевую роль в данном процессе.

Ризосферный изолят *B. subtilis* IV3 демонстрирует высокую антагонистическую активность против фитопатогенных микромицетов, что предполагает его потенциальное использование в качестве биофунгицида в сельском хозяйстве.

Работа выполнена на технической базе программы стратегического академического лидерства «Приоритет-2030».

ИДЕНТИФИКАЦИЯ МЕМБРАНСВЯЗАННОЙ ФОРМЫ ГЕМОЛИЗИНА II
BACILLUS CEREUS ИММУНОХИМИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

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

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

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

olesja.wetrowal1999@gmail.com

Bacillus cereus – условно-патогенная грамположительная бактерия, широко распространенная в окружающей среде, способная вызывать системные и местные инфекции у людей с ослабленной иммунной системой и являющаяся причиной до 12% всех пищевых отравлений. Одним из ключевых патогенных факторов бактерии является гемолизин II (HlyII), секретирующийся в виде водорастворимых мономеров. HlyII относится к группе β-складчатых пороформирующих токсинов, для которых характерна олигомеризация мономеров при взаимодействии с клеточной мембраной с последующим формированием ионных каналов. Наличие каналов в мембране приводит к свободному потоку низкомолекулярных соединений и, в конечном итоге, к гибели клетки-мишени.

Катализатором процесса пороформирования становится поверхностная мембрана клетки, на которую направлено токсическое действие. Каждая из стадий сопровождается конформационными изменениями в пространственной структуре токсина, а, следовательно, и изменениями эпитопной структуры, что должно проявляться в изменении доступности эпитопов для антител. Ранее авторами были получены панели моноклональных антител (МА) против отдельных районов HlyII: С-терминального домена, участков Met225 - Ile412 и Lys171 – Gly250. Для того чтобы определить, взаимодействуют ли МА с порой (ионным каналом), образовавшейся в мембране, был разработан метод, позволяющий выявлять иммунные комплексы антител с ионным каналом. За основу метода использовали иммунопреципитацию - способ выявления антигена в многокомпонентной смеси в виде комплекса со специфическим антителом. После лизиса эритроцитов кролика гемолизином II получали фрагменты мембран, содержащие поры, сформированные олигомерной формой токсина. Далее проводили делипидизацию полученных фрагментов для предотвращения возможных неспецифических взаимодействий. Полученный препарат, содержащий поры, инкубировали с исследуемым МА и с сефарозой с иммобилизованными кроличьими антителами против иммуноглобулинов мыши. Иммунопреципитат, связавшийся с сефарозой, отделяли из раствора центрифугированием, подвергали электрофоретическому разделению в денатурирующих условиях и проводили Иммуноблоттинг, в ходе которого выявляли присутствие HlyII в реакционной смеси. Полоса, соответствующая гемолизину, окрашивалась на

иммуноблоттинге только в том случае, если МА узнавало сформированный в мембране эритроцита ионный канал.

Данный метод позволил выявить антитела, узнающие олигомерную форму токсина, формирующую ионный канал, образованный на мембране клетки-мишени. Полученные результаты позволят идентифицировать изменения эпитопной структуры в процессе пороформирования, что существенно для определения возможных путей подавления гемолиза. Результаты могут быть использованы при разработке препаратов, блокирующих гемолитическое действие токсина.

Работа поддержана грантом РФФИ № 22-74-10026.

ИССЛЕДОВАНИЕ БАКТЕРИОФАГОВ КОАГУЛАЗООТРИЦАТЕЛЬНЫХ СТАФИЛОКОККОВ КАК ОСНОВЫ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Власенко А.И., Корниенко М.А., Шитиков Е.А.

Лаборатория молекулярной генетики микроорганизмов, ФГБУ ФНКЦ ФХМ
им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, Москва, Россия

alina.10801@gmail.com

Антибактериальная терапия инфекций переживает кризис из-за роста числа бактериальных возбудителей, обладающих множественной лекарственной устойчивостью к антибиотикам. Среди клинически значимых микроорганизмов особую роль играют представители рода *Staphylococcus*, в частности коагулазоотрицательные стафилококки *S. epidermidis* и *S. haemolyticus*. В связи с этим возрастает необходимость в разработке альтернативных методов лечения и профилактики инфекций, и одним из перспективных направлений является применение бактериофагов – вирусов, специфично поражающих бактериальные клетки. Целью представленной работы являлось выделение и характеристика бактериофагов, вызывающих лизис клинически значимых штаммов *S. epidermidis* и *S. haemolyticus*, проведение оценки их эффективности по сравнению с коммерческими терапевтическими коктейлями и типичным представителем вирулентных бактериофагов семейства *Herelleviridae*.

В работе использовались 7 коммерческих препаратов бактериофагов фирм НПО «Микроген» (Россия) и «AZIYA IMMUNOPREPARAT» (Узбекистан), а также типичный представитель вирулентных бактериофагов семейства *Herelleviridae* – vB_SauM-515A1, полученный и охарактеризованный ранее [Kornienko M., Scientific reports, 2020]. В исследование были включены 28 клинически значимых штаммов *S. haemolyticus* и *S. epidermidis* и 15 штаммов *S. aureus*. Штаммы типировали по сиквенс-типам и профилю лекарственной устойчивости. Спектр литической активности препаратов бактериофагов оценивался методами спот-тестирования и титрования по Грациа. Эффективность лизиса бактериофагами штаммов исследуемой коллекции оценивали на основании расчета эффективности посева. Геномы бактериофагов получены на платформе Illumina и аннотированы с помощью сервисов NCBI blast, GeneMarkS, HHPred, Phastest.

Штаммы *S. haemolyticus*, *S. epidermidis* и *S. aureus* относились к 9, 5 и 8 различным сиквенс-типам (ST) соответственно. В ходе работы из коммерческих препаратов на штамм-хозяине *S. haemolyticus* 513m было выделено 2 моноизолята бактериофагов: vB_SH-513mA5 и vB_SH-513mA6. Литический спектр в отношении коллекции штаммов *S. haemolyticus* у выделенных моноизолятов составил 66,7%, у бактериофага сравнения 60%, у коммерческих препаратов от 6,6 до 100% в зависимости от препарата. В отношении *S. epidermidis*: 92% и 76,9% у моноизолятов, у бактериофага сравнения 85% и от 7,7 до 53,8% у коммерческих препаратов. В отношении *S. aureus*: 100% у моноизолятов и бактериофага сравнения, от 73,3 до 93% у коммерческих препаратов. Выделенные моноизоляты конкурируют по эффективности посева с бактериофагом сравнения vB_SauM-515A1. На основании данных

полногеномного секвенирования все исследуемые бактериофаги принадлежали к отряду *Caudovirales*, семейству *Herelleviridae*. Ближайшим филогенетическим соседом бактериофага vB_SH_513m_A5 является *Staphylococcus phage Team1*, бактериофага vB_SH_513m_A6 – *Staphylococcus phage vB_SauM-515A1*.

Таким образом, использование бактериофагов семейства *Herelleviridae* возможно в отношении коагулазоотрицательных стафилококков как в составе фаговых коктейлей, так и в виде монопрепаратов.

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА ВЫДЕЛЕНИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПОНЕНТОВ
БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ СИСТЕМЫ ИЗ БИОМАССЫ ДИНОФИТОВЫХ
ВОДОРОСЛЕЙ *P. LUNULA*

Гаврилов Л.А., Загитова Р.И.

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

insectrus@yandex.ru

Динофитовые водоросли, или динофлагелляты – обширная группа одноклеточных микроорганизмов, обитающих как в пресных, так и в морских водах. Некоторые представители данной группы обладают способностью к биолюминесценции, среди них – вид *Pyrocystis lunula*, способный в ответ на внешний механический раздражитель испускать яркий синий свет. Отдельные аспекты биохимии биолюминесценции динофлагеллят хорошо изучены, но работ по изучению структур её низкомолекулярных компонентов и их взаимопревращений крайне мало. Для проведения полноценных структурных исследований необходимо получить эти вещества в достаточно больших количествах, поэтому целью работы является оптимизация известных методик выделения этих компонентов [1].

В работе использовались водоросли *P. lunula*, которые были получены путем статического культивирования в питательной среде F/2 в плоскодонных колбах при световом цикле 12/12. Полученную биомассу гомогенизировали путем механического растирания в жидком азоте. Для экстракции низкомолекулярных компонентов были использованы буферные растворы 2 мМ K_3PO_4 (Буферный раствор А) и 2 мМ K_3PO_4 , содержащий 5 мМ β -меркаптоэтанол (Буферный раствор Б). Анализ результатов экстракции в указанных буферных растворах проводили посредством ОФ ВЭЖХ. Для очистки компонентов из полученных клеточных лизатов использовали метод центрифугирования и твердофазной экстракции на картридже Macherey-Nagel SPE C18. В качестве заключительного этапа очистки использовали ОФ ВЭЖХ.

Показана возможность проведения процесса очистки целевых компонентов в более оптимальных и быстрых условиях, чем представленных в оригинальном методе очистки, таким образом проведено существенное сокращение времени и этапов очистки компонентов биолюминесцентной системы в два этапа взамен четырех, что критически важно в связи с нестабильностью данных компонентов.

В результате работы разработан более короткий по сравнению с оригинальным методом протокол очистки низкомолекулярных компонентов из биомассы динофлагеллят *P. lunula* в количестве, достаточном для последующего изучения их роли и функций в биолюминесцентной системе динофлагеллят.

Литература.

[1] Nakamura H. et al. Structure of dinoflagellate luciferin and its enzymic and nonenzymic air-oxidation products //Journal of the American Chemical Society. – 1989. – Vol. 111. – №. 19. – P. 7607-7611.

РАЗРАБОТКА КОРМОВЫХ ДОБАВОК НА ОСНОВЕ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ ЛАКТОБАКТЕРИЙ

**Гаврилова Е.А.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

В рамках перехода к органическому сельскому хозяйству и функциональному питанию во всем мире интенсивно разрабатываются новые экологически чистые кормовые добавки-пробиотики. 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. Многие пробиотические бактерии участвуют в разложении сложных соединений, способны вырабатывать витамины и аминокислоты, необходимые организму.

В качестве пробиотиков могут применяться микроорганизмы, в том числе рода *Lactiplantibacillus*. Данные микроорганизмы обладают способностью подавлять рост других бактерий, в том числе и патогенных, за счет продукции органических кислот, перекиси водорода и бактериоцинов.

Ранее в лаборатории «Молекулярная генетика микроорганизмов» был получен новый штамм *Lactiplantibacillus plantarum* S10 и его консорциум с *Acetobacter pasteurianus* из клеверного силоса. Данные бактерии можно использовать в качестве пробиотической части кормовой добавки для перепелов. Целью работы являлось охарактеризовать пробиотические свойства данного штамма *in vitro*, в качестве компонента синбиотического препарата в экспериментах *in vivo* на перепелах (работа выполнена с одобрения локального этического комитета КФУ – протокол №40 от 9 марта 2023).

После исследования штаммов на антагонистическую активность, сохранение жизнеспособности и пробиотические свойства провели оценку влияния препарата на перепелах. Бактерии в питательной среде на основе молочной сыворотки добавляли в рацион перепелов. 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).

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИИ В ГЕНЕ БИОСИНТЕЗА КАТЕХОЛОВОГО СИДЕРОФОРА ШТАММА *BACILLUS SUBTILIS* 168ΔDHBF НА КОЛОНИЗАЦИЮ КОРНЕЙ РАСТЕНИЙ

Гильмутдинова А.И., Рудакова Н.Л., Данилова Ю.В.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

aigwinrygilmvizn@gmail.com

Перспективы использования ризобактерий, стимулирующих рост растений (PGPR) в сельском хозяйстве непрерывно расширяются, так как они представляют собой эффективную и экологически безопасную альтернативу традиционным химическим удобрениям. PGPR, могут способствовать росту растений с помощью различных механизмов, включая солубилизацию фосфатов, выработку сидерофоров, увеличение поглощения питательных веществ, выработку фитогормонов, устойчивость к биотическим и абиотическим стрессам, индукцию системной резистентности, а также содействие улучшению ризосферной среды. Таким образом, крайне важно исследовать соединения, оказывающие положительное влияние на рост и развитие растений.

Ранее нами получен штамм *Bacillus subtilis* 168ΔdhbF, с мутацией в гене биосинтеза бацилликсина – катехолового сидерофора. Необходимо изучить как нарушение синтеза бацилликсина влияет на адгезию и колонизацию корней растений.

Для решения данной задачи в клетки нативного и мутантного штаммов трансформировали плазмиду pJET::BC16 содержащую ген зеленого флуоресцентного белка sfGFP. Исследование взаимодействия флуоресцентно меченных штаммов бактерий с корнями растений проводили на модельном *Arabidopsis thaliana*, а также на экономически значимой сельскохозяйственной культуре картофеля *Solanum tuberosum* L. (сорт Жуковский ранний). Асептические черенки картофеля и семена *A. thaliana* выращивали на агаризованной среде Мурасига-Скуга (с добавлением 30 г/л сахарозы для черенков картофеля), инкубировали при температуре 22 °С, освещением 2000 люкс с фотопериодичностью 16/8 в течение 14 дней (для картофеля) или 7 дней (для *A. thaliana*).

Флуоресцентно меченые бактериальные клетки использовали для приготовления суспензий. Асептические растения тщательно отмывали от остатков ростовой среды и инокулировали бактериальными суспензиями, затем совместно инкубировали в течение 5 дней (для растений картофеля) или 7 дней (для *A. thaliana*). Далее корни растений промывали в стерильной водопроводной воде, помещали под покровное стекло и исследовали с помощью конфокального микроскопа «LSM780» (Zeiss, Германия) для выявления бактериальной адгезии и колонизации.

Исследование продемонстрировало, штамм *B. subtilis* 168 проявлял высокую адгезию и способность проникать в ткани корней картофеля и *A. thaliana*. Мутантный *B. subtilis* 168ΔdhbF сохранил эти свойства, также штамм формировал слои с более высокой плотностью клеток на поверхности корня – биопленкоподобные структуры.

Анализ взаимодействия флуоресцентно меченых штаммов бактерий с корнями растений показал, что мутантный штамм *B. subtilis* 168 Δ dhbF проявлял большую способность к колонизации и проникновению в корни растений.

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (приоритет 2030).

МИКРОЦЕНОЗ ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ ОЗЕР КАПУСТИХА И КРИВОЕ
МУРАВЬЕВСКОГО ПАРКА УСТОЙЧИВОГО ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИЯ
И ЭКОПРОСВЕЩЕНИЯ

Гольц М.Е., Черпак А.А., Косицына О.А., Чагарова О.В.

ФГБОУ ВО «Благовещенский государственный педагогический университет»,
Благовещенск, Россия

ivanolga2005@mail.ru

Круговорот азота является ключевым механизмом формирования качества воды и определяет общую продуктивность водоема. Аммонификаторы минерализуют азотсодержащие продукты жизнедеятельности и разложения гидробионтов. В процессе их жизнедеятельности выделяется аммиак и соли аммония, который потребляют нитрификаторы и переводят их в безопасные нитраты [1]. Круговорот серы влияет на процесс эвтрофикации водоема, при недостатке кислорода и распаде органического вещества происходит образование сероводорода за счет деятельности сульфатредуцирующих бактерий (СРБ) [2]. Тиобациллы анаэробно окисляя железо и неорганические соединения серы, представляют огромный потенциал для детоксикации ДО, загрязненных тяжелыми металлами [3].

Цель исследования – выявление сообщества бактерий, участвующих в круговороте азота и серы. Объект исследования – донные отложения оз. Кривое и Капустиха. Образцы отбирали согласно ГОСТ 17.15.01-80. Культивирование бактерий элективных питательных средах по ГОСТ Р 54653 2011. Результаты таксономической принадлежности аммонификаторов получили с использованием оборудования ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ.

Во всех пробах ДО выделены аммонификаторы-анаэробы рода *Bacillus. sp*, что свидетельствует о протекании процессов гниения и разрушения белковых соединений. Выделение аммиака обнаружили по наличию характерного запаха аммиака и посинению лакмусовой бумаги. На микропрепаратах выявили Грам⁺ палочки с центральным или терминальным расположением спор и бесспорные формы. Накопление аммиака в среде Виноградского для 1 фазы нитрификации проверяли с реактивом Несслера. При добавлении 2-3 кап. реактива Несслера культуральная жидкость окрашивалась в желтый цвет и отмечали слабый запах аммиака. В образцах со средой для 2 фазы нитрификации образование азотной кислоты по реакции с дефиниламином. В результате культуральная жидкость окрасилась в интенсивно-синий цвет. На микропрепаратах обнаружены овальные и кокковидные клетки, короткие палочки. Наличие тионовых бактерий оценивали по степени помутнения среды и появлению на ее поверхности пленки. Во всех пробах выявили слабое помутнение среды и наличие на поверхности едва заметной пленки. На микропрепарате обнаружены бесспорные Грам⁻ палочки, кокки, подвижные. Присутствие СРБ указывает на накопление органического вещества, что ведет к интенсивному восстановлению сульфата – это в свою очередь является важным фактором минерализации органического вещества в донных отложениях. По наличию стойкого запаха сероводорода судили об активном накоплении СРБ. В мазках обнаружили

Грам⁻ бактерии по форме спириллы и вибрионы. Таким образом бактериальное сообщество ДО озер Кривое и Капустиха представлено аммонификаторами, нитрификаторами, СРБ и тиобациллами.

Литература.

1. Подлесная Г.В. Сусллова М.Ю., Штыкова Ю.Р., Томберг И.В., Елецкая Е.В., Тимошкин О.А., Белых О.И. Сезонные и пространственные вариации численности аммонифицирующих и денитрифицирующих бактерий в сообществах планктона и эпилимниона литорали оз. Байкал // Сибирский экологический журнал. 2021. № 5. С. 641-652.
2. Андреева Д.В. Сульфатредуцирующие бактерии из различных местообитаний реки Амур // Вестник ДВО РАН. 2018. № 4. С. 163-172.
3. Кузякина Т.И., Хайнасова Т.С. Левенец О.О. Биотехнология извлечения металлов из сульфидных руд // Вестник Камчатской региональной ассоциации Учебно-научный центр. Серия: Науки о Земле. 2008. № 2(12). С. 76-86.

ВЛИЯНИЕ ЦИКЛИЧЕСКИХ ЛИПОПЕПТИДОВ *BACILLUS VELEZENSIS* X-BIO-1 НА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ПОЧВ

Дилбарян Д.С., Тесля А.В., Яшников А.В., Васильченко А.С.

Институт экологической и сельскохозяйственной биологии (X-BIO), Тюмень, Россия

d.d.s98@mail.ru

Циклические липопептиды (цЛП) (сурфактины, фенгицины, бацилломицины) известны своей антагонистической активностью в отношении фитопатогенов, включая бактерии, грибы и оомицеты. При этом, позитивная роль, которую играют цЛП в жизни растений, не ограничивается антагонизмом. Известно, что цЛП активируют индуцированную системную устойчивость растений. Вероятно, есть и другие биологические эффекты бактерий в системе «почва-микробиом-растение», реализуемые посредством выработки цЛП.

Цель работы: изучить действие липопептидов *Bacillus velezensis* X-BIO-1 на ферментативную и дыхательную активность почв.

Материалы и методы: липопептиды выделяли из бесклеточной культуральной жидкости *Bacillus velezensis* X-BIO-1 путем осаждения 12М HCl (pH 2.0) с последующим центрифугированием осадка при 8000 rpm 20 мин. Образец лиофилизировали. Для оценки действия липопептидов на микробиологическую активность почв исследовали влияние соединений на рост *Solanum tuberosum* в лабораторных условиях. В почву массой 1,5 кг вносили липопептиды в концентрации 1 мг/кг почвы (ДМСО 2,5%), контроль - 2,5% ДМСО. Об изменениях микробиологической активности почв судили по динамике дыхательной и ферментативной активности на 30 и 60 сутки эксперимента. Ферментативную активность образцов измеряли на микропланшетном ридере с использованием флуоресцентно-меченых субстратов. Базальное дыхание почв (БД) определяли на основе скорости выделения CO₂ из почвы в течение 24 часов инкубации при 22°C и 60% от полной влагоемкости с использованием газового хроматографа Trace GC Ultra. Биомассу почвенных микроорганизмов определяли с помощью метода субстрат-индуцированного дыхания (СИД). Содержание углерода в микробной биомассе (Смик) выражали в мкг на 1 г почвы.

Результаты: Установлено, что активность почвенных ферментов в микрокосмах с внесенными цЛП в концентрации 1 мг/кг почвы к 30 суткам эксперимента была ниже контрольных значений. В частности, активность β-D-1,4-целлобиозидазы, β-1,4-глюкозидазы, β-1,4-ксилозидазы, β-1,4-N-ацетилглюкозаминидазы и кислой фосфатазы была меньше на 16,00-23,97% по сравнению с контролем. Активность L-лейцинаминопептидазы была меньше чем в контроле на 47,89%. К 60 суткам опыта активность ферментов оставалась ниже контрольных значений в среднем на 5,77-50,63%, однако активность L-лейцинаминопептидазы увеличилась на 106,14% по сравнению с контролем. Базальное дыхание почв к 30 и 60 суткам эксперимента было ниже контрольных значений на 43,89% и 57,07%, соответственно. На 60 сутки отмечалось также снижение показателей СИД и Смик относительно контрольных значений на 14,68% и 14,65%, соответственно.

Выводы: циклические липопептиды в концентрации 1 мг/кг почвы при недлительной инкубации оказывали ингибирующее влияние на ферментативную активность β -D-1,4-целлобиозидазы, β -1,4-глюкозидазы, β -1,4-ксилозидазы, β -1,4-N-ацетилглюкозаминидазы, кислой фосфатазы и L-лейцинаминопептидазы. Более длительная инкубация с цЛП приводила к увеличению ферментативной активности L-лейцинаминопептидазы. Липопептиды оказывали подавляющее воздействие на показатели дыхательной активности почвы на 30 и 60 сутки эксперимента.

Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственного задания FEWZ-2024-0005.

КОМПЛЕКС ВИДОВ ЦЕНТРОХЕЛИДНЫХ СОЛНЕЧНИКОВ *ACANTHOCYSTIS* AFF.
TRIFURCA (HAPTISTA: CENTROPLASTHELIDA)

Дмитровская С.В., Полузеров С.А., Мезенцев Е.С.

Санкт-Петербургский государственный университет – кафедра Зоологии беспозвоночных,
Санкт-Петербург, Россия

dmitrovskaya.sovi@gmail.com

Центрохелидные солнечники (Haptista: Centroplasthelida) – широко распространенные свободноживущие гетеротрофные протисты. Для них характерно наличие тонких неветвящихся аксоподий, несущих экструсомы, хорошо заметный центр организации микротрубочек и эксцентрично расположенное ядро. Центрохелиды отличаются разнообразием покровных кремниевых элементов, тонкая морфология которых, традиционно, имеет ключевое значение для идентификации видов.

Вид *Acanthocystis trifurca*, получивший свое название благодаря трем зубцам на дистальных концах радиальных чешуек, описан Каннетом Николсом в 1983 году. Организмы, идентифицированные как *Acanthocystis trifurca*, выделены из морских местообитаний (Чёрное море), пресноводных (болото, термокарстовое озеро, наземные местообитания, реки), а так же из геотермального источника в виде микрофоссилии. Морфология солнечников, определенных как *Acanthocystis trifurca*, схожа по основным определительным признакам, но заметно отличается от данных из первоописания. Диаметр клеток из типовой пресноводной культуры 6-18 мкм. Однако, в литературе, описаны культуры солнечников с диаметром клеток 16,4-36,5 мкм и 24-35 мкм. Варьируют также особенности тонкого строения кремниевых чешуек: некоторые авторы отмечают тангентальные чешуйки инкрустированные гранулами (Plotnikov, 2017; Prokina, 2018), различную длину аксиального утолщения, наличие каймы. Тангентальные чешуйки могут быть эллипсоидные, круглые или грушевидной формы.

Молекулярные данные также не подтверждают монофилию солнечников, которые были идентифицированы как *Acanthocystis trifurca*. Клоны HFzp-1 и HF-20 (*Acanthocystis trifurca*) группируются с *A. aff. myriospina* (AY749629) и неидентифицированным до вида *Acanthocystis* sp. (AY749626), в то время как клон HF-12 (*A. aff. trifurca*) группируется с *A. nichollsi* (Загуменный, 2023). По данным В.В. Златогурского штамм *A. trifurca* группируется с кладой *A. takahashii*.

Нами выделены два штамма солнечников из пресного внутреннего озера острова Мейбл (архипелаг Земля Франца-Иосифа) и из наземной моховой подушки с о. Средний (Керекский архипелаг). Солнечники установлены в лабораторных культурах и изучены с применением световой, сканирующей микроскопии. Также для обеих культур нами были получены фрагменты последовательности гена 18s рРНК. Штаммы обладают разными диапазонами размеров клетки. Часть радиальных чешуек солнечников штамма FJL24.1.5 несут два зубца на дистальном конце, клетки также отличаются отсутствием утолщения по краю тангентальных эллипсоидных чешуек и меньшими размерами покровных элементов. Штамм SR24.1.4 на тангентальных чешуйках имеет более выраженное аксиальное утолщение и узкую

кайму по краю, форма чешуек грушевидная. Сравнение последовательностей гена 18s рРНК показывает структурно значимые различия в варибельных регионах V5-V7 (300-400 п. н.), позволяющие отнести штаммы к разным видам.

Для *A. trifurca* и всех схожих с ним видов необходимо уточнение диагноза на основе подробного описания тонкой морфологии покровных кремневых элементов и подтверждение различий молекулярными данными. Мы предполагаем, что имеем дело не менее чем с тремя разными видами.

Работа выполнена с использованием оборудования МРЦ по направлению «Развитие молекулярных и клеточных технологий», «Культивирование микроорганизмов» и «Нанотехнологии» Научного парка СПбГУ.

ПАТОГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ШТАММОВ АЭРОМОНАД, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ВОДНОЙ СРЕДЫ И РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ

Доколин Д.А., Соколов М.Н., Зайцева Ю.В., Паюта А.А.

Лаборатория биотехнологии и прикладной биоэлементологии – структурное подразделение
ФГБОУ ВО Ярославский государственный университет имени П.Г. Демидова,
Ярославль, Россия

dimondokolin@yandex.ru

Бактерии рода *Aeromonas* – факультативно анаэробные палочковидные грамотрицательные бактерии. Представители данного рода могут быть обнаружены в водах различной солености, почве, а также в микробных сообществах, ассоциированных с водными организмами. Некоторые виды аэромонад являются патогенами, вызывающими инфекционное заболевание рыб и земноводных (аэромоноз). Наиболее известные патогенные представители данного рода – *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas caviae* и *Aeromonas veronii*.

Присутствие в среде вирулентных штаммов бактерий рода *Aeromonas* представляет особую угрозу предприятиям, осуществляющим разведение товарных видов рыб (в том числе радужной форели) в условиях аквакультуры. Высокая плотность содержания рыбы способствует быстрому распространению возбудителя инфекции в популяции. Такие вспышки аэромонозов могут привести к потере до 100% поголовья товарной рыбы и значительному экономическому ущербу для предприятия. Кроме того, зараженные продукты питания могут стать причиной возникновения инфекции у людей (прежде всего, у лиц со сниженным иммунитетом).

Патогенные свойства бактерий рода *Aeromonas* обусловлены наличием у них целого комплекса факторов: гидролитических ферментов, токсинов, устойчивости к некоторым антибактериальным препаратам.

В данном исследовании была проведена оценка патогенного потенциала штаммов аэромонад, выделенных из водной среды, а также из биологического материала радужной форели.

Объектом исследования являлись штаммы бактерий рода *Aeromonas*, выделенные из водной среды и кожных покровов радужной форели: *A. salmonicida* W70, *A. salmonicida* A1 и *A. sobria* TS40. У изолятов оценивали наличие протеолитической, липазной и гемолитической активности. Кроме того, проводили оценку наличия у бактерий рода *Aeromonas* генов, детерминирующих различные факторы патогенности, с помощью полимеразной цепной реакции.

Нами была проведена оценка протеолитической, липазной и гемолитической активностей у исследуемых изолятов аэромонад. Штаммы *A. salmonicida* A1 и *A. salmonicida* W70 продемонстрировали наличие всех трех рассматриваемых ферментативных активностей. Штамм *A. sobria* TS40 проявил только протеолитические и гемолитические свойства.

Скрининг штаммов бактерий рода *Aeromonas* на наличие вышеперечисленных генетических маркеров показал, что изоляты *A. salmonicida* A1 и *A. salmonicida* W70 обладали всеми рассматриваемыми генами факторов патогенности. Штамм *A. sobria* TS40 продемонстрировал наличие генов *lip*, *act* и *fla*, а гены *alt* и *ast* не были выявлены.

Штаммы *A. salmonicida* A1 и *A. salmonicida* W70 в ходе исследования продемонстрировали наличие всех выбранных молекулярно-генетических маркеров, а также проявили гемолитическую, протеазную и липазную активности. Это указывает на более высокий патогенный потенциал данных изолятов по сравнению с *A. sobria* TS40. Данные изоляты были выбраны нами в качестве модельных для проведения исследований, направленных на разработку методов профилактики аэромоназов в условиях аквакультуры.

Работа поддержана грантом РФФ № 24-76-00065.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНОГО CO₂ ПРИ ХЛОРИДНОМ БИОВЫЩЕЛАЧИВАНИИ МЕДНО-ЦИНКОВОГО КОНЦЕНТРАТА

**Дюбарь А.М., Артыкова А.В., Елкина Ю.А., Колосов А.В., Меламуд В.С., Нечаева А.В.,
Марданов А.В., Булаев А.Г.**

Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Москва, Россия

adiubar@yahoo.com

Биогидрометаллургия – группа технологий, использующих биологические системы для извлечения металлов из руд, концентратов и отходов производства, которая является неопасным для окружающей среды подходом ввиду низких затрат электроэнергии и меньшего углеродного следа, а также из-за сравнительно низкого образования поллютантов. Биогидрометаллургическая переработка позволяет извлекать из сульфидных руд такие металлы как медь и цинк. Для повышения эффективности выщелачивания меди и цинка применяют такие подходы, как варьирование температурного режима и внесение дополнительных ионов в среду (хлорида), однако эти приемы являются стрессовыми факторами для микробных сообществ биоокисления.

Цель данной работы – исследовать возможность нивелирования стрессовых воздействий на сообщество биоокисления медно-цинкового концентрата путем внесения дополнительного CO₂.

Объектом исследования был медно-цинковый концентрат, содержащий 16% меди и 5.3% цинка. В первом эксперименте биовыщелачивание осуществляли в цепи из двух реакторов в переменном температурном режиме (45 и 55°C соответственно). Во втором эксперименте во второй реактор цепи вносили в среду NaCl в концентрации 100 мМ. Для определения влияния диоксида углерода на процесс биоокисления в пульпу реакторов осуществляли подачу CO₂ (примерно 0.01 л/мин). В качестве инокулята использовали смешанную пульпу биореакторов, полученную в процессе биоокисления пирит-арсенопиритного сульфидного концентрата при температурах 40–50°C.

Для анализа активности процесса биовыщелачивания определяли pH и Eh среды, содержание ионов Fe³⁺ и Fe²⁺, мышьяка, меди, цинка, численность клеток микроорганизмов в жидкой фазе. Состав микробных сообществ определяли путём высокопроизводительного секвенирования V3-V4 переменных фрагментов генов 16S рРНК.

В первом режиме без дополнительной подачи CO₂ и без добавления хлорида в среду было извлечено 31% меди и 70% цинка. Использование дополнительного CO₂ в 1 режиме позволило извлечь 32% меди и 68% цинка, т.е. не привело к увеличению извлечения металлов. Во втором режиме биовыщелачивания (с добавлением хлорида натрия в среду) было извлечено в жидкую фазу 36% меди и 78% цинка, т.е. использование хлорида позволило несколько увеличить степень извлечения металлов. При этом во втором режиме

использование дополнительного CO₂ в качестве источника углерода позволило увеличить извлечение металлов: было извлечено 42% меди и 84% цинка.

Доминирующими группами микроорганизмов в популяциях биореакторов во всех случаях были бактерии р. *Sulfobacillus* (окислители Fe²⁺ и соединений серы) и археи р. *Ferroplasma* (окислители Fe²⁺). Изменение параметров процесса приводило к изменению соотношения между доминирующими группами микроорганизмов. При этом внесение хлорид иона в среду без использования дополнительного CO₂ приводило к увеличению доли бактерий р. *Sulfobacillus* в популяции, тогда как при использовании дополнительного CO₂ и хлорид иона происходило увеличение доли архей р. *Ferroplasma*.

Таким образом, использование хлорида и CO₂ повлияло на степень извлечения металлов, при этом наблюдались изменения в составе микробных популяций, которые могли быть причиной изменения степени выщелачивания металлов из концентрата.

Работа выполнена при поддержке Российским научным фондом, проект № 21-64-00019.

РОЛЬ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ФИТОСФЕРЫ В КАТАБОЛИЗМЕ И АНАБОЛИЗМЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Жаркова Е.К.

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

e.zharkova@fbras.ru

Фенольные соединения растительной природы являются важными биологически активными веществами, существенно влияющими на биохимические процессы как прокариотических, так и эукариотических организмов. В то же время фенольные соединения, являющиеся ксенобиотиками, ухудшают качество жизни в наземных и водных экосистемах. Для успешного регулирования анаболизма и катаболизма фенольных соединений как в окружающей среде, так и в живых организмах зачастую необходимы микробиологические агенты, обладающие биотехнологическим потенциалом в качестве средств коррекции фенольного метаболизма. В то же время, полифенольные соединения растительной природы являются актуальными средствами регулирования таксономической представленности и, непосредственно, численности микробных сообществ. Таким образом, целью исследования являлось изучение роли микробных сообществ фитосферы растений-производителей полифенольных соединений в катаболизме и анаболизме фенолов и выявление микроорганизмов, обладающих биотехнологическим потенциалом в области коррекции фенольного метаболизма.

Объектами исследования служили микробные сообщества, являющиеся компонентами фитосферы растений семейства Яснотковые (*Lamiaceae* L.). Оценка роли микроорганизмов в катаболизме и анаболизме фенольных соединений выполнялась при помощи методов классической микробиологии, молекулярно-генетического анализа, включая методы полимеразной цепной реакции, секвенирования с необратимым и обратимым терминированием, а также газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

В результате проведенных исследований был оценен вклад и определены генетические характеристики микроорганизмов, участвующих в катаболизме фенольных соединений в ризосфере и филлосфере растений, являющихся производителями фенольных соединений. Доказано влияние отдельных таксонов симбиотических микроорганизмов на биохимические превращения полифенолов в живых растениях. Установлена минимальная ингибирующая концентрация растительных полифенольных соединений на микроорганизмы из различных систематических групп. Проведен корреляционный анализ между содержанием и компонентным составом фенольных соединений в растениях и структурой микробных сообществ их фитосферы. Сформирована микробиологическая коллекция, включающая штаммы, обладающие биотехнологическим потенциалом как для коррекции анаболизма полифенолов в вегетирующих растениях, так и для устранения нежелательных фенольных соединений из естественных и антропогенных местообитаний.

Полученные результаты обладают значимостью для разработки новых экологически безопасных антимикробных препаратов, а также средств на основе штаммов-деструкторов, способных к биодegradации фенольных соединений в случае их нежелательного присутствия в окружающей среде, и биопестицидов, направленных на коррекцию фенольного метаболизма в растениях-продуцентах биологически активных веществ фенольной природы.

АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВЫЕ ИЗОЛЯТЫ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ В КИШЕЧНОМ МИКРОБИОМЕ ЖУЖЕЛИЦ

Желонкина А.Н.¹, Зацаринная Е.А.^{1,2}, Трушицына О.С.¹

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

²Институт проблем промышленной экологии Севера – обособленное подразделение
ФИЦ «Кольский научный центр РАН», Апатиты, Россия

Nastydi2004@gmail.com

Изучение особенностей микробиоты кишечника уже давно вызывает исследовательский интерес. Было показано, что разнообразие микроорганизмов, населяющих кишечника у насекомых может регулироваться многими факторами, включая среду обитания, пищевые предпочтения, стадии жизненного цикла насекомого-хозяина и т.д. Кроме того, установлено, что многие насекомые являются резервуаром бактерий, устойчивых к антибиотикам, способствуя горизонтальному переносу генов антибиотикорезистентности.

В качестве объектов исследования отобраны особи, относящиеся к четырем видам жуков: *Amara aenea*, *Pterostichus melanarius*, *Anchomenus dorsalis*, *Harpalus rufipes*. Виды разделены на две группы по типу питания (зоофаги и миксофитофаги) в соответствии с классификацией И.Х. Шаровой (1981). Особи находились на стадии имаго. Перед микробиологическим исследованием жуки были усыплены. Внешние покровы обрабатывали 70%-ным этанолом для освобождения от микроорганизмов, обитающих на них, и промывали в стерильном физиологическом растворе. Асептически извлекали кишечник и растирали каждый в отдельности в 1 мл физиологического раствора. Для получения чистых культур микроорганизмов из каждой суспензии кишечника исследуемых особей были приготовлены три ряда десятикратных разведений до 10^{-5} включительно. Каждое полученное разведение засеивали на для выделения энтеробактерий – на дифференциально-диагностическую среду Эндо. Посевы на среде Эндо инкубировали при температуре 37°C в течение 24-48 часов. Для подтверждения систематического отношения к порядку Enterobacterales проводили экспресс тест «тяжа» для подтверждения грамотрицательности, оксидазный тест и тест на ферментацию глюкозы до кислоты и газа. Выделено 56 изолятов, отнесенных к энтеробактериям. Определение родовой и видовой принадлежности проводили с помощью тест-системы для ускоренной биохимической идентификации энтеробактерий «Рапид-энтеро 200 М» (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург). Оценка чувствительности к 20 антибактериальным препаратам проводили диско-диффузным методом. Интерпретацию данных производили с использованием критериев EUCAST в программном пакете аналитической системы контроля антибиотикорезистентности «WHONET».

Выявлены различия в составе энтеробактерий, выделенных из кишечника жуков с разной пищевой специализацией. Наибольшее сходство видовых спектров обнаружено среди энтеробактерий жуков-зоофагов. Среди энтеробактерий, выделенных из кишечника

жуков-зоофагов, чаще встречались изоляты *Citrobacter freundii*. У жуков-миксофитофагов преобладали бактерии рода *Erwinia spp.*

Все выделенные изоляты энтеробактерий обладали устойчивостью к антибактериальным препаратам. Наиболее часто отмечена резистентность к бета-лактамным антибиотикам, в первую очередь к ампициллину и цефазолину. Бета-лактамазы расширенного спектра обнаружены у 43,7% изолятов. Наиболее эффективными препаратами в отношении рассматриваемых энтеробактерий оказались препараты группы фторхинолонов.

БАКТЕРИОФАГИ: ОТ ПРОШЛОГО К БУДУЩЕМУ В МИКРОБИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

Журавлев И.Е.

Муниципальное бюджетное общеобразовательное учреждение «Средняя школа № 21
им. Валентина Овсянникова-Заярского», Ханты-Мансийский автономный округ Югра,
Нижневартовск, Россия

iv260908@yandex.ru

Микробиология, как наука о мельчайших представителях живой природы, продолжает развиваться, открывая новые горизонты в изучении бактериофагов. Несмотря на долгую историю исследований, начиная с работ Ханкина и Туорта, интерес к бактериофагам вновь возрастает благодаря их уникальному потенциалу в медицине и биотехнологиях.

Открытие бактериофагов датируется концом XIX века, когда Э. Ханкин заметил антибактериальное действие воды индийских рек. Первые систематические исследования провел Ф. Туорт в 1915 году, определив бактериофаги как инфекционных «агентов», разрушающих «колонии» бактерий. Тем не менее, широкое практическое применение бактериофагов началось лишь в XX веке, особенно в СССР, где были проведены масштабные испытания фаготерапии.

Основные направления развития фаготерапии включают создание персонализированных фаговых коктейлей, разработку новых лекарственных форм (гели, мази, спреи) и интеграцию бактериофагов в комплексную терапию инфекций. Особое внимание уделяется использованию бактериофагов для борьбы с биопленками, где традиционные антибиотики часто неэффективны.

Препараты бактериофагов создаются путём селекции высокоактивных фагов, проявляющих сильную антибактериальную активность. Эти препараты исключают наличие умеренных фагов, способных к трансдукции или лизогенной конверсии. В процессе культивирования фагов на бактериальных клетках-штаммах накапливается биомасса бактериофагов, которая затем проходит тщательную очистку, удаляя остатки лизированных бактериальных клеток, антигенов и токсинов. Производители утверждают, что такая процедура обеспечивает степень очистки на уровне 98–99%.

Современные методы молекулярной биологии позволяют глубже исследовать структуру и функции бактериофагов. Известно, что эти вирусы состоят из нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК), заключенной в белковую оболочку, и обладают высокой специфичностью к определенным видам бактерий. Благодаря этому бактериофаги становятся важным инструментом в борьбе с резистентностью к антибиотикам.

Одним из перспективных направлений является генетическая инженерия бактериофагов, позволяющая создавать искусственные фаги с улучшенными характеристиками. Такие фаги могут использоваться как векторы для доставки терапевтических молекул или в качестве инструментов для изменения генетики бактерий.

Применение бактериофагов для контроля патогенных бактерий в продуктах питания и кормах животных снижает необходимость использования антибиотиков и улучшает безопасность продовольствия. В сельском хозяйстве бактериофаги используются для защиты растений от фитопатогенных бактерий.

Несмотря на значительные преимущества, применение бактериофагов сталкивается с рядом проблем, связанных с их высокой специфичностью и необходимостью точного определения возбудителя инфекции. Это ограничивает универсальность фаготерапии и требует разработки эффективных методов диагностики.

Бактериофаги остаются одним из самых многообещающих инструментов современной медицины и биотехнологий. Последние достижения в генетике и молекулярной биологии открывают новые пути для их эффективного применения. Дальнейшие исследования в этой области позволят расширить сферы использования бактериофагов.

ВЫДЕЛЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ХИМЕРНЫХ БЕЛКОВ НА ОСНОВЕ ЭНДОЛИЗИНА
PLY57 И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ АКТИВНОСТИ В ОТНОШЕНИИ
ПЕПТИДОГЛИКАНА И ПОЛИГЛУТАМАТА

Зиновьева К.Ю.¹, Кулябин В.А.², Скорынина А.В.², Шадрин А.М.²

¹Тульский государственный университет, Тула, Россия

²Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Пушкино, Россия

ksyu.zinoveva.03@bk.ru

В последние годы наблюдается резкий рост инфекций, вызванных бактериями, устойчивыми к антибиотикам. Это ставит перед научным сообществом задачу поиска новых антибактериальных агентов. Одним из перспективных направлений является использование бактериофагов – вирусов бактерий, которые эффективно борются с резистентными патогенами. Важным элементом этого процесса являются эндолизины – ферменты, разрушающие клеточную стенку бактерий в конце литического цикла фагов. Некоторые бактериофаги содержат PGA-деполимеразы, способные разрушать капсулы на основе полиглутамата. Совместное использование эндолизинов и деполимераз может стать новым направлением для разработки альтернатив антибиотикам, особенно против бактерий с множественной лекарственной устойчивостью.

Целью данной работы являлось получение рекомбинантных химерных белков Ply57_PghP и Ply57_Kir-te_domain, сочетающих в себе функции эндолизина и PGA-деполимеразы, и определение их активности в отношении пептидогликана и полиглутамата (PGA).

Объектами исследований являлись рекомбинантные химерные белки, Ply57_PghP и Ply57_Kir-te_domain, полученные в лабораторных условиях. Эти белки состоят из двух частей: эндолизина □ Ply57, PGA-деполимеразы (PghP и белка Kir-te_domain).

Для получения химерных рекомбинантных белков были сконструированы плазмидные конструкции на основе вектора pET33. Сборка осуществлялась методом TEDA (T5 exonuclease-dependent assembly). По итогу были получены плазмиды *pET33_Ply57_PghP* и *pET33_Ply57_Kir-te_domain*. Далее были получены рекомбинантные штаммы *Escherichia coli* BL 21 (DE3) *pET33_Ply57_PghP* и *Escherichia coli* BL 21 Star *pET33_Ply57_Kir-te_domain*. Белки Ply57_PghP и Ply57_Kir-te_domain были выделены и очищены с помощью металл-хелатной хроматографии.

Пептидогликан гидролазную активность химерных белков определяли турбидиметрическим методом с использованием клеток *B. tropicus* ATCC 4342. Для сравнения активности использовали эндолизин Ply57. Пептидогликан гидролазная активность Ply57_PghP составляет около 40-50% по сравнению с Ply57. Наименее активным оказался

белок Ply57_Kir-te_domain, активность которого равна 3-5% от Ply57. Белок Ply57_PghP сохраняет активность в диапазоне от 10 до 50 °С, при 70-80 °С полностью теряет активность. Белок Ply57_Kir-te активен в пределе температур от 10 до 40 °С, при 50 °С активность уменьшается до 30%. С 60 до 80 °С белок инактивируется.

PGA деполимеразную активность определяли по степени деградации полиглутамата, разделенном в 6% денатурирующем полиакриламидном геле. В результате было показано, что химерные белки способны деполимеризовать PGA. Для разрушения одинакового количества PGA нужно увеличить время инкубации белка Ply57_Kir-te не менее, чем в 4 раза. Белок Ply57_PghP проявляет PGA деполимеразную активность в диапазоне от 10 до 40 °С. Ply57_Kir-te так же активен в пределе от 10 до 40 °С.

Таким образом в ходе работы были получены рекомбинантные химерные белки Ply57_PghP (59,72 kDa) и Ply57_Kir-te_domain (94,8 kDa) и проверена их активность в отношении пептидогликана и полиглутамата.

ГАЛОАЛКАЛОФИЛЬНЫЕ БАКТЕРИИ СОЛЕННЫХ ОЗЕР БАРГУЗИНСКОЙ КОТЛОВИНЫ (РЕСПУБЛИКА БУРЯТИЯ)

Иванова А.Д.¹, Лаврентьева Е.В.^{1,2}

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Бурятский государственный университет», Улан-Удэ, Россия

²Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ, Россия

alisaivanova335@gmail.com

Соленые озера Гуджирганское и Нухэ-Нур, расположенные на территории Баргузинской котловины – это полиэкстремальные системы, которые демонстрируют щелочные значения рН в сочетании с высокой минерализацией (Lavrentyeva et al., 2023). Пробы были отобраны в августе 2024 года при температуре +21°C. Исследования показали, что вода озера характеризуется щелочными значениями рН, так в озере Гуджирганское рН составил 9,8, в озере Нухэ-Нур – 11. Озеро Гуджирганское являлось наиболее высокоминерализованным, и на момент отбора проб минерализация составила 100 г/дм³. Озеро Нухэ-Нур является солоноватым озером и его минерализация составила около 8 г/дм³. По гидрохимическому составу озера также отличались: в озере Гуджирганское доминировал сульфат-ион (54 г/дм³), тогда как в Нухэ-Нур гидрокарбонат ион (49 г/дм³). Щелочные значения рН и высокая минерализация способствуют развитию галоалкалофильного микробного сообщества в этих экосистемах. Нами определен количественный состав протеолитических бактерий в донных осадках изученных озер. Результаты культивирования показали высокую численность протеолитических аэробных и анаэробных бактерий при содержании солей 5 г/л – до 1 млн. кл/мл. Подсчет бактериальных клеток при концентрации соли 150 г/л выявил уменьшение численности у протеолитических бактерий аэробов – до 100 тыс. кл/мл и анаэробов – до 100 кл/мл. Методом высокопроизводительного секвенирования по гену 16s рРНК оценено разнообразие микробных сообществ озер. Выявлено, что в донных осадках исследованных озер развиваются специализированные алкало- и галофильные микробные сообщества. Доминирующими филумами в микробном сообществе всех озер являются Proteobacteria, Firmicutes и Bacteroidetes, с отличиями на уровне классов и родов. Показано, что большая доля этих бактерий принадлежит гетеротрофным бактериям, потенциально способных в природных экосистемах участвовать в трансформации органического вещества.

АНТАГОНИСТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГРИБНОГО СИМБИОТИЧЕСКОГО СООБЩЕСТВА ЧЕРНОГО ТРЮФЕЛЯ

**Имидоева Н.А., Малыгина Е.В., Бельшенко А.Ю., Мартынова Е.И.,
Вавилина Т.Н., Аксёнов-Грибанов Д.В.**

Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

nat.imidoeva@gmail.com

Трюфельные грибы относятся к классу аскомицетов, образующих симбиотические ассоциации с корнями различных древесных растений. Плодовые тела данных грибов состоят из разнообразного сообщества микроорганизмов, включающего бактерии, дрожжи, грибы. Эти микроорганизмы играют существенную роль в формировании органолептических свойств трюфелей. Кроме того, грибные симбионты оказывают значительное влияние на экологию трюфелей, повышая устойчивость к патогенам и участвуя в формировании уникальных характеристик плодовых тел.

Химический состав плодовых тел трюфелей включает углеводы, белки, липиды, терпеноиды, витамины и другие биологически активные вещества. Эти компоненты определяют не только пищевую ценность трюфелей, но и их потенциальные фармакологические свойства, включая антимикробную и антиоксидантную активность.

Целью данного исследования являлось выделение чистых культур грибных симбионтов черного трюфеля и оценка антагонистических свойств. Для этого фрагменты глебы плодовых тел черного трюфеля *Tuber* sp. были гомогенизированы в стерильной дистиллированной воде и посеяны газомом на питательные среды MEA и PDA. Для предотвращения контаминации в среды были добавлены антибиотики, такие как цефтриаксон и фурацилин. Культивирование происходило при + 24°C с последующей молекулярной идентификацией культур.

Для оценки антагонистических свойств использовали метод лунок. Для этого в агаризованную питательную среду, предварительно посеянной газомом тест-штабмом, вырезали лунки диаметром 1,5 см. Тестируемые штаммы смешивали с мягким агаром Сабуро и вносили в лунки. По истечении недели измеряли зону ингибирования роста тест-штабма вокруг лунки.

Результаты эксперимента показали, что антагонистическую активность проявили 6 штаммов из 8 исследованных. Наибольшую активность продемонстрировал штамм *Fusarium* sp., подавлявший рост 6 других штаммов с максимальной зоной ингибирования 3,3 см. Штамм *Trichothecium* sp. ингибировал рост *Clonostachys* sp. со средней зоной подавления 2,7 см. Другие штаммы, *Trichothecium* sp. и *Hypopichia* sp., также продемонстрировали антагонизм, ингибируя, в частности, *Clonostachys* sp. и *Penicillium* sp.

Таким образом, проведенное исследование позволило получить чистые культуры грибных симбионтов черных трюфельных грибов, а также оценить их антагонистические свойства. Наибольшую активность проявил штамм *Fusarium* sp., что подчеркивает его потенциальную роль в регуляции видового разнообразия симбиотических грибов. Результаты

исследования также подтверждают, что антагонистические взаимодействия между грибными симбионтами могут быть важным механизмом поддержания здоровья и устойчивости трюфелей. Дальнейшее изучение этих процессов может способствовать разработке методов биоконтроля и улучшению культивирования трюфельных грибов в искусственных условиях.

Работа поддержана грантом РФФИ № 22-76-10036.

АЦИДОТОЛЕРАНТНЫЕ АКТИНОМИЦЕТЫ КАК ИСТОЧНИКИ АНТИМИКРОБНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Ионова А.Д.¹, Синёва О.Н.²

¹Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский политехнический университет», Москва, Россия

²Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе», Москва, Россия

avedeneeva@mail.ru

Преодоление антибиотикорезистентности является важнейшей задачей современного общества. Для создания препаратов, эффективных в отношении резистентных микроорганизмов, на современном этапе актуален поиск новых продуцентов антибиотических веществ, обитающих в экстремальных условиях. Ацидотолерантные актиномицеты представляют собой перспективный источник получения новых соединений, обладающих антибактериальным и антифунгальным действием, что обуславливает их биотехнологический потенциал применения в медицине, сельском хозяйстве и животноводстве.

На сегодняшний день известны ацидотолерантные актиномицеты, принадлежащие к родам *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Catenulispora*, *Actinoallomurus*, *Actinospica* и др.

Целью исследования являлось оценка антибиотической активности 20 штаммов ацидотолерантных актиномицетов, выделенных из закисленной почвы (рН 5-5,5). Антимикробную активность определяли стандартными методом перпендикулярного штриха и методом лунок в агаре в отношении тест-организмов: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 9341, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pectobacterium carotovorum* ВКМ - 1247, *Pectobacterium brasiliense* ВКМ - 3424, *Pectobacterium versatile* ВКМ - 3419, *Saccharomyces cerevisiae* ИНА 01042, *Candida albicans* ATCC 14053, *Fusarium oxysporum* ВКПМ F-148, *Fusarium solani* ВКПМ F-890. Определение антимикробной активности методом перпендикулярного штриха проводили на плотной питательной среде Гаузе 2. Время культивирования штаммов актиномицетов составляло 7 суток при температуре 28°C. Зоны подавления роста тест-организмов регистрировали через 24 часа после нанесения. Для оценки антибиотической активности методом лунок актиномицеты культивировали на жидкой питательной среде Гаузе 2 при температуре 28°C и скорости шейкера 200 об/мин. Образцы культуральной жидкости отбирали на 5 и 7 сутки роста актиномицетов. Бактериальные тест-культуры наносили на чашки со средой Мюллера-Хинтона, грибные – на среду Мюллера-Хинтона с добавлением 2% глюкозы. Результаты регистрировали через 24 часа.

В результате экспериментов установлена высокая (зоны ингибирования более 10 мм) антимикробная активность, определенная методом перпендикулярного штриха, для штаммов актиномицетов 26л, 69л, 73л, 103л в отношении грамположительных бактерий, для штаммов 26л и 59л в отношении грамотрицательных бактерий. Зоны ингибирования роста *S. cerevisiae* и *C. albicans* более 15 мм были зарегистрированы у штаммов 69л, 88л и 89л. При глубинном

культивировании для штамма 53л была установлена самая высокая антимикробная активность в отношении грамположительных бактерий, в том числе *S. aureus* и грибов. Штаммы 59л, 43л и 34л обладали антифунгальной активностью в отношении фитопатогенных грибов *F. oxysporum* и *F. solani*. Зоны подавления роста фитопатогенных бактерий *P. versatile* отмечены для штаммов 53л и 69л.

Выполненное исследование показало, что данные acidотолерантные актиномицеты обладают антибиотической активностью. Особый интерес представляет активность изучаемых штаммов против фитопатогенов. Целесообразно дальнейшее изучение почвенных acidотолерантных актиномицетов для решения практических задач в сельском хозяйстве и медицине.

РОЛЬ БИОПЛЕНКИ В СУПРЕССИИ ВИРУЛЕНТНОСТИ ПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ В ФИЛЛОСФЕРЕ ТИМЬЯНА ОБЫКНОВЕННОГО (*THYMUS VULGARIS* L.)

Казакова В.М.¹, Жаркова Е.К.²

¹«Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»,
Москва, Россия

²«Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук», Москва, Россия

varvaritoo@yandex.ru

Филлосфера, являясь экстремальной средой обитания для микробиоты, поспособствовала трансформации сообщества микроорганизмов в сложно-ассоциированную структуру, называемую биопленкой. Биопленки – это кластеры микроорганизмов, которые прикреплены к поверхности и/или друг к другу и встроены в самостоятельную матрицу. Эти сложные микробные ассоциации могут сильно варьироваться по архитектуре и составу, но также они имеют ряд общих свойств, которые объединяют их в данную форму выживания на эпифитных поверхностях. Биопленки имеют чрезвычайно важную роль для растения-ассоциированных бактерий, архей и грибов, поскольку они защищают данные микроорганизмы от абиотических и биотических стрессов, таких как УФ-излучение, колебания рН, осмотический стресс и обезвоживание. Важная роль биопленок заключается в их ингибирующем действии на определённые виды патогенных микроорганизмов, тем самым не давая проникнуть им в ткани растений, и вызвать различные заболевания. Известно, что наряду с другими факторами, обеспечивающими иммунитет растений, эпифитная микробиота служит первичным барьером для защиты растений от попадающих из окружающей среды сапрофитных, условно-патогенных и патогенных микроорганизмов.

Актуальность изучения филлосферы Тимьяна обыкновенного (*T. vulgaris* L.) связана с высоким биологическим потенциалом данного вида, в частности, со значительной антимикробной активностью эфирного масла. Культивация этого ценного лекарственного растения является важной практической задачей, причем знание об эпифитном микробиоме является неотъемлемым аспектом его успешного культивирования. Целью исследования было изучение фунганального сообщества филлосферы Тимьяна обыкновенного (*T. vulgaris* L.) – ценного лекарственного растения, синтезирующего в надземных органах эфирное масло, обладающее высокой антимикробной активностью по отношению к микроорганизмам из различных систематических групп.

Таксономическое разнообразие грибов на уровне семейств характеризовалось доминированием микроорганизмов, способных повреждать сельскохозяйственные растения. доминирующим семейством было *Cladosporiaceae* и составлял около 34%.

Известно, что род *Cladosporium* обладает двойственным эффектом на растительную ткань: он может действовать как фитопатоген, вызывая при этом пятнистость листьев или заражая стебли и плоды, но также это распространенный эндофит растений, который может генерировать биологически активные метаболиты, служащие в качестве действующего

вещества экологически безопасных бактерицидных препаратов. Менее 1 % уступало семейство *Didymellaceae*, которое вызывает поражение листьев и стеблей. Семейство *Pleosporaceae*, способное вызывать альтернариоз, составляло 12% от всего порядка грибов. Семейство *Phaeosphaeriaceae*, найденное в количестве 3%, является возбудителем септориоза злаковых культур.

Таким образом, в подавлении вирулентности патогенных грибов ключевую роль играет биопленка, которая служит первичным барьером для защиты растений от попадающих из окружающей среды сапрофитных, условно-патогенных и патогенных микроорганизмов.

ВЛИЯНИЕ ХЛОРАМФЕНИКОЛА И ЭКЗОГЕННОГО ЦИСТИНА НА УРОВЕНЬ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ТИОЛОВ В КЛЕТКАХ *MYCOBACTERIUM SMEGMATIS*

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

Цистеин является жизненно необходимым компонентом клетки, он входит в состав белков и глутатиона и является источником серы для многих других молекул. Однако его избыток внутри клетки способствует увеличению пула свободного железа (Fe^{2+}), что в итоге может приводить к образованию высокотоксичных гидроксильных радикалов в ходе реакции Фентона. Чтобы избежать этих негативных последствий, бактериальные клетки должны строго регулировать уровень цистеина. Ранее было показано, что при торможении синтеза белка в клетках *Escherichia coli*, в том числе под действием хлорамфеникола (ХФ), одним из основных механизмов регуляции уровня цистеина является его встраивание в молекулу глутатиона. Грамположительные бактерии *Mycobacterium smegmatis* не содержат глутатион, однако имеют функциональный аналог – микотиол. Целью настоящей работы было изучить особенности гомеостаза цистеина и роль микотиола при действии ХФ и экзогенного цистина в клетках *M. smegmatis*.

Объектом исследования служил штамм *M. smegmatis* mc²155. Бактерии выращивали на минимальной среде М9 (дополнительно содержащей 0.05% твин, 0.4% глицерина, 1 мМ FeCl₃ и микроэлементы) с глюкозой (0.5%). Ночную культуру разбавляли в 100 мл свежей среды до начальной OD₆₀₀ 0.2 и культивировали в 250-мл колбах на термостатируемом шейкере (37 °С, 150 об/мин) до OD₆₀₀ 0.4, после чего в среду вносили 25 мкг/мл ХФ или 30 мМ цистина и продолжали инкубацию. 15 мл культуры центрифугировали, клеточный осадок ресуспендировали в 0.5 мл теплого (60°С) 50% ацетонитрила, содержащего 20 мМ Трис-НСl (рН 8) и 2 мМ монобромбимана. Через 15 мин инкубации при 60°С в темноте, добавляли 2.5 мкл 5N метансульфонової кислоты. Белок и клеточный дебрис осаждали, супернатант использовали для измерения. ВЭЖХ анализ проводили на хроматографе Shimadzu (Япония) с флуоресцентным детектором. 20 мкл образца, разведенного в 4 раза в 10 мМ метансульфонової кислоте, вводили в колонку C18 Phenomenex (США) (4,6 × 250 мм, размер частиц 5 мкм). В качестве элюента А использовали 0.25% уксусную кислоту, рН 3.5; элюент В – метанол. Условия разделения: 0 мин 15% В; 5 мин 15% В; 15 мин 23% В; 45 мин 42% В, с последующей отмывкой 10 мин элюентом В и 10 мин 15% В. Детектирование флуоресценции проводилось при λ_{ex} 395 нм и λ_{em} 475 нм.

Для идентификации низкомолекулярных тиолов использовали стандартные растворы. Сравнение образцов культуры *M. smegmatis*, необработанных и предварительно обработанных тиоловым реагентом NEM, выявило наличие хроматографических пиков, соответствующих цистеину, микотиолу (MSH) и сульфиду. Было обнаружено, что обработка клеток ХФ приводит к повышению уровней цистеина и MSH в 1.8 и 1.3 раза через 30 мин, и в 2.4 и 1.6

раз через 90 мин, соответственно. При этом незначительное повышение концентрации сульфида в первые 30 мин ответа на ХФ сменялось снижением его уровня. Добавление цистина (окисленной формы цистеина) в среду культивирования вызывало повышение уровня MSH в среднем в 50-100 в течение 60 мин экспозиции, а также увеличение концентрации сульфида в 5-15 раз. Также в ходе эксперимента был идентифицирован цистеин, не детектируемый до добавления цистина. В контрольных условиях концентрация MSH увеличивалась только в 2.8 раза, а уровень цистеина был ниже пределов чувствительности метода в течение всего эксперимента. Это свидетельствует о восстановлении экзогенного цистина в цистеин и его включении в состав микотиола.

Таким образом, было показано, что микотиол может выступать в качестве буфера свободного цистеина в клетке, что наиболее выражено при внесении экзогенного цистина.

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда № 22-14-00093.

ПРЕДОТВРАЩЕНИЕ БИОПОВРЕЖДЕНИЙ ПОЛИМЕРНЫХ КОМПОЗИЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ

Кацюрба Е.А., Фуфыгина Е.С., Яковлева Г.Ю.

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

katya.mironskaya@mail.ru

Одним из наиболее эффективных способов повышения стойкости полимерных композиционных материалов (ПКМ) является использование токсичных для микроорганизмов дисперсных, в том числе субмикронных частиц наполнителей, таких как, частицы серебра, нитрата серебра, оксида меди, хромата ртути и так далее. Целью данной работы являлась оценка влияния различных концентраций Cu_2O на устойчивость образцов полимерного композиционного материала к воздействию микроскопических грибов.

Образцы полимерного материала были предоставлены д.т.н, проф., зав. межвузовской междисциплинарной лабораторией КНИТУ/КАИ М.П. Данилаевым. В эпоксидный полимер вводили частицы Cu_2O с массовой концентрацией 0.05 ± 0.01 %, 0.16 ± 0.02 %, 0.33 ± 0.03 %, 0.50 ± 0.05 %, 0.67 ± 0.07 %, 0.83 ± 0.09 % и 1.10 ± 0.10 % по массе в матричном полимере как в некапсулированной, так и в капсулированной полилактидом форме. В качестве контроля использовали эпоксидный полимер, не содержащий частиц Cu_2O . Для определения грибостойкости, образцы ПКМ опрыскивали стерильной средой Чапека-Докса (создание условий, имитирующих минеральное и органическое загрязнение) и помещали в стерильные контейнеры. Для создания оптимальных условий для прорастания спор микромицетов и их роста испытание проводили при температуре 30°C и относительной влажности воздуха более 90%.

Уже на 3 сутки инкубирования на поверхности образца без частиц и на образцах с концентрацией Cu_2O 0.05 % и 0.16 % отмечали рост микроскопических грибов, идентифицированных по культурально-морфологическим признакам как *Aspergillus niger*. Начиная с 7 суток инкубирования на образце без Cu_2O и образцах с некапсулированными частицами Cu_2O в концентрации до 0.67% наблюдали интенсивный рост *A. niger*. Вне зависимости от вариантов внесения частиц, наряду с *A. niger* был отмечен рост других микромицетов родов *Aspergillus* и *Penicillium*, однако при дальнейшем инкубировании их рост был полностью подавлен. При более высоких концентрациях Cu_2O рост микроскопических грибов был незначительным. На 28 сутки инкубирования площадь обрастания образцов с массовой концентрацией Cu_2O 0.05 % по массе в матричном полимере как капсулированными полилактидом, так и некапсулированными, достоверно не отличалась от контрольного (без Cu_2O) образца. Внесение оксида цинка в концентрации 0.16 % и 0.33 % привели к уменьшению площади обрастания в 1.4 раза (для незаключенного в капсулу Cu_2O) и в 1.6 раза (для капсулированного Cu_2O) по сравнению с контрольным вариантом. При дальнейшем увеличении концентрации частиц оксида меди, отмечалось снижение площади поражения образцов. При массовой концентрации Cu_2O 1.10 % площадь обрастания была в 2.8 раза (для

некапсулированного Cu_2O) и 4.7 раза (для капсулированного Cu_2O) меньше, чем обрастание образцов без Cu_2O .

Спустя 28 суток образцы отмыли от обрастания микромицетами. Микроскопия с использованием сканирующего электронного микроскопа Carl Zeiss AURIGA CrossBeam с SDD Inca X-Max 80 mm^2 (Германия) показала наличие сохранившихся гиф микромицетов на поверхности образцов с некапсулированными частицами.

Следовательно, внесение Cu_2O в полимерные композиционные материалы привело к увеличению их грибостойкости в условии минерального и органического загрязнения. Площадь поражения образцов *Aspergillus niger* уменьшалась с увеличением концентрации дисперсных частиц. Для образцов, с капсулированными частицами, такое уменьшение было более значительным.

АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА И КИНЕТИКА ВЫСВОБОЖДЕНИЯ
ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОГО ЛИЗИНА LYSSi3-LK, ИНКАПСУЛИРОВАННОГО
В АЛЬГИНАТНЫЙ ГЕЛЬ

Климова А.А., Дудун А.А., Антонова Н.П., Васина Д.В.

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного
академика Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Москва, Россия

arina.klimova10012001@gmail.com

Инфекции кожи и мягких тканей (ИКМТ), в особенности, раневые инфекции, развиваются под действием полирезистентных бактерий, образующих поливидовые консорциумы, что приводит к долгосрочному лечению с применением ударных доз антибиотиков. Зачастую это сопровождается глубоким проникновением инфекции с последующим некрозом ткани. Для борьбы с ними предпочтительны наружные гидрофильные лекарственные формы, оказывающие защитное действие и обеспечивающие адекватное кондиционирование раны, регуляцию течения раневого процесса на фазах воспаления и регенерации. Тем не менее, спектр антибактериальных гелей сейчас ограничен, и существует острая необходимость в разработке специализированных средств для борьбы с кожными инфекциями.

Перспективным направлением антимикробной терапии является применение эндолизинов, так как вероятность развития резистентности в их отношении низка, что позволяет применять их в том числе и при длительных курсах лечения. Ранее нами был получен модифицированный фермент LysSi3-LK, обладающий антимикробным действием в отношении грамотрицательных бактерий группы ESKAPE, а также активный в отношении бактериальных биопленок. В качестве безопасной и биodeградируемой основы для геля нами был использован бактериальный альгинат, обладающий гидрофильными свойствами, позволяющими включать эндолизин в гель при щадящих условиях без денатурации и деградации белка. Однако, поскольку альгинаты несут отрицательный заряд, а модифицированный лизин – положительный, необходимо оценить способность лизина к высвобождению из гелевого матрикса, исключить отрицательное влияние альгината на антимикробные свойства фермента и его стабильность.

В ходе работы был использован высокомолекулярный бактериальный альгинат, полученный при культивировании *Azotobacter vinelandii* 12. С целью исследования свойств эндолизина в составе антимикробной композиции были получены 1, 2 и 4% альгинатные гели с концентрацией эндолизина 0,1 и 0,5 мг/мл. Было установлено, что минимальной эффективной концентрацией эндолизина в геле в отношении полирезистентных штаммов *Acinetobacter baumannii* является концентрация фермента 0,5 мг/мл. При этом, концентрация альгината не влияла на результат. Данные составы также элиминировали бактериальные биоплёнки. Была показана способность альгинатного матрикса, богатого отрицательно заряженными группами, связывать эндолизин LysSi3-LK, содержащий катионный пептид, с

сохранением активности и структурной целостности лизина и обеспечивать его пролонгированное высвобождение с достижением эффективных концентраций. Полученные результаты продемонстрировали, что разработка антибактериальных композиций с использованием эндолизина и бактериального альгината является перспективным направлением для дальнейших исследований.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-74-10027, <https://rscf.ru/project/23-74-10027/>

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ПАРВОВИРУСОВ СВИНЕЙ В ПОПУЛЯЦИИ ДИКИХ КАБАНОВ РОССИИ

Комина А.К., Кучерук О.Д.

Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский
институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко
Российской академии наук, Москва, Россия

komina.a.k@yandex.ru

Парвовирус свиней (PPV1) снижает общую производительность свиноводческих хозяйств, поскольку вызывает нарушение репродуктивной функции свиноматок: рождение мумифицированных или слабых поросят, прохолосты и малочисленные помёты. В отличие от PPV1 важность новых парвовирусов свиней (PPV2-8) для здоровья поголовья плохо изучена. Эти вирусы были обнаружены как у свиней с различными клиническими признаками, так и у здоровых. Парвовирусы свиней (PPVs) широко распространены по всему миру, и во многих странах регулярно проводят мониторинги инфекции. Более того, сообщалось об их обнаружении у диких кабанов. Однако данные о распространении PPVs в России ограничены. Поэтому целью данного исследования было изучение распространения и генетического разнообразия парвовирусов свиней 1-7 вида в популяции диких кабанов России.

Были проанализированы образцы тканей (селезенки, легких и лимфатических узлов), полученные от 48 диких кабанов из Московской, 35 - из Тверской и 25 - из Белгородской области в течение 2021-2024 годов. Нуклеиновые кислоты выделяли с помощью набора «РИБО-преп» (АмплиСенс, Россия) согласно протоколу производителя. ПЦР-анализы в режиме реального времени для обнаружения генома PPV1 проводили с использованием коммерческой тест-системы (Ветбиохим, Россия). Для выявления ДНК PPV2-PPV7 использовали праймеры и зонды из доступных опубликованных данных. Из положительных образцов были амплифицированы участки геномов и секвенированы по Сэнгеру. Филогенетический анализ проводили в программе MEGA 7.0, для построения дендрограмм использовали метод максимального правдоподобия.

Результаты исследования показывают, что в популяции диких кабанов России циркулируют семь видов PPVs. Наиболее распространенными видами были PPV7 (59,3%) и PPV3 (49,1%). PPV1 был обнаружен у 27 диких кабанов (25%). В каждом регионе были зафиксированы случаи одновременного выявления от двух до четырех видов вирусов. Исследование не выявило какой-либо значимой взаимосвязи распространенности PPVs с полом и возрастом животных.

Для филогенетического анализа были получены полные нуклеотидные последовательности генов капсидных белков (VP1/VP2) 17 изолятов PPV1. Большинство из них были отнесены к кластеру 1b, к которому относят изоляты из Европы и высокопатогенный штамм 27a. Два изолята находились в том же кластере 1d, что и высоковирулентный штамм Kresse. Один изолят не был отнесен ни к одному кластеру.

Кроме того, были получены три нуклеотидные последовательности генов VP1/VP2 - PPV2, PPV3 и PPV7, и по одной последовательности для PPV5 и PPV6. Изоляты PPV2, PPV3 и PPV7 были отнесены к различным кластерам вместе со штаммами, полученными от домашних свиней и диких кабанов из разных стран. Изолят PPV6 был включен в ту же группу, что и российский изолят от домашней свиньи, в то время как PPV5 не входил ни в одну группу с представителями из нашей страны.

Работа выполнена при финансовой поддержке 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.

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ БИОТРАНСФОРМАЦИИ
2,4,6-ТРИХЛОРБИФЕНИЛА ШТАММАМИ АЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ

Королев Н.А., Кирьянова Т.Д.

Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения РАН, Пермь, Россия

nicolay.korolyov@outlook.com

Полихлорбифенилы (ПХБ) являются сложными органическими загрязнителями, запрещенными Стокгольмской конференцией в 2001 году. Очистка от данных веществ включает методы микробиологической ремедиации, поэтому поиск активных биодеструкторов ПХБ и их производных представляет огромный интерес.

Выявление бактерий, осуществляющих разложение или трансформацию ПХБ, происходит с использованием модельных соединений. При первичном скрининге используется незамещенный бифенил. Далее, для изучения биодegradативного потенциала отобранных штаммов, используют низкохлорированные конгенеры, как менее токсичные. Перспективными для биоремедиационных технологий считаются штаммы, способные разрушать конгенеры ПХБ с тремя и более заместителями в молекуле.

Цель настоящего исследования – изучить особенности трансформации трихлорированного бифенила (2,4,6-трихлорбифенила) штаммами аэробных бактерий, отобранными из лабораторной коллекции биодеструкторов бифенила.

Скрининг проводили с применением метода «отмытых» клеток, анализ содержания 2,4,6-трихлорбифенила (2,4,6-триХБ) осуществляли газохроматографическим методом с масс-селективным детектором (ГХ-МС), наличие метаболитов в культуральной жидкости определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Удельную скорость роста рассчитывали по стандартной формуле на основании изменения оптической плотности культуры.

В результате первичного скрининга были отобраны штаммы, выделенные ранее из почв ООО «Северо-Волжский завод химикатов» (г. Чапаевск, Самарской области) (*Brevibacterium* sp. СА, *Leucobacter* sp. ВВ) и почв охраняемой природной территории «Осинская лесная дача» (Пермский край) (*Achromobacter* sp. Osa 3, *Achromobacter* sp. Osa 7, *Achromobacter* sp. Osa 25, *Pseudomonas* sp. Osa 28).

Установлено, что при культивировании в минеральной среде с внесением 2,4,6-триХБ как единственного источника углерода, удельная скорость роста штаммов составила: *Brevibacterium* sp. СА – 0,065 сут⁻¹, *Leucobacter* sp. ВВ – 0,071 сут⁻¹, *Achromobacter* sp. Osa 3 – 0,025 сут⁻¹, *Achromobacter* sp. Osa 7 – 0,017 сут⁻¹, *Achromobacter* sp. Osa 25 – 0,141 сут⁻¹, *Pseudomonas* sp. Osa 28 – 0,122 сут⁻¹.

Эффективность деструкции 2,4,6-триХБ штаммами *Achromobacter* sp. Osa 25 и *Pseudomonas* sp. Osa 28 достигала 94,5 % и 91,7 % соответственно.

Анализ метаболического профиля показал, что основным промежуточным соединением, образующимся при трансформации 2,4,6-триХБ исследуемыми штаммами является 2,4,6-трихлорбензойная кислота. Ее концентрация в культуральной среде варьировала от 2 мг/л до 12 мг/л. По-видимому, метаболизм 2,4,6-триХБ у исследуемых штаммов протекает по классическому бифенильному пути с начальным диоксигенированием незамещенного ароматического кольца молекулы субстрата.

Таким образом, отобраны штаммы аэробных бактерий, способные эффективно осуществлять трансформацию трихлорированного конгенера ПХБ.

Работа поддержана грантом РФФИ № 24-24-00498.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ПАУ-ДЕГРАДИРУЮЩЕГО ШТАММА
ENTEROBACTER LUDWIGII, СПОСОБНОГО К ДЕНИТРИФИКАЦИИ

Коцарев В.И., Пуликова Е.П., Дёмин К.А., Горовцов А.В., Минкина Т.М.

Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского,
Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

kotsarev@sfedu.ru

Одним из важнейших классов органических поллютантов являются полициклические полиароматические углеводороды (ПАУ). Они оказывают негативное воздействие как на человека, так и на природные экосистемы. Одним из методов очистки природных сред от этих веществ является использование биопрепаратов на основе микроорганизмов, разлагающих ПАУ. В условиях почвы часто бывает недостаток кислорода, в связи с чем способность штаммов к анаэробной деградации ПАУ является необходимым условием успешного применения биопрепарата. Носителями, на основе которых он сделан, могут быть различные материалы, например биосорбент из органических остатков (биочар). Целью данной работы было получение штамма деструктора ПАУ, способного к анаэробной деградации и его инокуляция на носитель – биочар.

Из почв углеотвалов Ростовской области были выделены штаммы микроорганизмов деструкторов ПАУ. Выделение проводили методом микробиологического посева серийных почвенных разведений на агаризованной минеральной среде Эванса в атмосфере фенантрена. После получения чистых культур, для отбора в коллекцию эффективных деструкторов использовался критерий накопления биомассы в жидкой среде Эванса, определяемый по мутности в единицах МакФарленда.

Один из выделенных штаммов был идентифицирован как *Enterobacter ludwigii* (99,65% идентичности) методом секвенирования 16S рРНК. Была определена активность нитритредуктазы и нитратредуктазы штамма по активности утилизации нитрита и образования нитрита из нитрата, соответственно. Также, была измерена активность разложения ПАУ (пирен и фенантрен) в песке. В качестве носителя для *E. ludwigii* был использован биочар из соломы пшеницы. Инокуляция производилась по методике, описанной в патенте RU 2819374. Из образцов инокулированного биочара была выделена тотальная ДНК и проведено её шотган-секвенирование на платформе MGI (DNBSEQ). Полученный метагеномный датасет подвергли следующей обработке: удаление человеческой ДНК (BWA); сбор контигов (MEGANIT); биннинг контигов (Maxbin2, Metabat2 и CONCOCT); получение консенсусных бинов (DASTool); оценка качества и таксономической принадлежности бинов (CheckM и GTDB-tk). Бины с полнотой сборки >60% и контаминацией <15% считали отдельными геномами. Среди собранных геномов определили и взяли в анализ геном, классифицированный как *E. ludwigii*, который аннотировали с помощью программ EggNOG и базы данных KEGG.

Собранный геном *E. ludwigii* имел полноту сборки 97.38%, а также 12% среднего покрытия сырыми метагеномными прочтениями; это свидетельствует о том, что полученный

изолят *E. ludwigii* был успешно инокулирован на биочар. В геноме изолята были обнаружены гены денитрификации (*narGHI*), процессов ассимиляционного (*nasAB*) и диссимиляционного (*narGHI*, *nirBD*) восстановления нитратов, а также гомологи генов деградации фенантрена и пирена (*pht4*, *pht3*, *phtAaBC*, *phdE*, *phdK*, *nahB*). Это, в совокупности с наличием у данного штамма нитрит- и нитратредуктазной активностей ($2,6 \pm 0,06$ и $0,22 \pm 0,05$ мкг N/мл суспензии штамма мутностью 0,5 единиц МакФарленда), а также ПАУ-деградирующей активности в песке (убыль суммы ПАУ за 2 недели – 4,61%), позволяет говорить о возможности анаэробной деградации ПАУ. В связи с полученным результатом, выделенный *E. ludwigii* потенциально может быть использован для создания биопрепаратов на основе биочара для очистки природных сред от ПАУ.

Исследование поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение № 075-15-2023-587, и Программой стратегического академического лидерства Южного федерального университета («Приоритет 2030»).

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ РАЗЛИЧИЯ ШТАММОВ ПУУМАЛА-ПОДОБНЫХ ХАНТАВИРУСОВ

Крупская М.Н., Дзагурова Т.К., Курашова С.С.

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

krupskayamary@gmail.com

Ортохантавирусы – род РНК-вирусов, обладающих широким спектром хозяев. Такие хантавирусы, как Хантаан, Сеул, Амур, Пуумала и Добрава/Белград, вызывают у людей заболевания, объединенные названием геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС).

ГЛПС распространяется грызунами и является самым часто встречающимся природно-очаговым заболеванием на территории Российской Федерации. Хантавирусные заболевания характеризуются тяжёлым течением болезни, длительным периодом восстановления, летальность от 1 до 14% в зависимости от возбудителя. Многообразие клинических проявлений вызывает значительные трудности в диагностике ГЛПС. Кроме того, на сегодняшний день не существует эффективных способов лечения ГЛПС, а профилактические меры направлены на предотвращение контакта человека с грызунами, что не обеспечивает достаточный уровень безопасности. Из-за этого на сегодняшний день важно активное изучение хантавирусов и вызываемых ими инфекций.

Некоторые непатогенные хантавирусы обладают сходными биологическими и иммунологическими характеристиками с патогенными хантавирусами и могут быть использованы в качестве модели для различных исследований, включая разработку диагностических препаратов и лекарственных средств.

Одним из основных методов количественного определения хантавирусов является метод титрования вирусов с использованием феномена фокусобразующих единиц вируса (ФОЕ). При этом ФОЕ, образуемые разными штаммами ортохантавирусов, могут визуально отличаться. Таким образом, этот метод помогает не только узнать титр вируса, но и предположить некоторые особенности биологии конкретного штамма.

В нашем исследовании мы использовали непатогенные Хабаровск-подобные хантавирусы, для которых ранее было описано их дифференцирование при помощи полимеразной цепной реакции и секвенирования. Эти вирусы были ранее изолированы в культуре клеток Vero E6 от различных грызунов, отловленных в Хабаровском крае. Нами были восстановлены эти вирусы из коллекции ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН». Контроль наличия вируса проводился путем оценки количества антигена вируса методом флуоресцирующих антител (МФА). Статус восстановленного штамма вирус получал при обнаружении антигена в МФА-тесте. В последствие эти штаммы были протитрованы методом

ФОЕ. По результатам титрования, один из штаммов, названный в данной работе MF-252, фенотипически отличался и давал более крупные бляшки.

В дальнейшем предполагается дифференциация данных штаммов методом нейтрализации и при помощи секвенирования по Сэнгеру с последующим филогенетическим анализом. Полученные результаты позволят полностью охарактеризовать непатогенные Пуумала-подобные хантавирусы, что может быть использовано в дальнейшем при разработке диагностических препаратов.

МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ ПОЧВЕННЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ АССОЦИАТОВ, ВЫРОСШИХ НА СРЕДЕ С ГЕЛЛАНОВОЙ КАМЕДЬЮ

Куликова Д.Б., Дёмин К.А., Онасенко К.А., Куликов М.П., Празднова Е.В.

Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского,
Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

dakulikova@sfnu.ru

В подавляющем большинстве случаев для культивирования микроорганизмов микробиологами используются среды на основе агар-агара. Тем не менее, несмотря на широкое распространение и удобство использования питательных сред на его основе, было выявлено, что во многих коммерческих агар-агарах содержатся фуран-2-карбоновые и 5-гидроксиметилфуран-2-карбоновые кислоты, которые способны ингибировать рост бактериальных колоний. Другие примесные органические вещества, а также активные формы кислорода, которые образуются в агаровых средах при автоклавировании, также могут подавлять микробный рост. Это, наряду с другими причинами, может быть объяснять трудности, связанные с культивированием многих распространенных групп почвенных бактерий (например, представителей филумов Verrucomicrobiota, Acidobacteriota и др.). Использование альтернативных желирующих агентов является перспективным подходом для выделения новых микроорганизмов.

Для оценки разнообразия культивируемой части почвенного микробиома разведения образцов почвы (Чернозём южный, Ботанический сад ЮФУ, Ростов-на-Дону), были посеяны на три питательных среды: среда на основе белков соевого молока, среда на основе гуминовых кислот, а также среда на основе таурина и метансульфоновой кислоты. В качестве желирующего агента использовалась геллановая камедь (1,5% м/о). Посев инкубировался в течение трёх недель. Смывы тотальной биомассы осуществлялись с пяти чашек в конце первой и третьей недели инкубирования, после чего образцы бактериальных смывов объединялись и центрифугировались. ДНК выделялась с помощью набора ДНК-Экстран (Синтол, Россия) в соответствии с инструкцией. Секвенирование проводили на приборе MinION с использованием набора реагентов Rapid Sequencing Kit V14 в соответствии с рекомендациями производителя. Контроль качества чтений проводили с помощью программы NanoPlot v1.42.0, фильтрацию и отбраковку низкокачественных чтений - с помощью программы Filtrlong v0.2.1. Сборка прочтений в контиги осуществлялась с помощью программы MEGANIT, оценка таксономической принадлежности контигов проводилась с помощью программы CAT_pack и базы данных GTDB v.140.

При анализе полученных данных было обнаружено, что на первой неделе инкубации на среде с соевым молоком наблюдался прирост редкой таксономической группы – Verrucomicrobiota. Так, количество аффилированных с данным таксоном контигов, обнаруженных на первой неделе, составило 14, в то время как на смывах с третьей недели инкубации было обнаружено 97 контигов (с максимальной длиной 56023 п.н. и средней длиной 14253 п.н.). Большинство контигов Verrucomicrobiota были аффилированы с родом

Luteolibacter (в частности, *L. yonseiensis*), родом *Haloferula* и родом *Roseimicrobium*. На двух других питательных средах не было отмечено прироста представителей данной таксономической группы или других редких групп почвенных бактерий.

Полученные данные согласуются с другими исследованиями альтернативных желирующих агентов и демонстрируют, что использование питательных сред с геллановой камедью вместо агар-агара является хорошей стратегией для выращивания редких групп бактерий.

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства «Приоритет 2030» № СП-12-23-04.

СОЗДАНИЕ ШТАММА *PSEUDOMONAS PUTIDA* С УМЕНЬШЕННЫМ ОБРАЗОВАНИЕМ
БИОПЛЕНКИ И СНИЖЕННОЙ ПОДВИЖНОСТЬЮ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ
В ФЕРМЕНТАЦИИ

Кунгуров Г.А., Фролов М., Трахтманн Н.В., Валидов Ш.З.

Федеральный исследовательский центр Казанский научный центр
Российской академии наук, Казань, Россия

gkungurov567@gmail.com

Pseudomonas putida PCL1760 относится к группе хорошо изученных непатогенных бактерий, которые обитают в почве, воде и на поверхности растений. Это грамотрицательная палочковидная бактерия, которая часто встречается в природе.

Наиболее распространенные проблемы при культивировании микроорганизмов в биореакторах касаются образования биопленок, что значительно усложняет процесс ферментации, приводя к повышенному потреблению энергии и трудностям при очистке оборудования. Бактериальные жгутики играют важную роль в подвижности бактерий, но также могут действовать как адгезивные структуры, способствуя эффективности формирования биопленки. Кроме того, бактерии рода *Pseudomonas* обладают пиллями IV типа (Т4Р), которые позволяют им прикрепляться к поверхностям и тем самым облегчают колонизацию. Генетическая оптимизация штаммов для ферментации представляется многообещающим подходом, который улучшает сами штаммы, а не модифицирует биореакторы или использует добавки.

В данной работе мы исследовали влияние делеции генов, участвующих в синтезе альгинатных биопленок (*algA*), экспорте жгутиков (*flhA*) и образовании пилей (*pilQ*). Для создания генетических конструкций фрагменты ДНК, содержащие последовательности длиной около 1000 пар оснований, фланкирующие гены-мишени (*algA*, *pilQ*, *flhA*), были клонированы в вектор рК18mobSacB, не способного к репликации в клетках *P. putida*. Делеционные мутации в штамме *P. putida* PCL1760 вносились последовательно методом гомологичной рекомбинации.

Мы получили мутантный штамм *P. putida* MGMM601 с удаленными генами и показали, что отсутствие этих генов снижает подвижность и образование биопленки (на 40% ниже через 72 часа) у мутанта. В то же время мы отметили положительное влияние этих делеций на рост мутантного штамма на богатой среде LB ($1,39 \times 10^{10}$ КОЕ/мл у мутанта и $6,4 \times 10^9$ КОЕ/мл у дикого типа) и на минеральной среде ($6,11 \times 10^9$ КОЕ/мл у мутанта и $1,36 \times 10^9$ КОЕ/мл у дикого типа) при выращивании в биореакторах малого объема. Значительное уменьшение количества биопленки и образования пены также наблюдалось для MGMM601 в биореакторе малого объема. Скорее всего, быстрый рост штамма с делецией происходит за счет снижения энергетической нагрузки на бактериальный аппарат.

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.)

ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПЕПТИДОВ В ПРИСУТСТВИИ ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕИНАЗ

Лобанов А.Н., Полюдова Т.В.

Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения
Российской академии наук, Пермь, Россия

lobanov.aleksandr.n@gmail.com

Антимикробные пептиды (АМП) в настоящее время рассматриваются в качестве альтернативы классическим антибиотикам, бактериальная резистентность к которым приобрела глобальные масштабы. Одним из путей преодоления резистентности может быть комбинированное действие антибиотиков и АМП.

В настоящей работе исследовано антибактериальное действие двух комбинаций АМП, колистин/варнерин и колистин/низин в отношении бактерий *Escherichia coli* ATCC 25922. Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) каждого пептидного соединения определяли методом двукратных разведений в бульоне Мюллера-Хинтона. Эффективность комбинаций АМП оценивалась методом шахматной доски на планктонных клетках путем расчета фракционных ингибирующих концентраций (ФИК) и их индексов (иФИК). Для оценки времени гибели бактерий (Time Kill) клетки промывали дистиллированной водой и готовили суспензии, содержащие 10^6 КОЕ/мл. Через 3 ч действия комбинаций АМП к суспензии бактерий добавляли ингибиторы протеиназ фенилметилсульфонил фторид (PMSF) (Sigma, США) до концентрации 12,5 мкМ и N-этилмалеимид (Sigma, США) до концентрации 30 мкМ, которые не оказывали токсического действия на *E. coli*.

Значения МИК антимикробных пептидов для *E. coli* ATCC 25922 были определены как: 0,6 мкг/мл для колистина, 250 мкг/мл для низина, антибактериальное действие варнерина выявлено не было. В то же время комбинирование колистина с варнерином или низином значительно повышало чувствительность бактерий и интенсивность их гибели. Индекс ФИК для комбинации колистин/варнерин (ФИК: 0,125/128 мкг/мл) составил 0,28, а для комбинации колистин/низин (ФИК: 0,03/62,5 мкг/мл) – 0,31, что свидетельствует о синергидном эффекте. При добавлении установленных концентраций пептидов в комбинации к суспензии бактерий, содержащей 10^6 КОЕ/мл, происходило снижение количества КОЕ/мл на 2 порядка через 3 ч инкубации. Однако дальнейшая инкубация в течение 24 ч приводила к возвращению уровня КОЕ/мл до исходных значений. Было сделано предположение, что данный феномен связан с протеолизом АМП после разрушения части бактерий. Добавление ингибитора сериновых протеиназ PMSF в субингибирующей концентрации не приводило к сохранению антибактериального действия комбинаций АМП. Добавление ингибитора цистеиновых протеиназ N-этилмалеимида способствовало сохранению антибактериальных эффектов синергидных комбинаций АМП и через 24 ч действия колистина с варнерином количество КОЕ/мл снизилось ещё на 4 порядка. В присутствии N-этилмалеимида эффективность антибактериального действия комбинации колистин/низин не повысилась, в то же время через

24 ч количество бактерий осталось на том уровне, который был зарегистрирован через 3 ч действия АМП.

Таким образом, ограничением в использовании пептидных антимикробных соединений является их высокая восприимчивость к протеолитической деградации, в том числе и при действии протеиназ, высвобождаемых из микробных клеток, разрушенных действием АМП. Результаты проведенных исследований показали перспективность сочетания АМП с ингибиторами протеиназ для усиления антибактериального эффекта. Ингибиторы протеиназ блокируют активность протеолитических ферментов, предотвращая разрушение АМП и сохраняя их активность.

Работа выполнена в рамках гос. задания № 124020500028-4.

ВЫДЕЛЕНИЕ, БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА, АНТАГОНИСТИЧЕСКАЯ
АКТИВНОСТЬ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ШТАММОВ ИЗ ОБРАЗЦОВ РАСТЕНИЯ
OROSTACHYS SPINOSA, ОТОБРАННЫХ В ПРИБАЙКАЛЬСКОЙ ЛЕСНОЙ ЗОНЕ

Ложкарев Т.А., Суханов А.Ю., Фролов М., Некрасов И.В., Валидов Ш.З.

Лаборатория молекулярно-генетических и микробиологических методов,
Федеральный исследовательский центр Казанский научный центр РАН, Казань, Россия

t.lozhkarev@knc.ru

В современных условиях ведения сельского хозяйства имеется тенденция на применение технологий, оказывающих меньшее воздействие на окружающую среду. В частности, использование биопрепаратов на основе отдельных микроорганизмов или их консорциумов. Некоторые свойства микроорганизмов, такие как увеличение биодоступности микро и макроэлементов, подавление возбудителей заболеваний растений и синтез фитогормонов позволят уменьшить использование традиционных удобрений и химических пестицидов при сохранении или увеличении урожайности. Несмотря на рост количества коммерчески доступных биопрепаратов, их применение имеет ограниченный характер, связанный с более высокой стоимостью, из-за меньших масштабов их производства, а также повышенных требований к условиям хранения, транспортировки и использования. Одним из подходов к увеличению использования биопрепаратов в сельском хозяйстве является поиск штаммов, оказывающих большее влияние на рост и урожайность растений, а также защиту от фитопатогенных микроорганизмов. Таким образом, для разработки новых биопрепаратов необходимо проводить исследования микробиомов почв и растений, с целью поиска перспективных штаммов.

В данной работе изучались бактериальные изоляты из образцов растения *Orostachys spinosa*, произрастающего в Прибайкалье. Дальнейшая работа проводилась с изолятами, имеющими различный морфотип колоний. Для каждого штамма была определена родовая принадлежность методом секвенирования гена, кодирующего 16S рибосомальную РНК. Антагонистическая активность к фитопатогенным грибам рода *Fusarium* проверялась методом совместного культивирования исследуемых штаммов с фитопатогенным грибом. Также проводились исследования ферментативных свойств, таких как: способность к фиксации атмосферного азота, возможность мобилизовать фосфор из натриевой соли фитиновой кислоты и разрушать целлюлозу. Использовался метод культивирования микроорганизмов на аналитических средах. Всего было выделено 16 изолятов с различным морфотипом. Наибольшее подавление штамма фитопатогенного гриба показали представители рода *Bacillus*. Способность к фиксации атмосферного азота проявили 14 штаммов. Ряд штаммов, значительная часть которых относится к роду *Pseudomonas*, показали возможность мобилизовать фосфор из натриевой соли фитиновой кислоты. Способность к деградации целлюлозы показали 9 штаммов, большинство из которых являются представителями рода *Bacillus*.

На основании полученных сведений, нами были отобраны штаммы *B. velezensis* 117BA, 117BE, *P. graminis* 117BB и 117BD с целью дальнейшего изучения, как кандидаты для создания на их основе новых биопрепаратов.

Работа выполнена в рамках Государственного задания №124050300050-4.

ОЗДОРОВЛЕНИЕ ВИНОГРАДА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КУЛЬТУРЫ *IN VITRO*

Мажейка К.И., Поротикова Е.В., Виноградова С.В.

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук», Москва, Россия

xena.mazh@yandex.ru

Виноградарство и виноделие – важные отрасли сельского хозяйства и пищевой промышленности России. Ключевое значение для развития данных отраслей имеет качественный посадочный материал винограда. При использовании вегетативного метода размножения винограда патогены маточного растения накапливаются в потомстве и могут значительно снизить продуктивность и продолжительность эксплуатации виноградника. Поэтому необходимо внедрение в производство эффективных методов диагностики фитопатогенов и размножения оздоровленного посадочного материала с проведением регулярного фитосанитарного мониторинга. Применение современных методов диагностики с использованием высокопроизводительного секвенирования и методов культуры *in vitro* позволяют вывести на новый уровень технологию оздоровления винограда.

Для оздоровления винограда от вирусов наиболее часто используют классические методы: выделение меристем, термотерапию и хемотерапию. Выделение меристем показало свою эффективность для элиминации флоэмноограниченных вирусов, таких как Grapevine rupestris stem pitting-associated virus, Grapevine leafroll-associated virus-1, Grapevine leafroll-associated virus-3, а также неповирусов. Однако этот метод является трудоемким, эффективность регенерации и скорость получения взрослых растений могут быть достаточно низкими. Ряд исследований показали, что термическая обработка более эффективна против паренхимных вирусов, например, Arabis mosaic virus, Grapevine fanleaf virus, чем против флоэмноограниченных, хотя данный способ широко применяется против вирусов, относящихся к разным родам и видам. Метод хемотерапии основан на использовании химических соединений, проявляющих противовирусную активность. Среди подобных соединений, широко используемых на винограде, отмечают синтетические аналоги нуклеотидов, рибавирин, тиазофуридин. Наиболее серьезным недостатком метода является проявление фитотоксичности, интенсивность которой зависит от исследуемого препарата, его дозировки и от используемого сорта. Сочетание нескольких методов является более эффективным для элиминации вирусов.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 23-16-00232) и Министерства образования и науки Российской Федерации.

ВТОРИЧНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ МАКРОМИЦЕТОВ: СКРИНИНГ БИОАКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Майорова И.В.^{1,2}, Псурцева Н.В.², Лукина Е.Г.³, Берестецкий А.О.³

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

²Ботанический институт имени В.Л. Комарова Российской академии наук,
Санкт-Петербург, Россия

³Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Пушкин, Россия

mayorovairina0248@gmail.com

Вторичные метаболиты базидиальных и сумчатых грибов представляют собой экологически безопасную альтернативу синтетическим химикатам, используемым в сельском хозяйстве. Эти соединения обладают широким спектром биологической активности, однако на сегодняшний день идентифицирована и охарактеризована лишь малая часть их потенциального разнообразия. Поэтому поиск и изучение новых биоактивных соединений из базидиомицетов остается актуальной задачей научных исследований. Таким образом, цель настоящей работы заключается в выявлении макромицетов, обладающих фитотоксической, антимикробной и энтомотоксической активностью, для использования в сельском хозяйстве в качестве пестицидов.

Объектами исследования являлись 53 штамма макромицетов, принадлежащих к 53 видам из 43 родов, отобранных из Коллекции культур базидиомицетов БИН РАН на основе литературных данных с использованием эколого-таксономического подхода. Видовая принадлежность штаммов была подтверждена молекулярными методами, полученные ITS последовательности были депонированы в Генбанк NCBI. Грибы культивировали на среде картофельно-глюкозный агар в течение 3 недель при 25°C в трех повторностях, после чего получали этилацетатные экстракты. Антимикробную активность определяли методом бумажных дисков на грамположительных бактериях *Bacillus subtilis*. Фитотоксическую активность экстрактов – методом листовых дисков на бодяке полевом (*Cirsium arvense*) и пшеницы обыкновенной (*Triticum vulgare*), а ингибирующий эффект на рост корней – на проростках салата *Lactuca sativa*. Остро-контактное действие исследуемых экстрактов определяли путем инъекции раствора в гемоцель гусениц большой восковой моли *Galleria mellonella*, используя микрошприц. Тонкослойную хроматографию использовали для оценки воспроизводимости метаболитных профилей экстрактов и их уникальности, высокоэффективную жидкостную хроматографию с тандемной масс-спектрометрией для предварительной идентификации известных веществ.

В ходе исследования была выявлена высокая биоактивность этилацетатных экстрактов базидиомицетов. Фитотоксичность на бодяке полевом проявили 56% экстрактов штаммов макромицетов, из которых экстракты *Sarcosoma globosum* LE-BIN 4694 (диаметр некротических поражений составил $8,38 \pm 0,89$ мм) и *Flammulina rossica* LE-BIN 4835 ($7,57 \pm 0,87$ мм) оказались самыми активными. Фитотоксичность на пшенице обыкновенной наблюдали у 71% экстрактов, наибольшую активность проявили 5 из них: *S. globosum* LE-BIN

4694 ($10,00 \pm 0,31$ мм), *Cerrena unicolor* LE-BIN 5317 ($8,86 \pm 0,14$ мм), *Galerina marginata* LE-BIN 2545 ($9,14 \pm 0,35$ мм), *Antrodia xantha* LE-BIN 1029 ($8,6 \pm 0,93$ мм) и *F. rossica* LE-BIN 4835 ($11,00 \pm 0,58$ мм). Рост корней салата ингибировали экстракты 41 штамма, наиболее активные из них: *Ischnoderma benzoinum* LE-BIN 1291, *F. rossica* LE-BIN 4835, *Mycoleptodonoides vassiljevae* LE-BIN 4817, *S. globosum* LE-BIN 4694, *Psycnoporellus fulgens* LE-BIN 2606 (ингибирующая активность составила от 93 до 100%). Антимикробную активность выявили у 17 штаммов, из которых наивысшую активность проявили *F. rossica* LE-BIN 4835 (зона подавления $8,8 \pm 0,14$ мм) и *Sparassis latifolia* LE-BIN 4829 ($5,0 \pm 0,00$ мм). Энтомотоксичность на личинках *G. mellonella* показали экстракты *Neonothopanus nambi* LE-BIN 5054 (гибель 100% насекомых) и *Gymnopilus luteus* LE-BIN 4500 (50% смертности).

Полученные результаты подтверждают перспективность исследования вторичных метаболитов этих штаммов для создания биопрепаратов.

Работа поддержана грантом РФФ № 24-46-00005.

ИССЛЕДОВАНИЕ СПОСОБНОСТИ ЭКСТРАКТОВ БАКТЕРИАЛЬНЫХ СИМБИОНТОВ ТРЮФЕЛЕВЫХ ГРИБОВ РЕГУЛИРОВАТЬ РОСТ СЕМЯН БЕЛОЙ ГОРЧИЦЫ

**Малыгина Е.В., Кулинич С.В., Имидоева Н.А., Вавилина Т.Н.,
Бельшенко А.Ю., Аксенов-Грибанов Д.В.**

Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

cat.malygina@gmail.com

Трюфели являются сумчатыми грибами, плодовые тела которых формируются в почве в ассоциации с корнями растений и почвенными микроорганизмами. Роль данных микроорганизмов в плодовых телах мало изучена. Однако известно, что некоторые из них способны изменять уровень фитогормонов, повышать доступность питательных веществ и подавлять патогенную микрофлору. Совокупность данных эффектов положительно сказывается на росте растений и их устойчивости к различного рода стрессам.

Целью данного исследования является оценка способности экстрактов бактериальных симбионтов трюфеля регулировать рост семян *Sinapis alba*. Для этого из идентифицированных штаммов бактерий-симбионтов черного трюфеля были выбраны 4 наиболее различающиеся друг от друга рода: *Paenibacillus* sp, *Peribacillus* sp., *Plantibacter* sp., *Microbacterium* sp. Далее проводили их глубинное культивирование на таких питательных средах, как TSB, MM, PDA при температуре +28 °C в течение 7 суток. Для экстракции внеклеточных метаболитов отбирали культуральную жидкость и смешивали с этилацетатом в соотношении 1:1. Полученными экстрактам пропитывали бумажные диски, на которые выкладывались семена белой горчицы (2 шт) и помещались в чашки Петри и затем инкубировали в термостате при температуре +28 °C в течение 7 суток. Общее количество семян, участвовавших в эксперименте – 340 шт. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программ Microsoft office Excel и Past 4.0.

В результате эксперимента в контрольных условиях длина корней семисуточных проростков семян *Sinapis alba* составила в среднем $35,33 \pm 20,03$ мм. При обработке семян экстрактом культуральной жидкости штамма *Peribacillus* sp. выращенного на среде MM наблюдалась статистически значимая индукция роста корня длиной в среднем $87,8 \pm 18,1$ мм. Также отмечено статистически значимое ингибирование роста корня 7 суточного проростка *Sinapis alba* до отметки $23 \pm 11,8$ мм в среднем, экстрактом внеклеточных метаболитов штамма *Microbacterium* sp. выращенного на питательной среде TSB. Для побегов 7 суточных проростков семян *Sinapis alba* пророщенных в контрольных условиях установлена средняя длина $15,7 \pm 5,6$ мм. При обработке семян экстрактом культуральной жидкости штамма *Paenibacillus* sp, выращенного на среде TSB наблюдалось выраженное ингибирование роста побегов до $2,3 \pm 1,3$ мм. В то же время экстракты этого же штамма, выращенного на среде PDA способны статистически значимо увеличивать рост побегов до $22,9 \pm 10,4$ мм.

Так, в результате проведенных исследований показано, что внеклеточные метаболиты бактерий выбранных родов способны как стимулировать, так и ингибировать рост растений

Sinapis alba в зависимости от типа используемых питательных сред. Исследования в данной области помогут лучше понимать экологическую значимость бактериального сообщества трюфельных грибов и способны привести к разработке новых методов использования симбионтов трюфелей для увеличения урожайности и качества сельскохозяйственных культур.

Работа поддержана грантом РФФ № 22-76-10036.

ВЛИЯНИЕ РИЗОСФЕРНОГО ШТАММА *BACILLUS SUBTILIS* AM7 И ЕГО МУТАНТА ПО ГЕНУ СИДЕРОФОРА НА АКТИВНОСТЬ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ КАРТОФЕЛЯ

Мамчур А.А., Васильева Ю.А., Данилова Ю.В.

Казанский («Приволжский») федеральный университет, Казань, Россия

alexandramamchur5250@gmail.com

В почвенной экосистеме растения испытывают абиотический и биотический стресс, отвечая на него образованием активных форм кислорода (АФК), таких как супероксид, перекись водорода и гидроксильный радикал. Эта генерация АФК приводит к окислительному стрессу, повреждению ДНК, белков, хлорофилла и мембранных функций.

Бактериальные сообщества в ризосфере, известные как PGPR (Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria), играют значительную роль в росте и развитии растений, уменьшая окислительный стресс. К таким бактериям относят представителей рода *Bacillus*, оказывающих положительное влияние на повышение устойчивости сельскохозяйственных культур к сложным условиям окружающей среды, благодаря подавлению фитопатогенов, синтезу фитогормонов и активации индуцированной системной устойчивости (ISR). В частности, для подавления патогенных микроорганизмов, таких как *Fusarium*, бациллы используют конкуренцию за железо с помощью сидерофоров и производство антибиотиков. Эти характеристики указывают на перспективность использования представителей рода *Bacillus* для создания новых биоудобрений с целью повышения устойчивости сельскохозяйственных растений к абиотическим и биотическим стрессам.

Цель исследования заключается в изучении влияния штаммов бацилл на индукцию системной защиты растений по накоплению активных форм кислорода (АФК) в листьях картофеля в присутствии патогена *Fusarium oxysporum*. В работе был использован ризосферный изолят *B. subtilis* AM7 и генномодифицированный штамм *B. subtilis* AM7 $\Delta dhbF$ с делетированным геном сидерофора катехолового типа (бациллибактина). Эффективность фитоиммунитета растений оценивали по активности фермента супероксиддисмутазы (СОД), который отвечает за утилизацию избыточных АФК и служит маркером взаимодействия растений с фитопатогеном *F. oxysporum*. Активность антиоксидантных ферментов была определена с помощью качественных реакций на основе полученных экстрактов из надземных частей черенков *Solanum tuberosum*. В присутствии фитопатогена *F. oxysporum* активность СОД в экстрактах картофеля увеличивается вдвое по сравнению с образцами, выращенными в присутствии *B. subtilis* AM7. Это указывает на то, что ISR-система растений воспринимает бациллярный штамм как чужеродный агент, но не считает его вредителем. Однако уровень активности СОД на *B. subtilis* AM7 $\Delta dhbF$ почти втрое превышает показатель ответа растений, инфицированных *F. oxysporum*. Совместное инкубирование фитопатогена и ризосферного бактериального штамма приводит к повышению активности СОД на 30% по сравнению с контролем, обработанным только *F. oxysporum*. При этом сохраняется тенденция к тому, что образцы, предварительно обработанные мутантным штаммом, имели уровень активности СОД на 25 % выше, чем образцы после обработки исходным изолятом. Таким образом, влияние фитопатогена *F. oxysporum* на картофель вызывает повышение активности СОД по сравнению с ризосферным штаммом *B. subtilis* AM7. Более того, мутация гена *dhbF* в штамме *B. subtilis* AM7 приводит к увеличению продукции антиоксидантных ферментов, что указывает на важную роль сидерофора в иммунной реакции растения.

ПОЛУЧЕНИЕ РАСТВОРИМОЙ TEV-ПРОТЕАЗЫ С ПОМОЩЬЮ БЕЛКА-ПАРТНЁРА – ЭНДОЛИЗИНА БАКТЕРИОФАГА T5

**Матишинец А.В.¹, Чернышов С.В.², Прохоров Д.А.³,
Тарлачков С.В.², Микулинская Г.В.²**

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

²Филиал Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино, Россия

³Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

matishinetz.artyom@yandex.ru

Многие рекомбинантные белки эукариот или неродственных бактерий продуцируются в клетках *E. coli* в виде телец включения, т.е. нерастворимых и неактивных белковых агрегатов. Одним из способов увеличения растворимости рекомбинантных белков является их гибридизация с белковыми партнёрами, которые направляют сворачивание слитого с ними целевого белка, что приводит не только к повышению растворимости, но и к восстановлению его структуры и функций.

Широко применяемый в биотехнологии фермент – протеаза вируса TEV (*tobacco etch virus*) – накапливается в клетках кишечной палочки практически полностью в нерастворимой форме вследствие образования телец включения. Для предотвращения агрегации мы использовали новый вариант белка-партнёра – эндолизин бактериофага T5 (EndoT5). Выбор этого глобулярного белка был обусловлен его небольшим размером (15,2 кДа), высоким уровнем продукции, нетоксичностью для клетки-продуцента, хорошей растворимостью и устойчивостью структуры в широком диапазоне условий.

Были созданы две генетические конструкции: первая – с природным геном *endoT5*; вторая – с мутантным геном *endoT5D130A*, кодирующим белок, лишённый каталитической активности. Оба варианта гена белка-партнёра соединяли с последовательностью гена TEV-протеазы посредством гибкого линкера, а также участка, кодирующего сайт узнавания/разрезания TEV-протеазы. Индукцию вели в двух температурных условиях: при 37°C и 21°C. Контролем служила плаزمид, несущая ген *tev* без дополнительных последовательностей. Денситометрия электрофореграмм осветлённых экстрактов и нерастворимых фракций с помощью программы TotalLab (v2009-NUL) показала, что растворимость TEV-протеазы, слитой с природным EndoT5, увеличилась с 10% в контроле до 63% при 37°C и 75% при 21°C. Для TEV-протеазы, слитой с мутантным EndoT5D130A, увеличение растворимости было несколько меньшим – до 48% и 61% при 37°C и 21°C, соответственно. При продукции наблюдалось ауторасщепление химерного белка по сайту TEV-протеазы *in vivo*, что свидетельствует о сохранности пептидазной активности целевого белка.

Растворимый рекомбинантный белок был очищен до электрофоретической гомогенности с помощью металлохелатной хроматографии и последующего диализа; элюцию вели в 20 мМ Трис-НС1 буфере (рН 8,0), содержащем 300 мМ NaCl и 160 мМ имидазола. Выход

со 125 мл культуры составил 4 мг и 3,3 мг гомогенной TEV-протеазы для вариантов с EndoT5 и EndoT5D130A, соответственно. Структура белка в растворе была проанализована методом ЯМР высокого разрешения в обоих препаратах. Наличие сигналов в высокопольной области одномерных ^1H -спектров указывает на существование гидрофобного ядра, в котором боковые цепи алифатических аминокислотных остатков (Val, Leu, Ile и Ala) фиксированы относительно радикалов ароматических остатков (Tyr, Phe и Trp). В области 6,4–5,1 м.д. наблюдаются сигналы α -протонов аминокислотных остатков, вовлеченных в состав β -структуры. Таким образом, полученная рекомбинантная TEV-протеаза представляет собой компактный глобулярный белок, в состав которого входит регулярная β -складчатая структура.

В результате работы была не только получена растворимая TEV-протеаза, но и продемонстрирована перспективность использования EndoT5 как белка-партнёра для повышения растворимости рекомбинантных белков при продукции в клетках *E. coli*.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОПИСАНИЕ НОВЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА
THERMOANAEROBACTER ИЗ ДОННЫХ ОСАДКОВ ОХОТСКОГО МОРЯ

Махортых С.С.^{1,2}, Рыжманова Я.В.¹, Щербакова В.А.¹

¹Институт биохимии и физиологии микроорганизмов 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

sonyamakh@yahoo.com

В морских донных отложениях сконцентрировано огромное разнообразие микроорганизмов, играющих ключевую роль в глобальных биогеохимических циклах. В северо-восточной части Курильской котловины Охотского моря расположены зоны разломов, характеризующиеся наличием газонасыщенных донных осадков с активным термофильным микробным сообществом. Из образцов донных осадков, отобранных во время рейса № 92 на НИС «Академик А.М. Лаврентьев» с 17.04.21 по 26.05.21 выделены штаммы LV19 (глубина 894 метра, горизонт 200 см; 51°17'096 с.ш., 154°15'442) и LV49 (глубина 996 метров, горизонт 50 см; 50°54'543 с.ш., 155°14'296 в.д.)

Филогенетический анализ генов 16S рРНК показал, что оба штамма являются представителями рода *Thermoanaerobacter* с ближайшим родственником *T. mathranii* АЗ^Т.

Клетки штаммов LV19 и LV49 были представлены прямыми подвижными спорообразующими палочками. Штамм LV19 рос в диапазоне температур от 55 до 75°C (оптимум 70°C), являлся галотолерантным, выдерживая соленость до 60 г/л NaCl с оптимумом 10 г/л; рос в широком диапазоне рН от 5.2 до 8.2 (оптимум рН 6.8).

Штамм LV49 рос в диапазоне температур от 55 до 75°C (оптимум 60°C), являлся галотолерантным, выдерживая соленость до 80 г/л NaCl с оптимумом 5 г/л; рос в диапазоне рН от 5.8 до 7.8 (оптимум рН 7.6).

Новые бактерии являлись облигатными анаэробами, имели окислительно-восстановительный тип метаболизма и использовали широкий спектр сахаров в качестве доноров электронов. Однако штамм LV49 облигатно зависел от наличия дрожжевого экстракта в ростовой среде, в то время как штамм LV19 не нуждался в его наличии.

У штаммов LV19 и LV49 были секвенированы геномы размером 2.36 и 2.21 Мб соответственно. Анализ метаболических путей штаммов LV19 и LV49 показал наличие генов метаболизма углеводов: Эмбдена-Мейергофа-Парнаса, пентозо-фосфатного пути, деградации галактозы и глюкоуроновой кислоты; пути биосинтеза витаминов В₁, В₂, В₅, В₆, В₁₂, кофермента А, кофермента ВН₄, липоевой кислоты и сирогема.

Уровень ANI и ДНК–ДНК гомологии LV19 и LV49 составил 99.46 и 97.0% соответственно. Значения ANI штаммов LV19 и LV49 с близкородственным штаммом

T. mathranii АЗ^T составили 98.48 и 98.61%, а ДНК–ДНК гомология 89.2 и 89.3% соответственно. Однако, исходя из того, что виды рода *Thermoanaerobacter* имеют высокие значения ANI и ДНК–ДНК гомологии (97-98% и 82-89 соответственно), а также ряда фенотипических отличий, штамм LV19 предположительно является новым видом рода *Thermoanaerobacter*, а штамм LV49 является его подвидом.

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ ФИТОСИМБИОЗА У
ГАЛОТОЛЕРАНТНОГО МЕТИЛОТРОФА *METHYLOBREVIS PAMUKKALENSIS* PK2

Мельников О.И., Розова О.Н., Бут С.Ю., Доронина Н.В., Хмеленина В.Н.

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

olegmelnikov96@yandex.ru

Растения являются основным источником метанола в атмосфере, создавая уникальную экологическую нишу для метилотрофных бактерий. Однако в условиях глобальных климатических изменений засоление почв и участвовавшие засухи ставят под угрозу устойчивость и выживаемость растений. В этой связи критически важно изучение галотолерантных метилотрофов, сочетающих способность к фитосимбиозу с устойчивостью к экстремальным условиям. Среди таких организмов выделяется метилотрофная бактерия – *Methylobrevis pamukkalensis* PK2. Ее способность выживать в условиях высокой солености, а также наличие генетических детерминант потенциального фитосимбионта делает ее перспективным объектом для изучения.

Главным преимуществом штамма PK2 является способность синтезировать индолилуксусную кислоту (ИУК) – гормон, играющий центральную роль в развитии корневой системы растений. При росте на метаноле штамм продуцирует 14,6 мкг/мл ИУК, которая не только стимулирует деление клеток корней, увеличивая площадь поглощения питательных веществ, но и усиливает симбиотическую связь: растения активнее выделяют экссудаты, создавая благоприятную среду для бактерий.

Еще одним ключевым механизмом фитосимбиоза является активность АЦК-дезаминазы – фермента, который гидролизует 1-аминоциклопропан-1-карбоновую кислоту (АЦК), предшественник этилена. Этилен, вырабатываемый растениями при стрессе, ускоряет старение тканей, что снижает урожайность. Штамм PK2, обладая активностью АЦК-дезаминазы 71,2 нмоль/мин на мг белка, предположительно способен снижать уровень этилена, продлевая вегетативную фазу растений. Это особенно важно в условиях засоления, где стрессовая нагрузка на растения максимальна.

Осмоадаптационные механизмы штамма PK2 (синтез N-ацетилглутаминилглутаминамида (NAGGN) и трегалозы) позволяют бактерии расти при 6% NaCl, что обеспечивает ее выживаемость в засоленных почвах, где другие микроорганизмы не конкурентоспособны. Интересно, что фитоассоциированные метилотрофы, такие как *Methylopila capsulata* IM1, *Hansschlegelia quercus* Dub и *Methylobacterium nodulans* ORS 2060, не выживающие при высокой солености, также синтезируют NAGGN. Это позволяет предположить, что у них NAGGN может служить резервом азота – критического элемента в ризосфере, где его доступность часто ограничена. Такая гипотеза согласуется с тем, что глутамин – ключевой компонент NAGGN – является важным донором аминогрупп в метаболизме. Таким образом, NAGGN у штамма PK2 выполняет двойную функцию: защищает

клетку от осмотического стресса и поддерживает азотный баланс, необходимый для синтеза ИУК и других метаболитов.

Способность *M. ramukkalensis* РК2 сочетать осмоустойчивость с активным синтезом ростостимулирующих соединений открывает пути для создания биопрепаратов нового поколения. Дальнейшие исследования должны быть сосредоточены на лабораторных испытаниях штамма, чтобы оценить его эффективность и оптимизировать методы применения.

ЭФФЕКТ КОМБИНАЦИИ ТЕТРАЦИКЛИНА И ЭСТРАДИОЛА НА РОСТ БАКТЕРИЙ-КОММЕНСАЛОВ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА В ПЛАНКТОННОЙ КУЛЬТУРЕ И БИОПЛЁНКАХ

Меткина А.А., Мартьянов С.В.

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук, Москва, Россия

metkina.anna48@gmail.com

Ключевые слова: биоплёнки, эстрадиол, тетрациклин, *Kytococcus*, *Lacticaseibacillus*, *Staphylococcus*.

Гормоны человека способны оказывать влияние на численность и видовой состав кожного микробиома. Поэтому при разработке новых методов терапии биоплёночных инфекций необходимо исследовать их совместный ингибиторный эффект с антибиотиками как для борьбы с патогенами, так и для оценки и предотвращения сопутствующего подавления роста непатогенных бактерий-колонизаторов кожи.

В настоящей работе исследовали эффект комбинации тетрациклина и эстрадиола на рост бактерий-комменсалов кожи человека *Kytococcus schroeteri*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Staphylococcus aureus* в планктонных культурах и биоплёнках. Показано, что при выращивании биоплёнок на поверхности тефлона в жидкой среде эстрадиол способен значительно усиливать действие тетрациклина в субингибиторной концентрации на моновидовые и бинарные биоплёнки *K. schroeteri* и *L. paracasei*. В то же время при культивировании биоплёнок на поверхности плотной питательной среды эффект гораздо менее выражен, и был показан только для китоккокков в моновидовом сообществе.

Для биоплёнок *S. aureus* синергидный ингибирующий эффект тетрациклина и эстрадиола практически не выражен. Однако при исследовании динамики роста культуры было показано, что при сочетании эстрадиола в физиологической концентрации ($3,7 \times 10^{-8}$ М) с тетрациклином в концентрации 0,05 мкг/мл значительно увеличивается время удвоения культуры по сравнению с тетрациклином без добавки гормона. Эффект становится ещё более выраженным при повышении концентрации эстрадиола на два порядка, при этом время удвоения числа бактерий возрастает с 6.5 до 10.8 ч (в 1.6 раза). При дальнейшем повышении концентрации гормона наблюдается менее выраженный ингибиторный эффект в стационарной фазе роста культуры.

Полученные данные свидетельствуют о том, что эстрадиол способен усиливать ингибиторное действие тетрациклина для планктонных культур и биоплёнок кожных комменсалов, что представляет большой интерес как с фундаментальной, так и с прикладной точки зрения.

Работа поддержана грантом РФ № 25-24-00066.

ИЗМЕНЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА И СТРУКТУРЫ МАТРИКСА ГРИБКОВО-БАКТЕРИАЛЬНЫХ БИОПЛЕНОК

Миронова А.В., Мадумарова Э.Р., Рогачева В.А., Тризна Е.Ю., Каюмов А.Р.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Россия

amironova2019@mail.ru

Биопленки являются сложным структурно-организованным трехмерным сообществом микроорганизмов, заключенным внутри полимерного матрикса, синтезированного членами этого сообщества. Высокая устойчивость бактерий в биопленке к антибактериальным препаратам связана, в первую очередь, с протективными свойствами матрикса, биохимический состав которого зависит от микроорганизмов, образующих биопленку.

В ходе работы, мы установили, что в составе смешанных грибково-бактериальных сообществ формируются менее плотные по своей структуре биопленки, по сравнению с моновидовыми и двувидовыми бактериальными сообществами. Кроме того, бактерии в составе двувидовых биопленок с *C. albicans* располагаются в нижних слоях биопленки, а *C. albicans* локализуется предпочтительно в верхних.

C. albicans в моновидовой биопленке располагается равномерно по всей площади с формированием небольшими пор в матриксе, а бактерии формируют классическую грибовидную структуру биопленки. При совместном культивировании бактерий с *C. albicans* наблюдается увеличение толщины биопленки. При этом *S. aureus* и *E. faecalis* в составе смешанного сообщества заполняют пространство между клетками микромицета. В смешанной биопленке *K. pneumoniae* – *C. albicans* оба микроорганизма располагаются равномерно в то время, как в биопленках *P. aeruginosa* – *C. albicans* и *E. coli* – *C. albicans* преобладают бактерии, а *C. albicans* находится в виде отдельных скоплений в плотном матриксе бактериальной биопленки.

В большинстве двувидовых биопленок достоверно увеличивалась общая биомасса по сравнению с моновидовыми сообществами. При этом, для биопленок *C. albicans* – *S. aureus* наблюдалось снижение α -полисахаридов и увеличение количества β -полисахаридов по сравнению с моновидовой биопленкой. Однако, в биопленках *K. pneumoniae* – *C. albicans* наблюдается увеличение содержания α -полисахаридов и снижение количества β -полисахаридов в составе матрикса. А в смешанном сообществе *P. aeruginosa* – *C. albicans* снижалось количество и α - и β -полисахаридов по сравнению с монокультурами этих видов. Кроме того, в составе внеклеточного матрикса двувидовой биопленки *E. coli* – *C. albicans* происходит достоверное увеличение белкового компонента.

Таким образом, в матриксе двувидовых грибково-бактериальных биопленок происходят различные перестройки состава и структуры матрикса в зависимости от микроорганизмов, составляющих это сообщество. Такие изменения могут влиять на проницаемость матрикса и доступность микроорганизмов для антимикробных препаратов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 24-14-00194).

ОБНАРУЖЕНИЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЙ АНАЛИЗ РОССИЙСКИХ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА А ЧЕРЕШНИ

Моцарь Е.В.¹, Шевелева А.А.¹, Шарко Ф.С.², Митрофанова И.В.³, Чирков С.Н.¹

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

²Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

³Главный ботанический сад имени Н.В. Цицина РАН, Москва, Россия

elena.motsar31@gmail.com

Косточковые плодовые культуры (*Prunus* spp., семейство *Rosaceae*) имеют важное экономическое значение и выращиваются по всему миру. Из более чем 50 известных вирусов этих культур, вирус черешни А (cherry virus A, CVA, род *Capillovirus* в семействе *Betaflexiviridae*) является одним из самых распространенных. При обследовании генофондовых коллекций Никитского ботанического сада (НБС) в Ялте и Главного ботанического сада имени Н.В. Цицина РАН (ГБС) в Москве были обнаружены деревья с вирусоподобными симптомами на листьях. Вирусы в собранных образцах диагностировали с помощью высокопроизводительного секвенирования и полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Впервые в России были найдены два изолята CVA. Один из них, названный РТС, обнаружен в НБС в гибриде *P. cerasifera* Erch. x *P. armeniaca* s. Shlor Tsiran. Контиг длиной 7426 нуклеотидов (нт) оказался наиболее близок (99,5% идентичности) к полногеномным последовательностям изолятов CVA 19SP013 (MZ291922) и 13TF169_N11 (KY510919) из Канады, а также Ruzyne (ON088603) and WK (LN879388) из Чехии и Австралии, соответственно. Филогенетический анализ полных геномов CVA показал, что крымский изолят РТС кластеризуется с не-вишневыми изолятами из различных регионов мира. Другой изолят CVA был обнаружен при обследовании коллекции косточковых ГБС на черешне (*P. avium*) сорта Ипуть с симптомами морщинистости на листьях. При изучении виroma данного растения был секвенирован полный геном московского изолята CVA, названного SwC14. Контиг длиной 7401 нт оказался наиболее близок (99,3–99,4% идентичности) геномам канадских изолятов CVA 13TF120_N8 (KY510908), 13TF101_N33 (KY510892) и 19SP016 (MZ291924) из черешни, а также изоляту Rannanja 46 (KU215411) из вишни. Типичным для рода *Capillovirus* образом, две открытые рамки считывания (ОРС) были предсказаны в геномах SwC14 и РТС. ОРС1 и ОРС2 обоих изолятов были одинаковой длины и кодировали белки одинакового размера. Идентичность между крымским изолятом РТС и московским SwC14 составляет 82% и оказалась значительно ниже, чем к близкородственным канадским изолятам. Также филогенетический анализ показал, что SwC14 входит в кластер, образованный изолятами CVA, найденными преимущественно на черешне в Канаде, а также в Чехии и Индии. Таким образом, обнаруженные в Москве и в Крыму изоляты вируса являются дивергентными и, вероятно, были завезены в Россию из разных источников. Полногеномные последовательности изолятов РТС и SwC14 были депонированы в Genbank под номерами OQ865368 и PQ036874, соответственно. CVA распространяется в основном при прививках зараженного материала. Поскольку обследованные в данной работе деревья

черешни из коллекции косточковых ГБС были привитыми, их зараженность СВА изучена с помощью ОТ-ПЦР, несмотря на отсутствие видимых симптомов. Вирус был обнаружен в шести из семи других обследованных сортов. Секвенирование продуктов ПЦР показало, что изоляты СВА из сортов черешни Тютчевка, Ревна, Юлия, Бряночка, Орловская и Янтарная на 99,1-99,6% идентичны соответствующему участку генома SwC14 из сорта Ипуть и, вероятно, имеют общего предка. Таким образом, полученные результаты расширяют представления о географическом распространении и генетическом разнообразии СВА на различных косточковых культурах в Европейской части России.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ, грант № 23-16-00032.

ОЦЕНКА ВИРУЛЕНТНОСТИ МИКРОМИЦЕТОВ РОДА *FUSARIUM* В ОТНОШЕНИИ КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ НОВЫХ СОРТОВ

Николаева А.А.¹, Лутфуллин М.Т.¹, Вологин С.Г.², Марданова А.М.¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

²Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Казанский научный центр Российской академии наук», Казань, Россия

azazel1212@rambler.ru

Картофель является одной из самых значимых пищевых культур в России. Только за последние 7 лет создано свыше 80 новых сортов с улучшенными потребительскими качествами клубней, что подчеркивает возрастающие требования рынка. Сухая гниль и фузариозное увядание, вызываемые различными представителями рода *Fusarium*, – распространенные заболевания, которые приводят к потере урожая при выращивании картофеля и порче клубней при хранении. При этом сорта картофеля различаются по восприимчивости к различным видам и штаммам *Fusarium*, встречаемость которых варьирует в зависимости от условий региона возделывания культуры.

Целью исследования была характеристика вирулентности фитопатогенных микромицетов *Fusarium* spp. в отношении новых сортов картофеля.

Исследуемые штаммы микромицетов были выделены из клубней картофеля сортов Ароза и Ягодный 19 с внешними признаками сухой гнили. Изоляты идентифицировали по генам ITS и TEF. Скрининг выделенных изолятов по вирулентным свойствам проводили на клубнях картофеля четырех новых сортов (Кайо, Зумба, Догода и Регги), полученных из коллекции ТатНИИСХ ФИЦ КазНЦ РАН. Здоровые клубни картофеля инфицировали 20 мкл споровой суспензии микромицетов (106/мл) и выдерживали при комнатной температуре в течение 21 суток. На каждый штамм микромицетов было использовано по 10 клубней каждого из сортов картофеля. Затем клубни разрезали пополам вдоль длинной оси и измеряли два перпендикулярных диаметра поражений ткани. Размер поражения рассчитывали для каждого клубня как среднее значение двух диаметров, выражая значения как среднее значение ± SE.

Результаты. Из сухой гнили картофеля сортов Ароза и Ягодный 19 выделены микромицеты рода *Fusarium*, идентифицированные как штаммы *F. oxysporum* (7 изолятов), *F. solani* (1 изолят) и *F. redolens* (2 изолята). Высокоагрессивными к клубням всех четырех сортов картофеля оказались штамм *F. solani* NS2 и *F. oxysporum* N1. Наиболее чувствительными к штамму *F. solani* NS2 оказались клубни сорта Регги (41.5±1 мм), а к штамму *F. oxysporum* N1 – клубни сорта Догода (23.8±2.5 мм). Вирулентность остальных штаммов фузарий значительно варьировала в зависимости от сорта картофеля. Так, наименее агрессивными в отношении клубней картофеля четырех сортов являлись штаммы *F. oxysporum* N5 и N8 (максимальный размер пораженной ткани составил 13.85±2.9 мм для сорта Догода). Наиболее восприимчивыми клубнями картофеля обладал сорт Догода, размер некроза клубней которого составлял в среднем 18 мм. Таким образом, установили, что развитие сухой гнили при

искусственной инокуляции зависит как от вирулентности штамма, так и устойчивости клубней конкретного сорта картофеля.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-76-00059,
<https://rscf.ru/project/24-76-00059/>

НОВЫЕ КОМПОНЕНТЫ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КСИЛОТРОФНЫХ БАЗИДОМИЦЕТОВ

Новиков А.В., Приставка А.А., Саловарова В.П.

Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

artem.ru88@mail.ru

Ксилотрофные базидиомицеты широко применяются в биотехнологии, сельском хозяйстве, экологии, пищевой промышленности и медицине благодаря способности синтезировать ценные биологически активные вещества и разлагать лигноцеллюлозные материалы. Это делает их перспективными организмами для утилизации отходов агропромышленного комплекса и лесной промышленности.

Ключевым этапом их промышленного использования является получение достаточного количества биомассы, применяемой в качестве инокулята для ферментации лигноцеллюлозных субстратов, а также для производства внутриклеточных метаболитов. В настоящее время в питательных средах используются дорогостоящие органические источники азота, такие как пептон и дрожжевой гидролизат. Для снижения производственных затрат актуален поиск альтернативных компонентов, обладающих низкой себестоимостью и высокой доступностью. В качестве перспективного решения предлагается использование белковых гидролизатов, предназначенных для спортивного питания, которые значительно дешевле традиционных компонентов и производятся из доступного сырья с высокой производственной мощностью.

Целью данного исследования было изучение влияния традиционных и альтернативных компонентов питательных сред на показатели глубинного культивирования базидиомицета *Fomitopsis officinalis* (Vill), который относится к группе белой гнили и активно разлагает лигнин и целлюлозу.

На первом этапе оценивался прирост биомассы гриба на различных питательных средах в условиях глубинного культивирования. В качестве контрольной среды использовалась среда Чапека-Докса (ЧД), где в качестве источника углерода использовали 3% глюкозы. Добавление водного экстракта опилок *Pinus sibirica* привело к увеличению биомассы в 5 раз по сравнению с контролем. Введение белкового гидролизата повысило прирост биомассы в 70 раз, а комбинация сывороточного белка с экстрактом опилок 1:15 показала максимальный прирост – в 95 раз по сравнению с контролем. При культивировании гриба на среде Сабуро прирост биомассы оказался выше в 56 раз, чем на среде Чапека-Докса.

Однако оценка ферментативной активности дала неоднозначные результаты. Фенолоксидазная и лигниноксидазная активности на экспериментальных средах были на 1–2 порядка выше, чем на традиционных. В то же время после автоклавирования в экспериментальных средах наблюдалось интенсивное неферментативное окисление субстратов, значительно превышающее контрольные показатели. Предположительно, это связано с присутствием низкомолекулярных соединений в составе белковых гидролизатов.

Таким образом, белковые гидролизаты для спортивного питания представляют собой альтернативу традиционным компонентам питательных сред, обеспечивая технологическую эффективность. Однако их применение сопряжено с трудностью точного измерения активности ферментов лигниназного комплекса из-за спонтанного не ферментативного окисления субстратов.

Для решения этой проблемы необходимы дальнейшие исследования природы и механизма данного процесса. Полученные результаты свидетельствуют о значительном технологическом потенциале предложенных компонентов для интенсификации накопления биомассы ксилотрофных базидиомицетов.

ШТАММ *STREPTOMYCES* SP. MLEM – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ АГЕНТ БИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ ФИТОПАТОГЕНОВ РАСТЕНИЙ

Носков А.Е., Антипова Т.В., Сузина Н.Е., Абашина Т.Н.

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

nosc0w@ya.ru

Биологические препараты для борьбы с болезнями растений являются перспективными средствами повышения урожайности сельскохозяйственных культур. Их преимущества перед химическими средствами защиты – экологичность по отношению к окружающей среде, безопасность для работников сельского хозяйства, отсутствие потенциально вредных соединений в производимой продукции. Традиционными агентами биологического контроля являются бактерии семейства *Bacillus* и грибы рода *Trichoderma* – они входят в состав большинства биопрепаратов Российского рынка. В то же время, ряд исследований показывает, что в этой роли могут быть эффективны и многие другие микроорганизмы, в частности актинобактерии рода *Streptomyces*. Они известны как лидеры по производству биотехнологически значимых вторичных метаболитов, обладают высоким адаптационным потенциалом для применения в любых типах почв, растут на большом количестве субстратов. Также среди стрептомицетов сравнительно мало патогенных видов: инфекции у людей могут быть вызваны *S. somaliensis* и *S. sudanensis*, а в растениях фитопатогенез может быть вызван *S. caviscabies*, *S. acidabies*, *S. turgidiscabbies* и *S. chabies*. Указанные особенности стрептомицетов открывают широкие перспективы для создания на их основе новых конкурентных средств защиты растений.

Нашей лабораторией был выделен и охарактеризован штамм *Streptomyces* sp. MLEM, обладающей выраженной антибактериальной активностью в отношении большинства протестированных грамположительных и некоторых грамотрицательных культур. По данным анализа гена 16S рРНК таксономически штамм наиболее близок к виду *Streptomyces tendae*. Морфологические характеристики штамма – цвет субстратного и воздушного мицелия, характер спорообразования – также типичны для представителей данного вида.

В ходе работы были подобраны оптимальные условия культивирования и проведены опыты по повышению антагонистической активности штамма. Для идентификации действующего вещества была проведена экстракция с последующим определением его молекулярной массы и спектра поглощения света.

Обработка семян крестоцветных растений культуральной жидкостью штамма не привела к угнетению их прорастания. В то же время, обработка штаммом MLEM семян рапса, заражённых фитопатогенной бактерией *Pectobacterium herbicola*, значительно снизила число не проросших семян по сравнению с заражённым, но не обработанным контролем.

По результатам комплекса проведенных исследований можно говорить о биотехнологической значимости и перспективности дальнейших исследований штамма *Streptomyces* sp. M Lem.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-64-00017, <https://rscf.ru/project/24-64-00017/>

ДРОЗОФИЛА – МОДЕЛЬ В ИЗУЧЕНИИ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ БАКТЕРИЯ-ХОЗЯИН НА ПРИМЕРЕ ИНФИЦИРОВАНИЯ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Нурасов Р.И., Хайруллина Л.Т., Харитоновна М.А., Костенко В.В.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

rifat.nurasov99@gmail.com

Биополлютанты являются опасными загрязняющими агентами, представляющими собой живые организмы (бактерии, вирусы, простейшие) и продукты их жизнедеятельности (токсины и аллергены). Среди биополлютантов наиболее многочисленны и значимы условно-патогенные и патогенные бактерии, которые относят к патогенным биологическим агентам (ПБА). Многие виды бактерий способны длительное время сохраняться в окружающей среде, а менее устойчивые к неблагоприятным факторам могут оставаться жизнеспособными в составе микробиомов носителей и распространяться посредством таких переносчиков как насекомые.

Drosophila melanogaster – это распространенный и удобный модельный организм, широко используемый для изучения эффектов кишечной микробиоты. Кишечник дрозофил имеет структурное и функциональное сходство с кишечником млекопитающих. Мухи и млекопитающие имеют схожие сигнальные пути, такие как Toll и Toll-подобные рецепторы, а также схожие защитные иммунные механизмы. Поэтому сегодня *Drosophila* широко используется в качестве модели *in vivo* для изучения бактериальных инфекций.

Цель работы – на модели *Drosophila* оценить особенности формирования признаков приспособленности насекомых в условиях инфицирования *S. aureus*.

В работе использовали линии дрозофил – Canton-S, Harwich и Верхний Услон (ВУ) (представляет собой природную популяцию мух, собранных близ с. Верхний Услон Республики Татарстан в августе 2021 г.). Мух инфицировали перорально суспензией клеток *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 29213 ($\sim 1 \times 10^8$ КОЕ/мл), которую вносили на поверхность питательной среды. Наличие и количество жизнеспособных стафилококков оценивали путем гомогенизации инфицированных дрозофил и последующего высева 10-кратных серийных разведениях на питательную среду для выделения стафилококков (Стафилококк-агар).

Показано, что у мух, инфицированных штаммом *S. aureus* наблюдается значимое снижение количества отложенных самками яиц: в линии Canton-S на 66%, в линии Harwich на 29%, в линии ВУ на 92% по сравнению с данными для интактных особей. Инфицирование дрозофил золотистым стафилококком увеличивает количество умерших потомков на стадии эмбриогенеза и на стадии куколки. В результате инфицирования мух всех трех генотипов наблюдалось достоверное снижение нейромышечной активности (снижение двигательной активности фиксируется в диапазоне от 30% до 75%). Кроме того, было установлено, что инфицирование мух штаммом *S. aureus* изменяет экспрессию генов, кодирующих антимикробные пептиды – *Metchnikowin*, *Cecropin A1*, *Defensin*, *Drosocin*, *Drosomycin*. По

завершению эксперимента стафилококки были обнаружены у инфицированных дрозофил всех исследуемых линий, при этом наибольшее их количество наблюдалось у Harwich (613 ± 29 КОЕ/муха), наименьшее у ВУ (10 ± 3 КОЕ/муха), промежуточные значения у Canton-S (310 ± 17 КОЕ/муха).

Таким образом, на модели *D. melanogaster* получены данные о формировании приспособленности насекомого в условиях инфицирования *S. aureus*, которое характеризуется снижением комплекса адаптивных признаков.

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДОВ ХРАНЕНИЯ МУТАНТНОГО ШТАММА ДРОЖЖЕЙ
S. CEREVISIAE, ИСПОЛЬЗУЕМОГО В ТЕСТ-НАБОРЕ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ГЕНОТОКСИЧНОСТИ КСЕНОБИОТИКОВ

Осипова Е.А.^{1,2}, Журишкина Е.В.^{1,3}, Кульминская А.А.^{1,3}

¹ФГБУ ПИЯФ им. Б.П. Константинова НИЦ Курчатовский институт, Ленинградская обл.,
Гатчина, Россия

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

³Курчатовский геномный центр – ПИЯФ, Ленинградская обл., Гатчина, Россия

5259308@mail.ru

Развитие промышленной и хозяйственной деятельности в 21 веке привели к резкому увеличению выбросов органических загрязнителей в окружающую среду. Это явление представляет собой потенциальную угрозу для экосистемы, в особенности для здоровья человека. Наибольшую опасность среди этих органических соединений представляют генотоксичные ксенобиотики, способные повредить в молекулярной структуре ДНК. Воздействие ксенобиотиков может приводить к генетическим нарушениям, которые являются причиной развития серьезных заболеваний. В связи с возрастающими экологическими рисками появляется необходимость в быстрых, точных и высокоселективных методах идентификации генотоксичных веществ. Ключевой задачей современных исследований является не только выявление таких веществ в окружающей среде, но и оценка их воздействия на организмы на различных уровнях.

В Курчатовском геномном центре Петербургского института ядерной физики (ПИЯФ) был разработан тест-набор, включающий в себя мутантный штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* 1-ТАЕ-1, полученный из коллекции дрожжей лаборатории генетики эукариот отделения молекулярной и радиационной биофизики ПИЯФ. Основной задачей разработанного метода является использование специально отобранного мутантного штамма, клетки которого имеют красный цвет в стандартных условиях культивирования. При наличии мутаций в шести генах, связанных с аденинзависимостью, колонии теряют красную окраску и приобретают белую. Эта особенность помогает определить присутствие в среде генотоксичных мутагенов. Коммерческий тест-набор для определения генотоксичности ксенобиотиков включает в себя три ключевых компонента: питательную среду, культуру дрожжей и известный мутаген для проведения положительного контроля.

Целью данного исследования была разработка оптимального и долгосрочного метода хранения мутантного штамма дрожжей *S. cerevisiae* 1-ТАЕ-1, который будет использоваться в коммерческих тест-наборах. Основными критериями выбора методики стали продолжительность хранения, удобство для транспортировки и сохранение мутантных особенностей штамма после процесса реактивации. Предложен метод хранения, при котором культура дрожжей помещается в защитный состав, состоящий из обезжиренного молока и раствора сахаров. Наиболее эффективными оказались защитные составы, содержащие

мальтозу и трегалозу. Клетки дрожжей и защитный состав смешивались с диоксидом кремния. Завершающим этапом было высушивание полученной смеси. В результате исследований было установлено, что клетки дрожжей, прошедшие данную сушку, легко поддаются реактивации, сохраняют свои мутантные свойства и хранятся при температуре 3-4°C.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Курчатовского геномного центра – ПИЯФ программой развития центров генетических исследований мирового уровня, соглашение № 075-15-2019-163).

ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИОПЛАНКТОНА ПРЕСНЫХ ГИДРОЭКОСИСТЕМ В УСЛОВИЯХ АНТРОПОГЕННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ И КЛИМАТА АРКТИКИ

Палатников А.М., Макаревич Е.В.

Мурманский арктический университет, Мурманск, Россия

artisthibinskj@gmail.com

Пресные водоёмы Арктики являются ценным природным ресурсом Мурманской области, где в последние годы наблюдается активное развитие промышленности и туризма. Изменение факторов среды под воздействием естественных процессов или антропогенной деятельности оказывает сильное влияние на высокочувствительные водоёмы арктической зоны. При этом даже сравнительно небольшие изменения условий окружающей среды могут привести к значительным трансформациям в структурах водных экосистем. Подобная специфика внутренних водоёмов Арктики позволяет использовать их в качестве индикатора экологического состояния среды, находящейся под антропогенным воздействием.

Одним из структурных компонентов водных экосистем является гетеротрофный бактериопланктон, выполняющий главную роль в трансформации сложных соединений и возвращении биогенных элементов в круговорот веществ. Исследование изменений структуры бактериопланктона позволяет не только оценить степень антропогенного воздействия и экологическое состояние среды, но и даёт возможность выделения штаммов микроорганизмов, которые могут быть потенциально полезны в процессах биоремедиации или иной биотехнологической деятельности человека.

В летний период 2024 года были отобраны пробы поверхностного слоя воды для микробиологического анализа из водоёмов Йокостровская Имандра, Большой Вудъявр и Малый Вудъявр, выбранный в качестве фонового объекта. Анализ был проведён в день отбора. Для определения общей численности бактериопланктона (ОЧБ) пробу поверхностного слоя воды окрашивали акридиновым оранжевым и фильтровали через темные нуклеопоровые фильтры с диаметром пор 0,22 мкм. Подсчёт клеток осуществляли при помощи люминесцентного микроскопа ZEISS West Germany с увеличением $\times 1000$.

Исследуемые группы бактериопланктона были условно разделены на основные (евтрофные, олиготрофные) и функциональные (углеводородокисляющие бактерии и бактерии, способные использовать минеральный или органический фосфор). Их численность определяли методом наиболее вероятного числа (НВЧ) на жидких питательных средах с дальнейшим расчётом по таблице Мак-Креди. Установлена структура бактериопланктона с использованием модификации коэффициента Разумова – отношение количества бактерий определённой группы к общей численности бактериопланктона.

Озёра Малый Вудъявр и Йокостровская Имандра по микробиологическим показателям принадлежат к классу очень чистых (I) и чистых (II) водоёмов в соответствии с ГОСТ 17.1.3.07-82. Большой Вудъявр имеет умеренно загрязнённый (III) класс качества вод. Наибольшее число бактерий обнаружено в озере Большой Вудъявр ($192,7 \times 10^4$ кл/мл), что в 2,7

раза больше, чем в Йокостровской Имандре ($70,15 \times 10^4$ кл/мл), и в 24,3 раза больше, чем в Малом Вудъявре ($7,93 \times 10^4$ кл/мл).

Структура бактериопланктона Йокостровской Имандры и Малого Вудъявра оказалась очень схожей: высокая численность бактерий основных групп – евтрофов и олиготрофов – и слабо развитые функциональные группы, которые в совокупности занимают менее одного процента от всего бактериопланктона. Озеро Большой Вудъявр напротив, отличается высокой численностью функциональных групп, особенно углеводородокисляющих бактерий, и малой численностью основных групп бактерий.

Развитие функциональных групп бактерий свидетельствует о неблагоприятном экологическом состоянии среды. Бактериальные сообщества исследуемых водоёмов, в особенности озера Большой Вудъявр, можно использовать в качестве источников потенциально пригодных для биоремедиации культивируемых штаммов микроорганизмов, способных расти и размножаться в условиях климатической зоны Арктики.

ВЫДЕЛЕНИЕ, ХАРАКТЕРИСТИКА И ИЗУЧЕНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ СВОЙСТВ
НОВОГО БАКТЕРИАЛЬНОГО ИЗОЛЯТА *JANTHINOBACTERIUM* SP. GRVW-12,
ОБИТАТЕЛЯ ГРУНТОВЫХ ВОД

Перов Я.А.^{1,2}, Абашина Т.Н.¹, Сузина Н.Е.¹

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

²Пущинский филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)», Пущино, Россия

yaroslaw.perow@gmail.com

Известно, что в современном мире антибиотикорезистентность (нечувствительность или устойчивость возбудителей инфекционных болезней к назначаемым для борьбы с ними антибиотикам) растёт с огромной скоростью, а абиотические препараты разрабатываются крайне медленно, что делает актуальным поиск новых способов борьбы с патогенными бактериями.

Из пробы грунтовой воды, взятой на глубине 6 метров рядом с д. Ворщикovo, Воскресенский район, Московская область нами была выделена грамотрицательная бактерия, штамм GrVW-12, образующая на агаризованных средах водонерастворимый пигмент интенсивного сине-фиолетового цвета.

На основании анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК установлено филогенетическое положение нового изолята. Выделенная бактерия относится к роду *Janthinobacterium*. Наиболее близким видом является *Janthinobacterium svalbardensis*.

Антибактериальную активность изолята исследовали диско-диффузионным методом, в основе которого лежит формирование зоны лизиса в области контакта с тест-культурой (при наличии антимикробной активности) и анализ её размеров (оценка интенсивности антимикробной активности). В качестве тест-культур было использовано 12 штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также фитопатогенных грибов, полученных как из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ), так и из рабочей лабораторной коллекции авторов.

Род *Janthinobacterium* входит в группу виолацеин-продуцирующих бактерий [1]. Виолацеин является биотехнологически значимым вторичным метаболитом, поскольку обладает антибактериальными, противогрибковыми и другими свойствами [2].

В результате проведенных исследований установлено, что штамм *Janthinobacterium* sp. GrVW-12, выделенный из грунтовой воды, синтезирует пигмент, аналогичный виолацеину, обладающий выраженным антимикробным действием, благодаря чему культура может конкурировать за развитие в разных экосистемах. Кроме того, они могут попадать с питьевой водой в организм человека и животных и конкурировать с кишечной микрофлорой.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда
№ 24-64-00017, <https://rscf.ru/project/24-64-00017/>

Литература.

1. Claudia Hornung The Janthinobacterium sp. HH01 Genome Encodes a Homologue of the *V. cholerae* CqsA and *L. pneumophila* LqsA Autoinducer Synthases / Claudia Hornung, AnjaPoehlein, Frederike S. Haack // PLOS.One : электронный журнал. – URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0055045#ack>. – Дата публикации: 06.02.2013.
2. Nelson Durán, Giselle Z. Justo, Marcela Durán Advances in Chromobacterium violaceum and properties of violacein-Its main secondary metabolite: A review // Biotechnology Advances. - 2016. - Volume 34, Issue 5. - С. 1030-1045.

МЕХАНИЗМ ЭЛЕКТРОННОГО ТРАНСФЕРА В СИСТЕМЕ БИОМАТЕРИАЛ-ФЕРРОЦЕН-ЭЛЕКТРОД

Перчиков Р.Н., Челюканов М.С.

ФГБОУ ВО Тульский государственный университет, лаборатория биологически активных соединений и биокompозитов, Тула, Россия

r.n.perchikov@tsu.tula.ru

Микробные биоплёнки, характеризующиеся как превалирующая форма микробной организации в экосистемах, представляют собой структурированные консорциумы микроорганизмов, адгезированных к абиотическим и биотическим поверхностям. Формирование биопленок вызывает значимые технологические и клинические осложнения, затрагивая такие сектора, как здравоохранение, пищевая промышленность и судостроение. В то же время, контролируя процесс биопленкообразования открываются перспективы для разработки экологически устойчивых технологий, включая биоремедиацию, очистку промышленных стоков и применение в биотехнологических процессах. Особый интерес представляет использование электроактивных биопленок в качестве активных компонентов биосенсорных систем и биотопливных элементов, что обусловлено их способностью к эффективному переносу электронов [1].

Поэтому в нашей работе мы использовали бактерии, выделенные из активного ила *Pseudomonas veronii* ВКМ В-3835, дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* ВКМ У-1173 и бактерия *Escherichia coli* К-802 были использованы в качестве основы для биосенсора БПК, поскольку они образуют экологически и клинически значимые биопленки и являются стандартом для изучения биопленок. Так как биоплёнки могут продуцировать в процессе своей жизнедеятельности электронные челноки, то их возможно использовать как биматериал для биосенсоров. Однако было установлено наибольшую константу скорости взаимодействия с биоматериалом имеют рецепторные системы на основе биопленок *E. coli*. Бактериальные биопленки имеют большую константу скорости взаимодействия ферроценового медиатора с микроорганизмами по сравнению с иммобилизованными клетками и дрожжами.

С помощью спектроскопии электрохимического импеданса было установлено что в системе с медиатором ферроценом и биоплёнкой у бактерий сопротивление ниже, чем у суспензий микроорганизмов и дрожжей, что свидетельствует о взаимодействии продуцируемых феназинов с иммобилизованным в графитовую пасту медиатором. Ферроцен выступает в роли медиатора, осуществляющего перенос электронов к электроактивным соединениям, иммобилизованным в полисахаридной матрице. Феназины, в свою очередь, демонстрируют повышенную эффективность взаимодействия с ферментными системами бактерий. В контексте биопленки, сформированной дрожжами *Saccharomyces cerevisiae*, наблюдаемое снижение константы скорости взаимодействия медиатора может быть обусловлено отсутствием эндогенных или экзогенных электроактивных компонентов в структуре экзополисахаридного матрикса. Отсутствие данных компонентов препятствует опосредованному переносу электронов от ферроцена к микробным ферментам. Более того,

пространственная организация матрикса, характеризующаяся высокой плотностью, затрудняет прямой доступ ферроцена к ферментными комплексам.

Работа выполнена при поддержке гранта Правительства Тульской области, договор № ДС/168.

Литература.

1. Perchikov, R.; Cheliukanov, M.; Plekhanova, Y.; Tarasov, S.; Kharkova, A.; Butusov, D.; Arlyapov, V.; Nakamura, H.; Reshetilov, A. Microbial Biofilms: Features of Formation and Potential for Use in Bioelectrochemical Devices. *Biosensors* **2024**, *14*, doi:10.3390/bios14060302.

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ДЕТЕРМИНАНТ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ В ГЕНОМАХ
KOCURIA SPP.

Плешко Е.М., Мосолова А.М.

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

lizapleshko@yandex.ru

Кокурии – повсеместно встречающиеся бактерии, вызывающие сопутствующие заболевания у людей с ослабленным иммунитетом. Мы исследовали распространение детерминант антибиотикорезистентности среди *Kocuria spp.* Мы построили филогенетическое дерево рода *Kocuria* с помощью программы VBCG. Далее мы провели поиск детерминант антибиотикорезистентности в белковых аннотациях 181 генома *Kocuria spp.* и сопоставили их наличие с филогенией рода. Мы показали, что наиболее распространены среди кокурий детерминанты устойчивости к макролидам и хлорамфениколу. У большинства штаммов есть ген макролид-2'-фосфотрансферазы или 23S рРНК (гуанозин(2251)-2'-O)-метилтрансферазы. У представителей монофилетической группы, образованной штаммами *K. carniphila*, *K. artinae*, *K. gwangalliensis*, есть два гена макролид-2'-фосфотрансферазы. Почти у всех штаммов есть ген RlmN, отвечающий за устойчивость к хлорамфениколу. У некоторых штаммов есть гены устойчивости к бета-лактамам, аминогликозидам, рифампицину. У штамма *K. carniphila* 988 есть ген 23S рРНК (уридин(2479)-2'-O)-метилтрансферазы, обеспечивающий устойчивость к авиламицину. У других штаммов *Kocuria* он отсутствует. По-видимому, он был приобретён *K. carniphila* 988 в результате горизонтального переноса генов достаточно недавно. Авиламицин – антибиотик, широко используемый в пищевой промышленности. Штамм *K. carniphila* 988 был выделен на мясном предприятии. Вероятно, в ходе своей эволюции штамм подвергался регулярному воздействию авиламицина, из-за чего наличие гена обеспечивало ему адаптивное преимущество. Детерминант резистентности к тетрациклину, ванкомицину и хинолонам ни в одном из исследуемых геномов обнаружено не было. Полученные результаты соответствуют данным о распространённости устойчивости к антибиотикам среди клинических изолятов кокурий.

После этого мы исследовали чувствительность к антибиотикам 5 штаммов кокурий: *K. rhizophila* ATCC 9341, *K. rhizophila* 155, *K. carniphila* 988, *K. rosea* 394, *K. rosea* 397. Было показано, что наличие детерминант антибиотикорезистентности в геномах кокурий в большинстве случаев согласуется с наличием устойчивости к соответствующим антибиотикам. Все три штамма обладают высокой устойчивостью к хлорамфениколу, что можно объяснить наличием в их геномах гена RlmN. Штамм *K. carniphila* 988 обладает наибольшей устойчивостью к азитромицину и содержит в геноме три гена, связанных с устойчивостью к макролидам. Кроме того, штамм *K. carniphila* 988 обладает высокой устойчивостью к авиламицину, в то время как рост остальных штаммов подавляется

минимальными концентрациями этого антибиотика. К остальным исследуемым антибиотикам все штаммы показали низкую устойчивость.

Полученные нами данные могут быть полезны при лечении инфекций, вызванных представителями рода *Kocuria*, а также при изучении распространения антибиотикорезистентности в ходе горизонтального переноса генов.

Работа поддержана грантом РФФИ № 24-24-20103.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И АНАЛИЗ ГЕНОМА НОВОГО БАКТЕРИОФАГА
ACIJ_313 ПРОТИВ *ACINETOBACTER JOHNSONII*

Пономарёв А.Л., Федорец В.А., Козлова Ю.Н., Тикунова Н.В.

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

sasha.ponomaryovv@mail.ru

Бактерии рода *Acinetobacter* являются серьёзной угрозой для здоровья человека в силу их устойчивости к антибиотикам, дезинфектантам, способности долго сохраняться во внешней среде. Помимо *Acinetobacter baumannii*, вызывают беспокойство вид *Acinetobacter johnsonii*, для ряда штаммов которого также показана множественная антибиотикорезистентность. *A. johnsonii* широко распространён в природе, его местообитания включают в себя водоёмы, почву, кожу человека. Имеются данные о катетер-ассоциированных инфекциях, инфекциях мягких тканей и сепсисе, вызванных штаммами *A. johnsonii*. Помимо угрозы здоровью человека, *A. johnsonii* также способен вызывать порчу продуктов питания, в основном это касается морепродуктов. *A. johnsonii* вызывает болезни у промыслово-значимых видов, принадлежащих семействам *Cyprinidae* (карповые), *Salmonidae* (лососевые), *Scombridae* (скумбриевые) и *Penaeidae* (креветки) как у диких, так и у выращенных искусственно, приводя к их порче. Применение бактериофагов является перспективным вариантом для борьбы с *A. johnsonii*, однако к настоящему времени известны лишь три фага против *A. johnsonii*.

Целью нашей работы являлось исследование генома и биологических свойств, таких как: кинетика лизиса, кинетика сорбции, динамика выхода и спектр хозяев бактериофага *Acinetobacter johnsonii* phage AcIJ_313, специфичного к природному изоляту *A. johnsonii* КЭМТК 8123.

Геном фага представляет собой двуцепочечную ДНК, длина генома с учётом концевых повторов составляет 105 952 п.н., концевые повторы были обнаружены с использованием программы PhageTerm, их длина составляет 7577 п.н.. В геноме фага AcIJ_313 был идентифицирован 201 ген, удалось установить функции 89 из них. Были обнаружены гены, кодирующие ДНК-полимеразу, праймазу/хеликазу, хвостовой белок рулетку, белок хвостовой оболочки, эндолизин и тРНК; генов лизогении обнаружено не было. Наличие генов белка хвостовой оболочки и гена хвостового белка-рулетки позволяет предположить, что фаг имеет миовирусный морфотип. Сравнительный анализ генома показал крайне низкую степень сходства (менее 5% по VIRIDIC) и нуклеотидной идентичности (NI менее 1% по BLASTN) исследуемого фага с какими-либо другими фагами из баз данных GenBank и ViPTree. Филогенетический анализ белков большой субъединицы терминазы, хвостового белка-рулетки и ДНК-полимеразы показал, что аминокислотные последовательности белков исследуемого фага существенно отличаются от аминокислотных последовательностей этих же белков у наиболее близких к нему фагов. По результатам биоинформатического

сравнительного анализа генома и белков можно утверждать, что данный фаг является представителем по крайней мере нового подсемейства и рода внутри этого подсемейства.

Электронные микрофотографии фага, подтвердили его миовирусный морфотип. Исследование спектра хозяев показало, что АсіJ_313 оказался способен инфицировать 4 штамма *A. johnsonii* из 87 проверенных штаммов *Acinetobacter spp.*, что говорит о его узком спектре хозяев. Фаг сорбируется на поверхности клеточных стенок бактерий на 60% за 10 минут, и снижает титр клеток на 2 порядка за 360 минут. При лизисе клетки высвобождается в среднем 23 вирусные частицы, цикл размножения фага занимает 62,5 минуты. Следовательно этот новый фаг является слаболитическим.

Исследование было поддержано в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 125012300671-8.

МЕТИЛОТРОФЫ НА ПУТИ К БИОЭКОНОМИКЕ: УГЛЕКИСЛЫЙ ГАЗ КАК ИСТОЧНИК ДЛЯ СИНТЕЗА ФОРМИАТА

Потапова Д.С.

Тульский государственный университет, Тула, Россия

darya_0102@bk.ru

Биоэкономика включает в себя те части экономики, которые используют возобновляемые биологические ресурсы суши и моря (в том числе микроорганизмы) для производства продуктов питания, энергии, товаров и услуг. Исследование формидегидрогеназ (ФДГ) метиловых бактерий *Methylobacterium extorquens* AM1 открыло путь к устойчивой фиксации парникового углекислого газа в формиат в электрохимическом реакторе.

Однако *M. extorquens* AM1 имеет относительно низкую скорость роста ($\mu = 0,092 \pm 0,006 \text{ ч}^{-1}$), и низкую активность ФДГ в бесклеточных экстрактах ($(0,14 \pm 0,06) \text{ Е/мг белка}$). Скорость роста метанотрофа *Methylohalobium alcaliphilum* 20Z, призванного одним из наиболее перспективных штаммов в биотехнологии, превышает скорость роста *M. extorquens* AM1 ($\mu = 0,12 \pm 0,03 \text{ ч}^{-1}$), а активность ФДГ в его бесклеточных экстрактах примерно в 4,5 раза выше при росте на метане ($0,62 \pm 0,05 \text{ Е/мг белка}$) и в 2 раза при росте на метаноле ($0,31 \pm 0,01 \text{ Е/мг белка}$) активности ФДГ в бесклеточных экстрактах *M. extorquens* AM1. Интересно, смогут ли ФДГ данного метанотрофа также успешно, как и ФДГ *M. extorquens* AM1, работать обратимо в искусственных условиях, утилизируя при этом парниковый газ путем синтеза полезного продукта?

Цель данной работы - подтвердить возможность конверсии углекислого газа в формиат ФДГ *Mtm. alcaliphilum* 20Z путем биоэлектрохимического синтеза и сравнить эффективность ФДГ *Mtm. alcaliphilum* 20Z и *M. extorquens* AM1 в утилизации CO_2 .

Для получения модели биоэлектрода с углеродными нанотрубками использовали графитовый стержневый электрод, поверхность которого модифицировали окисленными многостенными углеродными нанотрубками серии «Таунит» (МУНТок). Бесклеточные экстракты метилотрофов использовали в качестве биокатализатора в электрохимических исследованиях с применением методов циклической вольтамперометрии и хроноамперометрии.

В присутствии лизата бактерий, содержащих ФДГ, медиатора переноса электронов бензилвиологена (БВ, 1,1'-добензил-4,4'-бипиридиния дихлорида) и бикарбоната (как продукта растворения CO_2) на циклических вольтамперограммах наблюдается увеличение тока восстановления при потенциалах меньше $-0,1 \text{ В}$. Это обусловлено увеличением содержания окисленной формы БВ в биоэлектрокаталитической системе за счет биохимической реакции восстановления бикарбоната БВ до формиата, катализируемой формиатдегидрогеназой.

Эффективность биоэлектродокаталитического восстановления CO_2 под действием ФДГ исследуемых бактерий определяли методом хроноамперометрии при потенциале $-0,5$ В при одинаковом содержании ФДГ в лизате бактерий. Содержание ферментов нормировали по единицам активности (~ 4 Е активности на каждое измерение). Плотность тока биоэлектродокаталитического восстановления CO_2 была выше для метанотрофа *Mtm. alcaliphilum* 20Z ($(3,6 \pm 0,4)$ мА/см²) в два раза по сравнению с метиловобактерией *M. extorquens* AM1 ($(1,6 \pm 0,3)$ мА/см²).

Таким образом, ФДГ *Mtm. alcaliphilum* 20Z являются более перспективным объектом для разработки биоэлектродокаталитических систем превращения углекислого газа в формиат. Разработка биоэлектрохимических систем утилизации углекислого газа на основе ФДГ метилотрофов в будущем может помочь в сокращении выбросов углекислого газа, способствующего глобальному потеплению и другим негативным последствиям изменения климата, а также в синтезе полезного продукта формиата, используемого в различных областях деятельности человека.

БАКТЕРИИ ИЗ РИЗОСФЕРЫ РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА ПАСЛЕНОВЫХ, УСТОЙЧИВЫЕ К ЗАСУХЕ И ЗАСОЛЕНИЮ

Пригодская В.И., Ананьева И.Н., Сафронова Г.В., Клишевич Н.Г.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

prigodskaaveronika68@gmail.com

Абиотическими факторами, негативно влияющими на рост и развитие растений, являются засуха и засоление почв. Результат их действия – дефицит влаги, причиной которого может быть недостаточное количество осадков (физическая сухость: отсутствие дождей и высокие температуры) или недоступность имеющейся воды (физиологическая сухость: засоление почвы). Важную роль в повышении стрессоустойчивости растений семейства Пасленовых (томаты, картофель, перец, баклажаны и др.) при воздействии неблагоприятных абиотических факторов играют PGPR-бактерии. Ризобактерии, стимулирующие рост растений, обладают такими свойствами, как продукция метаболитов с гормональными и сигнальными функциями (ауксины, цитокинины, гиббереллины, абсцизовая, салициловая и жасмоновая кислоты), обеспечение растений элементами минерального питания (азот, фосфор, калий и др.), индукция механизмов системной устойчивости к стрессам абиотической и биотической природы (синтез АЦК-дезаминазы).

Цель работы – выделить бактерии из ризосферы растений семейства Пасленовых, обладающие агрономически ценными свойствами (синтез ИУК, азотфиксация, фосфатсолюбилизация), устойчивые к засухе и засолению.

Среди выделенных бактерий из ризосферы растений семейства Пасленовых были отобраны 38 азотфиксирующих изолятов, обильно растущих на безазотистых средах и 37 изолятов, солюбилизирующих фосфаты кальция.

В условиях искусственной засухи, созданной внесением в агаризованную среду культивирования 3% полиэтиленгликоля-6000 (ПЭГ-6000) (-0,20 МПа), выживали 25 изолятов, из них обильный рост отмечен только у 6 азотфиксаторов и 5 фосфатсолюбилизаторов. При внесении 5% ПЭГ-6000 (-0,42 МПа) и 7% ПЭГ-6000 (-0,83 МПа) обильный рост был выявлен у этих же 11 изолятов (6 азотфиксирующих и 5 фосфатсолюбилизирующих).

При засолении среды культивирования хлоридом натрия в концентрации 5% обильный рост выявлен у 13 изолятов, а при 10% NaCl – хороший и обильный рост проявляли 11 изолятов. В присутствии 12% NaCl выживали 9 изолятов, а 15% NaCl – только один изолят сохранял способность к росту.

Изучение влияния температуры в диапазоне 35-55°C показало, что из всех изученных бактерий при температуре 35°C рост выявлен у 31 изолята. Обильный рост при 40°C установлен у 22 изолятов, а при 45°C – у 18 изолятов. Наиболее устойчивы к высокой температуре культивирования были 9 изолятов, сохранившие низкую жизнеспособность при температуре 55°C.

Таким образом, по результатам проведенных исследований отобрано 12 изолятов, обладающих комплексом факторов, повышающих стрессоустойчивость растений при водном дефиците (растущих в условиях искусственно созданной засухи, при засолении и высокой температуре). По комплексу физиолого-биохимических свойств, определенных при помощи автоматического бактериологического анализатора Vitek 2 Compact фирмы «Biomérieux» (Франция) и Vitek®MS, изоляты отнесены к родам. *Rhodococcus*, *Rothia*, *Rhizobium*, *Pseudomonas* и *Arthrobacter*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б23КУБ-011).

ПОВЫШЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ДРОЖЖЕЙ К ОБЕЗВОЖИВАНИЮ ПУТЕМ НАПРАВЛЕННОЙ СЕЛЕКЦИОННОЙ АДАПТАЦИИ

Провоторова Е.А., Колосова А.А., Федосов Д.Ю.

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

ekaterina.provt@gmail.com

Устойчивость дрожжей к обезвоживанию является одним из важнейших технологических требований к штаммам, используемых для получения активных сухих дрожжей, применяемых в пищевой промышленности. Активные сухие дрожжи должны обладать способностью выдерживать осмотический и окислительный стресс, вызванный обезвоживанием, а также высокой метаболической активностью клеток после регидратации. Ключевыми факторами, определяющими устойчивость дрожжей к обезвоживанию, являются способность штаммов к синтезу осмопротекторов, таких как трегалоза и глицерин, а также высокая каталазная и супероксиддисмутазная активность, обеспечивающая защиту от окислительного стресса. Способность к синтезу этих соединений, а также транскрипционная активность соответствующих генов отличаются у различных штаммов дрожжей. Показано, что оптимизация условий культивирования способна оказывать значительное влияние на повышение устойчивости штаммов дрожжей к дегидратации. Применение протекторных соединений при обезвоживании способно дополнительно увеличивать устойчивость дрожжей к обезвоживанию.

В данном исследовании был разработан метод определения устойчивости к обезвоживанию винных штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, подобраны оптимальные условия культивирования: получение биомассы на жидкой питательной среде Ридер в течение 48 часов перед обезвоживанием. С использованием метода были подобраны условия, способные значительно увеличить жизнеспособность исследуемого штамма после обезвоживания, а также была проведена селективная адаптация штамма к обезвоживанию. Дрожжевые клетки были подвергнуты 8 циклам обезвоживания, включающим: получение биомассы в жидкой питательной среде, обезвоживание биомассы с последующей регидратацией, получение колоний на твердой питательной среде. После 3-х дней инкубации из единичной колонии проводили отбор культуры для последующего цикла культивирования биомассы.

Исследование проводили для штамма ВКПМ У-693, рекомендованного для приготовления белых тихих и крепленых вин. Получение биомассы на питательной среде Ридер увеличивало жизнеспособность штамма после обезвоживания до 16,7% в сравнении с биомассой, полученной на среде YPD, показавшей 4,5% жизнеспособных клеток. Применение направленной селекции штамма по признаку устойчивости к обезвоживанию позволило увеличить жизнеспособность штамма после обезвоживания до 60,1%, при этом соотношение живых клеток к мертвым после регидратации штамма составило 58,5±5%.

Таким образом, показано, что значительное повышение жизнеспособности клеток после обезвоживания может быть достигнуто путем направленной селекционной адаптации

штаммов, а также за счет оптимизации условий культивирования и применения протекторных соединений.

Работа проведена в рамках выполнения государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА СИНТЕЗ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ *CEREIBACTER SPHAEROIDES*

Пшатова А.Д., Ашихмин А.А., Ашихмина О.О.

Институт фундаментальных проблем биологии РАН – обособленное подразделение ФИЦ,
Пушино, Россия

Pshatova01@mail.ru

Все большую актуальность приобретают методы получения веществ для нужд сельскохозяйственной, пищевой и фармацевтических отраслей биотехнологическим способом. Пурпурные несерные бактерии являются продуцентами многих биоактивных соединений. Управляя условиями культивирования и составом питательных сред, можно изменять качественный и количественный состав ценных продуктов в биомассе клеток.

Цель данной работы заключалась в изучении влияния условий культивирования и состава сред на синтез ряда биологически активных веществ: бактериохлорофилл *a*, (БХл *a*); каротиноиды (Кар) и убихинон Q10 (Q10) у пурпурной несерной бактерии *Cereibacter sphaeroides*.

Объектами исследования были дикий штамм *Cereibacter sphaeroides* 2.4.1 и мутантный штамм *Cereibacter sphaeroides* Δ ctfI::ctfI^{PA}, у которого сфероиденовый путь биосинтеза каротиноидов был заменен на спириллоксантиновый.

Культивирование проводили на средах Хатнера и M22 в темновых аэробных и фототрофных анаэробных условиях. Данные среды отличаются источниками углерода и качественным составом витаминов. В результате исследования было определено, что дикий штамм *Cereibacter sphaeroides* в фототрофных условиях дорастал до стационарной фазы гораздо быстрее как на среде Хатнера, так и на среде M22 – 24 и 48 ч на свету и 124 и 149 ч в темноте, соответственно. В отличие от дикого, мутантный штамм дорастал до стационарной фазы роста на средах Хатнера и M22 за одинаковое время – 30 и 48 ч на свету и 30 и 50 ч в темноте, соответственно.

Анализ содержания целевых веществ в биомассе клеток проводили с помощью разделения ацетон-метанольного экстракта методом ВЭЖХ и последующим спектрофотометрическим определением концентрации веществ.

Было установлено, что у дикого штамма содержание Q10 на обеих средах практически не отличается в зависимости от условий культивирования (14,9±1,51; 14,0±0,72 и 13,5±1,95; 13,0±1,50 мг/г сухого веса на среде Хатнера и среде M22, соответственно). Напротив, количество БХл *a* и Кар значительно отличаются на свету и в темноте. На среде Хатнера на свету – 14,2±2,09 БХл *a* и 6,0±1,18 Кар мг/г сухого веса, а в темновых условиях – 4,7±0,30 БХл *a* и 2,4±0,19 Кар мг/г сухого веса. На среде M22 на свету – 11,6±2,08 БХл *a* и 6,1±1,11 Кар мг/г сухого веса, а в темновых условиях – 6,7±1,07 БХл *a* и 3,2±0,49 Кар мг/г сухого веса.

Показано, что для мутантного штамма закономерности отличаются. В том числе, количество Q10 в темновых условиях больше, чем в фототрофных (7,2±1,06 и 9,09±2,21 мг/г

сухого веса на среде Хатнера; $10,0 \pm 2,95$ и $11,4 \pm 1,99$ мг/г сухого веса на среде M22). Также, количество БХл *a* и Кар практически не отличается при культивировании на среде Хатнера на свету и в темновых условиях ($6,6 \pm 1,30$ и $6,2 \pm 0,22$ мг БХл *a*/г сухого веса и $1,8 \pm 0,26$ и $1,8 \pm 0,24$ мг Кар/г сухого веса). Используемый в работе подход подбора условий культивирования может быть использован при биотехнологическом получении БХл *a*, Кар и Q10 из пурпурных бактерий.

ПОИСК РАННИХ БЕЛКОВ БАКТЕРИОФАГА 9g, ИНГИБИРУЮЩИХ РОСТ
БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Рассаина С.Ю.¹, Касьянов В.А.², Гуцол А.Д.³, Антонова Д.А.²

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

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

³Санкт-Петербургский государственный технологический институт,
Санкт-Петербург, Россия

st096656@student.spbu.ru

Возрастающая антибиотикоустойчивость бактерий возвратила интерес к применению природных вирусов бактерий – бактериофагов. Бактерия, инфицированная литическим фагом, перестает делиться, что связано с экспрессией ранних фаговых генов. Бактериофаг 9g, инфицирующий *E.coli*, содержит гены ранних белков, не имеющих гомологии с белками с известной функцией [1]. Скрининг ранних белков данного фага позволит обнаружить белки, влияющие на рост бактерий, и найти новые мишени для воздействия антибиотиков.

В рамках данной работы гены 9 ранних белков бактериофага 9g были заклонированы в коммерческий вектор pHERD20T, содержащий промотор под регуляцией арабинозного оперона. Клетки *E.coli* штамма DH5α, несущие полученные плазмидные конструкции, помещались в лунки планшета с питательной средой LB с ампициллином (100 мкг/мл) и 0,05% арабинозой. В контрольных образцах арабиноза не добавлялась. Затем планшет помещался в планшетный спектрофотометр на 37 °С, с детекцией оптической плотности OD600 раз в пять минут в течение 12 часов, с перемешиванием между раундами детекции. Гены, чья экспрессия оказывала влияние на рост *E.coli*, были протестированы в *P. aeruginosa* аналогично, но с добавлением карбенециллина (100 мкг/мл) и 0,5% арабинозы.

По результатам эксперимента были построены кривые роста. Белки Gr7, Gr19, Gr32 не оказали воздействия на рост клеток *E.coli*, белки Gr9, Gr30, Gr31, Gr37 и Gr38 существенно замедлили скорость роста культуры в присутствии индуктора, а белок Gr34 ингибирует скорость роста клеток вне зависимости от присутствия индуктора в среде. Также, синтез белков Gr30 и Gr34 приводит к значительному замедлению скорости роста *P. aeruginosa*. Таким образом, эти 2 белка представляют интерес для дальнейшей работы.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ №24-44-02003.

Литература.

1. Kulikov, E.E. и др. Genomic Sequencing and Biological Characteristics of a Novel Escherichia Coli Bacteriophage 9g, a Putative Representative of a New Siphoviridae Genus // Viruses.– 2014. – Т. 6. № 12 – С. 5077-5092.

КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНА ГАЛАКТОКИНАЗЫ В СОСТАВЕ МОБИЛИЗУЕМОГО СУИЦИДАЛЬНОГО ВЕКТОРА pJQ200KS

Рогова А.П.¹, Позднякова-Филатова И.Ю.²

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

²Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушино, Россия

irafilatova24@gmail.com

Констрелекция – явление часто используемое в генной инженерии. Например, при направленном внесении делеций в геном микроорганизмов с помощью двойного кроссинговера контрелекцию используют для подавления роста меродиплоидов. Ген *sacB*, который кодирует левансахаразу, является часто используемым контрелективным маркером. При культивировании клеток в присутствии сахарозы происходит накопление токсичного левана, что приводит к гибели организма. Однако некоторые микроорганизмы либо способны метаболизировать сахарозу, не давая накопиться левану, либо устойчивы к самому левану, что делает невозможным использование этого маркера для контрелективного отбора.

Плазмида pJQ200KS содержит в своем составе ген *sacB*, ориджин репликации в клетках кишечной палочки, ген устойчивости к антибиотику гентамицину и ориджин переноса *oriT*, и часто используется для получения мутантных штаммов как грамотрицательных, так и грамположительных микроорганизмов. Мы клонировали ген галактокиназы *galK* в составе плазмиды pJQ200KS, что позволило получить мобилизуемый суицидальный вектор с двумя контрелективными маркерами.

Для конструирования плазмиды pJQ200KSgalK мы использовали T5-экзонуклеазу (T5 exonuclease-dependent assembly): вектор pJQ200KS линейризовали по сайту SphI, ген *galK* с промотором амплифицировали с помощью специфических праймеров *galK_up*(TEDA_SphI) (gttgcaaacccactgatccgtatgctgacgctcaatgccg) и *galK_dw*(TEDA_SphI) (cagcttctgtatggaacgggctggcgtaatagcgaagaggc). Полученной смесью трансформировали компетентные клетки *E.coli* DH5a, после чего отбирали трансформанты, чувствительные к 2-дезоксигалактозе. Из трансформанта, имеющего наименьшую частоту возникновения мутации в гене *galK* (2 устойчивых клона на 10⁹ КОЕ) выделили плазмидную ДНК, готовую к использованию для сайт-направленного мутагенеза.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИЙ CRISPR-CAS ДЛЯ СОЗДАНИЯ ШТАММОВ *E. COLI* С ФЛУОРЕСЦЕНТНО-МЕЧЕНЫМИ БЕЛКАМИ RECА И RECН

Рошектаева В.Д., Нестеренко В.А., Морозова Н.Е.

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

victoria.rd@yandex.ru

SOS-ответ – процесс, возникающий в бактериальной клетке в ответ на повреждение ее ДНК ультрафиолетом или различными антибактериальными агентами. Активация SOS-ответа может привести к точному восстановлению поврежденных участков ДНК и адаптации бактерий к повреждающим воздействиям [1].

Одним из основных белков, участвующих в SOS-ответе, является рекомбиназа RecA, которая играет важную роль в точном восстановлении двунитевых разрывов ДНК. Помимо RecA, в этот процесс вовлечены и другие белки, включая SMC-подобный белок RecN, который синтезируется и функционирует на начальных этапах SOS-ответа [2].

На данный момент белок RecN *E. coli* является малоизученным. К настоящему времени нами были произведены эксперименты по выделению данного белка, а также по изучению его свойств: связывание с ДНК различной топологии, определение АТФазной активности, определение локализации белка в клетке при нормальных условиях и во время SOS-ответа [3].

В рамках данной работы было проведено геномное редактирование бактерий с целью создания штаммов, содержащих флуоресцентно-меченые белки SOS-ответа RecA и RecN, для их дальнейшей визуализации с помощью флуоресцентной микроскопии. Последовательность гена RecA была соединена с последовательностью флуоресцентного белка mNeonGreen, а последовательность гена RecN – с последовательностью флуоресцентного белка mScarlet. Геномное редактирование осуществлялось с использованием технологий CRISPR-Cas9.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-74-00085, <https://rscf.ru/project/24-74-00085/>

Литература.

1. Podlessek Z. et al., The DNA Damage Inducible SOS Response Is a Key Player in the Generation of Bacterial Persister Cells and Population Wide Tolerance. / Podlessek Z., Žgur Bertok D. // Front. Microbiol, 2020. – Vol. 11. – P. 1785.
2. Odsbu I. et al., DNA compaction in the early part of the SOS response is dependent on RecN and RecA. / Odsbu I., Skarstad K. // Microbiology, 2014. – Vol.160 N 5. – P. 872-882.
3. Viktoria D. Roshektaeva et al., Features of the DNA Escherichia coli RecN interaction revealed by fluorescence microscopy and single-molecule methods // Biochemical and Biophysical Research Communications, 2024. – Vol. 716. – 150009.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЕНОМОВ ЦИРКОВИРУСОВ СВИНЕЙ 2 ТИПА В ПОГОЛОВЬЕ ДОМАШНИХ СВИНЕЙ И ДИКИХ КАБАНОВ ТВЕРСКОЙ И БЕЛГОРОДСКОЙ ОБЛАСТЕЙ

Рыкова В.С., 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

Выявление актуальных генетических вариантов вирусов, циркулирующих в поголовье животных, является необходимым условием обеспечения благополучия сельского хозяйства нашей страны. Одним из важных для свиноводства патогенов является цирковирус свиней 2 типа (ЦВС-2). Это небольшой безоболочечный икосаэдрический вирус с кольцевым одноцепочечным ДНК-геномом размером 1.7 kb.

Мы исследовали образцы паренхиматозных органов (бронхиального лимфоузла, селезенки, легкого) и сывороток крови диких кабанов и домашних свиней Тверской и Белгородской областей методом ПЦР в реальном времени. Положительные образцы с лучшим Ct выбирали для последующей амплификации открытой рамки считывания 2 (ОРС2), кодирующей капсидный белок цирковирусов. Фрагменты ДНК секвенировали по Сенгеру. Хроматограммы анализировали в программе SeqMan, последовательности выравнивали с помощью алгоритма MUSCLE в программе MEGA7. Дендрограммы строили в программе MEGA7 с использованием метода максимального правдоподобия. Расчет генетических дистанций между последовательностями проводили в программе MEGA7.

Нами были исследованы образцы паренхиматозных органов от 35 диких кабанов Тверской области и 25 из Белгородской области, от 10 домашних свиней Белгородской области и сыворотки крови от 80 домашних свиней из Тверской области. Положительными на ЦВС-2 оказались 20 кабанов из Тверской области, 19 кабанов из Белгородской области, 12 свиней из Тверской области, 10 свиней из Белгородской области. Нуклеотидные последовательности ОРС2 ЦВС-2 были получены для 9 кабанов из Тверской области, 4 кабанов из Белгородской области, 2 свиней из Тверской области, 5 свиней из Белгородской области.

По результатам нашей работы было показано, что только одна из последовательностей, полученная от кабана из Белгородской области принадлежала генотипу ЦВС-2b, все остальные принадлежали генотипу ЦВС-2d. Нуклеотидная идентичность последовательностей, принадлежавших генотипу ЦВС-2d, составила 99,1-100%, что говорит о низком генетическом разнообразии ЦВС-2 в популяциях домашних и диких животных в двух не граничащих друг с другом регионах страны.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ «Изучение циркуляции вирусных патогенов в стадах диких кабанов на территории отдельных субъектов Российской Федерации с применением молекулярных методов и метагеномных подходов» № 23-76-10055.

БИОСИНТЕЗ КАРОТИНОИДОВ ШТАММОМ *LAETIPORUS SULPHUREUS* В УСЛОВИЯХ
ПОГРУЖЕННОГО И СТАЦИОНАРНОГО КО-КУЛЬТИВИРОВАНИЯ С ПРОДУЦЕНТОМ
ЦЕЛЛЮЛОЗЫ *GLUCONACETOBACTER HANSENI*

Савельева О.А., Громовых Т.И.

Московский политехнический университет, Москва, Россия

ylgur.helga@yandex.ru

Каротиноиды – это органические пигменты природного происхождения, синтезируемые бактериями, грибами, водорослями, высшими растениями и коралловыми полипами. Существует более 50 видов каротиноидов, известно, что многие из них обладают высокой антиоксидантной, противоопухолевой и кардиозащитной активностями, являются метаболическими предшественниками витамина А. В виду того, что синтез каротиноидов в организме человека невозможен, существует необходимость разработки биологически активной добавки, содержащей каротиноиды. Химический синтез этих веществ является очень сложным, поэтому получение каротиноидов целесообразно биотехнологическим способом.

В работе использован штамм MZ-22 (ВКМ F-4276D ксилотрофного базидиального макромицета *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill штамм), содержащего уникальный каротиноид – латипоровую кислоту. Для повышения продуктивности мицелия разработан способ ко-культивирования базидиомицета с продуцентом целлюлозопроизводящей бактерией *Gluconocetobacter hansenii* GH-1/2008 (ВКПМ В-1054).

Были изучены продуктивность мицелия, самоиммобилизующегося на пленке бактериальной целлюлозы в условиях глубинного и стационарного культивирования, оптимизирован состав питательной среды Хестрина-Шрамма (HS), путем замены в ней пептона на казеин в разных концентрациях (от 1 до 9 г/л), наилучшие результаты получили при концентрации казеина 2 г/л.

Каротиноид выделяли методом экстракции (24 часа при комнатной температуре) из биомассы с использованием этилового и изопропилового спиртов в качестве полярных растворителей для выделения экстрактивных веществ. Оптическую плотность экстрактов определяли на двухлучевом спектрофотометре Shimadzu UV-1800 при длине волны 450 нм. Использование этанола в качестве экстрагента оказалось наиболее эффективным, так как в этом случае содержание каротиноида составило 15,6 мг/л при погруженном культивировании продуцентов и 6,7 мг/л при стационарном культивировании. При использовании изопропанольной экстракции концентрация каротиноида оказалась значительно меньше – 2,5 мг/л при погруженном и 1 мг/л при стационарном культивировании.

Таким образом, представленные результаты демонстрируют перспективность биотехнологического подхода к получению каротиноидов, в частности, латипоровой кислоты, путем ко-культивирования *Laetiporus sulphureus* MZ-22 и *Gluconocetobacter hansenii* GH-1/2008. Дальнейшие исследования включают в себя проверку антимикробной активности полученных экстрактов, а также исследование и цито- и онкотоксичности.

ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА L-РАМНОЗЫ И ФОРМИРОВАНИЕ
БАКТЕРИАЛЬНЫХ МИКРОКОМПАРТМЕНТОВ В КЛЕТКАХ НОВОГО
ПРЕДСТАВИТЕЛЯ ФИЛУМА *VERRUCOMICROBIOTA*

Салова В.Д.¹, Данилова О.В.¹, Ошкин И.Ю.¹, Сузина Н.Е.², Дедыш С.Н.¹

¹Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

²Институт фундаментальных проблем биологии, ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований» РАН, Пущино, Россия

salovavd@gmail.com

Филум *Verrucomicrobiota* – одна из широко распространённых и многочисленных групп бактерий в почвах, пресных и морских экосистемах, а также микробиоме различных животных и человека.

Представитель этого филума, штамм Vm1, был выделен из биореактора с аэробными метанотрофами рода *Methylococcus*. Для культивирования изолята и физиологических тестов использовали жидкую минеральную среду NMS с целевым субстратом (250 мг/л), дрожжевым экстрактом (50 мг/л), pH 7. Морфологические наблюдения выполняли с помощью микроскопа Axioplan 2 (Zeiss, Германия) и электронного микроскопа JEM-1400 (JEOL, Япония). Секвенирование генома проводили с использованием MiSeq (“Illumina”, США) и MinIon (“Oxford Nanopore”, Великобритания). Гибридная сборка коротких и длинных прочтений была выполнена с помощью Unicycler. Для аннотации генома использовали PROKKA и GhostKOALA.

Штамм Vm1 был представлен мелкими диплококками (0.45 мкм), которые росли в аэробных условиях на средах, содержащих некоторые сахара, полисахариды и пептиды. Роста на метане не наблюдалось. Полученная в работе последовательность генома штамма Vm1 состояла из двух контигов, суммарной длиной около 4.8 млн пар оснований. В ходе аннотации было предсказано 4254 белок-кодирующих генов, 3 копии оперона рРНК и 52 генов тРНК. Геном штамма Vm1 содержал полный набор генов ряда основных метаболических путей – гликолиза, окислительного пентозофосфатного пути, КДФГ-пути, цикла трикарбоновых кислот без глиоксилатого шунта.

Одной из интересных особенностей штамма Vm1 являлась его способность расти на L-рамнозе, входящей в состав экзополисахаридов метанотрофов рода *Methylococcus*. Электронная микроскопия срезов клеток, выращенных на L-рамнозе, выявила наличие бактериальных микрокомпарментов (БМК), формирующихся в клетках ряда представителей филумов *Planctomycetota* и *Verrucomicrobiota* при росте на дезокси-L-сахарах (L-рамнозе и L-фукозе). БМК необходимы для изоляции токсичного лактальдегида, образующегося при окислении этих сахаров. В геноме штамма Vm1 были обнаружены α-L-рамнозидазы и пути метаболизма L-рамнозы. Анализ выявил кластер генов БМК, включающий регулятор транскрипции семейства DeoR, четыре гена гексамер- и три гена пентамер-формирующих субъединиц оболочки, а также пять генов, кодирующих ферменты. В геноме был также

обнаружен БМК-независимый путь деградации L-рамнозы, ключевым ферментом которого является предполагаемый бифункциональный фермент, обладающий рамнулозо-1-фосфат альдозазной и лактальдегидрогеназной активностями. Вероятно, штамм Vm1 использует эти пути при росте в ассоциации с метанотрофами рода *Methylococcus*.

Работа поддержана грантом РФФИ № 25-24-00426.

ОЦЕНКА АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ШТАММОВ *BEAUVERIA BASSIANA*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПОЧВ МОСКОВСКОЙ И ВЛАДИМИРСКОЙ ОБЛАСТЕЙ

Скачкова А.Д., Козлов А.В.

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

a.skachkova@list.ru

Целью работы явилась оценка антагонистической активности штаммов *Beauveria bassiana*, выделенных из почв Владимирской и Московской области: *B. bassiana* DS3.2-О (Владимирская область, д. Сергеевка, садовая почва), *B. bassiana* БЭ5.2-О (Московская область, лесная подстилка). Выделение штаммов проводили методом приманки на гусениц *G. mellonella*. Оценку антагонистических свойств штаммов *B. bassiana* в отношении фитопатогенных грибов производили методом встречных культур. Для этого в чашки Петри с застывшим картофельно-сахарозным агаром (КСА) раскладывали блоки тест-культур *B. bassiana*, отступая 2 см от края чашки, а с противоположного края клали блок тест-культуры фитопатогенного гриба. В качестве контроля грибы выращивали изолированно друг от друга. Инкубирование посевов осуществляли при 25°C 7-14 дней. Анализ производили путем измерения диаметра мицелия фитопатогенов и рассчитывали индекс ингибирования роста по формуле:

$ИИР = ((R_1 - R_2) / R_1) * 100\%$, где

ИИР – индекс ингибирования роста, %;

R_1 – диаметр мицелия фитопатогенного гриба в контрольном варианте, мм;

R_2 – диаметр мицелия фитопатогенного гриба в опыте, мм.

Для оценки бактерицидных свойств штаммов использовали метод аппликации агарового блока: на поверхность застывшего КСА наносили бактериальную суспензию анализируемого штамма бактерии (полученную из суточной культуры с титром не менее 10^8 клеток/мл) и сверху раскладывали блоки штаммов *B. bassiana* (диаметр блока 1 см). Инкубирование посевов осуществляли при 28°C в течение 2-3 суток. Анализ антагонистической активности проводили измеряя диаметр зоны отсутствия бактериальных колоний вокруг блоков *B. bassiana*.

Результаты анализа показали, что штамм *B. bassiana* DS3.2-О способен подавлять рост чистых культур фитопатогенных грибов более, чем на 40%: *A. solani* 473 (выделен из клубня картофеля), *Drechslera teres* (выделен из листа ячменя), *Fusarium culmorum* 63 (выделен из колоса ржи), *F. graminearum* MFG 58918 (выделен из колоса пшеницы), *Macrophomina phaseolina* 1 (выделен из корнеплода сахарной свеклы) и на 38,5% *Pestalotiopsis funerea* X-001 (выделен из стебля туи), *Rhizoctonia solani* (выделен из почвы, Ленинградская область). Штамм также оказывал ингибирование роста колоний следующих бактерий: *Xantomonas pisi* 633, *X. arboricola* 614, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* 101.

ИИР штамма *B. bassiana* БЭ5.2-О в отношении *D. teres* составил 43% и 41% для *F. culmorum* 63, *F. graminearum* MFG 58918. В меньшей степени (до 39%) штамм подавлял рост *M. phaseolina* 1, *P. funerea* X-001, *R. solani* и *A. solani* 473. Штамм *B. bassiana* БЭ5.2-О не обладал бактерицидными свойствами в отношении рассмотренных в данной работе культур.

Полученные результаты открывают возможности для использования штаммов *B. bassiana* в качестве биологических средств защиты растений не только от насекомых-вредителей, но и от фитопатогенных грибов и бактерий. Это может быть перспективным для развития устойчивых методов защиты сельскохозяйственных культур.

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА КРАПИВЫ ДВУДОМНОЙ (*URTICA DIOICA*) НА
БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЕ ЛАБОРАТОРНОГО И ПАТОГЕННОГО ШТАММОВ
ESCHERICHIA COLI

Сутормина Л.В., Якубова Г.Ф., Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н.

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН,
Пермь, Россия

lyubov-sutormina@mail.ru

Инфекционные заболевания, вызванные патогенными для птиц штаммами *Escherichia coli* (АРЕС), включая колибактериоз, являются одной из ведущих причин смертности птиц и приводят к серьезным экономическим потерям в птицеводстве. Значительная часть бактерий существует в виде биоплёнок, что снижает их восприимчивость к противомикробным препаратам и приводит к неэффективности лечения. В свете поиска альтернативных методов борьбы с колибактериозом изучение влияния БАВ растительного происхождения на бактерии и их способность образовывать биопленки представляет собой актуальное направление исследований.

Крапива двудомная (*Urtica dioica*), многолетнее травянистое растение, известна своими биологически активными свойствами и широко используются в народной медицине. Поэтому препараты, полученные на основе этого растения, являются перспективными объектами для изучения их влияния на живые клетки.

Цель данной работы – изучить влияние предобработки водным экстрактом крапивы двудомной на способность лабораторного и патогенного штаммов *E. coli* образовывать биопленки.

В экспериментах использовались лабораторный штамм *E. coli* BW25113 из коллекции Keio и штамм *E. coli* АРЕС L-5876, выделенный из птиц, больных колибактериозом. Исследуемые штаммы выращивали на минимальной среде М9 с добавлением 4 г/л глюкозы в 96-луночных полистироловых планшетах при 37°C в течение 22 часов. Интенсивность биопленкообразования оценивали путем окрашивания генцианвиолетом. Рост свободноплавающих клеток определяли по изменению оптической плотности при длине волны 600 нм (OD600), а величину валового (BF) и удельного (SBF) биопленкообразования – при длине волны 540 нм (OD540), используя планшетный спектрофотометр xMark™ (Bio-Rad). Водный экстракт крапивы двудомной был получен из аптечного препарата «Крапивы листья» торговой марки «ФармаЦвет». Действующая концентрация экстракта 2.5 мг/мл.

Величина OD600 в контрольных условиях составляла 0.289 ± 0.03 и 0.431 ± 0.02 для штаммов BW25113 и АРЕС L-5876 соответственно. В присутствии экстракта крапивы в концентрации 2.5 мг/мл наблюдали стимулирование роста планктонных клеток у BW25113 в 1.4 раза и в 1.3 раза у АРЕС L-5876 по сравнению с необработанными клетками.

В контрольных условиях значения OD540 были выше у штамма BW25113 в 7.9 раз, чем у L-5876, величина валового биопленкообразования составляла 0.150 ± 0.008 и 0.019 ± 0.003 соответственно. В присутствии экстракта крапивы показатель BF был ниже в 5 раз у BW25113, и в 2.3 раза у L-5876 по сравнению с контролем.

Удельное биопленкообразование (SBF) определяли как отношение величины OD540 к OD600. В контрольных условиях показатель SBF у BW25113 был в 4.2 раза выше, чем у L-5876. Добавление экстракта крапивы в исследуемой концентрации снижало удельное биопленкообразование у BW25113 и L-5876 в 4.6 и 7 раз соответственно в сравнении с этим показателем в контрольных условиях.

Таким образом, в присутствии водного экстракта крапивы двудомной наблюдали значительное снижение способности исследуемых штаммов к образованию биопленок и увеличение количества свободноплавающих клеток. В целом, полученные результаты указывают на перспективность использования экстракта крапивы двудомной для изучения его влияния на механизмы биопленкообразования бактерий.

Исследование выполнено в соответствии с государственным заданием АААА-А19-119112290009-1.

ВИДОВОЙ СОСТАВ И АГРЕССИВНОСТЬ ГРИБОВ РОДА *FUSARIUM* НА КУЛЬТУРЕ МОРКОВИ СТОЛОВОЙ

Тихонова Т.О., Козарь Е.Г., Енгальчева И.А., Степанов В.А.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный
центр овощеводства», Одинцовский округ, Россия

tikhonova@tatyana94.ru

Одной из основных причин снижения эффективности производства моркови столовой являются потери товарной продукции в результате длительного хранения, которые могут достигать 25-60% и выше через 3-6 месяцев хранения. В последние десятилетия для данной культуры отмечено нарастание агрессивности и изменение видового состава возбудителей фузариозной гнили. По последним данным, в Китае в отдельные годы поражение сухой фузариозной гнилью, а именно видами *F. oxysporum* и *F. solani*, достигало до 80%. Во Франции ежегодно на посевах моркови наблюдается сухая и мягкая гниль, вызванная преимущественно видами *F. avenaceum*, *F. tricinctum*, реже встречаются *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. acuminatum* и *F. solani*. В Польше группа анаморфных гифомицетов в основном представлена видами *F. culmorum* и *F. oxysporum*. Экспериментально доказано, что в процессе эволюции на разнообразие механизмов патогенности и специализации к растению-хозяину у микромицетов рода *Fusarium* определенную роль может играть горизонтальный перенос генов вирулентности от патогенного штамма к непатогенному, что объясняет увеличение разнообразия и рост агрессивности грибов этого рода.

Исследования выполнялись с 2019 по 2024 годы на базе лаборатории молекулярно-иммунологических исследований ФГБНУ «Федеральный научный центр овощеводства» (ФГБНУ ФНЦО). Суммарно с пораженных корнеплодов моркови столовой было выделено 54 изолята микромицетов рода *Fusarium*. Для идентификации в ходе исследований изучены культуральные макро – и микроморфологические признаки колоний изучаемых изолятов. Проведенная оценка выделенных изолятов путем искусственного заражения корнеплодов и листьев у четырех образцов моркови выявила различную специфичность в отношении поражаемых ими органов растений. Большая часть изученных изолятов проявила высокую активность при заражении листьев. Отсутствие симптомов поражения на листовом аппарате зарегистрировано при инокуляции 9% изолятов, тогда как на корнеплодах – 24% изолятов. Лабораторная оценка патогенности и степени агрессивности изучаемых изолятов *Fusarium* на листьях и корнеплодах моркови выявила существенные различия между ними: 30% и 44% соответственно проявили низкую степень агрессивности, доля средне агрессивных была сопоставима и составила около 20%. Наибольший удельный вес изолятов, вызывающих поражение листовой пластинки были высокоагрессивными – 41%, тогда как процент из аналогичной группы, поражающих корнеплоды, был значительно ниже и составил только 11%. Необходимо отметить, что в группе высоко агрессивных присутствовали изоляты проявившую высокую активность как в отношении корнеплодов, так и в отношении листьев. Проведенная идентификация позволила отнести данные изоляты к четырем различным видам

Fusarium: *F. avenacium*, *F. oxysporum*, *F. sporotrichioides* и *F. acuminatum*. Необходимо отметить, что виды *F. avenacium* и *F. oxysporum* широко распространены в средней полосе России в патогенезе сухой гнили моркови, тогда как виды *F. sporotrichioides* и *F. acuminatum* зарегистрированы нами впервые. Это является доказательством расширения видового разнообразия фитопатогенных грибов рода *Fusarium* и повышения агрессивности аборигенных видов. Таким образом, полученные данные по идентификации видового состава *Fusarium* с помощью фитопатологических методов и молекулярного маркирования, оценки их агрессивности в отношении растения-хозяина являются значимыми в разработке стратегии защитных мероприятий и проведения иммунологических исследований в селекции на иммунитет.

БАКТЕРИИ АРКТИЧЕСКИХ МОРЕЙ КАК ИСТОЧНИКИ НОВЫХ АНТИБИОТИКОВ

Трошина Д.А.^{1,2}, Кроленко В.И.³, Коновалова О.П.⁴, Антоненц К.С.^{5,6}

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

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

³Институт проблем экологии и эволюции имени А.Н. Северцова РАН, Москва, Россия

⁴ООО «Центр морских исследований МГУ имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

⁵Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии,
Санкт-Петербург, Россия

⁶Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

darya.troshina02@mail.ru

На сегодняшний день одним из ключевых направлений развития сельского хозяйства является его экологизация, которая включает сокращение использования средств защиты растений, содержащих опасные химические вещества. Одна из альтернатив – биопестициды, основанные на использовании природных бактерий. Однако, не всегда можно подобрать бактерии, эффективные против патогенов растений, в связи с этим является актуальным поиск новых бактерий, обладающих антимикробным действием. Арктические морские микроорганизмы за счет экстремальных условий обитания (низкие температуры, наличие ледового покрова в течение продолжительного времени, низкое содержание органики и т.п.) также являются перспективным источником антибиотических веществ.

В задачи исследования входило поиск бактерий, потенциально способных к продукции бактерицидных и фунгицидных соединений, в донных отложениях и в микробиоте членистоногих в Северных морях России. Материал для данной работы был получен в 58-м рейсе НИС «Профессор Молчанов» в июле-августе 2024 г. Отбор образцов донных отложений проводился на 63 станциях на глубинах от 12 до 1700 м в Баренцевом, Карском море, море Лаптевых и континентальном склоне. Также в данных акваториях были отобраны представители класса Crustacea - 22 с пробами донных отложений и 5 из проб воды путем фильтрации. Полученные из отобранных материалов бактериальные колонии отличались по морфологическим признакам, условиям культивации и скорости роста. Часть данных арктических бактерий при тестировании антагонистической активности к возбудителям болезней растений (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Clavibacter michiganensis*, *Pectobacterium carotovorum*, *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas* sp.) выявило подавление роста грамотрицательных патогенов.

Предварительный анализ посевов бактерий из донных отложений и ракообразных позволяет сделать вывод о том, что количество и разнообразие образцов достаточно для поиска бактерий с бактерицидными, фунгицидными и инсектицидными свойствами. Наличие бактериальной культуры, продуцирующей антибиотические соединения, говорит о потенциальной ценности выделенных изолятов для сельского хозяйства.

Работа выполнена в рамках Всероссийской научно-образовательной программы «Плавучий университет» (соглашение № 075-03-2024-117).

БИОДЕГРАДАЦИЯ НЕФТИ ШТАММОМ *ASPERGILLUS NIGER* F-4815D

Тутучкина В.В.¹, Миндубаев А.З.², Бабынин Э.В.²

¹Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН, Казань, Россия

²ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия

mindubaev-az@yandex.ru

Нефти и нефтепродукты – основные загрязнители окружающей среды на сегодняшний день. Нефтепродукты в плане токсичности менее опасны для окружающей среды, чем соединения фосфора, но производятся и потребляются в значительно больших объемах. В представленном исследовании исследовалась биодegradация нефти с месторождения Первомайское (Республика Татарстан). В качестве микроорганизма деструктора выбран *Aspergillus niger* F-4815D, который ранее уже применялся для биодegradации белого фосфора и показал себя эффективным и универсальным деструктором токсичных загрязнителей.

Культуры высевались в планшеты Corning, скорость роста оценивалась микропланшетным ридером Infinite F200 Pro, Tecan (Австрия). Посев производился в среду состава (г/л) NaCl 2.5; MgSO₄ 0.5; KNO₃ 2.0, глюкоза 8.0. Хроматомасс-спектрометрическое (ГХ-МС) исследование проводилось на газовом хроматографе “Agilent 6890N” с масс-спектрометрическим детектором “5973 N” (“Agilent Technologies”, США).

Обращает внимание то, что в присутствии микроорганизмов с нефтями происходят изменения. На 18 сутки после посева стало заметно, что в среде, содержащей глюкозу в качестве основного источника углерода, нефть изменила консистенцию: утратила текучесть и собралась в комки. В среде без глюкозы нефти остались без изменений – по всей видимости, рост *A. niger* в ней не начался.

Мы провели более углубленное исследование методом ГХ-МС. В присутствии глюкозы в качестве основного источника углерода, нефть подвергается грибом глубокой деструкции. Без глюкозы деструкция тоже присутствует, но медленная и неглубокая. Получены следующие результаты химического состава. Наименьшее количество компонентов, выявленных ГХ-МС, 18, в варианте с глюкозой. В этом варианте появляются сигналы соединений, окисленных кислородом (кетонов, лактонов). Это означает, что разросшаяся на глюкозе биомасса гриба осуществляет биодegradацию компонентов нефти. Гриб, в первую очередь, метаболизирует алканы как нормального, так и разветвленного строения. Ароматические соединения разлагаются хуже.

Наиболее сложный состав (39 компонентов) в негативном контроле, в стерильной нефти. В посевах *A. niger* F-4815D без глюкозы количество компонентов составляет промежуточную величину, равную 30. Из этого можно сделать заключение, что *A. niger* способен существовать в присутствии нефти в качестве единственного источника углерода и осуществлять ее биодegradацию, однако процесс этот очень медленный, а биодеструкция менее глубокая, чем в присутствии глюкозы. Данный результат тоже хорошо соотносится с представленными выше.

Можно сделать вывод о том, что нефти подвергаются частичной биодegradации штаммом аспергилла, но только при наличии дополнительных легкоусваиваемых источников углерода. В принципе, дорогостоящую глюкозу можно заменить сельскохозяйственными отходами. При этом, нефть меняет консистенцию и становится комковатой. В перспективе, это открывает возможности для создания методов сбора нефти, поскольку комки собираются легче, чем жидкая пленка.

НОВЫЕ БАКТЕРИОФАГИ PSEUDOMONAS ДЛЯ ТЕРАПИИ ИНФЕКЦИЙ,
ВЫЗЫВАЕМЫХ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Федорова М.С., Анисимова А.А., Азнабаева З.А., Тризна Е.Ю., Каюмов А.Р.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

MaSFedorova97@mail.ru

На сегодняшний день снижение эффективности антибиотикотерапии во всём мире связано с быстрым развитием бактериальной резистентности к препаратам, поэтому поиск и разработка альтернативных подходов противомикробной терапии является актуальной задачей. Бактерии группы ESKAPE обладают множественной резистентностью к антимикробным препаратам и высокой вирулентностью, тем самым являясь причиной развития различных инфекционных заболеваний во всём мире. Одним из представителей данной группы является бактерия *Pseudomonas aeruginosa*. На сегодняшний день в качестве возможных подходов противомикробной терапии синегнойных инфекций могут стать бактериофаги как самостоятельный препарат, а также бактериофаги в комбинации с традиционными антимикробными препаратами. Проводили выделение новых бактериофагов из воды различных водоемов Поволжья с последующей оценкой вирулентных свойств бактериофагов в отношении клинических изолятов бактерий *P. aeruginosa*, и оценивали возможность повышения эффективности терапии синегнойных инфекций при их сочетанном действии антибиотиков с бактериофагом. Далее проводили анализ генома выделенных бактериофагов, с целью анализа наличия генов рекомбинации, которые ограничивают использование данных бактериофагов в качестве противомикробных препаратов *in vivo*. Оценивали возможность повышения эффективности антибиотиков с помощью бактериофагов на моделях синегнойной инфекции глаза у кроликов (работа выполнена с одобрения локального этического комитета КФУ – протокол №50 от 26.09.2024г). Так, после заражения глазной поверхности животных синегнойной инфекцией, проводилось лечение отдельных групп кроликов различными подходами: только антимикробными препаратами; комбинированными препаратами (антибиотик в сочетании с бактериофагом). Лечение инфекции проводилось до полной элиминации возбудителя у одной из групп (для оценки обсемененности глаза, на протяжении всего эксперимента брались смывы с глазной поверхности и оценивались показатели микробной обсемененности глаз). По окончании эксперимента дополнительно проводили анализ гистологических срезов роговицы глаза. В результате полученных данных, было показано, что комбинированный препарат (бактериофаг в сочетании с антибиотиком) показал высокую эффективность данного подхода для лечения синегнойного кератита на моделях *in vivo*.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения задания в сфере научной деятельности. Проект № FZSM2022-0017.

РАЗНООБРАЗИЕ И ЧИСЛЕННОСТЬ МИКРОБНОЙ КОМПОНЕНТЫ ПОЧВ
АРКТИЧЕСКОЙ СТАНЦИИ ОСТРОВ АНДРЕЯ, ЗАГРЯЗНЁННЫХ НЕФТЕПРОДУКТАМИ

Филатов И.Д., Манучарова Н.А., Новиков В.В.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Факультет почвоведения, Москва, Россия

ivan_filatov21@mail.ru

На островах российского арктического архипелага, после прекращения функционирования военных баз и создания метеостанций, происходит загрязнение углеводородами территорий, богатых уникальным биоразнообразием, в результате непрекращающегося завоза нефтепродуктов. Оценка поведения микробиоты в образцах с фоновым загрязнением и загрязнённых нефтепродуктами в модельных экспериментах позволяет определить способность прокариот к ремедиации и выявить доминантные микроорганизмы в среде с углеводородным загрязнением в экстремальных условиях, где ранее не проводилась подобная оценка.

Целью работы являлась оценка численности, метаболической компоненты и разнообразия бактериального комплекса почв арктической станции Остров Андрея, загрязнённых углеводородами нефти.

Для анализа были выбраны две серии экспериментов: фоновые образцы, отобранные у дороги возле дизельной станции ($C_xH_y \approx 1\%$) и загрязнённые нефтью до 10 % по массе грунта. В качестве контрольных образцов использовали почвы (заболоченные арктотундровые гумусовые слабооглеенные почвы) на склоне оврага с ненарушенным растительным покровом.

В ходе работ применяли молекулярно-биологические (люминесцентная микроскопия, FISH, секвенирование) и аналитические методы (измерение массовой доли остаточных нефтепродуктов).

По истечении месяца численность прокариот для образцов с нефтяным загрязнением составляла $6,97 \cdot 10^8$ шт./г почвы, в то время как для контроля и фона она достигала $1,94 \cdot 10^9$ и $2,53 \cdot 10^9$ шт./г почвы. При этом, доля метаболически активных прокариот (бактерий и архей) для контроля минимальна – $2,94 \cdot 10^8$ (15 %), тогда как для фонового и нефтезагрязнённого образцов составляет $7,11 \cdot 10^8$ и $1,84 \cdot 10^8$ (32 и 31 %). Более 90% из которых во всех случаях составляют бактерии, доля архей гораздо ниже. Количество углеводородов нефти при этом уменьшилось для фонового и нефтезагрязнённого образца с 1 до 0,4 % и 10 до 9,1 %. В контрольном варианте без загрязнений доминируют филумы *Pseudomonadota* (43 %), *Acidobacteriota* (18,5 %) и *Bacteroidota* (12%), в то время как в загрязнённом модельном образце доминирующим остался только филум *Pseudomonadota* (77 %). Причём даже на уровне класса внутри этого филума произошло изменение, в загрязнённом образце классы *Beta-* и *Gammaproteobacteria* почти полностью заменили ранее доминантный класс *Alphaproteobacteria*. Для фонового образца на первый план выходит филум *Actinomycetota* (47

%), представителей филума *Pseudomonadota* меньше ($\approx 30\%$), и их представители частично повторяют состав загрязнённого модельного образца. Индекс разнообразия Шеннона для образцов контроля и фона составлял 6,36 и 6,23, когда как для нефти он составил 4,04.

Полученные данные свидетельствуют о снижении численности и разнообразия бактериального сообщества при внесении нефти (10 %) по сравнению с контролем, и возрастании этих параметров в фоновом варианте. В образцах, загрязнённых нефтепродуктами *in situ* наблюдается снижение α -разнообразия и уменьшения количества метаболически активных прокариот, когда как при фоновом загрязнении наблюдается увеличение показателей разнообразия и метаболической компоненты. Соотношение метаболически активных бактерий и архей сохраняется для всех типов образцов. В ходе эксперимента наибольшее снижение количества углеводов установлено в модельном опыте.

Работа поддержана грантом РФФ № 24-14-00108.

СПОСОБНОСТЬ КЛОНОВ *PARAMECIUM CAUDATUM* К ФОРМИРОВАНИЮ
СИМБИОТИЧЕСКИХ ОТНОШЕНИЙ С БАКТЕРИЯМИ ДВУХ ВИДОВ РОДА *HOLOSPORA*

Чекрыгин С.А., Сабанеева Е.В., Лебедева Н.А.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
образования «Санкт-Петербургский государственный университет»,
Санкт-Петербург, Россия

s.chekrygin@spbu.ru

Симбиоз между инфузориями рода *Paramecium* и бактериями рода *Holospira* представляет собой интересный биологический феномен, исследуемый в клеточной биологии и микробиологии. Два вида *Holospira* – *H. undulata* и *H. obtusa* – инфицируют соответственно микронуклеус (МИ) и макронуклеус (МА) инфузорий *Paramecium caudatum*, что делает их уникальной моделью для изучения внутриклеточного симбиоза и эволюционной кооперации микроорганизмов. Исследования показывают, что присутствие эндосимбионта может оказывать как положительное, так и отрицательное влияние на хозяина. В частности, обладающие эндосимбионтами рода *Holospira* инфузории демонстрируют повышенную устойчивость к стрессам, но при этом их скорость деления замедляется, а клеточные процессы изменяются.

Исследование проводилось на 32 клонах *Paramecium caudatum*, полученных из Российской коллекции культур микроорганизмов, РС ССМ. Свободные от эндосимбионтов (20 клонов) и инфицированные видами *H. undulata* (11 клонов) и *H. obtusa* (1 клон) клоны *P. caudatum* культивировали на салатной среде, инокулированной *Klebsiella* sp.. Для заражения клетки, содержащие холоспор, концентрировали центрифугированием и разрушали с помощью ручного гомогенизатора для выделения инфекционных форм (ИФ). Концентрацию ИФ определяли с помощью счетной камеры Горяева. В случае одновременного добавления ИФ двух видов холоспор к реципиентным клеткам использовали равные объемы гомогената. Для наблюдения за процессом инфицирования клетки просматривали под микроскопом с помощью микрокомпрессора для иммобилизации.

В результате некоторые клоны оказались резистентными в разной степени к заражению (50%). Остальные клоны успешно заражались обоими видами холоспор и были выбраны для получения двойного заражения. При одновременном добавлении инфекционных форм *H. obtusa* и *H. undulata* оба вида бактерий занимали свои целевые компартменты, т.е. *H. undulata* попадала в МИ, а *H. obtusa* – в МА. Однако со временем наблюдалось несколько сценариев развития инфекции. В 65% случаев *H. obtusa* пролиферировала активнее и вытесняла *H. undulata*. В 11% случаев, была обратная ситуация, *H. undulata* подавляла рост *H. obtusa*. В 2% случаев оба симбионта сохранялись в клетке-хозяине в течение нескольких месяцев, но впоследствии один из них исчезал и только в редких случаях (1%) *H. undulata* проникала в МА, что сопровождалось потерей МИ и образованием стабильных амикронуклеарных клеток, несущих двойную инфекцию в одном компартменте.

Полученные данные подтверждают, что отобранные клоны *P. caudatum* являются универсальными реципиентами для двух видов бактерий рода *Holospira*, однако стабильность двойной инфекции зависит от множества факторов. Для поддержания двойной системы необходимо интенсивное кормление инфузорий, в противном случае система распадается и остается только один из симбионтов, какой именно зависит от конкретного клона реципиента. Одной из ключевых особенностей двойной симбиотической системы является снижение жизнеспособности и замедленное деление инфузорий. Попытки экспериментального заражения клеток с уже присутствующим одним из симбионтов не приводили к успешной инфекции, что указывает на сложные механизмы конкуренции и взаимодействия между внутриклеточными бактериями. Таким образом, симбиоз инфузорий и бактерий *Holospira* представляет собой сложную динамическую систему, в которой кооперация и конкуренция определяют успешность взаимодействий.

ТОНКОЕ СТРОЕНИЕ АМЕБ НОВОГО ВИДА РОДА *DERMATOEBEA*
(АМОЕВОЗОА: DISCOSEA)

Чикадзе Е.Д.¹, Камышацкая О.Г.^{1,2}, Мезенцев Е.С.¹

¹Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра зоологии беспозвоночных,
Санкт-Петербург, Россия

²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

lizapetrova842@gmail.com

Амебы рода *Dermatoeoba* имеют широкое географическое распространение и населяют наземные и пресноводные местообитания. Во время движения, клетки имеют вытянутую овальную форму с суженным передним концом, при этом на дорсальной стороне гребней обычно нет. Все представители рода обладают уникальным толстым гликокаликсом, который обычно виден даже при светомикроскопических исследованиях. На ультраструктурном уровне в гликокаликсе выделяют от 3 до 4 слоев. Базальный (или основной) слой состоит из веретенообразных структур, идущих параллельно мембране. Над ним располагается комковатый; выше слой фибрилл, расположенных перпендикулярно мембране. Самый внешний слой состоит из аморфного материала.

Многие дермамебы – микофаги, в том числе могут питаться фитопатагенами. Но несмотря на важную роль в трофических цепях и широкое распространение на сегодняшний день описано лишь четыре вида, а молекулярные данные получены лишь для двух. При этом, культура типового вида (*D. granifera*) была утрачена, молекулярных данных для этого вида нет, и для его надежной реизоляции есть возможность ориентироваться только на светомикроскопические и ультраструктурные данные.

Нами были изолированы один штамм дермамеб из проб мха из Дальних Зеленцов, и еще два из почвы с острова Кипр. По результатам морфологической идентификации штаммы 165 и Мария были отнесены к виду *D. fibula*, а 149 не удалось отнести ни к одному из известных видов. Однако, анализ молекулярных данных показал, что последовательности гена COI штаммов 165 и 149 идентичны, а последовательность штамма Мария имеет незначительные отличия от остальных, не влияющие на аминокислотную последовательность молекулы. При этом все три полученные последовательности существенно отличались от последовательностей этого гена двух ранее описанных видов. Таким образом, можно предположить, что все три штамма являются одним новым видом.

Несоответствие молекулярных и морфологических данных может говорить, о том, что идентификация только на светомикроскопическом уровне не всегда точна поскольку состояния небольшого количества используемых морфологических признаков у *Dermatoeoba* могут сильно различаться в зависимости от условий культивирования, а значит для надежной идентификации необходимо получение молекулярных маркеров.

Также нами были получены ультраструктурные данные для штамма Мария. На наших фотографиях однозначно можно выделить 3 слоя: базальный, занимающий около половины

общей толщины, слой перпендикулярных элементов, который гомологичен «фибрилярному слою» и аморфный слой. Однако, в отличие от данных по другим видам, структура слоя перпендикулярных элементов упорядочена, а на поперечных срезах можно отметить пентагональные ячейки. Всё это дает основание полагать, что слой, ранее описанный как «фибрилярный», на самом деле состоит из гликостилелей. Ядрышко состояло из негетерогенного зернистого материала, такое же строение упоминалось в работах и ранее.

Несмотря на то, что в общих чертах покровы нашего штамма похожи на покровы известных видов этого рода мы обнаружили некоторые различия в их строении. Возможно, ультраструктуру покровов можно использовать для более точной идентификации.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 23-74-00050 с использованием оборудования РЦ «Развитие молекулярных и клеточных технологий», «Культивирование микроорганизмов», «Биобанк» Научного парка СПбГУ.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ЛИТИЯ НА ГАЛОФИЛЬНЫЕ АРХЕИ *HALOARCULA*
HISPANICA В-1755 И *HALOFERAX GIBBONSII* В-1756

Шайкин А.А., Абашина Т.Н., Вайнштейн М.Б.

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН» (Институт биохимии
и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН), Пущино, Россия

shaikin.artem@gmail.com

Литий является химическим элементом, приобретающим широкое использование и значение в современных технологиях. Вместе с этим его возможное влияние на живые организмы до сих пор мало исследовано.

Целью нашей работы было изучение влияния ионов лития на галофильные культуры прокариот, которые способны жить в среде с высоким содержанием одновалентных катионов Na^+ (200 г/л). Исследование перспективно для извлечения лития из использованных литийсодержащих гальванических элементов питания для дальнейшего повторения производства.

Использованные в работе штаммы галофильных архей *Haloarcula hispanica* ВКМ В-1755 и *Haloferax gibbonsii* ВКМ В-1756. Выращивали в среде DSMZ 372 в трех вариантах: с добавлением NaCl или $\text{NaCl}+\text{LiCl}$, или LiCl . Оценку роста проводили по общему виду культуры, по числу клеток при микроскопии и по изменению оптической плотности спектрофотометрическим методом, при длине волны 600 нм (OD_{600}), в течении недели.

Экспериментальная проверка показала, что штамм *H. hispanica* ВКМ В-1755 не рос при высокой концентрации ионов лития в среде, тогда как *H. gibbonsii* ВКМ В-1756 рос в жидкой среде с концентрацией 200 г LiCl /л с соответствующим повышением аккумуляции лития в биомассе.

Таким образом *Haloferax gibbonsii* ВКМ В-1756 может быть использован в переработке литийсодержащих элементов питания с извлечением лития для производства новых элементов питания.

СТРУКТУРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ,
СИНТЕЗИРУЕМОЙ ШТАММОМ *GLUCONACETOBACTER HANSENI* GH-1/2008 НА
СРЕДАХ С ПОЛИВИНИЛОВЫМ СПИРТОМ

Шалина Н.А.^{1,2}, Громовых Т.И.^{1,2}, Архарова Н.А.², Клечковская В.В.², Луиен К.Л.¹

¹Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Московский политехнический университет», Москва, Россия

²Курчатовский комплекс кристаллографии и фотоники НИЦ «Курчатовский институт»,
Москва, Россия

nattie.shalina@gmail.com

Бактериальная целлюлоза – наноструктурный полимер, который синтезируется прокариотами, имеет уникальную трехмерную структуру. Формирование структуры гелевых пленок бактериальной целлюлозы зависит от штамма-продуцента, источника углерода, состава питательной среды и условий культивирования. Этот полимер легко поддается модификациям, что позволяет получить на его основе нанокомпозиты заданной функциональности, при этом модификация может осуществляться двумя путями: *in situ* и *ex situ*. В работе проведены исследования по модификации бактериальной целлюлозы *in situ* путем добавления в стандартную питательную среду во время культивирования штамма-продуцента *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008 поливинилового спирта.

В результате исследований показано, что культивирование штамма *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 на среде с поливиниловым спиртом не снижает продуктивность биосинтеза полимера бактериальной целлюлозы, но изменяет его микроструктуру. При двухступенчатой оптимизации состава среды методом полного факторного эксперимента и «крутого восхождения-спуска» показано, что для получения максимального количества биополимера бактериальной целлюлозы штаммом-продуцентом количество используемой глюкозы в среде оптимально 15 г/л, а поливинилового спирта 20 г/л.

При культивировании штамма *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 на средах с поливиниловым спиртом формируются пленки бактериальной целлюлозы, имеющие структуры, отличные от структур, формирующихся на среде с глюкозой. Диаметр пор пленок бактериальной целлюлозы колеблется в пределах 20 – 300 нм; самый распространенный размер нановолокон целлюлозных волокон находится в диапазоне 30 – 40 нм для всех пленок, синтезируемых на средах с введением поливинилового спирта.

Физико-механические свойства пленок бактериальной целлюлозы зависят от их структуры и толщины. Максимальная прочность 112,43 МПа и максимальный модуль Юнга 4283,55 МПа отмечена для пленок бактериальной целлюлозы толщиной 0,04 мм, синтезированных штаммом *G. hansenii* GH 1/2008 на среде H5 с составом, г/л: глюкоза 40 г/л и ПВС 20 г/л при деформации образца около 7,7%.

Все пленки бактериальной целлюлозы, полученные на среде H5 с поливиниловым спиртом (40 г/л) обладают хорошей водопроницаемостью.

ПРОФИЛЬ КЛОСТРИДИЙ У ЖИВОТНЫХ И ПТИЦ

Шастин П.Н., Супова А.В.

Федеральный научный центр Всероссийский научно-исследовательский
институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко
Российской академии наук (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН), Москва, Россия

shastin.pasha@yandex.ru

Заболевания желудочно-кишечного тракта обусловлены широким кругом микроорганизмов. Наиболее частая причина их возникновения – это возбудители токсикоинфекции. Одними из которых являются представители семейства клостридий.

Исследования проведены на базе лаборатории диагностики и контроля антибиотикорезистентности возбудителей наиболее клинически значимых инфекционных болезней животных ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН в период 2022-2024 гг. Исследования проводились стандартными общепринятыми методиками. Всего было проанализировано 5559 образцов клинического и секционного материала, из них 359 от крупного рогатого скота, 2754 – птицы, 2446 – свиней. Установлены места локализации клостридий, а также их патогенные и токсигенные свойства. Получены данные по антибиотикорезистентности изолятов клостридий.

Было получено 812 изолятов клостридии, 137 из которых от крупного рогатого скота – *Clostridium perfringens* – 17,5%, *Clostridium tertium* – 13,1%, *Clostridium sordellii* – 11,7%, *Clostridium chauvoei* – 11%, *Clostridium novyi* – 9,5%, *Paraclostridium bifermentans* – 8%, *Clostridium butyricum* – 8% и *Clostridium sporogenes* – 6,6%, *Clostridium spp.* – 5%, *Clostridium septicum* – 3%, *Clostridium cadaveris* – 2,2%, *Clostridium sphenoides* и *Clostridium cochlearium* по 1,5%, наименьшая доля составила у изолята *Clostridium sartagoforme* и *Clostridium paraputrificum* – 0,7%, из которых 25 обладали патогенными и 17 токсигенными свойствами; 393 от свиней – *Clostridium tertium* (36%), *Clostridium perfringens* (20,4%), *Clostridium sporogenes* (10,7%), *Clostridium difficile* (8,1%), *Paraclostridium bifermentans* (7,1%), *Clostridium paraputrificum* (5,1%), *Clostridium cadaveris* (4,8%), *Clostridium butyricum* (4,1%), *Clostridium sartagoforme* (1,8%), *Clostridium baratii* (1,3%), *Clostridium septicum* (0,3%) и *Clostridium innocuum* (0,3%). Среди которых патогенными свойствами обладали 24 изолята *Clostridium perfringens* 1 изолят *Clostridium septicum* и 22 изолята *Clostridium difficile*; токсигенные свойства обнаружены у 43 изолятов *Clostridium perfringens*, 1 – *Clostridium difficile*; 282 изолята от птицы – *Clostridium perfringens* 30,8%, *Clostridium tertium* 24%, *Clostridium sporogenes* 21,3%, *Paraclostridium bifermentans* 13%, *Clostridium butyricum* 4,6%, *Clostridium novyi* 2,4%, *Clostridium paraputrificum* 2,1%, *Clostridium cadaveris* 2,1%, *Clostridium cochlearium* 1,4%, *Clostridium spp.* 1,4%, из которых 42 штамма обладали патогенными свойствами и 28 токсигенными. Установлена полирезистентность изолятов *Clostridium perfringens* (n=24) полученных от крупного рогатого скота, к цеффиксиму, фузидиевой кислоте, цефотаксиму, цефаклору, спектиномицину, пиперациллину, кларитромицину, дорипенему, доксициклину. 97% изолятов *Clostridium perfringens*, выделенные от свиней имели устойчивость к цефаклору,

олеандомицину, полимиксину-В, триметоприму и цефоперазону, 94,3% – фузидиевой кислоте, карбенициллину и тиамулину, 94% – колистину, цефокситину, сульфадиазину, эритромицину и пиперациллину, 91,4% – канамицину, 88,6% – цефотаксиму, доксициклину и стрептомицину, 85,7% – тетрациклину, 83% – цефпирому, спектиномицину, 82,9% – пефлоксацину, 77% – гентамицину, 72% – клиндамицину, 66% – хлортетрациклину, цефтриаксону и спирамицину, 63% – цефепиму, азитромицину, левофлоксацину и офлоксацину, 62,8% – цiproфлоксацину 62% – бацитрацину, 57,2% – ванкомицину и рифампицину, 57,1 – тилозину и фосфомицину, 57% – норфлоксацину, 54,3% – бензилпенициллину, цефазолину и цефалексину, 48,6% – ампициллину, 40% – амоксициллину, 37,1% – энрофлоксацину, 37% – амоксиклаву. Полирезистентность изолятов *Clostridium perfringens* птиц установлена к окситетрациклину, полимиксину-В, хлортетрациклину, канамицину и стрептомицину, сульфафуразолу, доксициклину и цефаперазону, сульфадиазину, цефпирому, фосфомицину, цефепиму и цефаклору, норфлоксацину, линкомицину, цефокситину, азитромицину и амоксиклаву, хлорамфениколу, ампициллину, цефалексину и бацитрацину, цефотаксиму, левофлоксацину и цефтриаксону, эритромицину, пефлоксацину, гентамицину и рифампицину, эритромицину, цефазолину, офлоксацину и клиндамицину, энрофлоксацину, кларитромицину и бензилпенициллину, амоксициллину, ванкомицину, цiproфлоксацину. Антибиотикорезистентность изолятов *Clostridium difficile* к цефепиму составила 100%, клиндамицину и сульфафуразолу – 93%, цiproфлоксацину, линкомицину и цефалексину – 87%, ванкомицину, азитромицину, пефлоксацину – 86%, цефотаксиму, цефтриаксону, офлоксацину – 80%, амоксициллину – 74%, кларитромицину и гентамицину 67%, тилозину, бацитрацину, левофлоксацину и стрептомицину – 60%, рифампицину, бензилпенициллину – 54%, цефазолину – 47%, цефазолину, ампициллину – 40%, энрофлоксацину – 33%, фосфомицину, амоксиклаву – 20%, норфлоксацину – 13%.

Исследования проведены при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации проект FGUG-2025-0003.

ПЕРВИЧНАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ,
СИНТЕЗИРУЕМЫХ БАЙКАЛЬСКИМ ОКСИФИЛЬНЫМ ШТАММОМ *BACILLUS*, НА
СПЕРМАТОЗОИДЫ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

**Шелковникова В.Н., Дмитриева М.Е., Баталова А.А.,
Липатова О.Е., Аксенов-Грибанов Д.В.**

Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

shelkovnikova551@gmail.com

Бесплодие является одной из главных проблем современного здравоохранения. Подсчитано, что на мужской фактор приходится около 50% всех зарегистрированных случаев бесплодия во всем мире. Окислительный стресс является одной из основных причин репродуктивной дисфункции. Повышение уровня активных форм кислорода непосредственно повреждает ДНК сперматозоидов, что приводит к бесплодию. 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.

Рядом исследований показано, что микроорганизмы озера Байкал обладают бесспорным преимуществом по числу ранее неизученных природных соединений. Нами была сформулирована гипотеза, что в условиях высокого содержания растворённого кислорода в озере Байкал обитают свободноживущие оксифильные микроорганизмы, которые могут синтезировать антиоксиданты для защиты от окислительного стресса. Таким образом, экосистема озера Байкал предоставляет уникальные возможности по трансляции антиоксидантного потенциала микроорганизмов для репродуктивной медицины. Целью данного исследования являлся анализ влияния экстракта байкальского оксифильного штамма *Bacillus* sp. 2021M9, 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, затем добавляли эякулят. Экспериментальные образцы были разделены на 3 группы. Для 1 группы использовали концентрированный метанольный экстракт штамма (10 мг/мл). Для 2 группы концентрированный экстракт был разбавлен метанолом в 2 раз (5 мг/мл), а для 3 группы – в 5 раз (2 мг/мл). Также был проведен анализ влияния фракций экстракта штамма *Bacillus* sp. 2021M9 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 7 аналитических повторностях.

Положительным влиянием на активность сперматозоидов обладал экстракт штамма *Bacillus* sp. с концентрацией 2 мг/мл. Спустя 1 и 3 часа такие параметры, как процент подвижных сперматозоидов и локальная подвижность были увеличены, по сравнению с контрольными условиями. Экстракт с концентрацией 5 мг/мл после 3 часов инкубации положительно влиял на такие показатели, как прямолинейность и процент подвижных сперматозоидов. Большинство фракций экстракта штамма *Bacillus* 2021M9 повышали подвижность и скорость сперматозоидов. В то же время, некоторые протестированные фракции обладали спермицидным эффектом.

Таким образом, полученные материалы могут способствовать разработке препаратов, направленных на повышение активности сперматозоидов и увеличение продолжительности их жизни.

Исследование выполнено при поддержке Минобрнауки России, проекты FZZE-2024-0003 и FZZE 2024-0011.

ЭНДОЛИЗИН PLYC19 ПРОФАГА B473: СПЕКТР ЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Шорохова И.А.^{1,2}, Копосова О.Н.¹, Казанцева О.А.¹, Кулябин В.А.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

Группа спорообразующих бактерий *Bacillus cereus sensu lato* включает в себя большое количество филогенетически близких видов и отличается широким экологическим разнообразием. Наиболее подробно изучены три вида из этой группы – *Bacillus anthracis*, возбудитель сибирской язвы, *Bacillus cereus sensu stricto*, который провоцирует у человека пищевые отравления и может быть причиной сепсиса, а также широко используемый для борьбы с насекомыми-вредителями как компонент биопестицидов *Bacillus thuringiensis*. Потенциальным патогеном для человека является также термоустойчивая *Bacillus cytotoxicus*, штаммы которой были выделены при вспышках диареи с летальным исходом.

Бактериофаги и их ферменты представляют собой перспективные средства противомикробной терапии. Эндолизины – ферменты, которые отвечают за лизис клеточной стенки бактерий для выхода потомства фага в конце его жизненного цикла. Они обладают более широким спектром чувствительных штаммов, чем бактериофаги, при этом более специфичны, чем антибиотики. Кроме того, по некоторым данным, резистентность бактерий к эндолизинам формируется медленнее, чем к другим антимикробным агентам.

Целью работы стало определение характеристик эндолизина PlyC19 профага B473, выделенного и описанного ранее в лаборатории биологии вирусов бактерий ИБФМ РАН из штамма *B. cereus* VKM B-473.

PlyC19 содержит один каталитический домен амидазы второго типа и два SH3 домена связывания с клеточной стенкой. Суперпродукция белка проводилась в системе *E.coli* Rosetta Gam1 2(DE3) pET33. Антибактериальный спектр определялся спот-тестом по отношению к 45 штаммам рода *Bacillus*, 5 штаммам бактерий рода *Enterococcus* и 4 штаммам рода *Escherichia*. Термостабильность, чувствительность к уровню pH, концентрации NaCl и влияние ЭДТА на бактериолитическую активность PlyC19 определяли турбидиметрическим методом при +37 °C на штамме *B. cereus* VKM B-682.

Фермент продемонстрировал достаточно широкий спектр действия: лизировал 25 штаммов грамположительных бактерий рода *Bacillus*. Бактериофаг B473 оказался эффективным против лишь 17 штаммов этого рода. Кроме того, эндолизин проявил большую активность против штаммов *B. thuringiensis*, чем бактериофаг. PlyC19 не показал наличия бактериолитической активности по отношению к граммотрицательным бактериям рода

Escherichia и грамположительным бактериям рода *Enterococcus*. Максимальная ферментативная активность эндолизина наблюдалась при pH 9.0, при этом литическая активность сохранялась в диапазоне pH от 8.0 до 10.0. Белок сохранял ферментативную активность после инкубации в течение 60 минут в диапазоне температур от +4°C до +40°C. После инкубации при +50°C активность снижалась в 3 раза. Фермент проявлял максимальную активность при внесении NaCl в концентрации 10-400 мМ. Обработка в течение 30 минут 250 мМ раствором ЭДТА не оказала воздействия на работу фермента.

PlyC19 показал более широкий спектр антибактериальной активности, чем фаг, но оказался чувствителен к нагреванию до 50°C и проявлял активность в узком диапазоне pH. Эти его особенности могут быть ограничивающими факторами для его применения на практике.

СТРУКТУРА АЭРОБНЫХ ГАЛОФИЛЬНЫХ МЕТИЛОТРОФНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ
СООБЩЕСТВ ГИПЕРГАЛИННЫХ БОЛЬШОГО И МАЛОГО МЕДВЕЖЬИХ ОЗЕР
КУРГАНСКОЙ ОБЛАСТИ

Шустова М.Н.^{1,2}, Делеган Я.А.^{1,3}, Кочаровская Ю.Н.^{1,3},
Капаруллина Е.Н.¹, Доронина Н.В.¹

¹Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пушино, Россия

²Пушкинский филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)», Пушино, Россия

³Южный Федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

shustova.mn0709@gmail.com

Гипергалинные озера являются экстремальными экосистемами со специфическим составом микробиоты. В силу своей редкости и уникальности сообщества гипергалинных озер представляют особую значимость для изучения биоразнообразия на Земле. При получении накопительных культур метилотрофных бактерий из засоленных водоемов на минеральной среде с метанолом в качестве источника углерода и энергии и 2-3% NaCl нами получены устойчивые метилотрофные сообщества (более 10 пассажей на метаноле), из которых не удалось выделить чистые культуры метилотрофов. Единичные колонии на агаризованной среде с метанолом были представлены ассоциациями метилотрофов с гетеротрофами. Однако в настоящее время в результате развития молекулярно-генетических методов стало возможно изучить разнообразие микроорганизмов в сообществах без выделения чистых культур.

Цель работы – изучение структуры устойчивых галофильных метилотрофных бактериальных сообществ, полученных из образцов воды озер с высоким показателем минерализации Большого Медвежьего (GBL) и Малого Медвежьего (SBL) (Петуховский округ, Курганская область).

Методом высокопроизводительного секвенирования исследовано разнообразие устойчивых галофильных метилотрофных бактериальных сообществ, полученных из образцов воды двух соленых озер после 10 пересевов на минеральной среде с метанолом при 2-3% NaCl. С помощью биоинформатического анализа получено 21177 прочтений, которые были сформированы в 67 амплифицированных вариантов последовательностей (ASVs). Для бактериального сообщества из Большого Медвежьего озера получено 9822 прочтений, сформированных в 38 ASVs, относящихся к 16 родам, 4 классам и 3 филумам. В метилотрофном галофильном бактериальном сообществе Большого Медвежьего озера доминирующими родами являются 4 рода: *Methylophaga* (64,28%), *Halomonas* (15,08%), *Pseudomonas* (6,57%) и *Idiomarina* (3,36%). ASVs GBL-3, GBL-4 и GBL-7 можно называть эндемичными для данного сообщества, в связи с значением сходства <98,7%. Подавляющее большинство ASVs сообщества наиболее близки к некультивируемым бактериям, что может

являться объяснением сложности их выделения в чистую культуру. Для бактериального сообщества из Малого Медвежьего озера получено 11355 прочтений, сформированных в 29 ASVs, относящихся к 18 родам, 5 классам и 4 филумам. В сообществе Малого Медвежьего озера доминировали 9 родов: *Methylophaga* (70,44%), *Halomonas* (6,06%), *Shinella* (3,82%), *Idiomarina* (2,72%), *Pseudomonas* (1,70%), *Roseovarius* (1,53%), *Bradyrhizobium* (1,40%), *Mesonina* (1,26%), *Paracoccus* (1,18%). ASVs Малого Медвежьего озера SBL-13, SBL-22 и SBL-26 можно считать эндемичными.

Таким образом, впервые получены данные метагеномного анализа галофильных метилотрофных бактериальных сообществ соленых озер Большого Медвежьего и Малого Медвежьего. Установлено, что в изучаемых сообществах преобладают некультивируемые метилотрофы рода *Methylophaga*. В будущем планируется изучить метаболическую связь метилотрофов и гетеротрофов в сообществах.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ДРОЖЖЕЙ НА АРОМАТИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ КРАСНЫХ СУХИХ ВИН ИЗ АБОРИГЕННОГО СОРТА ВИНОГРАДА КРАСНОСТОП ЗОЛОТОВСКИЙ

**Шутова Т.А., Колосова А.А., Пожидаев В.М., Камаев А.В., Федосов Д.Ю.,
Федосова А.В., Толкачева В.А.**

НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

t.a.shutova@mail.ru

В России особое внимание уделяется развитию автохтонного виноделия, основанного на сохранении технологий производства вин из автохтонных сортов винограда. Красностоп Золотовский – автохтонный доской сорт. Вина из данного сорта характеризуются плотной структурой и бархатными танинами, что достигается длительной выдержкой в дубовых бочках. Однако в некоторых случаях, например, при недостаточной титруемой кислотности, длительная выдержка нецелесообразна. При производстве игристых вин, напротив, актуальна проблема высокой титруемой кислотности. Поэтому представляет интерес подбор штаммов дрожжей, позволяющих на стадии брожения смягчать и округлять танины и корректировать кислотность.

В данной работе представлены результаты исследований 24 штаммов дрожжей: 19 штаммов выделены из винограда российских винодельческих регионов Крыма, Кубани и Долины Дона; 5 штаммов (У-4170, У-4171, У-4177, У-4173, У-2416) получены из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт».

В винах, произведенных из сорта Красностоп Золотовский с использованием исследуемых штаммов, были исследованы концентрации следующих ароматобразующих соединений: этилацетата, ацетальдегида, бензальдегида, спиртов (метанола, пропанола-1, изобутанола, изоамилола, фенилэтилового спирта), кислот (галловой, ванилиновой, сиреневой, п-кумаровой, винной, яблочной, лимонной, янтарной, молочной и уксусной).

Органолептический анализ позволил выделить доминирующие дескрипторы, формирующие ароматический профиль вин из данного сорта. Преобладали тона ягодного направления (малина, ежевика, кизил) и в меньшей степени – землистого, цветочного и плодового. Были получены вина с гармоничным вкусом, лучшие из которых характеризовались минимальной концентрацией спиртов: пропанола (18-24 мг/дм³), изобутанола (316-363 мг/дм³), фенилэтилового спирта (69-82 мг/дм³), и кислот: галловой (15-22 мг/дм³), кофейной (8-9 мг/дм³), сиреневой (21-26 мг/дм³). Положительное влияние на ароматический профиль наблюдалось у вин с более высокими концентрациями этилацетата 106-120 мг/дм³, придающего винам фруктовые оттенки. Выявлен штамм У-4173, способствующий низкой концентрации титруемых кислот в полученных винах, (5,6 г/дм³) и штамм D-23-84.1.1, способствующий более высокой концентрации (6,2 г/дм³) при среднем значении во всех исследуемых образцах 6,4 г/дм³. Так же был отмечен штамм D-23-76.5, способствующий наименьшему накоплению метанола в процессе брожения. Концентрация метанола составила 12,4 мг/дм³ при средних значениях 37,4 мг/дм³. Эти данные коррелируют и подтверждаются предварительными исследованиями на сорте Каберне Совиньон.

Работа проведена в рамках выполнения государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

ПОДБОР ПАРАЗИТ-ХОЗЯИННОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ *IN VIVO* ТЕСТ-СИСТЕМЫ РЕКОМБИНАНТНЫХ БАКУЛОВИРУСНЫХ БИОПЕСТИЦИДОВ

Шухалова А.Г.^{1,2}, Сендерский И.В.², Тимофеев С.А.², Долгих В.В.²

¹Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

²Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Пушкин, Россия

nastyadzh@mail.ru

Широкое применение синтетических пестицидов в сельском хозяйстве нередко приводит к негативным последствиям как для окружающей среды, так и для здоровья человека. В качестве более безопасного решения перспективным направлением является использование биопестицидов на основе генетически модифицированных вирусов, которые способны действовать как природные антагонисты вредителей. Рекombинантные вирусы, содержащие гены токсинов, демонстрируют высокую эффективность, ускоряя процесс уничтожения заражённых насекомых. Однако перед их широким внедрением требуется тщательное исследование эффективности рекомбинантных вирусов по сравнению с их дикими штаммами.

Создание новых рекомбинантных штаммов из природных бакуловирусов является сложной и трудоёмкой биотехнологической задачей, однако существуют коммерчески доступные наборы, содержащие уже модифицированный под эти задачи штамм вируса, а также весь инструментарий для упрощённого встраивания в его геном рекомбинантных генов. Примером может служить система *Vac-to-Vac*TM, в которой используется модифицированный штамм вируса множественного ядерного полиэдроза *Autographa californica* (AcMNPV) для синтеза рекомбинантных белков в культурах клеток насекомых. В данной работе мы попробовали использовать эту систему не типичным образом и заражать рекомбинантным вирусом не клеточные культуры, а различные виды чешуекрылых вредителей. Это позволило изучить возможность заражения и особенности инфекции различных видов и выбрать из них наиболее подходящий для тестирования рекомбинантных штаммов.

Для заражения с помощью инъекций был использован ранее полученный рекомбинантный штамм бакуловируса, несущий зелёный флуоресцентный белок (GFP), что позволило первично диагностировать инфекцию с помощью флуоресцентной микроскопии тканей инфицированных насекомых. Гусеницы *Depressaria depressana*, *Pieris rapae*, *Ostrinia nubilalis* и *Yponomeuta evonymella* не выживали после инъекций, а *Aporia crataegi* и *Sitochroa palealis* не заражались инъекционными вирусными частицами. Накопление флуоресцентного продукта в тканях насекомых, свидетельствующего об успешном заражении на 3 день после инфекции было выявлено у видов *Mamestra brassicae*, *Galleria mellonella*, *Pectinophora gossypiella*, *Manduca sexta* и *Bombyx mori*. Экспрессия рекомбинантного белка в заражённых особях также была подтверждена с помощью ПЦР с обратной транскрипцией. Дальнейшие наблюдения за насекомыми в течение недели показали высокую смертность у всех видов, кроме *G. mellonella*, у заражённых особей которых практически не наблюдалось отличий в жизнедеятельности по сравнению с контролем, и у которого при этом накопление

рекомбинантного продукта в тканях наблюдалось наиболее выражено. Этот вид также отличается простотой содержания и разведения в лаборатории. Таким образом, именно *G. mellonella* оказался наиболее подходящим видом для тестирования различных молекул для создания рекомбинантных вирусов, так как только в этом случае низкая вирулентность самого вируса позволяет оценить эффект каждого изучаемого рекомбинантного токсина, использованного для его модификации

Работа поддержана грантом РФФ № 25-26-00236.

ШТАММ РИЗОБАКТЕРИИ *BACILLUS VELEZENSIS* MGMM30 В КАЧЕСТВЕ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ОСНОВЫ БИОПРЕПАРАТА ДЛЯ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

Яруллин К.И.¹, Валиахметов Э.Э.², Суханов А.Ю.², Валидов Ш.З.²

¹Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия

²ФИЦ Казанский научный центр РАН, Казань, Россия

karullin725@gmail.com

Биологические препараты все чаще становятся экологической и безопасной альтернативой химическим агентам. Большим потенциалом применения обладают бактерии рода *Bacillus* за счет способности вырабатывать вторичные метаболиты, проявляющие антагонизм к большинству фитопатогенов. В работе использовался штамм *Bacillus velezensis* MGMM30, который может стать эффективным агентом биоконтроля и позволит улучшить количество и качество урожая. Целью исследования, было оценить потенциал применения штамма MGMM30 в качестве агента биоконтроля для защиты пшеницы.

Штамм *Bacillus velezensis* MGMM30 представляет собой грамположительную бактерию с грязно-белыми матовыми плоскими круглыми колониями с бахромчатым краем. В ходе экспериментов на чашках Петри с аналитическими средами у штамма показано наличие протеазной активности, а также высокой подвижности в полужидком агаре, которая была выше по сравнению с другими видами рода *Bacillus*: *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *B. amyloliquifaciens* и *B. mojavensis*.

Для оценки антагонистической активности *B. velezensis* MGMM30 по отношению к грибным фитопатогенам, суспензию клеток высевали по краям чашки Петри со средой PDA (potato dextrose agar). Штамм фитопатогена высевали в центр чашки. Всего проанализировано 18 штаммов фитопатогенных грибов рода *Fusarium* выделенных из пораженных растений. Результаты показали значительное подавление роста четырех штаммов *F. oxysporum* s.c. и пяти из шести штаммов *F. solani*. К 6 штаммам *F. submicinum* и 2 штаммам *F. sporotrichioides* выявлен умеренный антагонизм.

Анализ нематоцидной активности штамма *B. velezensis* MGMM30 проводился на трех линиях нематод вида *Caenorhabditis elegans* N2, JD740 и DA1316. К нематодам добавляли культуральную жидкость *B. velezensis* MGMM30, в качестве контроля использовали буфер M9 и через 24 часа оценивали долю погибших нематод. В результате летальность в пробирках с добавлением супернатанта в среднем составила 79,3% у N2, 49,0% у JD740 и 51,0% у DA1316 при нулевой летальности в контроле. Полученные данные также сравнивали с летальностью при добавлении ивермектина. В результате летальность линий JD740 и DA1316 при добавлении супернатанта была в среднем в 6 раз больше. Таким образом, можно утверждать, что данный штамм может служить агентом биоконтроля по отношению к паразитическим видам нематод, в том числе имеющим резистентность к антипаразитарным препаратам.

Для обнаружения специфических генов, определяющих полезные свойства *B. velezensis* MGMM30, было проведено полногеномное секвенирование. По результатам

аннотации были обнаружены последовательности, кодирующие экзогенные ферменты, такие как: протеаза, липаза и целлюлаза. Обнаружен ген *penP*, кодирующий фермент β-лактамазу, обуславливающая множественную устойчивость к бета-лактамам антибиотикам. Кроме того, штамм имеет ген *copA*, обуславливающий устойчивость к меди, ген *arsB*, обуславливающий устойчивость к мышьяку и ген *czcD*, обуславливающий устойчивость к кадмию, кобальту и цинку.

Таким образом, антагонистические свойства штамма *B. velezensis* MGMM30 по отношению к нематодам и широкому ряду фитопатогенных грибов, а также наличие генов, определяющих устойчивость к неблагоприятным факторам, делает его эффективным агентом защиты растений с большим потенциалом применения.

Секция 4

«ФИЗИОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ И БИОМЕДИЦИНА»

ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ ПРОДУКТОВ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ
ЛИПИДОВ В ПЕЧЕНИ МЫШЕЙ, ПОДВЕРГШИХСЯ ФРАКЦИОНИРОВАННОМУ
ОБЛУЧЕНИЮ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ГРАНУЛОЦИТАРНОГО
КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА В ФОРМЕ ПЭГФИЛГРАСТИМА

Абелев Г.О., Ромодин Л.А., Никитенко О.В., Бычкова Т.М., Содбоев Ц.Ц.

Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский
биофизический центр имени А.И. Бурназяна, Москва, Россия

abelev.g@mail.ru

Исследование безопасных и действенных средств терапии лучевой болезни позволит разработать средство защиты от облучения при авариях на объектах атомной отрасли, при инцидентах с использованием ядерного оружия, поспособствует разработке эффективных способов лучевой терапии онкологических заболеваний в медицине.

Ведущую роль в патогенезе лучевой болезни при облучении в дозах до 10 Гр играют панцитопенический и иммунобиологический синдромы. Поэтому стимуляторы кроветворения представляются перспективными радиозащитными средствами.

В ходе представленной работы была проведена оценка радиозащитной эффективности применения гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ), усиленного полиэтиленгликолем, при фракционированном облучении мышей рентгеновским излучением.

Эксперимент спланирован и проведен в ФГБУ «ГНЦ – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» ФМБА России. Исследования были выполнены на аутбредных самцах мышей линии ICR (CD-1) SPF-категории (массой $36,7 \pm 0,4$ г), полученных из питомника РАН (г. Пущино).

Мыши были разделены на 3 группы: интактная, облучённый контроль и опытная. Животные подвергались 5 ежедневным облучениям в дозе 2,5 Гр. Мышам опытной группы через 3 часа после облучения подкожно вводился Г-КСФ в форме пэгфилграстима в дозировке 0,5 мкг/г массы тела. Кумулятивную выживаемость рассчитывали по Каплану-Майеру. Кривые выживаемости были проанализированы long-rank тестом – сравнение выживаемости групп с учётом всего периода наблюдения. Для оценки радиозащитной эффективности были использованы показатели: масса печени, содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) – триеновых, оксодиеновых конъюгатов и оснований Шиффа. Оценка содержания промежуточных продуктов (ПОЛ) и оснований Шиффа проводилась по модифицированной методике А.И. Журавлева с соавт. и И.А. Волчегорского с соавт. на спектрофотометре СФ-26. Статистическую обработку материала проводили с помощью пакета программ «Statistica 8.0».

Средняя продолжительность жизни павших животных не увеличилась на фоне применения пэгфилграстима, однако обращает внимание факт выживания 3 из 14 мышей, получавших данный препарат.

Применение Г-КСФ в форме пэгфилгратима во время фракционированного облучения способствовало снижению содержания оснований Шиффа, триеновых и оксодиеновых конъюгатов в печени до уровня, соответствующему интактным мышам.

Пэгфилгратим оказывает противовоспалительное, антиапоптозное и антиоксидантное действия с приоритетом последнего за счёт активации сигнальных путей p-Akt1/Nrf2/Sirt3 и p-Akt1/Nrf2/НО-1. Предположительно, подавление окислительного стресса связано с активацией данных сигнальных путей.

Исследования выполнены в рамках гранта РФФИ № 23-24-00383 и НИР «Технология-3» (номер регистрации НИР в системе ЕГИСУ НИОКТР: 1230113001053).

МОДУЛЯЦИЯ ГЕНЕРАЛИЗОВАННОЙ ГИПОКСИИ ПРИ ПОМОЩИ
ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ГИПЕРОКСИЧЕСКОЙ
КИСЛОРОДНО-ГЕЛИЕВОЙ СМЕСИ

Алхимова А.А.^{1,2}, Шинелев М.В.^{1,2}

¹Пуштинский филиал Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский биотехнологический университет»,
Пушино, Россия

²Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Пушино, Россия

alhimov.ru@gmail.com

Гипоксический фактор – один из ведущих в патогенезе сердечно-сосудистых и неврологических заболеваний, характеризующихся кислородной недостаточностью в тканях с развитием патологических и защитно-компенсаторных реакций. Длительное воздействие гипоксии способно привести организм к летальным исходам и инвалидизации. Несмотря на наличие огромного количества методик и лекарственных препаратов, способных снизить влияние недостатка кислорода на организм, продолжается поиск способов управления адаптационными функциями организма к условиям гипоксии.

Одним из подходов профилактики и повышения толерантности организма к гипоксии служит многократное применение гипероксической кислородно-гелиевой смеси (КГС). Известно, что КГС оказывает положительный эффект при ишемиях. Антигипоксический эффект КГС основан на физико-химических свойствах гелия. Доказана биологическая нейтральность гелия на животных. Его положительный эффект показан и при прекондиционировании на моделях ишемии миокарда и головного мозга.

Исходя из вышеизложенной информации, целью нашего исследования стало изучение влияния профилактического 14-ти дневного применения КГС на переносимость гипоксического состояния у крыс. В работе использовались аутбредные крысы SD (Sprague-Dawley), молодые самцы с определённым микробиологическим статусом (SPF), возраста примерно 8 недель. Гипоксию вызывали при помощи стандартной экспериментальной модели экзогенной гипобарии. При понижении атмосферного давления в барокамере за животными вели наблюдения и фиксировали давление, при котором отсутствует опора на конечности.

Профилактическое применение КГС достоверно уменьшало время восстановления крыс после нормализации давления. В результате проведенного исследования была показана возможность применения КГС в качестве адаптационного средства. Крысы, подвергающиеся ежедневным ингаляционным сеансам КГС, практически в 1,5 раза быстрее восстанавливали опору на конечности. Дальнейшие работы должны быть направлены на изучение продолжительности эффекта и механизма действия КГС.

ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПЕПТИДА RV4 НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА У МЫШЕЙ C57BL/6

Арабчикова П.А.^{1,2}, Бороздина Н.А.², Канаев П.А.

¹Пушинский филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)», Пушино, Россия

²Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Пушино, Россия

arabchikovap@mail.ru

Сахарный диабет 2 типа (СД2) – это хроническое заболевание, которое характеризуется нарушением обмена веществ, резистентностью к инсулину и нарушением гомеостаза глюкозы. Это глобальная проблема здравоохранения во всем мире, распространенность которой постоянно растет и требует разработки новых подходов к лечению. Метаболический синдром, который тесно взаимосвязан с сахарным диабетом 2 типа, является совокупностью факторов риска, включающие висцеральное ожирение, гипертонию, дислипидемию и повышенный уровень глюкозы в крови. Эти факторы повышают риск развития сердечно-сосудистых заболеваний, инсульта и других осложнений.

Целью работы являлось исследование профилактической эффективности пептида RV4 при моделировании сахарного диабета 2 типа в отношении углеводного и липидного обмена.

У мышей C57BL/6 моделировался метаболический синдром по типу сахарного диабета 2 типа. Для этого животные находились на высокожировой диете (ВЖД) в течение 19 недель. На 19 неделю исследования у всех животных измерялась масса тела и концентрация глюкозы в капиллярной крови для оценки развития метаболического синдрома. Ректальное введение пептида RV4 в дозировке 1 мг/кг проводилось ежедневно, 2 раза в сутки, начиная с 19 недели. Глюкометрия проводилась до введения препарата на 19 неделю (122-124 день), через 2 недели введения препарата на 21 неделю (148 день) и через 3 недели введения препарата на 22 неделю (155 день).

В результате на 132-155 день исследования у животных, находящихся на высокожировой диете, наблюдалось значительное увеличение массы тела, но при ректальном введении пептида RV4 было выявлено снижение прироста массы тела на 5,4% через 2 недели и на 4,6% через 3 недели. Концентрация глюкозы в крови натощак у животных на ВЖД значительно повышалась, что свидетельствует о развитии метаболических нарушений. Через 2 недели введения пептида RV4 концентрация глюкозы снижалась до контрольных значений, но через 3 недели введения снижения концентрации уже не наблюдалось. У животных на ВЖД вероятно развивалась жировая дистрофия органов, что приводило к снижению коэффициента массы печени и сердца. На 3-й неделе введения RV4 наблюдалось значительное снижение массы и коэффициента массы висцерального жира.

Таким образом, тестируемый препарат демонстрирует положительное влияние на изменение физиологических и биохимических показателей при моделировании метаболического синдрома.

ИЗУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ 5'-ДЕЙОДИНАЗ ПРИ РАКЕ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Артыкбаева Г.М.

Институт биофизики и биохимии при НУУз, Ташкент, Узбекистан

gulnoraar@rambler.ru

Цель: изучение активности 5'-дейодиназы 1-го (Д1) и 2-го (Д2) типов, катализирующих превращение прогормона Т4 в Т3, в норме и в патологических образцах ткани щитовидной железы (ЩЖ) человека.

Материалы и методы. Были использованы замороженные в жидком азоте образцы ткани ЩЖ. Все образцы были гистологически верифицированы (10 – опухолей и 8 – нормальных, окружающих узлы тканей ЩЖ). Активность Д1 и Д2 определялась в гомогенатах ткани по освобождению $^{125}\text{I}^-$ из ^{125}I rT3 (реверсивный Т3). Ткани ЩЖ были гомогенизированы ультразвуком в буфере 250 мМ сахарозы – 20 мМ HEPES – 1 мМ EDTA pH7,4. После инкубации гомогената с меткой и последующим центрифугированием, собирали супернатант, и на гамма-счетчике подсчитывали активность образовавшегося $^{125}\text{I}^-$ по количеству импульсов в мин.

Результаты. Роль Д1 при раке остается в значительной степени неизученной, а имеющиеся исследования частично противоречивы. Изучение ферментативной активности Д1 и Д2 показало, что щитовидная железа человека экспрессирует и Д1, и Д2 активности. Д1 и Д2 активности сравнивались в различных участках ткани щитовидной железы одного пациента. Экспрессия Д1 активности сохранялась на уровне нормальной ткани при фолликулярной аденоме. Исключение составил случай, когда в узле наблюдалось значительное снижение Д1 активности по сравнению с нормой. Далее наблюдалось повышение Д1 и Д2 активности при папиллярной и фолликулярной карциноме и повышение только Д1 активности при медуллярной карциноме.

Выводы. В тканях, таких как щитовидная железа, активность дейодиназ либо повышается, либо понижается в зависимости от гистологического подтипа. Активности Д1 и Д2 регулируются через рецептор тиреотропного гормона, который запускает каскад цАМФ. Повышающая регуляция Д2 была найдена в доброкачественных и злокачественных узлах рака щитовидной железы, включая фолликулярную, медуллярную и анапластическую карциномы, в то же время при папиллярной карциноме она была пониженной. Повышающая регуляция согласуется с фактом, что дейодиназа относится к цАМР-отзывчивым генам, экспрессия которой повышается при аденоме и фолликулярной карциноме, характеризующихся сверхстимуляцией пути цАМР. Раковые клетки являются примером клеток, которые могут точно регулировать концентрацию ТГ на различных стадиях прогрессирования опухоли. Переход к инвазивной и метастатической стадии происходит за счет усиления сигнала ТГ, который индуцируется каталитической активностью дейодиназ. Может ли профиль дейодиназы служить маркером стадии/классификации опухоли, остается открытым вопросом, хотя анализ больших наборов данных *in silico*, подтверждают эту возможность.

МОДЕЛЬ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА НА БОДРСТВУЮЩИХ КРЫСАХ

Афанасьева С.О.^{1,2}, Паликов В.А.^{1,2,3}, Павлов Н.Б.³

¹Пушинский филиал ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет»,
Пушино, Россия

²Филиал ФГБУН ГНЦ РФ Институт биоорганической химии

им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушино, Россия

³ФГБУН ГНЦ РФ Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

afa.sooooooooon21@mail.ru

Ишемический инсульт представляет собой патологическое заболевание, характеризующееся нарушением мозгового кровообращения с повреждением ткани, нарушением его функций вследствие препятствия или прекращения поступления крови в тот или иной отдел мозга. На данный момент остается одной из ведущих причин смертности во всем мире. Причинами же возникновения ишемического инсульта могут стать: тромбоз, атеросклероз или эмболия. В нашем исследовании этиологическим фактором ишемии выступал воздушный эмбол.

Исследование выполнено на половозрелых самцах крыс Sprague Dawley, которые были разделены на 7 групп, в каждой из которых содержалось по 3 крысы. Каждую крысу вводили под общую анестезию («Золетил», 30 мг/кг, и «Ксила», 10 мг/кг), проводили операцию по катетеризации участка наружной сонной артерии, где катетер предварительно был заполнен гепарином (50 Ед). Через 1 сутки моделировали инсульт на бодрствующих крысах путем инфузии воздуха через катетер, выведенный на холку. Подбирали объем и режим подачи воздуха в катетер: в 1-4-й группах весь объем воздуха вводили болюсно через шприц (общий объем воздуха: 3 мл/кг, 2 мл/кг, 1 мл/кг), а в 5-7-й группах – при помощи автоматического дозатора с заданной скоростью (0.5 мл/кг со скоростью введения воздуха 50 мкл/мин, 25 мкл/мин, 10 мкл/мин). Все использованные режимы приводили к гибели животных. По результатам подбора скорости и объема вводимого воздуха в катетер был выбран режим: общий объем введения 100 мкл, скорость введения 10 мкл/мин.

Далее координацию и моторную функцию крыс оценивали в тесте Rotarod (вращающийся стержень) на установке Rotamex-5 (Columbus Instruments) с диапазоном ускорения 1 об/мин каждые 10 с до максимальной скорости 60 об/мин опытной и контрольной групп. Через 3 часа после эмболии у опытной группы наблюдалась сниженная способность удерживаться на вращающемся стержне в сравнении с контролем. Опытная группа крыс в итоге держалась на стержне в среднем всего 40 секунд, в отличие от контрольной группы (220-280 секунд).

Таким образом, моделирование церебральной артериальной воздушной эмболии приводит к нарушению координации и двигательных навыков у животных, что подтверждается укорочением времени, в течение которого они могут удерживаться на вращающемся стержне. При гистологическом анализе были обнаружены фокальные очаги ишемического инсульта, находящиеся в бассейне средней мозговой артерии.

РЕМОДЕЛИРОВАНИЕ СПЕРМАТОГЕННОГО ЭПИТЕЛИЯ КАК МЕХАНИЗМ
РЕПРОДУКТИВНОЙ АДАПТАЦИИ СИРИЙСКИХ ХОМЯКОВ (*MESOCRICETUS
AURATUS*) В УСЛОВИЯХ ПРЕДГИБЕРНАЦИОННОЙ ПОДГОТОВКИ
И ЕСТЕСТВЕННОЙ ГИПОТЕРМИИ

Ахметшина А.А., Сухачева Т.В., Пономаренко Е.А., Алексанкина В.В., Кузнецова Е.В.

Научно-исследовательский институт морфологии человека им. академика А.П. Авцына
ФГБНУ «Российский научный центр хирургии им. академика Б.В. Петровского»,
Москва, Россия

malina.alina2001@mail.ru

У зимоспящих млекопитающих подготовка к гибернации сопровождается физиологической перестройкой организма для минимизации энергозатрат. Созревание половых гамет у самцов млекопитающих осуществляется в течение всей жизни. Предполагается, что сезонное подавление сперматогенеза запускается сокращением длины светового дня и снижением температуры среды перед спячкой. Цель данного исследования – анализ динамики и характера изменений морфологии и состава клеток сперматогенного эпителия при подготовке к гибернации и во время естественной гипотермии у самцов сирийского хомяка. Были исследованы семенники половозрелых самцов сирийского хомяка (*Mesocricetus auratus*). Температуру тела регистрировали с помощью термолоттеров ДТН5-458 (Эмбиресерч, Новосибирск), вживленных внутрибрюшинно. Животные были разделены на группы в зависимости от последовательно изменяющихся условий содержания: группа 1 (N=5) – при комнатной температуре и длинном фотопериоде (LD; 16ч света: 8 ч темноты); группа 2 (N=5) – при комнатной температуре и коротком фотопериоде (SD; 8ч темноты : 16ч света) в течение 5 недель; далее - при температуре окружающей среды +5°C и в темноте: группа 3 – холодовая адаптация животных в течение 4-7 дней (N=11), группа 4 – холодовая адаптация в течение 14 дней (N=4), группа 5 (N=6) – в состоянии естественной гипотермии. После эвтаназии извлекали и взвешивали семенники, фиксировали их в модифицированном растворе Дэвидсона и заключали в парафин. Поперечные срезы окрашивали гематоксилин-эозином, реактивом Шиффа с докраской гематоксилином для выявления акросом. На препаратах измеряли диаметр семенных канальцев, толщину эпителиосперматогенного слоя, полуколичественно (по 3-балльной шкале) определяли содержание сперматогоний, сперматоцитов, круглых и продолговатых сперматид, сперматозоидов. Результаты представлены в виде медианы. Морфологический анализ выявил прогрессирующее снижение веса семенников (1,8; 1,1; 0,7; 0,2; 0,4 г), диаметра семенных канальцев (288,5; 200; 202; 101,9; 158,8 мкм) и толщины эпителиосперматогенного слоя (79,9; 55; 57,1; 25,7; 55,2 мкм) в группах 1–5. В группе 2 толщина эпителия снизилась ($p < 0.05$). В группе 3 отмечалось значимое уменьшение веса семенников и диаметра канальцев ($p < 0.05$), снижение доли канальцев со сперматозоидами и продолговатыми сперматидами. Половые гаметы были представлены сперматогониями, сперматоцитами и круглыми сперматидами, ядра некоторых сперматоцитов содержали конденсированный хроматин и слущивались в просвет канальцев. В группе 4 диаметр канальцев и толщина эпителия достигли минимума ($p < 0.05$),

присутствовали только сперматогонии и клетки Сертоли, просвет был заполнен эозинофильным содержимым. В группе 5 регистрировали увеличение диаметра канальцев и толщины эпителия (уровень группы 3), появление сперматоцитов, сперматид обоих типов и сперматозоидов. Таким образом, в период предгибернации у самцов *M. auratus* изменения морфологии семенных канальцев выявлялись уже на 4-7 сутки холодной адаптации. Наибольшие изменения морфологии и состава клеток сперматогенного эпителия, свидетельствующие о блоке сперматогенезе на стадии профазы I, были зарегистрированы на 14 день холодной адаптации. У животных в состоянии естественной гипотермии наблюдались начальные признаки реактивации сперматогенеза.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 25-24-00643, <https://rscf.ru/project/25-24-00643/>.

ВЛИЯНИЕ L-КАРНИТИНА И МИЛДРОНАТА НА ФУНКЦИОНАЛЬНОСТЬ СЕМЕННИКОВ ЗА СЧЕТ РЕГУЛЯЦИИ ОСИ «КИШЕЧНИК-СЕМЕННИКИ»

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

Актуальной темой является изучение функциональности семенников и факторов, влияющих на репродуктивную способность мужчин. L-карнитин, известный влиянием на метаболизм жирных кислот и энергетические процессы, оказывает положительное воздействие на сперматогенез. Милдронат способен ингибировать фермент гамма-бутиробетаингидроксилазу, что снижает синтез L-карнитина в организме, и способствует переключению метаболизма на более эффективное использование глюкозы, но данных, посвященных влиянию истощения L-карнитина на функциональность семенников, недостаточно. Кроме того, данные соединения изменяют способны перестраивать метаболизма в целом, что может приводить и к изменениям кишечного микробиома. Регулирование оси микробиота-кишечник-семенники остается малоизученным.

Мы показали, что переключения метаболизма при помощи милдроната в семенниках мышей вызывает двукратное увеличение экспрессии генов, кодирующих ацетил-СоА-дегидрогеназы и ацетил-СоА-оксидазы в семенниках, а также двукратное увеличение экспрессии транспортера глюкозы *Slc5a2*. Минимальная экспрессия *Lepr*, кодирующего лептиновый рецептор, наблюдалась в группе мышей, получавших L-карнитин. Также в этой группе отмечалась тенденция к увеличению массы тела, что может иметь негативные последствия для фертильности. Милдронат оказывал влияние на половое поведение самцов, увеличивая время полового акта, но данный показатель не несет в отдельности отрицательного действия на фертильность и потенциально может быть связан с повышенной выработкой NO. L-карнитин значительно изменял состав кишечного микробиома, снижая количество *Limosilactobacillus reuteri*, *Ligilactobacillus murinus*, *Lactobacillus taiwanensis*, необходимые для улучшения показателей спермы. В целом было показано снижение α -разнообразия кишечного микробиома в группе мышей, получавших, L-карнитин, что согласуется с данными у пациентов с астенозооспермией. Милдронат, несмотря на истощение L-карнитина, не вызывал дисфункций в мужской системе и бактериальном составе кишечного микробиома.

Работа поддержана Министерством науки и высшего образования в рамках нацпроекта «Наука и университеты» (проект FZGW-2024-0003).

РАЗРАБОТКА МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ НЕИНВАЗИВНЫХ ПОДХОДОВ К ПРОГНОЗИРОВАНИЮ КАЧЕСТВА ООЦИТОВ

**Башенджиева Е.О.¹, Смольянинова А.Р.¹, Пономарцев Н.В.¹, Остромышенский Д.И.¹,
Татищева Ю.А.², Калугина А.С.², Енукашвили Н.И.¹**

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

²Клиника ВРТ «Скайферт», Санкт-Петербург, Россия

bashendjieva@yandex.ru

Клетки кумулюса отвечают на воздействие гормонов и сигнальных молекул, синтезируемых ооцитом изменениями реорганизацией транскриптома, протеома, метаболома. В свою очередь, кумулюсные клетки направляют рост и созревание ооцита. Поэтому анализ транскрипционного профиля кумулюсных клеток может стать одним из подходов к неинвазивному прогнозированию качества ооцитов в программах вспомогательных репродуктивных технологий.

Цель исследования: оценить экспрессию выбранных генов в кумулюсных клетках у женщин с первичным и вторичным типом бесплодия с положительными и отрицательными результатами вспомогательных репродуктивных технологий.

Методы: в исследовании приняли участие 9 здоровых доноров и 19 пациенток, проходящих лечение бесплодия методами ВРТ. РНК выделяли из клеток кумулюса, полученных при подготовке ооцитов к оплодотворению, синтезировали кДНК и использовали ее в качестве матрицы для ПЦР в реальном времени с праймерами к генам *AREG*, *SDC4*, *PTGS*, *SCD5*, *HAS2*, *VCAN*, *STAR* и двум lncRNA (*ANXA2P2*, *MALATI*). Экспрессия генов интереса зависела не от типа бесплодия, а, скорее, от исходов ЭКО. Панель мРНК-биомаркеров (*SDC4*^{up}*AREG*^{up}*MALATI*^{not changed}*ANXA2P2*^{not changed}) была характерна для случаев с худшим прогнозом компетентности ооцитов, а набор биомаркеров *SDC4*^{not changed}*AREG*^{down}*MALATI*^{down}*ANXA2P2*^{down} регистрировали в случае удачных исходов ЭКО.

Полученные результаты предполагают, что использованный неинвазивный метод может быть использован для определения качества ооцитов у пациентов с первичным и вторичным бесплодием.

Работа выполнена в рамках гранта РФФ № 24-24-00533.

РОЛЬ ГЛИКОПРОТЕИНОВ В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ КИШЕЧНИКА НА МОДЕЛИ МЫШЕЙ *Muc2*^{-/-}

Бец В.Д.¹, Ачасова К.М.², Гончарова Е.П.¹, Литвинова Е.А.¹

¹Новосибирский государственный технический университет, Новосибирск, Россия

²Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, Россия

betsvd.bio@gmail.com

Муцин 2 (*Muc2*) является основным компонентом слизистого барьера кишечника, играющим ключевую роль в защите эпителия от патогенов, токсинов и механических повреждений. Нарушение экспрессии или функции *Muc2* связано с развитием воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК), таких как язвенный колит и болезнь Крона. Экспериментальные модели мышей с нокаутом гена *Muc2* представляют собой ценную модель для изучения роли муцина в патогенезе кишечного воспаления.

Мыши с нокаутом гена *Muc2* (*Muc2*^{-/-}) демонстрируют полное отсутствие слизистого слоя в кишечнике, что приводит к прямому контакту кишечной микробиоты с эпителиальными клетками. Это способствует развитию колита, характеризующегося активацией иммунных клеток, инфильтрацией нейтрофилов и макрофагов, а также повышением уровня провоспалительных цитокинов (например, IL-1β, TNF-α, IL-6).

В данной работе было продемонстрировано, как отсутствие *Muc2* приводит к дисбиозу кишечной микробиоты, характеризующемуся увеличением доли протеобактерий и снижением численности полезных бактерий, таких как *Firmicutes* и *Bacteroidetes*. Также у мышей с нокаутом *Muc2* наблюдается активация Th17-опосредованного иммунного ответа, что подтверждалось повышением уровня IL-17A и IL-22. Одновременно отмечалось снижение регуляторных Т-клеток (Treg), что способствует нарушению иммунной толерантности и хронизации воспаления. У мышей *Muc2*^{-/-} были выявлены выраженные морфологические изменения, включая укорочение ворсинок и удлинение крипт. Гистологический анализ показал наличие инфильтрации иммунными клетками и повреждение эпителиального барьера.

Таким образом, модель мышей с нокаутом гена *Muc2* подтверждает критическую роль муцина 2 в поддержании кишечного гомеостаза и предотвращении воспаления. Нарушение функции *Muc2* приводит к дисбиозу, активации иммунного ответа и развитию хронического колита. Данная модель является важным инструментом для изучения патогенеза ВЗК и разработки новых терапевтических стратегий.

Работа поддержана грантом РНФ № 20-64-47020.

ВЛИЯНИЕ МЕТАБОЛИЗМА L-КАРНИТИНА НА ЗАЩИТУ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК МЫШЦ НА ФОНЕ ИСТОЩАЮЩИХ ФИЗИЧЕСКИХ НАГРУЗОК

Бочарова М.Э., Садовникова И.С., Гуреев А.П.

Кафедра генетики, цитологии и биоинженерии, Воронежский государственный университет,
Воронеж, Россия

MarysiaVasAl@yandex.ru

Физические нагрузки, с одной стороны, являются мощным инструментом для укрепления здоровья, а с другой стороны профессиональный спорт сопряжен с серьезными проблемами, в том числе, может стать причиной повреждений как сердца, так и скелетных мышц. Тяжелый профессиональный спорт, характеризующийся экстремальными физическими нагрузками и постоянным преодолением пределов человеческих возможностей, приводит к значительному увеличению потребления кислорода, что, в свою очередь, повышает образование активных форм кислорода – свободных радикалов, создавая уникальную среду, способствующую развитию митохондриальных дисфункций. Поэтому следует разрабатывать препараты, способные снижать митохондриальную дисфункцию. В качестве потенциальных препаратов, защищающих мышцы от повреждений, мы использовали L-карнитин и его антагонист милдронат.

В нашем эксперименте были группы мышей, получавших L-карнитин и милдронат с водой на протяжении трёх недель, а также были группы, которые пили только воду без каких-либо препаратов. Спустя три недели мышцы подвергались принудительному плаванию на протяжении получаса с сопротивлением ежедневно в течение недели. После окончания эксперимента мышцы были умерщвлены. Для исследования были использованы сердце и мышцы передних конечностей: бицепсы и трицепсы. В обоих типах скелетных мышц увеличилось количество повреждений митохондриальной ДНК в среднем на 22%. В трицепсе оба препарата не снижали количество повреждений митохондриальной ДНК. При этом L-карнитин в бицепсе не только защищал от повреждений митохондриальную ДНК, но и увеличивал массу самой мышцы и количество митохондриальной ДНК. Стоит также отметить, что не наблюдалось статистически значимого увеличения массы трицепса в группе мышей, не получавших препаратов, но подвергавшихся принудительному плаванию. Принудительное плавание вызывало в среднем двукратное увеличение количества повреждений митохондриальной ДНК в сердечной мышце. У тех мышей, которые получали милдронат, количество повреждений было в среднем меньше на 20%.

В целом, наши исследования показывают, что применение L-карнитина и милдроната способствует защите митохондриальной ДНК от повреждений, а также L-карнитин, но не милдронат, способствует увеличению мышечной массы.

ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ ВОДОРАСТВОРИМОЙ ФОРМЫ ДЕГИДРОКВЕРЦЕТИНА
НА ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ОБМЕН В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ У КРЫС В
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА, ИНДУЦИРОВАННОЙ 6-
ГИДРОКСИДОФАМИНОМ

**Булгин И.В.^{1,2}, Полякова Т.В.^{1,2}, Медведева В.П.^{1,2}, Миронов В.В.^{1,2},
Миронова Г.Д.², Хундерякова Н.В.²**

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и
экспериментальной биофизики РАН, Пушино, Россия

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

forest.far@yandex.ru

Болезнь Паркинсона (БП) – это хроническое нейродегенеративное заболевание центральной нервной системы, характеризующееся прогрессирующей деградацией дофаминергических нейронов черной субстанции, отвечающих за инициацию двигательной активности. Поиск препаратов для профилактики и лечения БП является актуальной задачей современной медицины. Ранее в нашей лаборатории было показано антиоксидантное и антигипоксантное действие «Таксифолин аква», действующем веществом которого является дегидрохверцетин водорастворимый (ДГК-ВД) в модели с экспериментальной кардиомиопатией. Выбор ДГК-ВД связан с тем, что данное вещество лучше проникает в клетки и оказывает длительный терапевтический эффект, чем его нерастворимая форма.

Целью работы было изучить действие водорастворимого дегидрохверцетина «Таксифолин аква» на активность ключевого маркера митохондрий сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и цитоплазматического маркера гликолиза лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в лимфоцитах крови в модели БП, индуцированной введением нейротоксина 6-гидроксидофамина (6-ОНДА). Для моделирования БП мы использовали половозрелых самцов крыс линии Wistar массой 280-300 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище, на одинаковом рационе в соответствии с нормами содержания лабораторных животных, с соблюдением светового и шумового режимов. Все эксперименты выполнены с учетом рекомендаций Европейской конвенции о гуманном обращении с лабораторными животными. Моделирование БП проводилось билатеральным стереотаксическим введением 6-ОНДА в черную субстанцию мозга крыс. Лечение БП животных проводилось введением per os «Таксифолин аква» в дозе 30 мг/кг веса животного в течении 21 дня. Активность СДГ и ЛДГ в лимфоцитах измеряли с помощью высокочувствительного цитобиохимического метода на мазке крови по восстановлению нитросинего тетразолия хлорида до темно-синего диформаза (Кондрашова М.Н. и др. 2009). Содержание малонового диальдегида (МДА) в сыворотке крови и митохондриях мозга крыс определяли спектрофотометрическим методом с помощью тиобарбитуровой кислоты.

Результаты ЦБХ-исследования показали, что в группе БП животных активности СДГ и ЛДГ в лимфоцитах крови достоверно не изменилась по сравнению с контролем и лечение ДГК-ВД не имело достоверных изменений. В тоже время по показателю МДА в сыворотке крови у БП животных было повышение на 20% уровня перекисного окисления липидов, а в группе леченных снижение до контрольных значений. Снижение уровня ПОЛ в сыворотке у леченных животных является признаком снижения окислительного стресса и антиоксидантных свойствах ДГК-ВД.

Полученные данные позволяют судить о антиоксидантном действии «Таксифолин-аква» и возможности его дальнейшего применения для профилактики БП.

Работа подрежена грантом РФФИ № 25-25-00282.

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ МОНОАМИНОКСИДАЗЫ Б У КРЫС С НОКАУТОМ ГЕНА ТРАНСПОРТЁРА ДОФАМИНА В ПОСТНАТАЛЬНОМ РАЗВИТИИ

Бурдинская В.О.^{1,2}, Куликова Е.Д.², Трактиров Д.С.²

¹Санкт-Петербургский государственный технологический институт
(технический университет), Санкт-Петербург, Россия

²Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

viktorina.burdinskaya@gmail.com

Моноаминоксидаза Б (МАО Б) – фермент, расположенный на внешней мембране митохондрий, катализирующий окисление аминов, таких как серотонин, дофамин и норадреналин. МАО Б участвует в деградации дофамина и поддержании его гомеостаза. Согласно существующей гипердофаминергической теории синдрома дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ), дисбаланс дофамина в структурах мозга пациентов может способствовать развитию основных симптомов данного заболевания, таких как нарушение когнитивных функций, импульсивность и гиперактивность. Модель крыс с генетически детерминированным нарушением обмена дофамина (ДАТ-КО) характеризуется отсутствием функционального белка обратного захвата дофамина (ДАТ), что приводит к повышенной концентрации дофамина в синаптической щели и позволяет воспроизвести основные симптомы СДВГ. Определение ферментативной активности МАО-Б у таких крыс позволяет оценить компенсаторные механизмы, регулирующие катаболизм дофамина в условиях его избытка.

Крысята были разделены по генотипу на 3 группы: ДАТ-КО (полный нокаут ДАТ), гетерозиготы и дикий тип. На 14 (n=5) и 21 (n=5) день постнатального развития у крысят извлекали стриатум, префронтальную кору и средний мозг. Для оценки активности МАО Б проводили спектрофотометрический анализ согласно описанному ранее протоколу (Vinel, Polina K et al., 2021).

Двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA показал, что активность МАО Б значительно изменяется с возрастом ($p < 0,001$), но не зависит от генотипа и структуры мозга. Отсутствие взаимодействия между факторами (структура × генотип, структура × возраст) указывает на то, что по всей видимости имеется другой механизм, участвующий в регуляции избыточного уровня дофамина в данных структурах у ДАТ-КО животных.

Работа выполнена при поддержке ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», проект № FGWG-2025-0016.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ТРЮФЕЛЬНЫХ ГРИБОВ В КАЧЕСТВЕ ПИЩЕВОЙ ДОБАВКИ НА СИЛОВЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС

**Вавилина Т.Н., Малыгина Е.В., Бельшенко А.Ю., Имидоева Н.А.,
Жиленков В.М., Аксёнов-Грибанов Д.В.**

Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

t.vavilina03@mail.ru

В качестве альтернативных источников белка наиболее эффективным продуктом является грибной белок благодаря полноценному аминокислотному составу и высокой усвояемости. Одним из перспективных источников грибного белка является черный трюфель, так как помимо вышеперечисленных характеристик он содержит в своем составе биологически активные соединения. Данные соединения способны участвовать в ускорении метаболизма, регуляции массы тела и повышении физической выносливости, что повышает ценность данного источника белка.

Так, целью данного исследования являлось изучение влияния трюфельного белка в качестве пищевой добавки на изменения в силе хвата и массе тела лабораторных крыс линии *Wistar*.

Для эксперимента было отобрано 18 взрослых крыс линии *Wistar*, разделённых на три экспериментальные группы. В качестве контроля исследовались животные, получавшие стандартный злаковый корм и не подвергавшиеся физическим нагрузкам. Первая тестовая группа лабораторных крыс получала злаковый корм и продукт на основе черного трюфеля в размере 20% от дневного рациона. Данная группа тренировалась с помощью метода вынужденного плавания в стеклянном резервуаре объемом 0,08 м³ при температуре воды 25 °С в течение 30 минут. Вторая тестовая группа животных получала злаковый корм и вареное куриное мясо в размере 20% от дневного рациона и также подвергалась тренировкам вышеописанным образом. В течение 4 недель эксперимента проводились регулярные измерения пиковой силы хвата с использованием портативного динамометра SHANE (Китай) и контроль массы тела. Все эксперименты с участием лабораторных животных спланированы и проведены согласно правилам этического комитета ФГБОУ ВО «ИГУ». Статистическая обработка данных выполнялась в программах Microsoft Excel и Past 4 с помощью критерия Фридмана (для внутригруппового сравнения) и Краскела–Уоллиса (для межгруппового сравнения) при уровне значимости $\alpha = 0,05$.

Результаты исследования показали, что крысы, употреблявшие грибной белок, имели статистически более высокие показатели силы хвата в сравнении с другими экспериментальными группами ($p = 0,032$). К 4-й неделе средняя пиковая сила хвата увеличилась до $2,3 \pm 0,6$ Н/г в группе с трюфелем, до $1,9 \pm 0,5$ Н/г в группе с курицей и до $1,8 \pm 0,5$ Н/г в контрольной группе. Кроме того, установлено, что животные, употребляющие грибной белок, эффективнее снижали массу тела, чем группа крыс, употребляющих курицу в качестве источника белка. До начала эксперимента средняя масса тела в группе,

употреблявшей трюфель, составляла 416 ± 30 г, а к 4-й неделе снизилась до 400 ± 28 г. Различие подтверждено статистически ($p = 0,0094$).

Таким образом, проведенное исследование подтвердило положительные эффекты от употребления порошка из черных трюфелей. Полученные в ходе эксперимента данные указывают на его благоприятное влияние на мышечный тонус. Данный продукт может рассматриваться как перспективный компонент для использования в составе БАДов, а также в сфере диетического и спортивного питания.

Работа поддержана грантом РФФИ № 22-76-10036.

СВЕТОЗАВИСИМОЕ УГНЕТЕНИЕ ПРОТОН-УПРАВЛЯЕМЫХ ИОННЫХ КАНАЛОВ АЗОБЕНЗОЛ-СОДЕРЖАЩИМ ПОЛИАМИНОМ

Васькин Н.В.¹, Гатаулина Э.Д.², Николаев М.В.²

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

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

nicitavaskin431@gmail.com

Протон-управляемые ионные каналы (ASIC, acid sensing ion channels) – это ионотропные рецепторы, активирующиеся в ответ на закисление внеклеточной среды. Представляют собой трансмембранные белки, состоящие из трех субъединиц. ASIC локализованы в центральной и периферической нервной системе и принимают участие в восприятии боли, синаптической передаче и пластичности. Доказано их участие в патологических процессах: ишемической болезни, развитии депрессии. Фотохромные лиганды, действие которых можно регулировать с помощью энергии света, являются новыми инструментами в изучении функций ионных каналов. В настоящее время таких соединений для модуляции ASIC не существует.

Классические лиганды ASIC – неорганические катионы, эндогенные и синтетические органические катионы, а также пептидные токсины. Примером эндогенного лиганда ASIC является спермин, модулирующий токи через ионные каналы ASIC1a и ASIC1a/2a. В нашей работе изучены эффекты модифицированного спермина, несущего азобензольный фрагмент, благодаря которому вещество изменяет структуру в ответ на облучение светом.

Эксперименты выполнены на изолированных клетках линии CHO-K1, трансфицированных плазмидами, несущими гены *ASIC1a* или *ASIC2a*. Регистрация ионных токов через гомомерные каналы осуществлялась методом пэтч кламп в конфигурации целая клетка и в режиме фиксации потенциала. ASIC активировались быстрой подачей внеклеточного раствора с кислыми значениями pH, близкими к pH₅₀ для соответствующего типа рецептора. Для фотоизомеризации вещества использовался монохроматический свет длиной волны 450 нм.

В присутствии вещества (30 мкМ) амплитуда токов через гомомерные каналы ASIC1a и ASIC2a снижалась примерно в два раза относительно контроля при комнатном освещении. Облучение светом 450нм предотвращало угнетение. Подача вещества в момент активации рецепторов не приводила к угнетению, а варьирование мембранного потенциала фиксации не вызывало достоверных различий. Следовательно, данное вещество не является поровым блокатором и связывается с рецептором в его закрытом состоянии.

Таким образом, фотохромное производное спермина является обратимым и фотоуправляемым модулятором ASIC. Несмотря на то, что угнетение наблюдается в достаточно высоких концентрациях, данное вещество является первым примером светуправляемого модулятора ASIC. Это открывает возможность для разработки новых эффективных инструментов для фотохромной модуляции ASIC.

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ МРНК ГЛЮКОКОРТИКОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В ЦНС КРЫС ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ДЕКСАМЕТАЗОНА

Вильникова В.А., Тютюнник Т.В.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

vilnikovavaleria@gmail.com

Актуальность: глюкокортикоиды (ГК) относятся к классу стероидных гормонов, продуцируются корой надпочечников и проявляют противовоспалительное, противоаллергическое, иммунодепрессивное и противошоковое действие. Геномные эффекты ГК опосредуются глюкокортикоидными рецепторами (ГР). ГР распространены по всему мозгу, но большая часть из них находится в гиппокампе и коре. ГР имеют низкое сродство к эндогенному ГК крыс – кортикостерону, относительно используемого в медицине синтетического препарата – дексаметазона. Известно, что при введении данного вещества содержание кортикостерона в плазме крови крыс значительно снижается. Однако неизвестно, как изменяется уровень кортикостерона в клетках ЦНС и экспрессия мРНК гена ГР.

Цель: оценить изменение кортикостерона в клетках ЦНС (гиппокамп, стриатум, кора) и экспрессии мРНК гена ГР в гиппокампе, коре и стриатуме крыс после введения дексаметазона в дозе 8 мг/кг.

Методы: в эксперименте использовали 10 половозрелых самцов крыс *Wistar*. Животных случайным образом разделили на 2 группы по 5 крыс в каждой. Каждой группе вводился дексаметазон в дозе 8 мг/кг и проводилась декапитация спустя 18 часов. Контрольной группе вводили физ. раствор (0 часов). Для оценки уровня эндогенного кортикостерона в клетках ЦНС (стриатум, гиппокамп, кора) использовался метод твердофазного иммуноферментного анализа. Экспрессия гена GR определялась с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией.

Результаты: оказалось, что в клетках гиппокампа уровень кортикостерона в опытной группе не отличался от контрольной группы ($p = 0,8857$). В клетках стриатума наблюдалось уменьшение содержания кортикостерона относительно контрольной группы ($p = 0,0286$). После введения дексаметазона в дозе 8 мг/кг также снижался уровень кортикостерона в коре крыс ($p = 0,0286$). Экспрессия мРНК гена GR во всех исследуемых структурах (гиппокамп, стриатум, кора) осталась неизменной относительно контроля ($p = 0,5159$; $p = 0,3095$; $p = 0,7429$ соответственно).

Следовательно, можно предположить, что уровень эндогенного кортикостерона в мозге крыс снижается за счет реализации отрицательной обратной связи, индуцированной введением дексаметазона в дозе 8 мг/кг. Эффект сохраняется, как минимум, в течение 18 часов после однократного введения дексаметазона.

Работа поддержана грантом РНФ № FGWG-2025-0016.

ИЗУЧЕНИЕ СОСТАВА НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ
ПОСТЭМБРИОНАЛЬНОЙ СТАДИИ РАЗВИТИЯ МУРАВЬЕВ *LASIUS NIGER*

Власова А.А., Липатова О.Е., Моргунова М.М., Тельнова Т.Ю., Аксёнов-Грибанов Д.В.

Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

anfi98@bk.ru

Муравьи – социальные насекомые, чья высокая организация и сложные взаимодействия внутри колоний обеспечивают их выживание. Они активно используют химические вещества для коммуникации, координации поведения и защиты от патогенов. Онтогенез муравьев включает два основных периода: эмбриональный и постэмбриональный. Постэмбриональное развитие состоит из 3 фаз: личинки, куколки и имаго. Каждая из этих фаз характеризуется уникальными морфологическими и физиологическими изменениями, обеспечивающим переход от одной стадии развития к другой. Особый интерес представляет стадия куколки, поскольку происходит формирование основных структур таких, как голова, нижняя челюсть, грудь и черешок. Несмотря на значительный интерес к морфологическим особенностям развития муравьев, исследования, посвященные биохимическому составу куколок, практически отсутствуют. Таким образом, целью исследования являлось изучение состава низкомолекулярных соединений в куколках муравьев *Lasius niger*.

Пробоотбор куколок проводили в полевых условиях в летний период. Образцы промывали дистиллированной водой и сушили в течение 4 дней в термостате. Далее трехкратно экстрагировали с использованием метанола и 10% трихлоруксусной кислоты. Анализ проводили на газовом хромато-масс-спектрометре Маэстро-αМС (Интерлаб, Россия) с электронной ионизацией. Полученные хроматограммы обрабатывали с помощью ПО Маэстро, идентификацию соединений выполняли с использованием библиотек масс-спектров NIST20.

В экстрактах были идентифицированы различные биологически активные соединения, которые относятся к следующим классам веществ: пиразины, кетоны, алканы, фенолы, пирролы, циклические дипептиды и жирные кислоты. Так, были обнаружены Trimethylpyrazine и 2,5-dimethylpyrazine, относящиеся к компонентам феромонов, которые выделяют ядовитые железы. 2,5-dimethyl-3-(3-methylbutyl)pyrazine является компонентом феромона тревоги, а 3-Methyl-4-phenyl-1H-pyrrole обнаружен в экстракте головного мозга муравья. Также обнаружены циклодипептиды: 3-Methyl-2,3,6,7,8,8a-hexahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, Cyclo(L-prolyl-L-valine), Hexahydro-3-(1-methylpropyl)pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl)-Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(phenylmethyl). Известно, что циклические дипептиды обладают антибактериальными, противогрибковыми и альгицидными свойствами. Алканы Pentadecane и Tricosane, обнаруженные в экстракте, содержатся в Дюфуровых железах и обладают антимикробной активностью.

Таким образом, в исследовании впервые был изучен низкомолекулярный состав постэмбриональной стадии развития (куколки) муравьев *L. niger*. Был обнаружен широкий

спектр низкомолекулярных соединений, которые могут играть важную роль в развитии и защите куколок муравьев. Кроме того, обнаруженные соединения представляют значительный интерес для биотехнологии.

Работа поддержана грантами Минобрнауки России FZZE 2024-0003 и FZZE 2024-0011.

УЛУЧШЕНИЕ СЕПАРАЦИИ МОЛОКА ЧЕРЕЗ ОПТИМИЗАЦИЮ БУФЕРНЫХ СИСТЕМ В ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ АНТИБИОТИКОВ

Герbst А.Г.^{1,2}, Моисеева А.А.², Семейкина А.А.²

¹Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, факультет биотехнологии и промышленной экологии, Москва, Россия

²Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Gerbst-Alexander@yandex.ru

Контроль антибиотиков в молоке имеет критическое значение из-за их негативного влияния на здоровье потребителей и риска возникновения устойчивых бактерий, что может привести к трудноизлечимым и опасным инфекциям.

Иммунохроматографический анализ, который считается эффективным методом выявления антибиотиков в цельном молоке, требует предварительной подготовки образца из-за сложности его состава. Поэтому одной из ключевых задач является оптимизация буферной системы, обеспечивающей эффективную сепарацию молочной матрицы и минимизацию её влияния на результаты анализа.

В данном исследовании для демонстрации методики комплексной оптимизации буферных компонентов и их параметров рассматриваются иммунохроматографический анализ стрептомицина и тетрациклина в цельном молоке. Эти антибиотики широко используются в ветеринарии для лечения бактериальных инфекций у сельскохозяйственных животных. Поэтому они подлежат строгому контролю в молочной продукции в соответствии с жесткими нормативными требованиями.

Для реализации данного проекта в качестве маркера использованы частицы цветных латексов, которые конъюгировались с антителами против тетрациклина и стрептомицина карбодимидно-сукцинимидным методом.

Иммунохроматографическая тест-полоска – многомембранный композит, где стекловолоконная мембрана СВ06 фирмы «KinBio», обработанная оптимизированным буфером, обеспечивает эффективную сепарацию цельного молока. Параметры буферной системы последовательно оптимизировались для повышения скорости потока и чувствительности анализа.

На первом этапе проводился подбор буферной основы. Оценивались фосфатный и трисовый буферы (50 - 200 мМ, рН 7,4 и 9). Оптимальные условия стабильности и эффективности разделения компонентов образца достигнуты в трисовой буферной основе (100 мМ, рН 9).

Затем исследовалось влияние неионогенных детергентов Tween-20 и Triton X-100 (0, 0,5 и 1). Наилучшую скорость прохождения потока по мембране обеспечивала смесь детергентов, содержащая 0,5 % Tween-20 и 1 % Triton X-100.

Далее изучалось влияние БСА и анионного детергента SDS (0 - 1%) для минимизации неспецифического связывания и улучшения разделения компонентов. Оптимальные условия были достигнуты при концентрациях 1 % БСА и 0,25 % SDS.

На завершающем этапе исследовалось влияние поливинилпирролидона (PVP) (0 - 1%) на качество сепарации. Максимальный эффект достигнут при добавлении 0,1 % PVP.

Каждый этап эксперимента оценивался по показателям чувствительности, специфичности и воспроизводимости, что позволило провести комплексную оптимизацию условий для надежного иммунохроматографического анализа антибиотиков в цельном молоке.

Предел обнаружения тест-систем при визуальной детекции составил 10 нг/мл для тетрациклина и 200 нг/мл для стрептомицина, что соответствует требованиям российского законодательства (СанПиН 2.3.2.1078-01) и подтверждает пригодность тест-систем для мониторинга остаточного содержания данных антибиотиков в молоке без предварительной пробоподготовки.

АКТИВНОСТЬ ПРОТЕИНКИНАЗЫ C В КУЛЬТУРЕ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК МЫШИ В УСЛОВИЯХ ГИПЕРГЛИКЕМИИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ N-NITRO-L-ARGININE

Грачева А.И.^{1,2}, Митрошина И.Ю.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

Гипергликемия нарушает функционирование сигнальных систем эндотелиоцитов за счет изменения активности ферментов, в частности протеинкиназы C (PKC) за счет ее активации в сигнальном пути диацилглицерол – протеинкиназа C. Активация PKC индуцирует множественные внутриклеточные сигнальные механизмы, вызывающие увеличение проницаемости сосудистой стенки, нарушение эндотелийзависимой релаксации сосудов (за счет подавления активности NO) и активации окислительного стресса. Однако четкого представления о взаимодействии этих сигнальных молекул нет.

Целью работы было изучить влияние L-NNA на экспрессию гена PKC в эндотелиальных клетках 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). 20 мкл $5 \cdot 10^{-3}$ L-NNA добавляли в культуральный флакон, инкубировали 24 ч при 37°C. Анализ экспрессии генов проводили с помощью количественной ПЦР. Для выделения РНК использовали RNA Solo (Евроген, Россия). кДНК синтезировали из тотальной РНК с использованием набора MMLV RT (Евроген, Россия). ПЦР проводили с использованием qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия). Амплификация и детекция результатов была проведена на амплификаторе DT light 4 («НПО ДНК-Технология», Россия). Данные представлены в виде медианных значений. Статистическую обработку результатов проводили с помощью Mann–Whitney U-test ($p \leq 0.05$).

В результате анализа данных с помощью относительной количественной оценки ($\Delta\Delta Ct$ method) обнаружено, что различия в экспрессии PKC, выявляемые в культуре эндотелиальных клеток мыши, культивируемых в условиях нормогликемии (0,695 (0,292÷1,91; n=8)) и гипергликемии (0,004÷1,983; n=6)) не являются статистически значимыми. При введении в культуру L-NNA (N-нитро-L-аргинин специфический ингибитор eNOS) наблюдалось значительное снижение экспрессии PKC в условиях нормогликемии (0,114 (0,084÷0,376; n=10)), а в условиях гипергликемии (0,099 (0,066÷0,146; n=9)) различия в уровне экспрессии PKC не были выявлены.

Проведенные нами исследования показали, что, несмотря на отсутствие значительных различий в экспрессии PKC между нормогликемическими и гипергликемическими условиями, ингибирование eNOS с помощью L-NNA оказывает значительное влияние на уровень экспрессии PKC в эндотелиальных клетках в условиях нормогликемии, что может иметь важные последствия для понимания механизмов, связанных с эндотелиальной дисфункцией.

Работа поддержана грантом РФФИ № 22-15-00215.

ПРИМЕНЕНИЕ ГИДРОФИЛЬНЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОЧАСТИЦ В РАЗРАБОТКЕ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Девятов С.О.¹, Кропанева 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

Ранняя диагностика играет одну из решающих ролей в борьбе с различного рода заболеваниями. Особенно ярко это было продемонстрировано в период пандемии коронавирусной инфекции. Разработка и совершенствование методов экспресс-диагностики для условий с ограниченными ресурсами также остается актуальной. Данная работа предлагает подход к конструированию иммунохроматографического анализа на основе гидрофильных наночастиц углерода. Повышение гидрофильности наночастиц приводит к снижению фонового сигнала и, как следствие, к повышению чувствительности анализа. На сегодняшний день не существует коммерчески доступных тест-систем с использованием углеродных наночастиц по причине недостатка исследований по получению диагностических реагентов, сохраняющих функциональную активность при длительном хранении и по их применению. Возникает потребность в разработке усовершенствованных экспресс-иммуноанализов с применением углеродных наночастиц.

В работе использовался метод динамического светорассеяния и спектрофотометрия, с помощью которых было исследовано сохранение функциональной активности конъюгата при хранении. Для создания конъюгата использовался метод физической сорбции антител. Для регистрации результатов анализа использовался офисный сканер.

Была разработана и валидирована методика создания и проведения иммунохроматографического анализа. Выявлены оптимальные концентрации антител: 1 мг/мл на нитроцеллюлозной мембране и 200 мкг на 1 мг углеродных наночастиц. Были определены оптимальные буферы: фосфатно-солевой с добавлением Tween-20 до 0,1% и казеина до 1% для блокирования и фосфатно-солевой с добавлением Tween-20 до 0,1% для разведения образцов и промывки. Также были сравнены нитроцеллюлозные мембраны с различными свойствами, установлен необходимый объем конъюгата (100 мкл/см²) и образца (120 мкл) для анализа.

Таким образом, был сконструирован и оптимизирован модельный иммунохроматографический анализ с использованием гидрофильных углеродных наночастиц на простатспецифический антиген. Эффективность анализа была продемонстрирована в результате валидации. Разработанный метод анализа может быть применён в медицинских учреждениях и на месте оказания помощи. Также данный формат анализа удобен для мониторинга простатспецифического антигена в домашних условиях.

Работа поддержана грантом РФФИ № 24-75-00076.

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА СПИНОВЫХ ЛОВУШЕК СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА С РАЗЛИЧНЫМИ ЗАМЕСТИТЕЛЯМИ

Дементьев С.А.^{1,2}, Подаров Р.А.^{1,2}, Санникова Н.Э.², Полиенко Ю.Ф.³, Кирилюк И.А.³,
Крумкачева О.А.^{1,2}

¹Новосибирский государственный университет, физический факультет, Новосибирск, Россия

²Международный Томографический Центр СО РАН, Новосибирск, Россия

³Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова, Новосибирск, Россия

s.dementev@g.nsu.ru

Активные формы кислорода (АФК) являются ключевым агентом в фотодинамической терапии рака (ФДТ): при облучении фотосенсибилизатор (ФС) переходит в триплетное состояние и генерирует АФК, что приводит к апоптозу и/или некрозу окружающих клеток. Актуальной задачей в развитии ФДТ остается поиск новых перспективных ФС. [1] Важным шагом в оценке применимости новых ФС является определение эффективности генерации ими синглетного кислорода ($^1\text{O}_2$) – одного из видов АФК. Одним из способов решения данной задачи является метод спиновых ловушек (СЛ). Диамагнитная СЛ захватывает $^1\text{O}_2$ и становится парамагнитным стабильным радикалом (СР), который можно детектировать с помощью стационарного ЭПР. Однако у данного метода есть существенное ограничение: большинство СЛ синглетного кислорода существенно отклоняют рН среды в щелочную сторону. Это препятствует оценке свойств ФС, ввиду деградации СР и агрегации некоторых типов ФС при щелочных рН. [2] Более того, ФС как потенциальные лекарственные агенты необходимо исследовать при физиологических рН, что невозможно для большинства СЛ $^1\text{O}_2$, наиболее распространённых в исследованиях. Данную проблему можно решить, применяя специфические СЛ с различными заместителями.

Целью данной работы являлось исследование эффективностей захвата $^1\text{O}_2$ рядом как новых, так и известных СЛ, синтезированных в лаборатории азотистых соединений НИОХ СО РАН. Данные ловушки отличаются различными заместителями в 4, а также во 2 и 6 положениях пиперидинового цикла. Для данных СЛ, с помощью ЯМР спектроскопии, были определены значения рКа. Затем с использованием в качестве ФС модельного порфирина мезо-тетрааксис(Н-метил4-пиридил)порфин (ТмРур4), исследовалась эффективность захвата $^1\text{O}_2$ спиновыми ловушками при стационарном фотолизе с использованием светодиода при комнатной температуре в оптической кювете при различных уровнях рН в 10 мМ фосфатном буферном растворе. Контроль селективности захвата $^1\text{O}_2$ осуществлялся дополнительными исследованиями в растворе с азидом натрия и в дейтерированой среде. В результате были установлены структуры СЛ наиболее перспективные для исследования эффективности генерации синглетного кислорода ФС.

Литература.

1. Falk-Mahapatra R., Gollnick S. O. Photodynamic therapy and immunity: an update //Photochemistry and photobiology. – 2020. – Т. 96. – №. 3. – С. 550-559.
2. Victória H. F. V. et al. Detection of singlet oxygen by EPR: The instability of the nitroxyl radicals //Free Radical Biology and Medicine. – 2022. – Т. 180. – С. 143-152.

ПРОТЕКТОРНЫЕ ЭФФЕКТЫ РАСТИТЕЛЬНОГО ЭКСТРАКТА *PRUNELLA GRANDIFLORA* В ОТНОШЕНИИ ЭТОПОЗИДА НА ДРОЗОФИЛИНОЙ МОДЕЛИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Жудловский Д.Г.¹, Бобков Я.Н.¹, Антосюк О.Н.², Костенко В.В.¹

¹Институт фундаментальной медицины и биологии,
Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия

²Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина,
Екатеринбург, Россия

dgzhudlovskiy@kpfu.ru

Болезнь Альцгеймера (БА) характеризуется накоплением в мозгу Аβ амилоидных бляшек и нейрофибрилярных клубков. Аβ бляшки представляют собой скопления процессированных фрагментов белка-предшественника амилоида (App). Растительные экстракты рода *Prunella* имеют в своем составе природные антиоксиданты и ингибиторы ацетилхолинэстеразы, в частности розмариновую кислоту, что позволяет рассматривать их в качестве потенциальных лекарственных средств для терапии БА. Используя систему UAS/Gal4, нами были получены гибриды *Drosophila Melanogaster*, у которых наблюдалась конститутивная сверхэкспрессия UAS-APP под контролем Gal4.

В ходе эксперимента мухи со сверхэкспрессией культивировались на среде с добавлением этопозида (0.04 мкг/мл), обладающего цитотоксическим действием, 10% спиртового экстракта *Prunella grandiflora*, смеси данных компонентов и на контрольной среде. Методики включали в себя оценку смертности мух на предимагинальной стадии, жизнеспособности имаго, продолжительности жизни и индекса локомоторной активности полученных гибридов, а также анализ уровня экспрессии App по интенсивности флуоресценции в головном ганглии мух и анализ экспрессии генов стресс-ответа (*p53*, *Gadd45*, *BrcA*, *DeBcl*, *cat*) методом qPCR.

Было установлено, что экстракт при введении мухам со сверхэкспрессией App не вызывает достоверных изменений предимагинальной гибели и количества жизнеспособных имаго по сравнению с контролем. Экстракт обладает геропротекторным действием, увеличивая медианную продолжительность жизни самок мух со сверхэкспрессией по сравнению с мухами из других опытных групп. *P. grandiflora* характеризуется нейропротекторным действием, увеличивая двигательную активность самок со сверхэкспрессией по сравнению с контрольной и экспериментальными группами, особенно выраженный эффект наблюдался у старых особей. В группе *Prunella* выявлено снижение интенсивности флуоресценции головного ганглия по сравнению с другими опытными группами. Результаты qPCR демонстрируют значительное снижение экспрессии генов, ассоциированных со стрессом и апоптозом в группах, получавших экстракт и экстракт совместно с этопозидом, по сравнению с группой, получавшей только этопозид.

**ИНТЕНСИВНОСТЬ АВТОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ В СИНЕ-ЗЕЛЁНОМ СПЕКТРЕ
КАК МАРКЕР НАЛИЧИЯ ИЛИ ОТСУТСТВИЯ ОНКОЛОГИИ ТКАНЕЙ
СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ РТА**

**Закржевская В.Д.¹, Тальзёнкова А.Д.², Шестакова А.В.²,
Давыдова Е.Ю.², Брянская Е.О.¹**

¹ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева»,
Орёл, Россия

²Детский технопарк «Кванториум», БУОДО «Дворец пионеров и школьников
имени Ю.А. Гагарина», Орёл, Россия

esenvitalina@gmail.com

Во всём мире злокачественные новообразования слизистой оболочки рта (СОР) занимают 6 место среди наиболее распространённых видов рака. При этом, потенциально злокачественные заболевания тканей СОР, такие как лейкоплакия, красный плоский лишай, стоматит, в отсутствии своевременной диагностики могут привести к развитию инвазивного рака СОР. Для оценки состояния тканей СОР перспективным видится применение метода флуоресцентной визуализации, который в отличие от стандартно применяемого метода оральной цитологии является неинвазивным, безболезненным и экономически доступным методом. Ранее показано, что высокий уровень интенсивности автофлуоресценции эндогенных флуорофоров в клетке, таких как ФАД, в сине-зелёном спектре может быть маркером наличия патологии ввиду нарушения в метаболизме.

Целью данной работы являлась оценка уровня автофлуоресценции разных типов клеточных культур в сине-зелёном спектре для обоснования специализированных медико-технических требований, предъявляемых к устройству флуоресцентной визуализации тканей СОР, а именно интенсивности оптического излучения для возбуждения автофлуоресценции.

В качестве объекта исследования выбраны здоровые фибробласты кожи человека и клетки меланомы В16. Клетки культивировали до уровня конfluence не менее 40-50%. Культуры клеток выдерживали при 37°C в увлажнённой среде, содержащей 5% CO₂ и 95% воздуха. Автофлуоресценцию контролировали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Zeiss LSM 900 (длина волны возбуждения – 488 нм, регистрация автофлуоресценции – 505-550 нм). Во избежание фототоксичности интенсивность освещения была на уровне 0,1-0,2% от мощности лазера.

Были получены изображения автофлуоресценции клеток меланомы В16 и фибробластов кожи. В результате проведённого статистического анализа экспериментальных данных отмечено, что интенсивность автофлуоресценции здоровых фибробластов кожи превышает интенсивность автофлуоресценции клеток меланомы В16 в 4-5 раз со статически значимой разницей между экспериментальными группами на уровне 95% (*p < 0,05) по критерию Мана-Уитни.

Совокупность полученных данных позволяет полагать, что метод флуоресцентной визуализации является перспективным для выявления патологий тканей СОР, при этом сверхнизкий уровень интенсивности автофлуоресценции на зарегистрированных изображениях может служить маркером наличия онкологических заболеваний. Количественный анализ зарегистрированных с помощью устройства флуоресцентной визуализации изображений СОР, а также классификация изображений с помощью подходов на основе теории распознавания образов позволят повысить диагностическую точность предлагаемого метода. Предлагаемая технология позволит осуществлять быстрый скрининг здоровья населения, проводить повторные исследования тканей СОР для оценки эффективности проводимого лечения, а также снизить затраты на проведение диагностики ввиду экономической эффективности применяемого подхода.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 24-75-00144, <https://rscf.ru/project/24-75-00144/>

ИЗМЕНЕНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ МЫШЕЙ C57BL/6 ПРИ ОСТРОМ ОТРАВЛЕНИИ АЦЕТАМИНОФЕНОМ

Зудова А.И.^{1,2}, Апанович С.В.³, Мухлынина Е.А.¹, Соломатина Л.В.¹

¹Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук,
Екатеринбург, Россия

²Уральский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения
Российской Федерации, Екатеринбург, Россия

³Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина,
Екатеринбург, Россия

tina.zudova@mail.ru

Введение. Ацетаминофен (парацетамол) является одним из наиболее распространенных лекарственных средств, приводящих к развитию гепатотоксичности, ассоциированной со смертельным исходом. По современным концепциям отмечается взаимосвязь между развитием системного воспаления и смертельными исходами у пациентов с острыми критическими состояниями. Поэтому было высказано предположение, что и при ацетаминофен-индуцированной гепатотоксичности уровень летальности может иметь связь с системным воспалением. В связи с чем актуальным стало изучение феноменов системного воспаления: системной воспалительной реакции, системного микротромбообразования, системной альтерации и дистресс-реакции гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы – при остром отравлении данным препаратом.

Цель исследования – выявить изменения показателей острофазного и цитокинового ответа, микротромбообразования, тканевой деструкции, дистресс-реакции гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы в плазме крови мышей C57Bl/6 с острой интоксикацией ацетаминофеном.

Материалы и методы. Самцы мышей линии C57Bl/6 ($n = 42$), в возрасте 10 недель, разделены на 9 одинаковых по численности групп: 1 – интактная, 2 – контрольная, 3-6 – экспериментальные группы. Животным экспериментальных групп однократно, внутрибрюшинно ставили раствор ацетаминофена (14 мг/мл) в дозе 600 мг/кг массы тела (LD-50), контрольной - 0,9%-й раствор NaCl в эквивалентном объеме. Животных выводили из эксперимента через 6, 12, 24 и 48 часов и забирали кровь из бедренной вены. Для выполнения иммуноферментного анализа кровь центрифугировали 15 минут при 1000g, отбирали плазму, которую замораживали при -80°C и в дальнейшем использовали для определения интерлейкинов-1 α , -6, -10, фактора некроза опухоли- α , D-димеров, кортикостерона, С-реактивного белка, тропонина I.

Результаты. Начиная с 6 часов после введения токсиканта, происходит рост уровней интерлейкинов-1 α , -6, -10, тропонина I, а фактора некроза опухоли- α – начиная с 12 часов. При этом отмечается пик содержания факторов в первые сутки и их дальнейшее снижение через 48 часов после острой интоксикации. С-реактивный белок повышается, начиная уже с 6 часов после введения лекарственного средства, при этом значимое увеличение у экспериментальных

животных по сравнению с контрольными продолжается до 24 часов. Содержание D-димеров претерпевает снижение, начиная с 24 часов после острого отравления. Однако, не было выявлено значимых изменений содержания кортикостерона у мышей экспериментальных и контрольной групп.

Выводы. При острой передозировке ацетаминофеном у самцов мышей C57Bl/6 отмечаются развитие цитокинового и острофазного ответа, повреждение ткани сердца, изменения в системе микротромбообразования. При этом самые значимые признаки отмечались в первые сутки после введения токсиканта. Однако не было достоверных различий в показателе гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы.

Работа поддержана грантом РФФИ № 24-25-00469.

ПОКАЗАТЕЛИ ЭРИТРОЦИТОВ И РЕТИКУЛОЦИТОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ
ПРИ ИСКУССТВЕННОЙ ГИПОТЕРМИИ У КРЫС И ЕСТЕСТВЕННОЙ
ГИПОТЕРМИИ У СУСЛИКОВ

Ивашкина В.С.¹, Теплова П.О.², Лизоркина К.И.²

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

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

ivashkina70@list.ru

Гипотермия влечет за собой ряд функциональных изменений у теплокровных животных, которые могут привести к патологическим состояниям. Гибернирующие животные, в свою очередь, приобрели в процессе эволюции способность адаптироваться к экстремальным условиям окружающей среды рядом уникальных приспособлений, в частности, связанных с эритропозом. Понимание специфики кроветворения у гибернирующих животных позволит разработать новые методы для адаптации обычных теплокровных животных к критически низким температурам.

Цель исследования заключалась в сравнительном анализе изменений показателей эритроцитов и ретикулоцитов в периферической крови у крыс и сусликов в различных функциональных состояниях.

Материалы и методы. Исследования выполняли на трех группах самцов крыс *Wistar* (n=18) весом 200-290 г. в состоянии: нормотермии (n=6, 38°C); сразу после охлаждения методом «закрытого сосуда» в течение 3-4 часов (n= 6, 18-20 °C); через сутки после охлаждения (n=6, 38°C) и трех группах длиннохвостых сусликов *Urocitellus undulatus* массой 550-700 г. в состоянии: нормотермии (летние активные, n=4, 38-39°C); торпора (5-6 день гипотермии в период гибернации n=4, 2-3°C) и во время кратковременных эпизодов эутермии во время гибернации (n=4, 36-37°C). Отбор крови у сусликов осуществляли после декапитации (активные животные подвергались анестезии), а у крыс – из боковой хвостовой вены. Окрашивание мазков крови выполняли рабочими растворами Дифф-квик и бриллиантового крезилового синего. Анализ мазков крови выполняли с помощью широкопольного прямого микроскопа Leica DM 6000 B (Leica, Германия) на базе сектора оптической микроскопии и спектрофотометрии ЦКП ПНЦБИ РАН. Статистический анализ выполняли с помощью программы GraphPad Prism 10. Опыты проводили с соблюдением правил Европейской конвенции по обращению с лабораторными животными.

Результаты. В состоянии нормотермии у крыс и сусликов эритроциты имеют двояковогнутую форму (дискоциты), в то время как при гипотермии появляются атипичные формы клеток, которые частично замещают дискоциты. У крыс через сутки после охлаждения количество атипичных форм снижается, однако, наблюдается агрегация эритроцитов. У сусликов в период межбютных пробуждений тоже происходит частичная замена атипичных форм на дискоциты, но агрегация отсутствует. У крыс гипотермия не оказывала влияние на

уровень содержания ретикулоцитов, однако, их количество резко возрастает в 1,5 раза спустя сутки после охлаждения. У сусликов в период гипотермии и эутермии количество ретикулоцитов увеличивается вдвое относительно нормотермии.

Заключение: Изменения эритроцитов у крыс при гипотермии, вероятно, обусловлены усилением перекисного окисления липидов и повреждением мембран (Saidov & Scheikhova, 2021), что приводит к агглютинации и атипичной форме клеток. У сусликов же адаптивные механизмы позволяют клеткам изменять форму для прохождения через суженные сосуды (Lizorkina et al., 2024), предотвращая клеточный стресс (L'vova & Gasangadzhieva, 2003). Можно предположить, что рост количества ретикулоцитов у крыс, который наблюдался в период эутермии, может быть связан с активной выработкой эритропоэтина во время охлаждения. Тогда как у сусликов количество ретикулоцитов увеличивается на протяжении всего периода гибернации вследствие необходимости поддержания постоянства эритроцитарного состава.

Работа выполнена в рамках государственного задания № 075-00607-25-00.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ЦИТОКИНА TRAIL В ТЕРАПИИ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА

Кобякова М.И.^{1,2}, Фадеев Р.С.^{1,2}

¹Институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ИЦИГ СО РАН,
Новосибирск, Россия

²Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушино, Россия

kobyakovami@gmail.com

Ревматоидный артрит (РА) является одним из самых распространённых хронических аутоиммунных заболеваний, которое характеризуется синовиальным воспалением, сопровождающимся деградацией хряща и костной ткани. РА остается одной из значимых причин инвалидности и потери трудоспособности экономически и социально-активных людей, затрагивая около 0,2 – 1 % мирового населения. Несмотря на достижения современной фармакологии и ревматологии, а также значительные улучшения в терапии РА, применяемые противоревматические препараты имеют ряд недостатков, включая низкую эффективность действия, о чем свидетельствуют общие показатели ремиссии РА, а также значительные системные побочные эффекты, частый и хронический режим введения и создаваемая ими непереносимость препаратов. Поэтому разработка новых подходов к терапии ревматоидного артрита является крайне актуальной задачей.

Иммунный цитокин семейства фактора некроза опухоли, лиганд, вызывающий апоптоз (TRAIL), представленный на внешней клеточной мембране цитотоксических Т-клеток, НК-клеток и миелоидных дендритных клеток, является одним из главных молекулярных эффекторов адаптивного иммунитета и индуцирует селективный рецептор-опосредованный апоптоз клеток, обладающих патологическим фенотипом, включая опухолевые, вирус-инфицированные и сенесцентные клетки, связываясь с мембранными рецепторами DR4 и DR5, не вызывая при этом гибель нормальных здоровых клеток организма. В последнее время накапливается все больше данных, которые указывают на то, что TRAIL также играет важную иммунорегуляторную роль при аутоиммунных заболеваниях. Так, в ряде исследований *in vivo* продемонстрировано, что TRAIL апоптоз-независимым способом способен препятствовать провоспалительной активации макрофагов, а также Т-клеток, путем подавления TCR-сигнального пути. В патогенезе ревматоидного артрита центральное место уделяется хроническому воспалению синовиальной оболочки, которое опосредовано инфильтрующими ее аберрантно-активированными иммунными клетками, основными из которых, помимо В-клеток, являются Т-клетки и макрофаги. Показано, что при РА именно макрофаги секретируют большинство провоспалительных цитокинов, включая фактор некроза опухоли (ФНО)- α , интерлейкин (ил)-1, ил-6, которые усиливают не только воспаление посредством активации пути ядерного фактора каппа В (NF- κ B), что также приводит к образованию остеокластов, участвующих в резорбции костной ткани, но также и пролиферацию воспалительных фибробластоподобных синовиоцитов, обладающих патологическим фенотипом и участвующих в резорбции хрящевой ткани. В свою очередь, Т-

клетки, которые являются преобладающим типом лимфоцитов в синовиальной оболочке при РА, также участвуют в развитии и поддержании воспаления, посредством секреции интерферона (ИНФ)- γ .

Таким образом, исключительное и селективное проапоптотическое действие по отношению к воспалительным синовиоцитам при РА, а также потенциальное противовоспалительное действие цитокина TRAIL по отношению к активированным Т-клеткам и макрофагам может лежать в основе нового высокоселективного подхода к терапии ревматоидного артрита.

Работа выполнена в рамках государственного задания FWNR-2025-0014.

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРОВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ ВО ВКУСОВОМ ЭПИТЕЛИИ МЫШИ

Коваленко Н.П., Копылова Е.Е., Рогачевская О.А., Черкашин А.П.

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

a.p.cher@yandex.ru

Научные изыскания последних лет в области вкусовой рецепции млекопитающих показывают, что помимо пяти базовых вкусовых модальностей (соленое, кислое, сладкое, горькое, умами) периферическая вкусовая система может распознавать вкус жирных кислот, являющихся естественными метаболитами в биологических тканях. Для каждой из базовых вкусовых модальностей определены специфические рецепторы и ионные каналы, отвечающие за детекцию соответствующих веществ, входящих в состав принимаемой пищи. Чтобы уверенно говорить о наличии шестой вкусовой модальности - вкуса жирного - необходимо в первую очередь установить, есть ли во вкусовой ткани специфические молекулярные рецепторы, отвечающие за распознавание жирных кислот, поскольку в настоящий момент на этот вопрос нет однозначного ответа.

Недавними исследованиями показано, что свободные жирные кислоты являются лигандами рецепторных белков, функционирующих на плазмалемме, в цитозоле и на ядерной мембране, которые регулируют множественные клеточные функции. На плазматической мембране функционируют 4 рецептора жирных кислот, относящиеся к суперсемейству GPCR: GPR120 и GPR40, активируемые длинноцепочечными жирными кислотами; GPR41 и GPR43, активируемые короткоцепочечными жирными кислотами. Относительно периферической вкусовой системы только для GPR120 достаточно убедительно показано, что он функционирует во вкусовой ткани как рецептор жирных кислот. Свидетельства об участии GPR40 во вкусовой трансдукции противоречивы и отличаются в разных исследованиях, а экспрессия и функционирование GPR41 и GPR43 во вкусовой ткани не упоминаются. Нам представляется логичным провести собственную оценку вовлечения всех 4 рецепторов в детекцию жирных кислот как вкусового стимула.

Используя образец диссоциированной вкусовой ткани языка мыши, содержащий только вкусовые почки из желобоватого сосочка с минимальной примесью отдельных клеток соединительной и эпителиальной тканей были получены препараты суммарной РНК, на основе которой была синтезирована кДНК. Анализ экспрессии рецепторов жирных кислот GPR40, GPR41, GPR43, GPR120 во вкусовой ткани мышей проводили методом ОТ-ПЦР, используя кДНК в качестве матрицы. Для амплификации транскриптов рецепторов использовали специально подобранные ген-специфичные праймеры. Для качественной оценки транскриптов эксперимент проводили в трех повторах, для каждой пары праймеров ставили отрицательный контроль, чтобы исключить ложноположительный сигнал с геномной ДНК. Анализ экспрессии рецепторов жирных кислот во вкусовых почках мышей показал наличие транскриптов GPR43, GPR120 и отсутствие транскриптов GPR40, GPR41. Полученный

результат позволяет предположить, что у мышей за детекцию коротких и длинных жирных кислот в пище могут отвечать GPR43 и GPR120 рецепторы соответственно. Данное предположение будет проверено в последующих физиологических экспериментах с использованием гетерологической экспрессии этих рецепторов и соответствующих стимулов.

Работы с животными были проведены в соответствии с требованиями Комиссии ИБК РАН ФИЦ ПНЦБИ РАН по биоэтике.

Работа поддержана грантом РФФИ № 24-74-10082.

ГИПОКСИЯ ПРЕДОТВРАЩАЕТ ГЕМОЛИЗ ГЕМАТИН-ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ЭРИТРОЦИТОВ

Ковган П.Е.¹, Михайлова Д.М.^{2,3}, Миндукшев И.В.³

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

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

³Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия

kovganpolina@yandex.ru

Введение. Ряд патологий (малярия, геморрагический инсульт, серповидно-клеточная анемия, бета-талассемия) характеризуется высвобождением из поврежденных эритроцитов высоких концентраций токсического гематина (до 500 мкМ). Гематин – это производное свободного гема, ферропротопорфирин с присоединенным к железу (Fe^{3+}) лигандом -ОН. Известно, что гематин способен повреждать мембрану эритроцитов, изменять конформацию цитоскелетных белков, что в результате приводит к изменению формы клеток (сферизация) и гемолизу, что в результате усугубляет течение вышеперечисленных заболеваний. Кроме того, гипоксия, наблюдаемая при данных патологиях, приводит к деоксигенации гемоглобина и последующим изменениям в мембранном белке полосы 3, предполагаемого сайта связывания гематина. Дезоксигемоглобин связывается с N-концевым цитоплазматическим доменом белка полосы 3 с большим сродством, чем окси-форма. Данное связывание нарушает взаимодействие полосы 3 с цитоскелетом эритроцитов через спектрин и анкирин, вызывая деформацию клеток и снижение стабильности мембраны. Таким образом, воссоздание условий гипоксического стресса в эритроцитах позволит детально установить механизмы действия гематина на эритроциты человека.

Материалы и методы. Исследования проводились на отмытых эритроцитах человека (10^6 клеток/мл, финальная концентрация). С помощью метода молярной экстинкции были рассчитаны концентрации гематина, спектры контролировались спектрофотометрически. Для оценки трансформации эритроцитов использовались методы лазерной дифракции и проточной цитометрии. Для контроля сферизации эритроцитов и кластеризации мембранного белка полоса 3 использовался тест на связывание эозин-5-малеимида с помощью проточной цитометрии. Для перехода в гипоксическое состояние клетки барботировали аргоном.

Результаты. Гематин вызывал значительное снижение флуоресценции эозин-5-малеимид окрашенных эритроцитов, что соответствует сферизации эритроцитов. Кластеризация эритроцитов не наблюдалась как в оксигенированном состоянии, так и при условиях гипоксии. 50 нМ гематина вызывали более быструю сферизацию эритроцитов в оксигенированном состоянии, чем в условиях гипоксии. В дезоксигенированном состоянии гематин индуцировал гемолиз, начиная с 2 мкМ, в нормальных условиях гемолиз начинался уже при 1 мкМ гематина.

Вывод. Таким образом, эритроциты в условиях гипоксии менее подвержены гематин-индуцированным трансформациям, что может быть связано с изменением конформации белка полосы 3 в условиях гипоксии.

Выполнено по госзаданию ИЭФБ РАН № 075-00263-25-00.

ОЦЕНКА ВКЛАДА IP₃-РЕЦЕПТОРОВ В Ca²⁺-УТЕЧКУ
ПОКОЯЩИХСЯ КЛЕТОК ЛИНИИ НЕК 293

Кочкина Е.Н., Копылова Е.Е.

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

kate-kochkina@yandex.ru

В клетках линии НЕК 293 внутриклеточные Ca²⁺-сигналы, индуцированные агонистами, генерируются за счёт выброса Ca²⁺ из депо (эндоплазматического ретикулума, ЭР) через IP₃-рецепторы (IP₃R). IP₃-рецепторы являются тетрамерными Ca²⁺-каналами, формируемыми тремя различными субъединицами (IP₃R1, IP₃R2 и IP₃R3). Различные изоформы IP₃R различаются по чувствительности к IP₃ и Ca²⁺, а также по механизмам регуляции. С использованием технологии CRISPR/Cas9 в нашей лаборатории редактировался геном клеток НЕК 293 и были получены моноклональные линии клеток IP₃R1-НЕК, IP₃R2-НЕК и IP₃R3-НЕК, в каждой из которых функциональна единственная изоформа IP₃-рецептора – IP₃R1, IP₃R2 или IP₃R3, соответственно. Кроме того, была получена линия клеток ТКО-НЕК, в которой полностью отсутствуют функциональные IP₃-рецепторы. В своей совокупности, эти линии создавали экспериментальную платформу для анализа роль каждой изоформы IP₃-рецептора в Ca²⁺-гомеостазе и генерации Ca²⁺-сигналов, индуцируемых агонистами.

Индивидуальные клетки исследовались методом микрофотометрии клеток с использованием флуоресцентного Ca²⁺-зонда Fluo-8. В частности, ставился вопрос о том, является ли спонтанная активность IP₃-рецепторов фактором утечки Ca²⁺ из Ca²⁺-депо в покоящихся клетках. Проводился классический тапсигаргиновый тест с использованием клеток НЕК 293 дикого типа (WT-НЕК), в которых функциональны все три изоформы IP₃R, и клетки линий IP₃R1-НЕК, IP₃R2-НЕК, IP₃R3-НЕК и ТКО-НЕК. Клетки инкубировали в присутствии 1 мкМ тапсигаргина, ингибирующего Ca²⁺-АТФазу SERCA, тогда как внеклеточный Ca²⁺ был снижен до 260 нМ. Возникающие в этих условиях Ca²⁺-ответы были вызваны утечкой Ca²⁺ из ЭР, что опустошало Ca²⁺-депо и стимулировало активность депо-управляемых каналов, хотя и без очевидного депо-управляемого входа Ca²⁺, уровень которого во внеклеточном растворе снижен на 4 порядка до 260 нМ. После инкубации тапсигаргином в течение 600 секунд (интервала, обеспечивающего релаксацию внутриклеточного Ca²⁺ до исходного уровня) концентрацию внеклеточного Ca²⁺ возвращали к 2 мМ, инициируя существенный депо-управляемый Ca²⁺-вход и заметные Ca²⁺-ответы в цитозоле клеток.

С помощью разработанной нами методологии для анализа Ca²⁺-гомеостаза в условиях тапсигаргинового теста мы оценили относительную проницаемость мембраны ЭР для ионов Ca²⁺ для клеток различных линий. По этому параметру клетки ранжируются как IP₃R2-НЕК > IP₃R1-НЕК > IP₃R3-НЕК ≈ ТКО-НЕК. Таким образом, наши результаты свидетельствуют о том, что спонтанная активность IP₃-рецепторов, особенно изоформа IP₃R2, вносит существенный вклад в утечку Ca²⁺ из депо.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 22-14-00031.

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ μ - И m -КАЛЬПАИНОВ ДЕКСАМЕТАЗОНОМ В КЛЕТКАХ ЦНС

Куликова Е.Д., Карпенко М.Н.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

kulikovaekaterina77@gmail.com

Синтетические глюкокортикоиды, в том числе дексаметазон, активно применяются в клинической практике для лечения аутоиммунных заболеваний, острых воспалительных процессов и др. Однако несмотря на широкую распространенность, существуют данные, свидетельствующие о вовлеченности глюкокортикоидов в индукцию нейродегенеративных процессов. Одним из возможных факторов, влияющих на развитие нейродегенеративных процессов, является дисрегуляция работы кальпаиновой системы. Кальпаины – это семейство кальций-зависимых протеаз, которые, расщепляя свои субстраты, вовлекаются в реализацию всех физиологических функций. В центральной нервной системе наиболее представлены две изоформы кальпаинов: μ - и m -кальпаин. Гиперактивация m -кальпаина преимущественно связана с развитием нейродегенерации, а μ -кальпаина – с индукцией пластических процессов. Целью данной работы являлось исследование влияния дексаметазона на активность церебральных μ - и m -кальпаинов.

Исследование проводилось на половозрелых самцах крыс линии *Wistar*. После декапитации мозг крыс гомогенизировали в лизирующем буфере, содержащем ингибитор сериновых протеаз (PMSF, 10 mM) и Triton x100 (0,1%). Из гомогената путем разбавления готовили пробы с концентрацией белка 1 мкг/мкл и инкубировали при 37°C НТС добавлением дексаметазона в концентрациях: 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM. Также варьировали время инкубации: 5, 7, 10, 12, 15 и 20 минут. Активность кальпаинов оценивалась при помощи казеиновой зимографии в геле. Для статистического анализа использовался непарный t -критерий Стьюдента.

Было обнаружено, что дексаметазон повышает активность μ -кальпаина ($p = 0,049$), при этом не влияет на активность m -кальпаина. Доза-зависимые эксперименты *in vitro* показали, что дексаметазон активизирует кальпаины, начиная с концентрации 3 mM. В то же время при оценке временной зависимости не было обнаружено отличий в уровнях активности обеих изоформ кальпаинов в разных временных точках. Результаты экспериментов *in vitro* согласуются с ранее проведенными экспериментами на животной модели, которые показали повышение активности кальпаинов в группе с однократным введением дексаметазона (8 мг/кг веса животного) в префронтальной коре ($p = 0,0079$) по сравнению с контрольной группой.

Таким образом, при назначении дексаметазона необходимо учитывать его способность активировать церебральный μ -кальпаин.

АНАЛИЗ АССОЦИАЦИЙ SNP RS10166942 ГЕНА *TRPM8* С РИСКОМ РАЗВИТИЯ ДЕПРЕССИИ У БОЛЬНЫХ МИГРЕНЬЮ

Кутузова А.П.¹, Галимова Э.С.²

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

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

st096302@student.spbu.ru

Мигрень – распространённое неврологическое заболевание, относящееся к первичным головным болям и затрагивающее центральную нервную систему, тройничный нерв и мозговые оболочки. Заболевание распространено среди молодого трудоспособного населения, особенно среди женщин. Одним из коморбидных заболеваний мигрени является депрессия. Исследования последних лет позволили выявить потенциальные общие сигнальные пути и факторы развития этих двух болезней, в том числе генетические. Ген холодового канала с транзиторным рецепторным потенциалом *TRPM8* был последовательно идентифицирован в нескольких исследованиях, проведенных методом полногеномного поиска ассоциаций (GWAS), как один из генов предрасположенности к мигрени в различных популяциях. Цель данного исследования – изучить роль полиморфизмов гена *TRPM8* в развитии депрессии у больных мигренью.

Образцы ДНК были получены из венозной крови пациентов, проходивших клинические исследования в Центре диагностики и лечения головной боли, ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова (г. Санкт-Петербург). В качестве контроля в работе использовали образцы ДНК, выделенной из цельной крови здоровых доноров Санкт-Петербурга. Биологический материал получен с информированного согласия пациентов и доноров. Исследование одобрено Локальным этическим комитетом ИЭФБ им. Сеченова РАН.

Диагноз мигрень у пациентов установлен в соответствии с критериями Международной классификации головной боли III (ICHD III, 2013г). Депрессия была оценена у больных мигренью с использованием шкалы Цунга (The Zung Self-Rating Depression Scale). Выделение ДНК из венозной крови пациентов происходило по методу фенол-хлороформной экстракции, описанному Mathew C. Для исследования полиморфного локуса применялся метод ПЦР в реальном времени. Математическую обработку результатов анализа ассоциации полиморфного локуса выполняли с помощью пакета программ PLINK 1.06 (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/index.shtml>).

При изучении распределения частот аллелей и генотипов полиморфного варианта rs10166942 показано, что частота встречаемости генотипа Т/Т значительно выше у больных мигренью с депрессией (39,53%), чем у здоровых доноров (17,90%; $p=0.057$; $OR=2.99(1.35–6.63)$). Кроме того, частота Т аллеля у больных мигренью с депрессией составила 54.65%, тогда как в контроле 33.87% ($p=0.00083$, $OR=2.25(1.38–3.64)$). Значения OR свидетельствуют об ассоциации Т аллеля и гомозиготного генотипа Т/Т с риском хронификации мигрени ($CI=95\%$, $OR=2.99$ и $OR=2.25$, соответственно). Таким образом, наши данные показывают, что аллель Т и генотип Т/Т повышают риск развития депрессии у больных мигренью.

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ, ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ И УРЕАЗЫ ДЛЯ НЕПРЕРЫВНОГО МОНИТОРИНГА ЛАКТАТА, ГЛЮКОЗЫ И МОЧЕВИНЫ

Лаврова Т.В., Харьковская А.С.

Тульский государственный университет, Тула, Россия

lavrova0000@yandex.ru

Определение концентраций лактата, мочевины и глюкозы в биологических жидкостях имеет высокую диагностическую ценность, эти аналиты, являясь индикаторами гипоксии, работы почек и углеводного обмена, важны для выявления и мониторинга заболеваний. Разработка эффективных методов непрерывного количественного анализа метаболитов является актуальной задачей для клинической лабораторной аналитики и биомедицинских исследований. Целью работы является формирование биосенсора для быстрого определения лактата, мочевины и глюкозы.

Биосенсор включает электрохимическую ячейку, рабочий электрод, модифицированный ферментом для анализа одного из показателей: лактата, мочевины или глюкозы; электрод сравнения и потенциостат. Модификация рабочего графитопастового электрода (ГПЭ) включала использование композитного материала на основе полиазура и одностенных углеродных нанотрубок (ОУНТ). ОУНТ обладают высокой площадью поверхности и электропроводностью, что способствует улучшению электронного транспорта и повышению чувствительности сенсора. Полиазур обеспечивает благоприятную микросреду для иммобилизации ферментов, взаимодействует с активным центром и поверхностью электрода, что позволяет зарегистрировать окисление субстратов амперометрическим методом – по изменению силы тока до и после введения аналита при приложенном потенциале. Для обеспечения селективности анализа проводилась иммобилизация ферментов на поверхности модифицированных ГПЭ: лактатдегидрогеназы для определения лактата, уреазы для определения мочевины и глюкозооксидазы для определения глюкозы. Иммобилизация ферментов осуществлялась методом инкапсуляции с помощью диализной мембраны.

Экспериментально установлены параметры функционирования сформированных биосенсоров: диапазоны определяемых концентраций (лактат: 1,25-3,74 мМ; мочевина: 0,6-26 мМ; глюкоза: 1,2-19,6 мМ) и температура, при которой генерируется максимальный аналитический сигнал (40-60°C). Исследования показали, что введение ОУНТ в композитный материал значительно увеличивает электрохимический сигнал биосенсора, что обеспечило высокую чувствительность анализа. Найденные нижние границы определяемых концентраций позволяют после апробации использовать биосенсор для неинвазивного анализа слюны, где содержание лактата составляет около 0,2 мМ, мочевины 1,7-3,3 мМ и глюкозы до 1,77 мМ.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-73-01220, <https://rscf.ru/project/23-73-01220/>

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ НИЗКОЧАСТОТНОГО ИМПУЛЬСНОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ НА МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЭРИТРОЦИТОВ КРЫС

Лабынцева О.М., Куканова О.В., Рохмистрова Е.Г., Липова В.В.

Федеральное государственное унитарное предприятие «Российский федеральный ядерный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной физики»,
Саров, Россия

memf@bfrc.vniief.ru

С появлением современных компьютерных технологий, принципиальным образом расширились возможности количественного изучения морфологии клеточных элементов системы кроветворения. Применение новых объективных количественных показателей позволило повысить информативность микроскопического исследования поверхности, формы, площади, объема, высоты и оптических свойств цитоплазмы клеток крови в исследовательской практике и медицине.

Состояние эритроцитов – чувствительных индикаторов изменений нормального хода физиологических, биохимических и биофизических процессов изучено недостаточно. Исследование особенностей структурно-функциональной организации эритроцитов, может иметь, помимо теоретического, диагностическое и прогностическое значение для оценки реакции организма на действие низкочастотного магнитного поля.

Объектом исследования являлись крысы-самцы в количестве 40 шт массой 220 г.

Проведено экспериментальное исследование влияния однократного 30-минутного воздействия импульсным магнитным полем (ИМП) (частотой 100 Гц, индукцией от 1,40 до 3,15 мТл) на морфометрические показатели эритроцитов. Забор крови осуществляли через сутки после воздействия ИМП. Морфометрию эритроцитов проводили с помощью аппаратно-программного комплекса «МЕКОС-Ц1» (ООО «Медицинские Компьютерные Системы», г. Москва) в программе «Эритроцитометрия для крыс» в монослое мазков периферической крови, окрашенных по Гимза-Романовскому. В каждой группе (контроль, опыт) анализировали по 12 тыс. клеток.

Воздействие ИМП вызывало снижение площади эритроцита на 6 % ($p=0,03$), диаметра эритроцита на 3,5 % ($p=0,02$) и увеличение фактора формы объекта на 4 % ($p=0,0089$), что приводило к смещению кривой Прайс-Джонса влево.

Изменение геометрии и объема клеток связано с состоянием цитоскелета и определенного осмотического баланса, обусловленного ионной проницаемостью плазматической мембраны и нормальным функционированием белков.

Таким образом, воздействие низкочастотного ИМП с указанными характеристиками оказывает влияние на мембранные структуры клеток и приводит к изменению морфометрических параметров эритроцитов в сторону микроцитоза.

ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ОСНОВ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ
ОГРАНИЧЕНИЯ КАЛОРИЙНОСТИ ПИТАНИЯ ПРИ
НЕФРОТОКСИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ

**Ляо С.^{1,2}, Андрианова Н.В.¹, Зорова Л.Д.¹, Семенович Д.С.¹, Манских В.Н.¹,
Садовникова И.С.³, Гуреев А.П.³, Плотников Е.Ю.¹**

¹НИИ Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,

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

²Факультет биоинженерии и биоинформатики, Московский государственный университет

имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³Кафедра генетики, цитологии и биоинженерии,

Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

starrain524@gmail.com

Ограничение калорийности питания (ОКП), заключающееся в уменьшении калорийности употребляемой пищи, известно своими терапевтическими свойствами при различных патологиях жизненно важных органов. В последнее время эффекты ОКП начали изучать в контексте заболеваний почек, в частности, при остром почечном повреждении (ОПП). ОПП представляет собой клинически значимую патологию, часто возникающую как ятрогенное осложнение при применении лекарственных средств, например, антибактериальных препаратов аминогликозидного ряда. Данные соединения, в том числе гентамицин, индуцируют острую канальцевую нефропатию за счет чрезмерного образования активных форм кислорода (АФК), что запускает гибель клеток почечного тубулярного эпителия.

Целью исследования было изучение эффектов и молекулярных механизмов действия ОКП при гентамицин-индуцированном ОПП, включая влияние на систему аутофагии, состояние митохондрий и уровень окислительного стресса.

В данной работе ОПП вызывали путем введения крысам гентамицина (160 мг/кг, 6 дней), часть крыс предварительно в течение 4 недель подвергалась ОКП. В крови и моче животных оценивали уровень маркеров почечной дисфункции, кроме того, с помощью вестерн-блоттинга, гистологического анализа и ПЦР проводили изучение состояния ткани почек.

У крыс, находившихся на ОКП, было выявлено ингибирование пути mTOR, усиление аутофагии, снижение апоптоза и окислительного стресса. При ОПП диета многократно снижала концентрацию маркеров почечной дисфункции, уменьшала активацию системы репарации, гибель клеток и инфильтрацию иммунных клеток в ткани почек, способствовала увеличению количества копий митохондриальной ДНК (мтДНК). При гистологическом анализе было обнаружено, что лечение крыс с помощью ОКП уменьшает некроз проксимальных канальцев, а также приводит к более выраженной активации процесса аутофагии.

Таким образом, было показано, что ОКП приводит к значительному снижению тяжести ОПП, а также способствуют уменьшению воспаления в ткани почки, восстановлению ее нормальной морфологии и функции. Кроме того, ОКП активирует аутофагию, снижает уровень окислительного стресса, повышает количество копий мтДНК и толерантность ткани к апоптотической гибели клеток.

Работа поддержана грантом РФФ № 21-75-30009.

ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО ВОДОРОДА ДЛЯ КОРРЕКЦИИ СОСТОЯНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ У КРЫС

Маркелова В.Е., Грачева Е.А., Дерюгина А.В.

ННГУ имени Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

markeloval017@gmail.com

На фоне сахарного диабета (СД) возникают различные осложнения, приводящие к преждевременной инвалидизации и высокой смертности. Устойчивое повышение глюкозы в крови – гипергликемия, является основным показателем СД и при длительном течении влияет на морфологию, метаболизм и функциональную активность эритроцитов. Окислительный стресс, вызванный гипергликемией, инициирует повреждение β -клеток и ускоряет прогрессирование заболевания. Эффект молекулярного водорода (H_2) при СД связан с ингибированием окислительного стресса и апоптоза β -клеток.

Целью данной работы ставилось изучение электрофоретической подвижности эритроцитов (ЭФПЭ), агрегации и осмотической устойчивости эритроцитов при моделировании СД 1 и 2 типа у крыс при действии молекулярного водорода.

Исследование проводили на крысах линии *Wistar* массой 200-250 г. Моделирование СД 1 типа у животных ($n = 10$) проводили с помощью внутривентриального введения аллоксана в дозе 170 мг/кг, после чего разделили их на две группы: опытную и контрольную. Для воспроизведения преддиабетического состояния при СД 2 типа на крысах ($n = 10$) проводили подкожное введение дексаметазона в комбинации с высокожировой диетой. Животные аналогично были разделены на опытную и контрольную группы. Обе опытные группы получали ингаляции 2% H_2 . Уровень физиологической нормы исследуемых показателей измеряли у интактных животных. Забор крови осуществляли из подъязычной вены на 3, 7, 14, 28 сутки после моделирования СД 1 типа и на 3, 7, 14 сутки после моделирования СД 2 типа. Агрегацию, осмотическую резистентность эритроцитов и ЭФПЭ изучали с помощью методов оптической микроскопии, фотометрии и микроэлектрофореза, соответственно.

В ходе исследования было установлено, что использование H_2 повышало осмотическую резистентность эритроцитов, которая достигала максимальных значений на последние сутки лечения у животных с обеими моделями СД. У крыс с СД 1 типа наблюдалось устойчивое повышение ЭФПЭ в опытной группе и его снижение в контрольной группе после 7 суток лечения. У животных с СД 2 типа на 14 сутки ЭФПЭ в контрольной группе снизилась на 36% относительно интактных показателей, в то время как в опытной повысилась на 23%. Ингаляционное введение H_2 определило менее выраженное возрастание уровня агрегации эритроцитов в опытной группе крыс с СД 1 типа по сравнению с группой контроля. На 14 сутки эксперимента показатель агрегации у крыс контрольной группы с СД 2 типа вырос на 78% относительно физиологической нормы, что в 3,5 раза больше, чем у крыс опытной группы (22%).

Полученные результаты доказывают возможность использования молекулярного водорода в коррекции состояния эритроцитов, что требует дальнейших исследований действия молекулярного водорода в качестве возможной терапевтической стратегии при СД.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСНОВНЫХ НЕИНВАЗИВНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК РАЗЛИЧНЫХ ФАЗ СНА У МЕЛКИХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Меланина Ю.В., Андреев А.И., Апушкин Д.Ю., Ахременко Е.А., Коваленко И.И.

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

melanina.yuliya@mail.ru

Для чёткой дифференциации фаз сна и бодрствования эффективно применение инвазивных методов, таких как снятие электроэнцефалографического сигнала с электродов, размещённых под поверхностью черепа. Недостатком таких методов является сложность исполнения, необходимость использования дорогостоящего оборудования, затруднительность проведения оперативного скрининга потенциальных лекарств с применением таких животных. Исходя из этого, существует потребность в разработке неинвазивного количественного метода оценки/дифференциации фаз сна и бодрствования, а также оперативного скрининга биологически активных веществ, обладающих свойствами, влияющими на состояние сознания лабораторных животных.

Цель. Выявление и валидация неинвазивных признаков фаз сна у лабораторных животных.

Материалы и методы. Исследование проводили на самках крыс линии *Wistar* в возрасте 8-9 месяцев. Животным проводили стереотаксическую операцию для вживления электроэнцефалографических (ЭЭГ) электродов в головной мозг. Электроды в черепе животного были соединены с аппаратом регистрации ЭЭГ, поведение животного фиксировалось на видео на протяжении полного циркадного цикла, синхронно с ЭЭГ. Далее был сформирован массив данных из 15-секундных отрезков видео в инфракрасном (ИК) свете и 15-секундных отрезков ЭЭГ (эпох), синхронных этим видеозаписям. Нами было сформировано 216 пар «ЭЭГ+видеозапись», названных «энцефалографическими событиями».

Результаты. Для дальнейшего статистического анализа были отобраны состояния животного, которые в экспертно описанном экспериментальном массиве наблюдались не менее 10 раз: "openactiv" – высокая подвижность при открытых глазах, "closedpassiv" – неподвижность при закрытых глазах, "openpassiv" – неподвижность при открытых глазах, "openlow" – низкая подвижность при открытых глазах, "fadepassiv" – неподвижность при закрывающихся глазах. В качестве электроэнцефалографической характеристики отрезков ЭЭГ мы использовали распределение спектральной плотности мощности по характерным частотным интервалам каждого из ритмов: дельта, тета, альфа, бета, гамма. После анализа полученных данных можно уверенно констатировать, что состояния с открытыми глазами и хотя бы минимальной подвижностью существенно отличаются от трёх состояний с неподвижностью, в том числе с открытыми глазами. В дальнейшем, сочетанное использование экспертного анализа видеозаписей, дифференциального трекинга точек головы, ЭЭГ и

машинного обучения позволило добиться аккуратности неинвазивной дешифровки состояний «NREM-сон», «REM-сон» и «бодрствование» в 79%.

Выводы. По результатам валидационных исследований видно, что экспертно определяемые неинвазивные параметры имеют ограниченную пригодность для неинвазивного мониторинга состояния сознания животных, в первую очередь, не позволяя различая собственно фазы сна животного, что обуславливает необходимость автоматизации таких исследований, например, с помощью прецизионного дифференциального трекинга ключевых точек головы животного, и разработки алгоритмов автоматической идентификации состояния сознания животных на больших интервалах времени, возможность которой и была продемонстрирована в нашей работе.

Работа поддержана грантом Фонда содействия инновациям договор № 18172ГУ/2022 от 20.12.2022.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ И МУЛЬТИМОДАЛЬНЫХ ДАННЫХ ДЛЯ РАННЕГО ВЫЯВЛЕНИЯ ЗАМЕДЛЕННОГО ЗАЖИВЛЕНИЯ ПЕРЕЛОМОВ

Мельникова М.С.¹, Арзамасов К.М.^{1,2}

¹МИРЭА – Российский технологический университет, Москва, Россия

²Научно-практический клинический центр диагностики и телемедицинских технологий,
Москва, Россия

melnikova_m@mirea.ru

Согласно статистическим данным, замедленное сращение или полное несращение развивается в 5–10% случаев всех переломов длинных костей, а при сложных диафизарных переломах этот показатель может достигать 20%. У пациентов с факторами риска, такими как пожилой возраст, сахарный диабет, остеопороз или курение, частота осложнений достигает 30%. Недодиагностика на ранних этапах приводит к упущению оптимальных сроков коррекции лечения и увеличивает риск несращения.

Исследования показывают, что чувствительность рентгенографии (РГ) при выявлении нарушений консолидации варьирует в пределах 65% – 75%, тогда как у компьютерной томографии (КТ) она достигает 73% – 78%, а специфичность КТ при ряде сопутствующих факторов иногда может достигать до 96%. Однако, несмотря на более высокую точность по сравнению с РГ, КТ и магнитно-резонансная томография (МРТ) остаются недостаточно специфичными методами и не позволяют с полной уверенностью предсказать успешность сращения кости. К тому же, их применение ограничено высокой стоимостью, трудоёмкостью и продолжительным временем проведения исследования, что затрудняет их использование в рутинной клинической практике.

Шкала RUST (Radiographic Union Scale for Tibial fractures) представляет собой альтернативный инструмент, предназначенный для оценки состояния перелома на основе стандартных рентгенограмм, который учитывает степень формирования костной мозоли по четырём кортикальным слоям и обладает высокой воспроизводимостью. Однако и этот метод имеет свои ограничения: субъективность оценки, недостаточная чувствительность на ранних стадиях регенерации и слабая эффективность при сложных переломах со смещением отломков или обширным повреждением мягких тканей.

Перспективным направлением решения проблемы является применение алгоритмов машинного обучения (ML), анализирующих мультимодальные данные. Такие модели объединяют данные стандартной визуализации с клиническими, биохимическими и генетическими параметрами, что позволяет учесть комплексные факторы, влияющие на процессы регенерации костной ткани.

Анализ существующих исследований показал, что включение биомаркеров, таких как остеокальцин, костная щелочная фосфатаза (ALP), N-концевой пропептид проколлагена I (PINP) и маркеры воспаления (IL-1 β , IL-6), повышает чувствительность ML-моделей при выявлении замедленного сращения до 82%. Дополнение этих данных показателями

физической нагрузки с носимых датчиков и генетическим профилированием пациентов (например, полиморфизмы в генах NOS2 и BMP7) увеличивает точность прогнозирования до 90% и выше.

Исследования показали, что полиморфизмы в генах BMP2, BMP7, VEGF, NOS2 достоверно ассоциированы с риском несращения. Включение данных о генетических предрасположенностях в ML-модели позволяет повысить чувствительность алгоритмов на 10–15% по сравнению с традиционными методами оценки рисков.

На данный момент перспективным направлением является разработка алгоритмов, анализирующих динамику рентгенологических снимков во времени. Такие подходы позволяют выявлять замедление темпов консолидации на основе оценки временных изменений плотности костной ткани и формирования костной мозоли. Исследования показывают, что подобные алгоритмы достигают точности до 85% в выявлении ранних признаков несращения при анализе серийных снимков.

ОСОБЕННОСТИ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК ГРУДНОЙ АОРТЫ КРЫС ЛИНИИ *SHR*

Мещерякова Е.И., Жалимов В.К., Вихлянцев И.М., Грицына Ю.В.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

elena.mesh2311@gmail.com

Гладкомышечные клетки (ГМК) аорты являются основным структурным и функциональным компонентом среднего (медиального) слоя артериальной стенки, который составляет большую часть структуры аорты, определяя ее диаметр и неся на себе большую часть механической нагрузки. Основная функция ГМК – принятие активного участия в сокращении и расслаблении стенки сосудов. Эти клетки обладают тремя основными активностями: сократительной, пролиферативной и миграционной. Известно, что в норме у половозрелых крыс линии *Wistar* ГМК аорты обладают повышенной сократительной активностью и пониженными пролиферативной и миграционной активностями. При этом, у крыс линии *SHR* (*spontaneously hypertensive rats*, спонтанно-гипертензивные крысы) аналогичного возраста (линия считается наиболее близкой моделью гипертонии человека), активность ГМК аорты меняется в сравнении с таковыми у крыс линии *Wistar*: сократительная активность снижается, пролиферативная и миграционная активности повышаются. При этом, не известно, как будут меняться данные активности ГМК аорты крыс линии *SHR* на самых ранних стадиях заболевания, когда артериальное давление у животных этой линии такое же как у контрольных крыс линии *Wistar*.

В связи с этим, цель данной работы заключалась в сравнении сократительной, пролиферативной и миграционной активностей ГМК грудной аорты крыс линии *SHR* с таковыми у крыс линии *Wistar* возраста 1 неделя от рождения.

В работе применялись следующие методы: первичные ГМК были выделены из грудной аорты крыс линии *Wistar* и *SHR* методом ферментативного расщепления с последующим высевом клеток на культуральные среды; ПЦР в реальном времени проводилась для оценки пролиферативной активности ГМК путём сравнения относительного количества геномной ДНК между контролем и опытом; тест заживления повреждения в монослое клеток (*Wound healing assay*) осуществлялся для определения миграционной активности ГМК; метод оценки степени сжатия коллагенового геля применялся для определения уровня сократительной активности клеток. Все эксперименты на ГМК аорты проводили до третьего пассажа включительно.

Обнаружено увеличение миграционной, пролиферативной и снижение сократительной активностей ГМК грудной аорты крыс линии *SHR* относительно таковых активностей клеток у крыс линии *Wistar* возраста 1 неделя от рождения. Полученные результаты расширяют представление об эффектах передаваемой по наследству гипертонии у крыс линии *SHR* раннего неонатального периода развития. Накопление данных в этой области исследования открывают перспективы для усовершенствования методов диагностики врожденной гипертонии на ранней стадии заболевания у новорожденных, у которых артериальное давление еще в норме, но уже могут наблюдаться патологические изменения свойств ГМК аорты.

Работа поддержана грантом РФФИ № 25-25-00135.

ПРОДУКТЫ РАСПАДА ГЕМОГЛОБИНА ИНДУЦИРУЮТ АКТИВАЦИЮ И ГИБЕЛЬ ТРОМБОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

Михайлова Д.М.^{1,2}, Ковган П.Е.², Гамбарян С.П.^{1,3}

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. Тромбозы являются наиболее частыми осложнениями заболеваний, ассоциированных с гемолизом (геморрагический инсульт, язва желудка, малярия, серповидно-клеточная анемия). При гемолизе эритроцитов происходит выход свободного гемоглобина в кровотоки, который окисляется до токсичных соединений – гематина и гемина. Известно, что данные соединения, предположительно связываясь с рецептором CLEC-2, вызывают активацию тромбоцитов. Высокие концентрации окисленных производных гема индуцируют гибель тромбоцитов, что приводит к тромбоцитопеническим состояниям. Несмотря на большой объем данных, остаются неясными механизмы, вовлеченные в гематин-индуцированную активацию и гибель тромбоцитов человека, что значительно затрудняет терапию гемолитических заболеваний.

Цель. Исследовать механизмы гематин-индуцированной активации тромбоцитов

Материалы и методы. Исследование проводилось на отмытых тромбоцитах человека ($2 \cdot 10^7$ клеток/мл, финальная концентрация). Изменение формы, агрегация тромбоцитов и внутриклеточный кальций контролировались методом лазерной дифракции на анализаторе частиц LaSca-TM (БиоМедСистем, Санкт-Петербург, Россия). Анализ активации проводился с помощью метода проточной цитометрии (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) с анализом не менее 15 000 событий.

Результаты. Гематин в низких концентрациях (до 10 мкМ) индуцировал активацию и агрегацию тромбоцитов. Высокие концентрации гематина (20-50 мкМ) вызывали более медленную агрегацию, выход фосфатидилсерина на внешнюю поверхность мембраны, значительное снижение жизнеспособности и необратимый подъем внутриклеточного кальция. Активаторы ингибиторных путей cGMP/PKG и cAMP/PKA блокировали агрегацию только при низких концентрациях гематина. Ингибитор интегринов П_б/III_а (ReoPro) блокировал агрегацию на всем диапазоне концентраций. Альбумин инициировал дезагрегацию в гематин-активированных тромбоцитах.

Выводы. Низкие концентрации гематина активируют тромбоциты через рецептор-опосредованный путь активации, не оказывая токсического действия на клетки. Однако высокие концентрации гематина вызывают нарушение кальциевого гомеостаза, что приводит к гибели тромбоцитов.

Работа поддержана грантом РФФ № 23-15-00142.

УЛУЧШЕНИЕ ДИАГНОСТИКИ *C. DIFFICILE*: ОПТИМИЗАЦИЯ БУФЕРА ДЛЯ ОБРАЗЦА В ИХА ТЕСТЕ

Муратова К.В.^{1,2}, Семейкина А.А.¹, Моисеева А.А.¹

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

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
образования «МИРЭА – Российский технологический университет», Москва, Россия

melonmur@gmail.com

Clostridioides difficile является одной из самых распространенных внутрибольничных инфекций. В основной группе риска находятся люди пожилого возраста, а также лица, прошедшие терапию антибиотиками. Симптомы заражения варьируются от полного их отсутствия до диареи различной степени тяжести и колита. Ранняя диагностика поможет предотвратить возникновение опасных симптомов. Для этих целей наиболее часто используют метод иммунохроматографического анализа (ИХА), который позволяет быстро (10 – 15 минут) и эффективно получить результат исследования *C. Difficile*.

Для обнаружения *C. difficile* в качестве образца используется кал. Он является специфичным матриксом из-за сложного и неоднородного состава. Это может привести к неспецифическому связыванию и матричным эффектам. Кроме того, вариативность консистенций образца и низкое содержание целевых аналитов усложняют создание быстрого и надежного теста. Разработка оптимального буфера для экстракции токсинов из кала может значительно улучшить специфичность и качество теста.

Цель исследования – оптимизация экстрагирующего буфера ИХА для диагностики *Clostridioides Difficile*. Опасными являются штаммы, продуцирующие токсины, которые отвечают за образование воспаления в кишечнике. Поэтому тесты нацелены на определение токсинов А и В.

В качестве маркера ИХА выбраны разноцветные латексные частицы, содержащие карбоксильные группы на своей поверхности. Конъюгаты латексных частиц с моноклональными антителами получены карбодиимидно-сукцинимидным методом.

Первый этап оптимизации буфера состоял в подборе буферной основы, молярности и значения рН. Данные показатели способствуют стабилизации целевых антигенов, поддержанию функциональности антител и минимизации неспецифических связываний. Рассмотрены боратный, трис, фосфатно-солевой буфер в диапазоне молярных концентраций от 50 до 200 мМ и значений рН от 7 до 9. Наилучший результат показал 100 мМ фосфатно-солевой буфер, рН = 7,5. Для приближения буфера к физиологическим условиям рассмотрен хлорид натрия в диапазоне от 200 мМ до 100 мМ. Эксперимент показал, что данный компонент ухудшает чувствительность теста, поэтому он не был включен в итоговый буфер. Затем проводилось добавление детергентов, которые активно используются в качестве добавок для предотвращения неспецифических взаимодействий и для улучшения высвобождения целевых

антигенов из образца. Апробированы неионогенные детергенты – Tween20, TritonX100, PluronicF68 в концентрациях 0,05%, 0,25% и 0,5%. Лучшие результаты показал TritonX100 с концентрацией 0,25%. Финальным этапом стало добавление белков БСА и казеина с концентрациями 0,25%, 0,5% и 1%. Данные добавки блокируют неспецифическое связывание антител с компонентами образца, такими как липиды, белки и твердые частицы, и уменьшают фоновое окрашивание в аналитической зоне. По итогам эксперимента был выбран БСА с концентрацией 1%.

Суммируя все вышесказанное, 100 мМ фосфатный буфер (pH=7,5), содержащий 0,25% TritonX100 и 1% БСА является наиболее оптимальным для определения токсинов А и В в образце кала. Данный буфер улучшил чувствительность теста, что поможет диагностировать *C. difficile* на ранних стадиях заражения.

ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТА НОВЫХ РЕГУЛЯТОРОВ РЕЦЕПТОРА ТИРЕОТРОПНОГО ГОРМОНА С АКТИВНОСТЬЮ ПОЗИТИВНЫХ АЛЛОСТЕРИЧЕСКИХ МОДУЛЯТОРОВ НА ТИРЕОИДНУЮ СИСТЕМУ У КРЫС

Назаров И.Р., Печальнова А.С., Деркач К.В., Шпаков А.О.

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова
Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

inazarovgm@gmail.com

Тиреоидная система контролирует энергетический обмен, термогенез, функции опорно-двигательного аппарата, активность нервной и сердечно-сосудистой систем. Важнейшим регулятором тиреоидной системы является секретируемый гипофизом тиреотропный гормон (ТТГ), мишенью которого является рецептор ТТГ, локализованный в тироцитах и опосредующий стимулирующее влияние ТТГ на синтез тиреоидных гормонов (ТГ) щитовидной железой. При таких заболеваниях, как аутоиммунный гипотиреоз и гипотиреоз, вызванный мутациями в рецепторе ТТГ, уровни ТТГ находятся в пределах нормы или чаще повышены, что обусловлено усилением стимулированной тиролиберином (ТРГ) продукции ТТГ в условиях недостатка ТГ. В основе этого лежит снижение чувствительности тироцитов к ТТГ. Тем самым, необходимы лекарственные препараты, повышающие ответ щитовидной железы на эндогенный ТТГ. Наиболее перспективным их классом являются позитивные аллостерические модуляторы (ПАМ) рецептора ТТГ, которые способны потенцировать эффекты ТТГ на синтез ТГ тироцитами.

Целью работы было изучение эффектов новых тиено[2,3-d]-пиримидиновых производных ТРУох и ТРУmorph с активностью ПАМ рецептора ТТГ на базальные и стимулированные ТРГ уровни ТГ в крови и на экспрессию генов, вовлеченных в синтез ТГ, в щитовидной железе крыс.

Показано, что введение ТРУох и ТРУmorph в дозе 20 мг/кг слабо влияло на уровни ТГ и экспрессию генов синтеза ТГ, за исключением повышения уровня общего трийодтиронина (tT3) и экспрессии гена дейодиназы 2-го типа (Dio2) при использовании ТРУmorph. При обработке ТРУох и ТРУmorph стимулирующие эффекты ТРГ на уровни ТГ и экспрессию тироидальных генов сохранялись и в ряде случаев усиливались, но динамика и выраженность их потенцирующего эффекта были различными. ТРУох усиливал стимулирующие эффекты ТРГ на уровни общего тироксина (tT4) и трийодтиронина (fT3, tT3) через 1.5 ч после обработки ТРГ, в то время как ТРУmorph усиливал эффекты ТРГ на уровни fT3 и tT3 через 3 ч, когда потенцирующее влияние ТРУох исчезало. В щитовидной железе ТРУох усиливал ТРГ-стимулированную экспрессию гена Tro, в то время как ТРУmorph повышал ТРГ-индуцированную экспрессию генов Dio2 и Nis.

На основании этого сделан вывод о том, что наиболее перспективным из разработанных нами препаратом для повышения чувствительности рецептора ТТГ является соединение ТРУmorph, 5-амино-N-(трет-бутил)-4-{4-[3-(2-гидрокси-3-морфолинопропокси)про-1-ин-1-ил]фенил}-2-(метилтио)тиено[2,3-d]пиримидин-6-карбоксамид, которое может рассматриваться как первый активный ПАМ рецептора ТТГ.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 19-75-20122).

АГЛИКОНЫ ФЛАВОНОИДОВ ОБЛАДАЮТ АНТИАПОПТОТИЧЕСКИМ ЭФФЕКТОМ НА ТРОМБОЦИТЫ

Найда Л.В.^{1,2}, Балыкина А.М.², Гамбарян С.П.²

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

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

nayda.lidiya@mail.ru

Тромбоциты выполняют важную роль в системе гемостаза благодаря своей способности к активации и агрегации. Они обеспечивают целостность сосудистой стенки, препятствуя кровотечениям, участвуют в коагуляционном каскаде, а также взаимодействуют с другими клетками, находящимися в циркуляции в кровотоке. Известно, что опухолевые клетки также способны взаимодействовать с тромбоцитами, вызывать их активацию и прокоагулянтную трансформацию. Данные фенотипы тромбоцитов способствуют прогрессии опухоли, ангиогенезу и метастазированию. Разработаны химиотерапевтические препараты-индукторы апоптоза, в том числе соединение АВТ-737. Они с высокой аффинностью связываются с антиапоптотическими белками семейства Bcl-2 и ингибируют их действие, вызывая апоптоз злокачественных клеток. Серьезным побочным эффектом применения препаратов данной группы является тромбоцитопения. В связи с этим, актуальным остается поиск способов сохранить жизнеспособность тромбоцитов в условиях применения препаратов-индукторов апоптоза, ингибировать их активацию и прокоагулянтную трансформацию. Широким спектром фармакологических эффектов обладают флавоноиды – полифенольные соединения растительного происхождения. В литературе описана способность флавоноидов индуцировать апоптоз злокачественных клеток, а также ингибировать активацию тромбоцитов. Остается неизвестным влияние флавоноидов на апоптоз тромбоцитов.

Целью нашей работы стало исследование влияния агликонов флавоноидов: лютеолина, мирицетина, кверцетина, эриодиктиола, кемпферола и апигенина на апоптоз тромбоцитов.

Тромбоциты были выделены из крови здоровых доноров и инкубировались с тестируемыми агликонами флавоноидов в течение 20 минут при температуре 37°C. Проточная цитометрия использовалась для исследования экстернализации фосфатидилсерина (ФС), изменения трансмембранного митохондриального потенциала и секреции Р-селектина. Вестерн блот анализ использовался для определения степени расщепления каспаз.

В процессе апоптоза фосфолипид ФС мигрирует на внешнюю поверхность мембраны тромбоцитов. Было установлено, что все исследуемые агликоны флавоноидов значительно снижают экстернализацию ФС, вызванную АВТ-737. Тромбоциты содержат полностью функциональный внутренний (митохондриальный) путь апоптоза. Падение трансмембранного потенциала митохондрий является ключевым признаком запуска апоптоза по внутреннему пути. Мы установили, что тестируемые соединения не влияли на АВТ-737-

индуцированное изменение мембранного потенциала митохондрий тромбоцитов. Активные каспазы – цистеиновые протеиназы – способны расщеплять свои субстраты, что приводит к характерным для апоптоза изменениям в клетке. Лютеолин и кверцетин ингибировали расщепление каспаз 3, 6 и 9, вызванное АВТ-737.

Прокоагулянтные тромбоциты характеризуются экстернализацией ФС и высвобождением содержимого тромбоцитарных альфа-гранул. Все исследуемые агликоны флавоноидов ингибировали экстернализацию ФС на мембране прокоагулянтных тромбоцитов, а также снижали секрецию Р-селектина из альфа-гранул.

Данные результаты могут лечь в основу разработки более безопасной комбинированной противоопухолевой терапии.

Работа поддержана грантом РФФИ № 23-15-00142.

НЕЙРОПРОТЕКТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ МЕТФОРМИНА (НА МОДЕЛИ СКОПОЛАМИН-ИНДУЦИРОВАННЫХ КОГНИТИВНЫХ НАРУШЕНИЙ У КРЫС)

Обухова Д.А.^{1,2}

¹Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

²Институт мозга человека им. Н.П. Бехтеревой РАН, Санкт-Петербург, Россия

obuhowadaria@gmail.com

Метформин широко используется в клинической практике для лечения сахарного диабета второго типа. В последние годы этот препарат привлекает внимание исследователей, благодаря своим потенциальным нейропротективным свойствам. Показано, что метформин способен модулировать энергетический метаболизм, уменьшать окислительный стресс и воспаление, что делает его перспективным кандидатом для терапии когнитивных нарушений. Одной из распространенных моделей для изучения когнитивной дисфункции является использование антагонистов ацетилхолиновых рецепторов, таких как скополамин. Скополамин индуцирует когнитивные нарушения, схожие с наблюдаемыми при нейродегенеративных заболеваниях, включая ухудшение памяти и снижение исследовательской активности. В связи с этим, изучение влияния метформина на когнитивные функции и нейрохимические параметры в условиях скополамин-индуцированных нарушений представляет значительный интерес.

Четырехмесячные самцы крыс линии *Wistar* (260–350 г) были разделены на 4 группы по 9 животных: группы 1 и 2 – контрольные, получали физиологический раствор (1 мл/кг/день); группы 3 и 4 – метформин (100 мг/кг/день). С 15-го дня группы 2 и 4 дополнительно получали скополамин (1 мкг/кг). Через месяц после начала введения метформина были проведены поведенческие тесты (водный лабиринт Морриса, Y-образный и приподнятый крестообразный лабиринты). После тестирования животные были декапитированы, у них был извлечен стриатум и гиппокампа, в данных структурах методом ВЭЖХ определено содержание основных моноаминов, а методом ПЦР - уровень мРНК MAO-A, MAO-B и COMT. Статистическая обработка данных проведена в GraphPad Prism 8.0.1 с использованием двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA и post hoc критерия Тьюки. Данные представлены как среднее \pm SEM, статистическая значимость – при $p < 0,05$.

Оказалось, что введение метформина улучшает пространственную память крыс, не влияя на процесс обучения, рабочую память и уровень тревожности. На фоне скополамин-индуцированных когнитивных нарушений метформин снижает выраженность дефицита пространственной памяти и повышает двигательную и исследовательскую активность. Скополамин вызывает снижение уровня дофамина и серотонина в стриатуме в 3,0 и 1,9 раза соответственно. Введение метформина приводит к увеличению уровня дофамина и его метаболитов в стриатуме и в среднем в 1,5 раза. В гиппокампе метформин не восстанавливает уровень гомованилиновой кислоты, и вызывает снижение уровня дофамина, диоксифенилуксусной кислоты и гомованилиновой кислоты в 1,5, 2,0 и 2,9 раза соответственно. Метформин не влияет на уровень мРНК COMT, но повышает уровень мРНК

МАО-В в стриатуме в 2,3 раза и мРНК МАО-А в гиппокампе в 3 раза. Таким образом, метформин обладает нейропротективным потенциалом, улучшая когнитивные функции и модулируя нейрохимические параметры в условиях скополамин-индуцированных нарушений.

Эта работа выполнена в рамках государственного задания ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» № FGWG-2024-0015.

АНТИТЕЛА К БЫЧЬЕМУ СЫВОРОТОЧНОМУ АЛЬБУМИНУ У ПАЦИЕНТОВ С ЦЕЛИАКИЕЙ

Павлова Е.В., Савватеева Е.Н.

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

pavlova.elizaveta@phystech.edu

Целиакия – аутоиммунное заболевание, возникающее в ответ на употребление глютена у генетически предрасположенных людей и характеризующееся энтеропатией и наличием специфических антител (АТ) к дезаминированным пептидам глиадина и тканевой трансаминазы 2. Пожизненное соблюдение безглютеновой диеты (БГД) в настоящее время является общепринятым методом лечения целиакии. Тем не менее, у некоторых пациентов соблюдение БГД не приводит к улучшению состояния. Атрофия ворсинок и повреждение слизистой оболочки тонкой кишки могут приводить к изменению характера переваривания и всасывания белков из пищи, что может вызвать выработку АТ к пищевым белкам. Целью данной работы является выявление уровня иммуноглобулинов класса А (IgA) к бычьему сывороточному альбумину (БСА) в сыворотке крови взрослых пациентов с целиакией, соблюдающих БГД.

Повышение уровня сывороточных IgA-БСА было выявлено методами мультиплексного и иммуноферментного анализа у 22% взрослых пациентов с целиакией (n=27). В контрольных группах уровни IgA к БСА, превышающие норму на три стандартных отклонения от среднего значения сигналов здоровых лиц, были обнаружены у четырех пациентов из 123. Контрольные группы составили пациенты с аутоиммунным гастритом (n=30), пациенты с аутоиммунными эндокринными заболеваниями (n=39), пациенты со злокачественными новообразованиями желудочно-кишечного тракта (n=21) и здоровые доноры (n=33). IgA к БСА не были обнаружены ни у здоровых лиц, ни в группе пациентов со злокачественными новообразованиями желудочно-кишечного тракта. В группе аутоиммунных эндокринных заболеваний повышенный уровень IgA к БСА был выявлен у трех пациентов, а в группе аутоиммунного гастрита – у одного пациента. С использованием оригинального белкового гидрогелевого биочипа проведена оценка кросс-реактивности IgA-БСА к другим альбуминам, а также к аутоантигенам, цитокинам и белкам воспаления. Показано, что повышенный уровень IgA-БСА может влиять на результаты иммуноанализа с использованием БСА в качестве стабилизатора, что требует применения буферов без животных биоматериалов для анализа сывороток пациентов с целиакией во избежание ложноположительных результатов.

Выявлена подгруппа пациентов с целиакией с повышенными уровнями IgA к БСА. Возможно, что эти антитела являются маркерами стойкого воспаления слизистой оболочки кишечника у части пациентов с целиакией, даже при соблюдении безглютеновой диеты, или могут быть причиной сохраняющихся неблагоприятных симптомов.

Работа выполнена при поддержке гранта Фонда научно-технологического развития Ханты-Мансийского автономного округа – Югры № 2023-571-05/2023.

ВЛИЯНИЕ СЕЗОНА НА БИОХИМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ СЫВОРОТКИ КРОВИ АГРЕССИВНЫХ И РУЧНЫХ АМЕРИКАНСКИХ НОРОК (*NEOGALE VISON*)

Панова Э.В.¹, Калинина С.Н.¹, Илюха В.А.², Трапезов О.В.³

¹Институт биологии Карельского научного центра РАН, Петрозаводск, Россия

²Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, пос. Борок,
Ярославская обл., Россия

³Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия

panova550@gmail.com

В процессе domestikации животные адаптируются к антропогенной среде благодаря закрепляющимся генетическим изменениям. Под действие отбора прежде всего попадают те физиологические функции и/или особенности поведения животных, которые необходимы человеку. На сегодняшний день существуют лишь фрагментарные сведения о том, какие перестройки в работе регуляторных систем и физиологических функций происходят в ходе многолетнего отбора по поведению. В связи с этим актуальными являются исследования изменчивости показателей физиологических функций у животных, подвергнутых многолетнему отбору по поведению. Удобными объектами в подобных исследованиях могут служить линии агрессивных и ручных американских норок *Neogale vison*, созданные в ходе отбора по оборонительной реакции на человека в Институте цитологии и генетики (ИЦиГ) СО РАН (г. Новосибирск). Ранее было показано, что селекция норок по оборонительной реакции на человека сопровождается изменениями окраски, роста и развития, уровня нейромедиаторов, стресс-реактивности, репродуктивной функции, активности пищеварительных ферментов и др. В ходе селекции, при элиминации в той или иной степени действия природных, социальных и физических средовых факторов у животных может наблюдаться снижение интенсивности обмена веществ. Методом лабораторной диагностики, который позволяет оценить работу внутренних органов и получить информацию об обмене липидов, белков, углеводов, является биохимический анализ крови. Изменчивость биохимических показателей крови животных, подвергнутых отбору по поведению, в зависимости от разных факторов среды, в том числе сезона года не до конца изучена. Цель работы состояла в изучении биохимических параметров сыворотки крови американских норок, задействованных в отборе на ручное и агрессивное поведение, в летний и осенний период.

В эксперименте были задействованы самцы американской норки ($n = 50$; возраст – 1–2 года) клеточного разведения (звероферма ИЦиГ СО РАН). Сбор образцов сыворотки крови осуществлялся у ручных и агрессивных животных летом (июнь) (по $n = 15$) и осенью (октябрь) (по $n = 10$). Оценивали влияние факторов «сезон» и «тип поведения» на исследуемые показатели (критерий Краскелла-Уоллиса), статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

Уровни изученных показателей (аспартатаминотрансфераза (АСТ), билирубин, холестерол) сыворотки крови американских норок были выше в осенний период по сравнению

с летним, что согласуется с данными других исследований на этом виде животных. Тип поведения также влиял на некоторые биохимические показатели. Так, у агрессивных норок отмечено более высокое содержание глюкозы, креатинина, лактатдегидрогеназы и холестерина по сравнению с ручными животными. Совместное статистически значимое влияние факторов было установлено для содержания холестерина, активностей АСТ и липазы. Таким образом, в ходе длительной селекции американских норок по поведению показатели обмена веществ существенно меняются, однако сохраняются некоторые сезонные колебания отдельных биохимических параметров крови, что отражает эволюционно сложившуюся адаптивную особенность норок к переживанию неблагоприятных условий среды. Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (FMEN-2022-0003) и ИЦиГ СО РАН (FWNR-2022-0023).

СРАВНЕНИЕ МОДЕЛЕЙ МАТЕРИНСКОЙ ГИПОКСИИ И ИШЕМИИ ПЛАЦЕНТЫ
IN VIVO: HIF1-ЗАВИСИМЫЙ МЕТАБОЛИЗМ И ГЛЮКОКОРТИКОИДНАЯ
ИННЕРВАЦИЯ РАЗВИВАЮЩЕГОСЯ МОЗГА

Потапова С.С., Сафарова Д.Н., Губа Е.А., Ветровой О.В.

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

sofiya-potapova@mail.ru

Факторы внешней среды оказывают существенное влияние на развивающийся организм. Нормальное протекание беременности подразумевает высокую эффективность поступления энергетических субстратов, а также ограничение поступления стероидных гормонов до поздних сроков беременности, когда глюкокортикоиды вовлекаются в процессы терминальной дифференцировки нейронов и созревания легких. Ограничение кислородного снабжения эмбриона вызывает существенные нарушения метаболизма, ведя к замедлению развития, в то время как избыточное поступление глюкокортикоидов способно нарушать формирование адекватного профиля тканеспецифичной экспрессии, сохраняющегося на всю жизнь на эпигенетическом уровне.

Данная работа была посвящена сравнению эффектов гипоксии плода в сочетании со стрессом матери и без него на HIF1-зависимый метаболизм и глюкокортикоидную иннервацию развивающегося мозга. Для разделения эффектов гипоксии и глюкокортикоидного стресса матери нами было использовано две экспериментальные модели – гипобарическая пренатальная гипоксия (ПГ), сопровождающаяся глюкокортикоидным ответом матери и мономодель гипоксии – ишемия плаценты (ИП), заключающаяся в четырехсторонней окклюзии плацентарных артерий.

Работу проводили на эмбрионах, новорожденных и взрослых крысах, переживших ПГ или ИП. С помощью методов вестерн-блот, ПЦР в реальном времени, ИФА и энзиматических методов мы оценили влияние ПГ и ИП на экспрессию HIF1 α , HIF1-зависимый метаболизм, метаболизм ацетилхолина и экспрессию ацетилхолиновых рецепторов в мозге, а также активность глюкокортикоидной системы.

Мы показали, что ПГ и ИП вызывают увеличение транскрипционной активности HIF1 α в эмбриональном мозге крыс, что сопровождается усилением анаэробного гликолиза и HIF1-зависимым подавлением пентозофосфатного пути. ПГ (но не ИП) вызывает усиление глюкокортикоид-зависимой транскрипции в развивающемся мозге и провоцирует устойчивое на протяжении дальнейшей жизни снижение чувствительности мозга ПГ животных к глюкокортикоидам. Ни ПГ, ни ИП не вызывают нарушений метаболизма ацетилхолина в развивающемся мозге. Однако, мы обнаружили существенные глюкокортикоид-зависимые нарушения экспрессии $\alpha 7$ -nAChR в структурах лимбической системы мозга взрослых ПГ (но не ИП) крыс, сопровождающиеся нарушением пластичности системы в ответ на воздействие никотина.

Таким образом, результаты данного исследования проясняют индивидуальный вклад гипоксического и глюкокортикоидного стрессов в развитие мозга плода. Сочетание моделей ПГ и ИП в экспериментальной практике может дать ценную информацию для будущих исследований механизмов неврологических и соматических патологий развития мозга.

Работа поддержана средствами федерального бюджета в рамках государственного задания ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН (№ 10230324002368-3.1.4) (эксперименты на плаценте) и грантом РНФ № 22-75-0003 (эксперименты на развивающемся мозге).

СОЕДИНЕНИЯ ГИДНЕЛЛУМА ОРАНЖЕВОГО (*HYDNELLUM AURANTIACUM*) ИНГИБИРУЮТ АКТИВАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ

Пронин Н.А., Гамбарян С.П.

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

nikitapronin.platelets@gmail.com

Введение. Сердечно-сосудистые заболевания вносят значительный вклад в мировую смертность. Важной частью их патогенеза являются нарушения гемостаза, приводящие к возникновению опасных тромботических осложнений – инфаркту миокарда, ишемическому инсульту и др. Для их профилактики широко применяют антиагрегантные средства, однако их использование ограничено побочными эффектами (например, кровотечениями) и реакциями гиперчувствительности. При поиске новых веществ с антитромбоцитарной активностью большую роль играет исследование вторичных метаболитов природных источников – к примеру, растений и грибов. Гиднеллум оранжевый (*Hydnellum aurantiacum*) – распространенный на территории России гриб, содержащий п-терфенилы – группу соединений с различными видами биологической активности, в том числе с антиоксидантными и противовоспалительными свойствами. Однако влияние данных веществ на тромбоциты исследовано недостаточно.

Цель. Исследование влияния природных п-терфенилов на тромбоциты.

Материалы и методы. На кафедре фармакогнозии Санкт-Петербургского химико-фармацевтического университета из *H. aurantiacum* были выделены и предоставлены для исследования следующие соединения: 1 (leucoatromentin), 2 (5-O-ethylatromentin), 3 (2'-O-benzoylatromentin), 4 (2-O-benzoyl-5-O-ethylleucoatromentin). Тромбоциты человека получали из венозной крови здоровых доноров. Уровень активации α IIb β 3-интегринов определяли методом проточной цитометрии с использованием фибриногена, меченого флуоресцентным красителем Alexa-Fluor 647. Степень фосфорилирования белка VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein) оценивали методом Western Blot анализа.

Результаты. Исследуемые вещества дозозависимо (10, 30, 60, 90 μ M) ингибируют активацию тромбоцитов, индуцированную тромбином. Бензоилированные п-терфенилы (соединения 3 и 4) в концентрации 90 μ M снижают уровень связывания фибриногена относительно контроля до $10,5 \pm 4,5\%$ и $9,7 \pm 3,2\%$ соответственно, что значительно превышает активность соединений 1 и 2 ($44,2 \pm 6,5\%$ и $27,4 \pm 7,6\%$). Известно, что некоторые природные соединения реализуют свой антитромбоцитарный эффект, воздействуя на систему циклических нуклеотидов (сАМР и сGMP). Повышение их уровня в клетке активирует протеинкиназы А и G (РКА и РКГ), которые фосфорилируют множество субстратных белков, что препятствует активации тромбоцитов. Анализ фосфорилирования белка VASP показал отсутствие значимого эффекта у соединений 1, 2 и 4, в то время как вещество с наиболее выраженной антитромбоцитарной активностью (3) дозозависимо фосфорилировало VASP. Интенсивность процесса со временем (1, 5, 15, 30 мин) возрастала.

Выводы. Исследуемые п-терфенилы обладают антитромбоцитарной активностью. Механизм действия соединения 3 связан с системой циклических нуклеотидов – его сильный эффект согласуется с фосфорилированием белка VASP. Влияние вещества на эту сигнальную систему может объясняться, например, активацией аденилат- и гуанилатциклазы (АС и GC) или соответствующих протеинкиназ А и G, ингибированием активности различных фосфодиэстераз, агонизмом к аденозиновым A_{2A} рецепторам. Механизмы действия как вещества 3, так и остальных соединений также предположительно могут включать снижение уровня активных форм кислорода и ингибирование тромбоксан-A₂-синтазы. Дальнейшие исследования влияния природных п-терфенилов на указанные мишени позволят более точно установить механизмы их антитромбоцитарной активности.

Работа поддержана грантом РФФ № 23-15-00142.

ЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПЛАСТОХИНОНА НА ЭРИТРОЦИТЫ ПРИ ТЕРМИЧЕСКИХ ОЖОГАХ КОЖНЫХ ПОКРОВОВ II СТЕПЕНИ

**Пыхова Е.С.^{1,2}, Пашкевич Н.И.³, Ашихмин А.А.¹, Ветошкина Д.В.¹,
Осочук С.С.³, Борисова-Мубаракшина М.М.¹**

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

²Пушкинский филиал федерального государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего образования «Российский биотехнологический университет
(РОСБИОТЕХ)», Пушкино, Россия

³Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,
Витебск, Республика Беларусь

katkapw@yandex.ru

Ожоговая травма вызывает не только повреждение кожных покровов, но и системные изменения, включая выраженный окислительный стресс, обусловленный гиперпродукцией активных форм кислорода (АФК) и азота (АФА). АФК индуцируют перекисное окисление липидов мембран, структурные изменения белков и нарушение микроциркуляции. Эритроциты, обладая высокой чувствительностью к окислительному стрессу, при ожоговой болезни подвергаются повреждению, что сопровождается изменением их формы, агрегацией и гемолизом крови, способствуя развитию гипоксии. Важным терапевтическим направлением является применение антиоксидантов, способных снижать окислительное повреждение. Одним из перспективных соединений является пластохинон – мобильный липофильный переносчик электронов в хлоропластах, – обладающий выраженной антиоксидантной активностью.

Цель исследования – оценка провоспалительной активности пластохинона *in vitro*, а также его защитного влияния на состояние эритроцитов при термическом ожоге кожи II степени *in vivo*.

Исследование провоспалительной активности пластохинона, выделенного и очищенного из листьев высших растений, проведено на крови здоровых доноров. Венозную кровь (с добавлением гепарина) разводили 1:10 в RPMI-1640, инкубировали (37°C, 5% CO₂, 6 ч) с провоспалительным индуктором липополисахаридом (ЛПС) (100 нг/мл, выделенного из *E. coli* O55:B5), пластохиноном (1 или 10 мкМ), этанолом (95%) или без добавок (контроль). После центрифугирования (1500 g, 15 мин) плазму разводили (α -ФНО – 1:5, ИЛ-6 – 1:35) и анализировали методом ИФА. Установлено, что пластохинон в исследуемых концентрациях не индуцировал продукцию α -ФНО и ИЛ-6 клетками крови, тогда как ЛПС вызывал значительное повышение уровня данных цитокинов. Полученные данные свидетельствуют о том, что пластохинон не вызывает воспалительной реакции организма.

Эксперименты с моделированием ожоговой травмы проведены на 140 крысах-самцах (180–250 г). Ожог (30% поверхности тела) наносили под кетаминным наркозом, прикладывая к бритой коже металлическую пластину (150°C, 4 мин). Животных разделили на группы с

анализом через 3 и 24 часа. Пластохинон и убихинон вводили накожно (50 мкМ) или внутривенно (5 мкМ). После декапитации исследовали кровь: подсчитывали количество эритроцитов и их измененные формы (камера Горяева, Leica DM 2000), а также определяли индекс агрегации эритроцитов. Термический ожог способствовал увеличению числа морфологически измененных эритроцитов. Нанесение липосом с пластохиноном способствовало снижению данного показателя практически до контрольных значений, устраняя стресс-индуцированные нарушения. Введение пластохинона и убихинона (накожно и внутривенно) снижало индекс агрегации эритроцитов в 2 раза, а внутривенное введение пластохинона полностью предотвращало их агрегацию.

Таким образом, нами разработан метод защиты эритроцитов от деформации и гемолиза при ожоговой травме с использованием пластохинона.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕСТА ВЕРМИШЕЛЬ ДЛЯ ОЦЕНКИ ДЕЙСТВИЯ НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫХ ПЕПТИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ, НАПРАВЛЕННЫХ НА КОРРЕКЦИЮ ОТДАЛЕННЫХ НЕВРОЛОГИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ

Раджабова Г.С., Рябоштан П.Ф., Тарасов А.С.

Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия

radzhabovags@mail.ru

Неонатальная гипоксия (НГ) приводит к возникновению нарушений разной этиологии в работе центральной нервной системы. Традиционные методы лечения как непосредственно НГ, такие как гипотермическая терапия, поддерживающая реанимация и антиоксидантная терапия, так и методы лечения отсроченных последствий НГ в целом хоть эффективны, но все же имеют ряд ограничений, связанных с техническими требованиями и стоимостью. В связи с этим особое внимание уделяется изучению альтернативных подходов к лечению последствий НГ. Одним из перспективных направлений является использование нейропротекторных пептидных препаратов, способных модулировать ключевые процессы на молекулярном уровне и восстанавливать нарушенные функции нейронов. Актуальность проблемы доступности современных методов лечения последствий НГ, подчеркивает необходимость разработки достаточно безопасных нейропротекторных средств, которые можно применить у детей различного возраста. Исходя из этого, пептидные препараты, будучи относительно недорогими (при массовом производстве) и простыми в применении, могут стать перспективным решением для коррекции последствий оксидативного стресса или нейродиструктивных процессов.

Для осуществления оценки способности пептидных препаратов необходимо разработать надежные методы диагностики и анализа их влияния на восстановление двигательных функций организма на этапе доклинических исследований. Одним из методов оценки результативности лечения пептидными препаратами может являться тест по поеданию вермишели крысами. Предполагалось, что группа грызунов со смоделированной экспериментальной патологией, которым вводились пептидные препараты, должны демонстрировать улучшение координации движений передних лап в сравнении с контрольной группой, получавшей плацебо, особенно при наблюдении таких паттернов, как удержание и хватание мелких объектов, например вермишели. Данный тест используется в доклинических исследованиях как маркер поражения областей мозга животных, отвечающих за мелкую моторику. Это позволяет предположить, что тест на поедание вермишели может служить моделью для оценки эффективности пептидных препаратов, в том числе для лечения последствий НГ, поскольку движения передних лап крыс демонстрируют функциональную схожесть с движением рук человека. Это указывает на высокую перспективность данной модели для оценки двигательной активности и мелкой моторики при изучении физиологии и патологии функций верхних конечностей.

В ходе обработки данных исследования метод показал двигательные нарушения у отдельных животных, но в сравнении с другими методами диагностики

психоневрологических нарушений (такие как ротарод и анализ пространственной навигации в лабиринте Морриса), его диагностическая чувствительность оказалась недостаточной для поиска достоверных отличий между патологическим состоянием без лечения и группами животных, получавших лекарственный препарат. Полученная информация указывает на ограниченную эффективность использованного нами метода в данном контексте и необходимость применения дополнительных методов для более точной диагностики и анализа результатов эксперимента.

НАПРАВЛЕННАЯ ЭВОЛЮЦИЯ СТРУКТУРЫ ПЕПТИДНОГО ЛИГАНДА В СОСТАВЕ
КОМПЛЕКСА ГКГ/ТКР МОЖЕТ БЫТЬ ИСПОЛЬЗОВАНА ДЛЯ КОРРЕКТИРОВКИ
ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ЛИГАНДА В СОСТАВЕ
АУТОИММУННОГО КОМПЛЕКСА

Радченков Н.С.¹, Данилкович А.В.^{1,2}

¹Университет Росбиотех (Филиал в Пушино), Пушино, Россия

²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчиникова РАН,
Пушино, Россия

radchenkov2004@gmail.com

Тройной иммунный комплекс МНС/p/TCR в целом отвечает за инициацию иммунных стимулов, которые приводят к воспалительным аутоиммунным процессам у высших позвоночных, если лиганд напоминает компоненты миелина. Некоторые микробные пептиды могут иметь трехмерную конформацию, напоминающую миелиновые белки, поэтому они могут активировать генетически обусловленную аутореактивность. В результате - Т-клетки направляют аутоиммунный ответ на миелин. Это свидетельствует о так называемой перекрестной реактивности иммунной системы.

Мы использовали данные о трёхмерных координатах атомов в составе комплекса 4gr1 (*SwissProt ID*), содержащего Т-клеточный рецептор, характеризуемого генотипом *Hy.1B11* (ТКР), полученного от человека, больного рассеянным склерозом. Данный иммунный комплекс способен распознавать как аутоантиген человека – участок основного белка миелина (ОБМ), так и мимический пептид, происходящий из микробных патогенных клеток. Минимальная эффективная длина пептидного лиганда составляет 8 аминокислотных остатков, которые экспонированы на димерном рецепторе белков главного комплекса гистосовместимости (ГКГ) HLAII с генотипом (*DQ*). Ранее мы показали, что определённый октамерный пептидный лиганд может применяться в качестве эффективного средства лечения *EAE* у крыс линии DA (утвержденная животная модель РС). Для исследования термодинамики взаимодействия пептидного октамера с комплексом ГКГ/ТКР (4gr1) мы использовали процедуру молекулярного докинга для создания иммунных комплексов, содержащих пептидные лиганды, в том числе – в смещённых положениях. Мы рассчитали энергии взаимодействия лигандов в разных вариантах комплекса и обнаружили, что для некоторых моделей пептидных лигандов их энергия взаимодействия превосходит исходные величины. Мы изучили структуры пептида, содержащего в качестве точечной замены остаток *Ala* в разных положениях, и сравнили рассчитанные энергии взаимодействия лиганда. Дополнительно, мы показали, что аминокислотные остатки *Leu*, расположенные на флангах пептидного октамера, не мешают связыванию лиганда. Таким образом, полученные данные могут быть использованы для поиска новых лекарств и лечения аутоиммунных заболеваний, в том числе – рассеянного склероза.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ НОВОЙ
ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ СХЕМЫ КОРРЕКЦИИ ОСТРОГО ЛУЧЕВОГО СИНДРОМА В
ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА МЫШАХ

Родионова Е.Д.¹, Ромодин Л.А.², Московский А.А.^{2,4}, Никитенко О.В.^{2,3}, Бычкова Т.М.^{2,3}

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

²Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России,
Москва, Россия

³Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

⁴Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва, Россия

lizabeth13132@gmail.com

Введение. Научные исследования по поиску фармакологической защиты от действия ионизирующего излучения показали неэффективность применения только одного вещества: малотоксичные соединения защищают слабо, а признанные эффективные радиопротекторы имеют высокую токсичность. Из этого следует необходимость разработки схем коррекции острого лучевого синдрома, подразумевающих применение нескольких веществ с различным механизмом радиозащитного действия.

Цель настоящей работы – оценка эффективности схем коррекции острого лучевого синдрома в опыте на мышах.

Методы и материалы. Первая схема подразумевала введение фенилэфрина в дозировке 5 мкг/г за 15 минут до острого воздействия рентгеновского излучения в дозе 6,5 Гр, глутатиона в дозировке 200 мкг/г через 30 минут после облучения, α -токоферола в дозировке 400 мкг/г через сутки после облучения и гранулоцитарного колониестимулирующего фактора в форме пэгфилграстима в дозировке 0,5 мкг/г через 1–4 и 8–11 суток после облучения ежедневно. Вторая схема соответствует первой с дополнительным введением медного хлорофиллина в дозировке 20 мкг/г через 2 и 3 дня после облучения.

Эксперименты были выполнены на аутбредных самцах мышей линии ICR (CD-1) SPF-категории. Облучение проводилось на рентгеновской биологической установке РУБ РУСТ-М1 (Россия) с мощностью дозы 0,85 Гр/мин в дозе 6,5 Гр. Эффективность изучаемых терапевтических схем оценивалась на основании 30-суточной выживаемости и гематологических показателей и массы некоторых органов мышей через 4 и 7 суток после облучения.

Результаты исследования. Комбинированное применение фенилэфрина с антиоксидантами глутатионом и токоферолом и пэгфилграстимом способствовало полной выживаемости облучённых в дозе 6,5 Гр (ЛД₇₅ для облучённого контроля) группы, однако дополнение данной схемы медным хлорофиллином существенно снижало выживаемость. Нами было предположено, что такой результат может быть связан с токсическим взаимодействием медного хлорофиллина с другими препаратами схемы, например, пэгфилграстимом. Использование обеих схем обеспечило статистически значимую

коррекцию вызванного облучением снижения массы тимуса и селезёнки, что позволяет констатировать некоторую коррекцию иммунобиологического синдрома лучевой болезни за счёт применения изучаемых терапевтических схем.

Заключение. Таким образом, нами была разработана новая эффективная схема коррекции острого лучевого синдрома, не предусматривающая использования табельных радиопротекторов. Также была показана несовместимость медного хлорофиллина, при изолированном применении проявляющего радиозащитные свойства, с некоторыми веществами.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-00383 (<https://rscf.ru/project/23-24-00383/>).

ВЛИЯНИЕ УМЕРЕННОЙ ГИПОБАРИЧЕСКОЙ НЕОНАТАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ НА ОСОБЕННОСТИ ПОВЕДЕНИЯ И АКТИВНОСТЬ ГЛЮКОКОРТИКОИДНОЙ НЕЙРОЭНДОКРИННОЙ СИСТЕМЫ ВЗРОСЛЫХ КРЫС

Сафарова Д.Н.¹, Потапова С.С.², Ветровой О.В.²

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»,
Санкт-Петербург, Россия

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт Физиологии им. И.П. Павлова» Российской Академии Наук, Санкт-Петербург, Россия

disavarova@mail.ru

Неонатальный период является критически важным этапом развития высших структур мозга. Стрессорные воздействия в неонатальном периоде могут влиять на эпигенетическую программу созревающих в этот период клеток мозга, что будет проявляться в изменённой реакции на стрессоры в дальнейшей жизни. Умеренные формы гипоксии в режимах пре-и посткондиционирования хорошо известны как стрессорные воздействия, оказывающее стимулирующее влияние на молекулярные механизмы обеспечения адаптивных реакций мозга на последующие повреждающие воздействия или нейропротекции в контексте ранее пережитой патологии гипоксической или стрессорной природы. Нами было сделано предположение, согласно которому трехкратные сеансы умеренной гипобарической гипоксии в неонатальном периоде, могут способствовать устойчивому перепрограммированию функционирования мозга в сторону повышенной эффективности решения когнитивных задач и сниженной общей тревожности.

Целью данного исследования стала оценка влияния умеренной гипобарической неонатальной гипоксии (НГ) на поведенческие характеристики и особенности активности глюкокортикоидной нейроэндокринной системы крыс во взрослом возрасте.

Работы проведены на крысах линии Вистар. НГ представляла собой 3 сеанса пребывания при 360 мм. рт. ст. (эквивалент 10% O₂) в гипобарической камере проточного типа по 2 часа с интервалом 24 ч между сеансами в постнатальные дни р8-р10. Дальнейшая работа осуществлялась на взрослых 3-месячных контрольных и НГ самцах крыс.

В докладе будут представлены результаты исследования влияния НГ на исследовательскую активность (тест «открытое поле»), тревожность (тест «приподнятый крестообразный лабиринт»), депрессивность (тест Порсолта), скорость и амплитуду акустического стартл-рефлекса, пространственную память и эффективность обучения (водный лабиринт Морриса). Кроме того, будут показаны результаты исследования концентрации адренокортикотропного гормона и кортикостерона в плазме крови, проникновения кортикостерона в структуры мозга, экспрессии глюкокортикоидных рецепторов в экстрагипоталамических структурах мозга, а также эффективности регуляции глюкокортикоидной отрицательной обратной связи по содержанию кортиколиберина в гипоталамусе и проопиомеланокортина в гипофизе.

Работа поддержана средствами федерального бюджета в рамках государственного задания ФГБУН Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (№ 10230324002368-3.1.4).

ВЛИЯНИЕ ГИПЕРГЛИКЕМИИ НА КОЛЕБАНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ $[Ca^{2+}]_i$ И $[NO]_i$
В ЭНДОТЕЛИОЦИТАХ КОЖИ МЫШИ В ПРИСУТСТВИИ
ИНГИБИТОРОВ РКС И P13K ПРИ НАГРЕВЕ

Сидорова М.С.^{1,2}, Дюкина А.Р.², Мякишева С.Н.², Гриневич А.А.², Серов Д.А.³

¹Пушчинский филиал «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)»,
Пушино, Россия

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

³Федеральное государственное бюджетное учреждение науки ФИЦ «Институт общей физики
им. А.М. Прохорова РАН», Москва, Россия

marya.yase@yandex.ru

Дисфункция эндотелиоцитов является одной из причин развития осложнений сахарного диабета, связанного с гипергликемией и провосполительными факторами. Потенциальными механизмами развития эндотелиальной дисфункции являются нарушения изменения концентраций внутриклеточного кальция ($[Ca^{2+}]_i$) и продукции оксида азота ($[NO]_i$) в эндотелиоцитах. При этом изменение амплитудно-частотных характеристик (АЧХ) этих колебаний отражает функциональное состояние эндотелиоцитов, которое может меняться при эндотелий-опосредованных осложнениях метаболических нарушений. В настоящем исследовании были изучены механизмы действия гипергликемии на пути регуляции колебаний $[Ca^{2+}]_i$ и $[NO]_i$, с помощью ингибиторов протеинкиназы С (РКС) и фосфоинозитид-3-киназы (P13K), при температурном воздействии, что необходимо для понимания метаболических нарушений сосудодвигательной функции эндотелиоцитов в микрососудах.

Для гипергликемии клетки инкубировали в течение 24 часов в среде для культивирования клеток с концентрацией 5.5 мМ (нормогликемия) и 22 мМ D-глюкозы (гипергликемия). Для оценки $[Ca^{2+}]_i$ и $[NO]_i$ клетки окрашивали 5 мкМ Fura-2 AM и 8 мкМ DAF-FM, соответственно, в течение 1.5 ч в CO₂-инкубаторе в культуральной среде, затем промывали HBSS. За 10 мин и 1 ч до измерения добавляли ингибиторы РКС и P13K: GF109203X (GF) и TG100713 (TG), в концентрациях 1 мкМ и 10 мкМ, соответственно. Запись проводилась в течение 15 мин при температуре 37°C (контроль) и 20 мин при температуре 40°C (нагрев) с использованием программы WinFluorXE. Анализ изображений проводился с помощью ImageJ, а АЧХ колебаний $[Ca^{2+}]_i$ и $[NO]_i$ с помощью вейвлет-преобразования в частотном диапазоне эндотелиального ритма кожной микроциркуляции 0.007-0.03 Гц. Результаты представляли в виде медианных значений и интерквартильных размахов (25%: 75%). Статистическую значимость различий оценивали с помощью критерия Манна-Уитни.

Для колебаний $[Ca^{2+}]_i$ гипергликемия в сравнении с нормогликемией значимо увеличивала амплитуду при нагреве почти на порядок, а для колебаний $[NO]_i$ только при нормотермии приблизительно в 1.5 раза. Ингибирование РКС убирало различия амплитуд колебаний $[Ca^{2+}]_i$ и $[NO]_i$ между гипер- и нормогликемией для обеих температур. В присутствии ингибитора P13K гипергликемия по сравнению с нормогликемией достоверно

снижала амплитуду колебаний $[Ca^{2+}]_i$ для обеих температур, а для колебаний $[NO]_i$ только при нагреве.

Полученные результаты указывают на значимые изменения регуляции колебаний $[Ca^{2+}]_i$ и $[NO]_i$ через РКС- и РІЗК-сигнальные пути при нагреве в эндотелиоцитах, находящихся в гипергликемических условиях. Эти результаты могут быть использованы для поиска новых путей терапии осложнений сахарного диабета и разработки новых подходов к противовоспалительной терапии.

Работа поддержана грантом РФФ № 22-15-00215.

ИССЛЕДОВАНИЕ МОРФОЛОГИИ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР МЕТОДОМ РАСТРОВОЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ В МОДЕЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ

Спиридонов А.И.¹, Платонова В.А.¹, Алексеев Р.З.², Мамаева С.Н.¹

¹Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова, Якутск, Россия

²Якутский научный центр комплексных медицинских проблем, Якутск, Россия

Albertspiridonov123@gmail.com

Гемолиз эритроцитов (разрушение эритроцитарных клеток) является одним из важных факторов, влияющих на состояние крови и ее функциональность. Он может быть вызван различными воздействиями, включая химические, физические и биологические факторы. Одним из таких факторов является низкая температура, которая может привести к нарушению структуры и функции эритроцитов.

Процесс гемолиза эритроцитов при холодовом воздействии вызывает особый интерес, так как его последствия могут быть серьезными и даже угрожать жизни человека. Изучение гемолиза эритроцитов при гипотермии позволяет выявить какие изменения происходят в клетках на значительные изменения в обмене веществ, которые происходят при уменьшении температуры, и как при этом изменяются их функциональные и морфологические свойства. Понимание механизмов этого процесса имеет важное значение для клинической практики и научных исследований.

Целью данной работы является исследование влияния искусственно созданной низкой температуры на морфологию эритроцитов крови человека.

В данной работе были исследованы сухие мазки венозной и капиллярной крови. Забор образцов крови осуществлялся по общепринятым методикам.

Исследование проводилось с использованием растрового электронного микроскопа высокого разрешения JSM-7800F с катодом Шоттки и супергибридной объективной линзой. Растровый электронный микроскоп (РЭМ) предназначен для получения изображения поверхности объекта с высоким (несколько нанометров) пространственным разрешением, а также (при наличии соответствующих детекторов) информации о химическом составе, строении и некоторых других свойствах приповерхностных слоев.

Результаты эксперимента выявили, что при снижении температуры в течении 30 минут в венозной крови выраженных патологических форм эритроцитов не наблюдается. Начиная с 15°C появляются изменения в мембране эритроцитов, а при 5°C – единичные эхиноциты. В капиллярной крови со снижением температуры выявлены мелкие частицы с размером 0,018мкм, которые по мере снижения температуры увеличиваются в размерах (до 0,058мкм) и уменьшаются в количестве. (Платонова и др. 2022)

Данное исследование имеет практическое значение, так как позволяет лучше понимать процессы, которые происходят в эритроцитах крови при изменении температуры.

ПЕРИЦИТЫ – КЛЮЧЕВОЙ РЕГУЛЯТОР КОНСТРИКЦИИ
СОСУДОВ ЖИРОВОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА

Сюткина В.В., Антропова Ю.Г., Калинина Н.И., Ткачук В.А., Чечехин В.И.

Кафедра биохимии и регенеративной биомедицины, факультет фундаментальной медицины
медицинского научно-образовательного института, МГУ имени М.В. Ломоносова,
Москва, Россия

svarvariums@gmail.com

Артериальная гипертензия является ведущей причиной смертности во всём мире. На артериальное давление влияют две основные составляющие: работа сердца и тонус сосудов. Принято считать, что гладкомышечные клетки (ГМК) экспрессируют рецепторы к вазоконстрикторам, а эндотелиальные к вазодилаторам. Вместе с тем, ранее в нашей лаборатории было показано, что $\alpha 1A$ -адренорецепторы, являющиеся вазоконстрикторными, располагаются на перицитах. В связи с этим, мы предположили, что рецепторы и к другим вазоконстрикторам также локализуются преимущественно на перицитах, а не на ГМК. Так, проанализировав данные РНК-секвенирования одиночных клеток, мы показали, что рецепторы к вазоконстрикторам ангиотензину II (*AGTRI*) и вазопрессину (*AVPR1A*) экспрессируются на перицитах, а не в гладкомышечных клетках. Эти результаты были подтверждены с помощью иммуногистохимической окраски сосудов жировой ткани человека. Используя иммуногистохимическую окраску, мы показали, что рецепторы ангиотензина II 1 типа и вазопрессина типа 1A специфически экспрессируются PDGFR β + перицитами, а не CALP+ ГМК и CD31+ эндотелиальными клетками.

Таким образом, мы показали, что рецепторы основных вазоконстрикторов располагаются на перицитах, а не на ГМК или эндотелии.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-75-30007.

ИССЛЕДОВАНИЕ СЕЗОННЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ МЕТАБОЛИЗМА ДЛИННОХВОСТОГО СУСЛИКА *UROCITELLUS UNDULATUS*

Теплова П.О., Захарова Н.М.

Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований РАН», Пущино, Россия

p.o.teplova@gmail.com

В работе исследованы сезонные изменения некоторых параметров метаболизма длиннохвостых сусликов *Urocitellus undulatus* ($n = 19$). Использовали животных обоего пола в состояниях: «летняя активность/нормотермия/контроль» ($38-39^{\circ}\text{C}$), «осенняя активность/предгибернация ($36-37^{\circ}\text{C}$)», «торпор/оцепенение» ($1-5^{\circ}\text{C}$), «зимняя активность/зимняя эутермия» ($34-37^{\circ}\text{C}$). Случайным образом было сформировано 2 группы животных. Первая группа – суслики, используемые в респирометрических тестах ($n=7$, одни и те же особи для всех сезонов), вторая – в гистологическом исследовании щитовидной железы ($n=12$). Показатели метаболизма (потребление кислорода, выделение углекислого газа и выделение энергии - heat) регистрировали с помощью установки ММ-100 с дополнением ММХ-8 (CWE Inc., США). Гистологический анализ проводили следующим образом: после аутопсии щитовидную железу фиксировали с дальнейшим получением криосрезов и стандартной окраской гематоксилином-эозином, получали цифровые изображения на микроскопе Leica DM 6000 B (Leica, Германия), цифровую обработку проводили в ImageJ. Активных животных перед декапитацией предварительно подвергали легкому наркозу (Zoletil, Virbac, Франция, 4 мг/кг, внутримышечно). Все процедуры на животных были одобрены комиссией по биоэтике ИБК РАН. Статистический анализ проводили в GraphPad Prism (10.1.1), результаты считали достоверными при $p < 0,05$.

Респирометрия показала рост скорости метаболизма у осенних сусликов: значения O_2 , CO_2 , и Heat увеличиваются в среднем в 2 раза, а в торпоре снижаются до экстремально низких значений ($\downarrow > 90\%$), вновь возвращаясь к «осенним» уровням во время периодически повторяющейся зимней эутермии. Щитовидная железа также претерпевает значительные морфофункциональные изменения, согласующиеся с результатами метаболических тестов: наибольшая функциональная активность железы отмечена в осенний период, в торпоре наблюдается практически полная инволюция органа, которая носит обратимый характер. В докладе развернуто обсуждаются полученные результаты и возможные адаптационные стратегии.

Часть работы выполнена с использованием приборной базы сектора оптической микроскопии и спектрофотометрии ЦКП ПНЦБИ РАН.

Работа выполнена в рамках государственного задания № 075-00607-25-00.

ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ И ЦИТОПРОТЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ ДИАМИДОВ ЩАВЕЛЕВОЙ КИСЛОТЫ

Терновая Н.Д.¹, Лифинцева А.А.¹, Калистратова А.В.¹, Ощепков М.С.¹, Акимов М.Г.²

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева»,
Москва, Россия

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки ГНЦ Институт
биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук, Москва, Россия

hope.latrom@gmail.com

По данным Всемирной организации здравоохранения, в 2022 году в мире было зарегистрировано 20 миллионов новых случаев рака и 9,7 миллиона смертей от онкологических заболеваний. Разработка эффективных противораковых препаратов по-прежнему остается одной из ключевых задач современной медицины. Предполагается, что модификация диамидов щавелевой кислоты с введением заместителей в амидную группу с одной стороны и N-карбамоилэтиламидного конца с другой стороны оксамидного остова может способствовать повышению их противораковой активности. Эти вещества способны более эффективно ингибировать лактатдегидрогеназу, критически важный фермент для опухолевого роста, что делает целесообразным изучение их биологической активности. В связи с этим был проведен анализ воздействия ряда новых соединений этой группы на пролиферацию опухолевых клеток различных гистологических типов.

Для оценки воздействия веществ использовали человеческие опухолевые линии: рак молочной железы MDA-MB-231, глиобластома U-87 MG и рак поджелудочной железы Panc1. Инкубация клеток с добавлением исследуемых соединений проводилась в течение 72 часов. Жизнеспособность клеток определяли с помощью ресазуринового теста и прямого подсчета клеток.

Была оценена цитотоксическая активность 7 диамидов щавелевой кислоты с этиловыми, пирролидиновыми, морфолиновыми, 4-метилфенильными и 4-хлорфенильными заместителями. Для N-4-хлор-фенил-N',N'-диэтилоксамидил-аминоэтилкарбамата, была обнаружена антипролиферативная активность на человеческой опухолевой линии рака молочной железы MDA-MB-231 с EC₅₀ порядка 25 мкМ. Остальные 6 соединений не показали цитотоксическую активность на данных раковых линиях.

Кроме того, была оценена активность соединений в цитопротекторных модели химической гипоксии на линии нейробластомы SH-SY5Y.

Полученные данные представляют интерес для дальнейшего изучения противораковой активности диамидов и амидоэфиров щавелевой кислоты.

Работа поддержана грантом РФФИ № 22-73-10076.

ВЛИЯНИЕ СПЕРМИДИНА НА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ *CAENORHABDITIS ELEGANS* В УСЛОВИЯХ ИНДУЦИРОВАННОГО ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

Трофименцева Е.В.^{1,2}, Смирнова С.В.¹, Абилов С.К.^{1,2}

¹Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия

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

etrofimentseva@mail.ru

Спермидин – это природный полиамин, синтезируемый из путресцина и обнаруженный у различных организмов, от вирусов до высших растений. Он участвует в поддержании клеточного гомеостаза, аутофагии и антиоксидантной защите, а также способен формировать агрегаты, взаимодействующие с ДНК и защищающие её от деградации. Кроме того, спермидин снижает уровень окислительного стресса, активирует механизмы репарации ДНК и обладает антимуtagenными свойствами, однако механизмы его защитного действия остаются недостаточно изученными.

Целью данного исследования было изучение свойств спермидина в отношении токсического воздействия параквата на модельном объекте – нематоде *Caenorhabditis elegans*. Проверялась гипотеза о способности спермидина снижать мутационную нагрузку, защищать ДНК от повреждений, активировать механизмы репарации ДНК при окислительном стрессе, вызванном паракватом, тем самым увеличивая медианную продолжительность жизни нематод. Оценивалось влияние различных концентраций спермидина (0,0015 моль/л, 0,0075 моль/л и 0,0375 моль/л) на уровень токсичности параквата (0,05 моль/л).

В ходе исследования была выявлена зависимость медианной продолжительности жизни нематод *Caenorhabditis elegans* от воздействия параквата и спермидина в различных концентрациях. В сравнении с контрольной группой, обработанной только паракватом (медианная продолжительность жизни – 18 часов), дополнительное введение спермидина в концентрации 0,0015 моль/л способствовало увеличению этого показателя до 21 часа, что свидетельствует о частичном защитном эффекте спермидина. Однако с повышением концентрации спермидина медианная продолжительность жизни нематод, подвергшихся воздействию параквата, снижалась: при 0,0075 моль/л она составляла 18 часов, а при 0,0375 моль/л – 12 часов. При этом нематоды, обработанные исключительно спермидином в концентрации 0,0375 моль/л, демонстрировали медианную продолжительность жизни 18 часов, тогда как совокупное воздействие спермидина (0,0375 моль/л) и параквата приводило к её сокращению до 12 часов. В целом, как нематоды, подвергшиеся только воздействию спермидина, так и обработанные одновременно паракватом и спермидином, имели меньшую продолжительность жизни (12–21 час) по сравнению с водным контролем (34 часа). Нематоды, обработанные спермидином в концентрациях 0,0015 моль/л и 0,0075 моль/л, жили в среднем 21 час, тогда как при 0,0375 моль/л этот показатель снижался до 18 часов.

Полученные результаты позволяют сделать несколько выводов. Во-первых, спермидин в низкой концентрации (0,0015 моль/л) оказывает частичный защитный эффект против токсического действия параквата, что, вероятно, может быть связано с его воздействием на

ДНК, а также антиоксидантными и аутофагическими свойствами. Однако при увеличении концентрации спермидина его защитное действие ослабляется, а в высоких дозах он, напротив, может потенцировать повреждающий эффект параквата, что проявляется значительным сокращением продолжительности жизни нематод. Во-вторых, обработка нематод исключительно спермидином, особенно в высоких концентрациях, также снижает их продолжительность жизни относительно водного контроля, что указывает на возможное токсическое или стрессовое воздействие спермидина на организм при избытке. Таким образом, спермидин проявляет концентрационно-зависимое влияние на жизнеспособность нематод, выступая как защитным, так и потенциально токсичным агентом в зависимости от дозировки.

ХОЛЕСТЕРИН И TRPV КАНАЛЫ В РЕГУЛЯЦИИ СПОНТАННОЙ СЕКРЕЦИИ АЦЕТИЛХОЛИНА В НЕРВНО-МЫШЕЧНОМ СИНАПСЕ МЫШИ

Тупицына А.Д.^{1,3}, Маломуж А.И.¹, Петров А.М.^{1,2,3}

¹Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия

²Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

³Казанский федеральный университет, Казань, Россия

arina.tupitsyna2014@yandex.ru

Холестерин является одним из основных липидных компонентов плазматической мембраны животной клетки, где его распределение неоднородно, и он участвует в формировании липидных микродоменов, называемых «плотами» или «рафтами». Исследования последних лет демонстрируют важность липидных рафтов и холестерина синаптических мембран для сигнальных процессов, в частности передачи сигнала с мотонейрона на скелетное мышечное волокно. Практическая значимость исследований в этой области обусловлена, тем, что нарушения метаболизма холестерина часто сопутствует нервно-мышечным заболеваниям. Более того, самый распространенный в клинике класс препаратов – статины (лекарства, снижающие уровень холестерина) в качестве ведущего побочного эффекта вызывают мышечные нарушения. При этом, данных о механизме влияния снижения уровня мембранного холестерина на функциональное состояние нервно-мышечного контакта млекопитающих крайне мало. Известна важная роль липидных микродоменов в функционировании Na, K-АТФазы в мышечных волокнах.

В данной работе исследовали влияние удаления мембранного холестерина (с помощью 20-мин аппликации метил- β -циклодекстрина или М β CD) на функциональное состояние нервно-мышечной передачи, оцениваемой по уровню спонтанной квантовой секреции ацетилхолина в нервно-мышечном препарате диафрагмы мыши – главной дыхательной мышцы. Для определения механизма влияния М β CD использовали блокатор натрий-калиевой АТФазы (уабаин, 10 нМ, 1 мкМ, 50 мкМ), блокатор L-типа кальциевых каналов (нитрендипин, 5 мкМ) и блокатор ванилоидных TRPV1 каналов (A-784168, 10 мкМ). Спонтанную квантовую секрецию ацетилхолина оценивали методом микроэлектродного внутриклеточного отведения потенциалов по частоте миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП). Анализировали и амплитудно-временные параметры МПКП.

М β CD использовали в концентрациях 1 мМ, 10 мМ, 30 мМ и 50 мМ. Достоверное увеличение частоты МПКП наблюдалось только после инкубации препарата в концентрации 30 и 50 мМ (на $231 \pm 47\%$ и $954 \pm 149\%$). В дальнейшем использовали М β CD в концентрации 30 мМ. Эффект циклодекстрина на частоту МПКП реализовывался в полном объеме на фоне активации и блокады натрий-калиевой АТФазы. Частичное снижение эффекта М β CD на спонтанную секрецию наблюдалось при блокаде L-типа кальциевых каналов. Полное же устранение влияния циклодекстрина отмечалось в присутствии блокатора ванилоидных TRPV1 каналов.

Исходя из полученных данных, можно сделать следующее заключение: снижение уровня мембранного холестерина приводит к увеличению спонтанного выделения ацетилхолина. Данный эффект связан, судя по всему, не столько с изменением транспорта ионов натрия и калия, сколько ионов кальция в двигательном нервном окончании. Ключевая роль при этом отводится входу кальция именно через TRPV каналы первого типа, которые могут быть крайне чувствительны к липидному окружению и биофизическим свойствам плазматической мембраны.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЭКСТРАКТА КОРНЕЙ *SCUTELLARIA BAICALENSIS* НА ПРОСТРАНСТВЕННУЮ ПАМЯТЬ В УСЛОВИЯХ «СОЦИАЛЬНОГО» СТРЕССА

Уранова В.В.¹, Ломтева Н.А.²

¹Астраханский ГМУ Минздрава России, Астрахань, Россия

²Астраханский государственный университет им. В.Н. Татищева, Астрахань, Россия

fibi_cool@list.ru

Изучение влияния факторов «социального» стресса на человека является важным направлением в физиологии и медицине. Понимание причин и последствий такого стресса в современном обществе, где социальные взаимодействия имеют ключевое значение, даст возможность разработать эффективные средства для устранения негативных последствий и поддержания физического и психического здоровья, особенно в условиях экономических кризисов, политической нестабильности и пандемий. Стресс-индуцированные изменения в нейронной пластичности, связанные с функционированием ионотропных глутаматных рецепторов, влияют на синаптическую проводимость и когнитивную гибкость. Дисбаланс в данных системах может вызвать когнитивные дефициты. Для управления «социальным» стрессом следует создавать эффективные терапевтические стратегии и развивать навыки саморегуляции в социальной среде.

Целью исследования явилось изучение воздействия экстракта корней *Scutellaria baicalensis* (SB) на пространственную память в условиях «социального» стресса. Экстракт SB был получен методом мацерации из культивированного на территории Астраханской области сырья (корни). Изучение проводилось на модели «социального» стресса при использовании тестов «Водный лабиринт Морриса» и «Условный рефлекс пассивного избегания» (УРПИ). Работа была проведена на 160 самцах нелинейных белых крыс в возрасте 5-6 месяцев массой 276,5±32,05 г. Оценку влияния экстракта корней SB на пространственную «референс» память выполняли на шести сформированных группах животных: контрольной (группа I, n=20.); животных, которым вводили экстракт SB (группа II, n=20); особей агрессоров (n=10) и жертв (n=10), подвергавшихся воздействию межсамцовых конфронтаций (группы III-IV, n=10); крыс с доминантным (n=10) и субмиссивным (n=10) типами поведения, получавших SB в условиях «социального» стресса (группы V-VI). Статистическую обработку полученных результатов выполняли с использованием пакета «Statistica 10», определяя нормальность распределения данных, медиану, межквартильный размах и достоверность различий показателей в группах.

Оценка результатов, полученных при испытаниях по методике теста Морриса, показала, что животные, получавшие экстракт SB, продемонстрировали значительно лучшие результаты в навигации по водному лабиринту ($p < 0,01-0,05$). Анализ экспериментальных данных свидетельствовал о восстановлении пространственной памяти и способности к обучению при возникновении патологического состояния вследствие формирования межсамцовых конфронтаций ($p < 0,01-0,05$). Оценка результатов показала, что животные, получавшие экстракт, значительно превосходили по преодолению экспериментальных препятствий, выполнение которых предполагало задействование рефлекторных

возможностей, сформированных при участии пространственной памяти, по сравнению с контрольной группой, что подтверждено ускорением нахождения платформы в тесте Морриса и снижением количества животных, посетивших «аверсивный» отсек в тесте условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) ($p < 0,01-0,05$). Полученные данные свидетельствуют о проявлении нейропротекторной активности при введении экстракта корней SB; его способности устранять негативные последствия, вызванные факторами «социального» стресса. Установлено, что в экспериментально созданных условиях «социального» стресса, который отрицательно сказывается на когнитивных процессах, экстракт проявил свои нейропротекторные свойства, способствуя уменьшению уровня тревожности и стресса у экспериментальных животных, что, вероятно, обусловлено флавоноидным комплексом потенциально активной лекарственной формы.

СВЯЗЬ ПОЛИМОРФНОГО ЛОКУСА RS12976445 *MIR 125*
С ТРУБНЫМ ФАКТОРОМ БЕСПЛОДИЯ

Федоренко И.С., Бутенко Е.В.

Южный Федеральный Университет «Академия биологии и биотехнологии
им. Д.И. Ивановского», Ростов-на-Дону, Россия

fedorenko77irina@mail.ru

Проблема бесплодия имеет большую актуальность в настоящее время, одной из распространённых причин ненаступления беременности является трубный фактор. Полиморфизмы микроРНК могут играть роль в развитии женского бесплодия и рассматриваются как перспективные биомаркеры репродуктивных патологий. Нашей целью было выявить связь полиморфизма miR-125 rs12976445 с репродуктивными нарушениями.

Сбор клинического материала проводили на базе Центра репродукции и ЭКО г. Ростова-на-Дону. В контрольную группу вошло 95 женщин с диагнозом мужской фактор бесплодия; в исследуемую группу вошло 56 женщин с трубным фактором бесплодия. Материалом для генетических исследований служила венозная кровь. Генотипирование проводили методами ПЦР с использованием коммерческих наборов фирмы Евроген, Россия и электрофореза в агарозном геле. Последовательности использованных праймеров: F(C) 5'-ТСТСАГААТГТСТТСТГТГССС-3'; F (Т) 5'-СТСТСАГААТГТСТТСТГТГССТ-3'; R 5'-САГГТТТСАГТТГГТГГТСА-3'. Протокол амплификации: 95° – 5 мин; 40 циклов 95° – 15 сек, 62° – 15 сек, 72° – 25 сек; 72° – 1 мин; 10° – ∞ в объеме 25 мкл. Оценку различий в частоте генотипов производили с помощью критерия Хи-квадрат, с использованием калькулятора Gen Expert (84.201.145.131).

Распределение частот генотипов по исследуемому полиморфному варианту составило: 37,5% ТТ, 32,1% ТС, 30,4% СС среди группы с трубным фактором бесплодия и 42,1% ТТ, 52,6% ТС, 5,3% СС в группе контроля. Распределение частот генотипов по исследуемому полиморфизму в контрольной группе соответствует равновесию Харди–Вайнберга, в группе с трубным фактором бесплодия наблюдается отклонение от равновесия Харди-Вайнберга ($p=0,05$), что может быть связано с влиянием данного полиморфного локуса на репродуктивную способность.

Выявлены статистически значимые различия в распределении частот аллелей и генотипов между исследуемой и контрольной группами. Генотип СС увеличивает риск бесплодия, связанного с трубным фактором ($OR = 7.85$, $CI 2.70–22.77$). Таким образом miR-125 rs12976445 ассоциирован с трубным фактором бесплодия.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания в сфере научной деятельности No FENW-2023-0018.

ВЛИЯНИЕ УФ-ИЗЛУЧЕНИЯ И ИЗЛУЧЕНИЯ ИСКРОВОГО РАЗРЯДА НА ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Фиайос Баррионуэво К.М., Иванова И.П.

Институт биологии и биомедицины Федерального государственного автономного
образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский
Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»,
Нижний Новгород, Россия

kamifiallos96@gmail.com

Окислительно-восстановительные процессы – это химические реакции, при которых происходит перенос электронов между молекулами, что может влиять на клеточную функцию и передачу сигналов. В лимфоцитах окислительно-восстановительные процессы имеют решающее значение для активации и пролиферации клеток, а также для выработки цитокинов и иммунологических медиаторов. Понимание того, как лимфоциты реагируют на стрессоры, такие как ультрафиолетовое излучение и излучение искрового разряда, может дать ценную информацию об активации и регуляции иммунного ответа.

Лимфоциты выделяли из консервированных образцов крови человека с использованием градиента плотности (Фикол). К лимфоцитам добавляли раствор Хэнкса в соотношении 1:5. Отбирали аликвоты по 1 мл смеси лимфоцитов и подвергали их воздействию УФ-излучения и искрового разряда. Дозы облучения составляли 2, 10 и 30 Дж/мл в течение 1, 5 и 15 минут соответственно.

После воздействия измеряли флуоресценцию белков: триптофана (длина волны возбуждения - 288 нм и длина волны излучения - 350 нм), тирозина (длина волны возбуждения - 275 нм и длина волны излучения - 335 нм) и оснований Шиффа (ОШ) (длина волны возбуждения-370 нм и излучения-450 нм). Также были измерены спектры поглощения никотинамидадениндинуклеотида (НАД) в его окисленной и восстановленной (НАДН) формах с длиной волны поглощения 260 и 360 соответственно. Измерения проводились на флуориметре fluorate-02-Panorama.

Результаты показали, что изученные дозы ультрафиолетового излучения и искрового разряда существенно не изменяли флуоресценцию тирозина. С другой стороны, только воздействие ультрафиолетового излучения в дозах 10 и 30 Дж/мл значительно снижало уровень триптофана по сравнению с контролем.

При более высокой дозе облучения как ультрафиолетовым излучением, так и искровым разрядом была обнаружена более низкая флуоресценция оснований Шиффа, при этом доза 30 Дж/мл обоих стимулов вызвала наибольшее снижение (снижение флуоресценции ОШ в 1,5-2 раза ниже контроля). Снижение флуоресценции ОШ может указывать на изменение жесткости и проницаемости клеточной мембраны в результате облучения.

При изучении спектра поглощения НАД и НАДН было показано, что чем выше доза облучения, тем ниже концентрация НАД как в восстановленной, так и в окисленной форме. Коэффициент восстановления НАД/НАДН снижался в 2 раза относительно контроля после воздействия как УФ-излучения, так и искрового разряда.

Таким образом, воздействие УФ-излучения и излучения искрового разряда в исследованных дозах вызвало дисбаланс между метаболическими коферментами НАД и НАДН, что является показателем окислительного стресса, вызванного повышенной продукцией активных форм кислорода под действием излучений.

ОЦЕНКА ИЗМЕНЕНИЯ МОРФОЛОГИИ ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ СВИНЬИ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР

Филиппов В.П.¹, Платонова В.А.¹, Алексеев Р.З.², Мамаева С.Н.¹

¹Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова, Якутск, Россия

²Якутский научный центр комплексных медицинских проблем, Якутск, Россия

filippovvitya0705@gmail.com

Во многих странах свиньи уже давно привлекают внимание исследователей в качестве биологической модели из-за их сходства с человеком в анатомическом и физиологическом смысле. Сходство людей и свиней не ограничивается анатомическим строением органов. Практически заболевания у людей и свиней идентичные. Например, у свиней, как и у людей, в пожилом возрасте может развиваться болезнь Альцгеймера. Кроме того, свиньи подвержены сердечно-сосудистым заболеваниям, диабету, мышечной дистрофии и ожирению. В связи с этим эксперименты, проводимые на свиньях, способствуют более глубокому пониманию различных патологических состояний человеческого организма, в том числе патологических состояний, вызванных воздействием холода.

Целью данной работы является выявление морфологических особенностей эритроцитов крови свиньи при действии низких температур.

Объектом данного исследования явились образцы мазков крови девяти свиней 2-3-х месяцев. На первом этапе пробоподготовки свинью приводили в медикаментозный сон путем введения ксилазина. После проведения гигиенической и фиксации свиньи к операционному столу закреплялись температурные датчики (уличной, внутримышечной, мышечной, пищевода, ректальной). На втором этапе исследования каждое из девяти животных в длительный период времени (более трех часов) находилось в среде с определённой температурой в пределах от -25°C до -52°C . В начале и в ходе второго этапа эксперимента фиксировали показания датчиков температуры, а также ежечасно производился забор крови свиней. На третьем этапе эксперимента, начало которого определялось утратой электрической активности мозга методом электроэнцефалографии, свиньи помещались в среду при комнатной температуре. В ходе третьего этапа эксперимента при постепенном увеличении температуры тела животных ежечасно производился забор крови. В течение всего эксперимента сразу после забора крови готовились мазки на предметном стекле без окрашивания и фиксации и сушились при комнатной температуре.

Исследование подготовленных таким образом сухих образцов крови проводилось с использованием растрового электронного микроскопа (РЭМ) высокого разрешения JSM-7800F с катодом Шоттки и супергибридной объективной линзой.

Результаты эксперимента показали, что при охлаждении в крови свиньи количество дисморфных эритроцитов увеличивается. Гипотермия вызывает изменения в структурной организации мембран эритроцитов свиньи, проявляющееся в увеличении количества патологических форм эритроцитов, их усиленной агглютинации и агрегации. Далее, при

отогревании свињи происходит полная и обратимая трансформация эхиноцитов обратно в дискоциты, а также снижение агглютинации и агрегации эритроцитов. Это может быть связано с регенерацией мембранных липидов, которые отвечают за поддержание нормальной формы эритроцитов.

Данная работа имеет практическое значение, так как позволяет наблюдать с помощью РЭМ изменения морфологии эритроцитов крови млекопитающих при снижении температуры. Это исследование может быть полезно для разработки новых методов диагностики и лечения заболеваний, связанных с переохлаждением.

СМЕЩЕНИЕ КРИВОЙ ДИССОЦИАЦИИ ОКСИГЕМОГЛОБИНА ПРИ ПОМОЩИ КИСЛОРОДНО-ГЕЛИЕВОЙ СМЕСЬЮ У КРЫС

Холина А.В.^{1,2}, Паликов В.А.^{1,2}, Дьяченко И.А.^{1,2}

¹Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (Филиал ГНЦ ИБХ РАН),
Пушино, Россия

²Пушинский филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)» (ПушГЕНИ – филиал РОСБИОТЕХ), Пушино, Россия

bervinova@bibch.ru

Целью данного исследования являлось изучение влияния дыхательной смеси на газовый состав крови после однократной интервальной ингаляции (3 раза по 5 минут). В исследовании были использованы 16 аутбредных самцов крыс линии Sprague Dawley в возрасте 9 – 10 недель. Животные были поделены по 8 особей в каждой группе. Группа 1 – контрольная, дышала кислородно-азотной смесью, в составе которой находилось 21% O₂/ 79% N₂. (КАС). Группа 2 – исследуемая, дышала кислородно-гелиевой смесью, в составе которой находилось 21% O₂/ 79% He (КГС).

Все животные были размещены в «Лабораторном ингаляционном комплексе» предоставленном ЗАО «СКБ ЭО при ИМБП РАН», каждая группа ингалировалась отдельно. Анализ газов крови проводился с помощью анализатора ABL90 FLEX до ингаляции и сразу после ее окончания. В качестве образца использовалась капиллярная кровь, собранная путем отсечения кончика хвоста. При заборе крови после сеанса ингаляции удаляли струп и забирали необходимый объем крови для анализа. Для одного анализа было достаточно 70 мкл цельной крови.

В результате проведенного исследования было продемонстрировано, что однократная ингаляция КГС приводит к более интенсивному смешению газов крови, чем КАС. Водородный показатель (рН) крови в обоих случаях увеличивается на 1%. Напряжение углекислого газа (рСО₂) при ингаляции КАС уменьшается на 11%, в то время как при КГС оно снижается на 26,4%. После ингаляции КАС напряжение кислорода (рО₂) и его сатурация (sO₂) увеличилась на 47% и 45% соответственно. Однако при гипероксическом содержании кислорода в КАС показатель р50 вырос, а значит, уменьшилось сродство гемоглобина к кислороду. В результате кислород не так эффективно доставляется в ткани. После ингаляции КГС происходит увеличение таких показателей, как рО₂ и sO₂ на 84% и 113% соответственно. В свою очередь р50 – величина, при которой 50% гемоглобина в крови находится в связанной с кислородом форме, уменьшилось на 28%. Что свидетельствует о более высокой аффинности гемоглобина к кислороду и может быть полезно в условиях кислородного голодания.

АКТИВНОСТЬ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ И ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ПРИ ВЫСОКОЖИРОВОЙ ДИЕТЕ У МЫШЕЙ

Хундеряков И.А., Федорова Е.В., Полякова Т.В., Булгин И.В., Хундерякова Н.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и
экспериментальной биофизики РАН, Московская обл., Пушкино, Россия

ikhunderyakov@gmail.com

В последнее десятилетие во всех развитых странах появилась проблема ожирения, которую называют пандемией 21 века. Всемирная организация здравоохранения включила ожирение в число хронических заболеваний, характеризующихся избыточной массой тела с индексом более 30. Болезни, связанные с избыточным весом и ожирением, наносят вред здоровью человека, они являются фактором, снижающим производительность труда, поэтому поиск препаратов для профилактики и лечения ожирения является актуальным на сегодняшний день. В недавних исследованиях (Jian-Ping Yuan 2010) был показан клинически значимый антиоксидантный эффект при приёме Астаксантина, особенно в группах, восприимчивых к окислительному стрессу (курильщики, лица с ожирением и избыточной массой тела), и отмечена нормализация биохимических показателей окислительного стресса у людей с избыточным весом. Целью работы является исследование действия природного антиоксиданта Астаксантина на энергетический обмен - активность сукцинат (СДГ) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) лимфоцитов крови в модельной системе высокожировой диеты у мышей. Эксперименты были проведены на половозрелых шестимесячных самцах мышей линии SHK разведения ИГЭБ РАН. Животные были произвольно разделены на четыре группы и содержались в одинаковых условиях температуры и влажности при свободном доступе к стандартному гранулированному корму и воде. В подгруппе высокожировой диеты мышам ежедневно на протяжении трех месяцев в корм добавляли 1 г сала на животное. Также были подопытные группы в рацион питания которых помимо стандартного корма вводили астаксантин заключенный в агарозные блоки из расчета 10мг/кг на животное или астаксантин совместно с салом.

В настоящей работе использовали высокочувствительный Цитобиохимический метод определения активности митохондриального фермента (СДГ) и гликолитического ЛДГ в лимфоцитах крови на мазке крови по восстановлению нитросинего тетразолия хлорида до темно-синего диформаза. (Кондрашова и др. 2009).

Было установлено, что активность СДГ и ЛДГ в лимфоцитах крови в контрольной и группе с Астаксантином достоверно не изменилась. Наиболее высокие достоверные отличия были получены по показателю ЛДГ/СДГ, предложенному нами как отношение гликолиза к окислительному фосфорилированию (дыханию) митохондрий. В группе с высокожировой диетой ЛДГ/СДГ снизился в 1,5 раза по сравнению с контролем. В группе с Астаксантином и высокожировой диетой было показано защитное действие вещества на активность СДГ и ЛДГ лимфоцитов. Снижение катаболической и анаболической активности лимфоцитов у животных с высокожировой диетой, по-видимому, связано с окислительным стрессом, который

происходит при накоплении излишних жирных кислот и факторов воспаления (Неудахин Е.В. и др. 2012). Адаптационные реакции организма на стресс при ожирении выражаются изменением метаболизма и приводят к снижению энергетической активности. Таким образом, в работе было установлено достоверное снижение показателя ЛДГ/СДГ лимфоцитов крови при трехмесячной высокожировой диете и отмечено регуляторное действие Астаксантина.

Работа выполнена по госзаданию № 075-00223-25-00.

ВКЛАД КАЛЬЦИЙ-НЕЗАВИСИМОЙ ФОСФОЛИПАЗЫ С В ОСТРЫЕ ТОКСИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ АКТИВИРОВАННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Цай А.А.¹, Пименов О.Ю.², Дынник В.В.², Бережнов А.В.¹

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

²Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушино, Россия

annatsay2001@mail.ru

Известно, что хроническое или острое повышение уровня жирных кислот (ЖК) в крови, может приводить к развитию различных патологических состояний. Причиной гибели клеток является резкое накопление ЖК и их активированных производных – ацил-КоА и ацилкарнитинов. Ранее было показано, что пальмитоилкарнитин (РС) приводит к гибели клеток посредством активации кальциевых каналов саркоэндоплазматического ретикулума (СР/ЭР) и повышения проницаемости мембраны для ионов кальция. Однако детали патологического процесса остаются не до конца изучены.

В данной работе использовали *in vitro* модель острого токсического действия жирных кислот с добавлением РС – на свежeweделенные кардиомиоциты крысы.

С использованием методов конфокальной, флуоресцентной микроскопии и ингибиторного анализа было показано, что добавление РС (20 мкМ) в течение нескольких минут вызывает гиперконтрактуру кардиомиоцитов и нарушение целостности плазматической мембраны клеток. Гиперконтрактура возникает после лаг-фазы, длящейся в среднем около 6 минут. Во время лаг-фазы не наблюдается изменения уровня цитозольного кальция, однако возникает усиление явления кальциевых спарков в кардиомиоцитах. Кроме того, наблюдается снижение уровня флуоресценции NADH и снижение восстановленного глутатиона, указывая на нарушения окислительно-восстановительного и биоэнергетического статуса клетки. Применение ингибитора Ca²⁺-независимой формы фосфолипазы A₂ (iPLA₂γ) – PACOCF3 (25 мкМ) предотвращает гиперконтрактуру, усиление кальциевых спарков и клеточную гибель, однако не влияет на РС-индуцированное изменение уровня NADH и GSH.

В работе обсуждаются возможные механизмы участия метаболитов арахидоновой кислоты в токсическом действии ацилкарнитинов на кардиомиоциты.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ПНЦБИ РАН № 075-00607-25-00 (1024032700128-8-1.6.4 «Разработка препаратов для терапии повреждений мозга и эпилепсии: исследования *in vitro* и *in vivo*»).

АНАЛИЗ ПОВЕДЕНИЯ КРЫС НА ОСНОВЕ ИМПЛАНТИРУЕМОЙ ТЕЛЕМЕТРИИ:
ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Шамсиев И.Д.¹, Бородачева Ю.В.¹, Ибрагимова В.Р.², Родин В.Д.², Клименко М.А.³,
Гольцев М.Ю.⁴, Семенкова Н.Ю.⁴, Шалагинова И.Г.^{2,5}, Бондарь И.В.¹

¹Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

²Балтийский Федеральный Университет им. И. Канта, Калининград, Россия

³Институт Биохимической Физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

⁴Государственный научно-исследовательский институт химии и технологии
элементоорганических соединений, Москва, Россия

⁵Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

ildarshamsiev.al@gmail.com

Введение. Поведение животных является важным параметром, представляющим интерес в качестве самостоятельного объекта изучения, а также как индикатор внутреннего состояния в различных экспериментальных условиях. В поведении выделяются стабильные конечные последовательности отдельных действий (паттерны), поддающиеся объективной количественной оценке (напр. эпизоды груминга, стойки). Основным методом выделения поведенческих паттернов является анализ видеозаписей, однако он имеет ряд недостатков. Для этой цели также можно использовать инерциальные датчики (акселерометры и гироскопы). Имплантируемые телеметрические устройства на их основе позволяют добиться стабильного долговременного бесконтактного наблюдения за поведением животного без использования видеорегистрации. В ходе нашего исследования мы создали такое устройство и продемонстрировали возможность выделения поведенческих паттернов на основе показаний его инерциальных датчиков.

Материалы и методы. В исследовании участвовало 2 пары крыс (*Wistar*, пол М, возраст 1.5 лет и 3 месяца, вес 570-580 гр и 320-330 гр, соответственно). В ходе операции им подкожно в области пояснично-брюшного отдела с правой стороны были установлены телеметрические устройства (объем 8-9 см³, вес ок. 10 гр). Устройства были покрыты биосовместимым силиконом и оснащены акселерометром и интерфейсом беспроводной связи BLE. У 2й пары крыс имплантаты сместились каудальнее, в область над правым бедром. После восстановительного периода (14 дней) мы проводили синхронную регистрацию видео (частота 30 Гц) и телеметрии (20 Гц) во время свободного поведения крыс в различных условиях (домашняя клетка, незнакомая клетка, открытое поле). Каждая крыса из первой пары участвовала в 3 сессиях, а из второй пары – в 1 сессии, соответственно. На видеозаписях вручную выделялись начало и окончание следующих поведенческих паттернов: перемещения, стойки с опорой и без опоры, груминг головы и туловища. Затем мы проанализировали показания датчиков во время выполнения животным этих паттернов в течение нескольких экспериментальных сессий.

Результаты. У первой пары крыс показания акселерометра в течение всего времени выполнения стоек и груминга значительно отличались от показаний во время локомоции и в

неподвижном состоянии ($p \ll 0.05$, тест Вилкоксона). Размеры эффекта для отдельных животных составили $\min. 2.4$ и $\min. 0.97$ (d Коэна). Из второй пары крыс (имплантат каудальнее) у одного животного также удалось отличить стойки и грумминг от локомоции и неподвижности ($p \ll 0.05$, тест Вилкоксона), однако размер эффекта был значительно меньше ($\min. 0.69$, d Коэна). У второго животного оказалось невозможным разделить эти паттерны ($p \gg 0.06$, тест Вилкоксона), так как сигнал был более чувствителен к небольшим движениям (в первую очередь задними лапами).

Выводы. Выделение поведенческих паттернов крысы в свободном поведении возможно на основе показателей акселерометра с хронически имплантированного устройства, однако чувствительность метода напрямую зависит от положения имплантата.

Работа поддержана грантом УМНИК Фонда содействия инновациям (Договор 18451ГУ/2023 от 16.08.2023).

Секция 5

«ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ ОРГАНИЗМОВ»

МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ *ARABIDOPSIS THALIANA* К ПОВЫШЕННЫМ ДОЗАМ УФ-В ИЗЛУЧЕНИЯ: РОЛЬ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ И СВЕТОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ

Абрамова А.А.¹, Верещагин М.В.¹, Креславский В.Д.², Пашковский П.П.¹

¹ФГБУН Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, Москва, Россия

²Институт фундаментальных проблем биологии РАН – обособленное подразделение ФГБУН ФИЦ Пушкинский научный центр биологических исследований РАН, Пушино, Россия

ann.kiedis2000@gmail.com

Ультрафиолетовое излучение спектра В (УФ-В, 280–320 нм) оказывает двойственное влияние на растения. С одной стороны, оно вызывает окислительный стресс и повреждение ДНК, а с другой – активирует защитные механизмы, такие как синтез флавоноидов и антоцианов, обладающих антиоксидантными и антибактериальными свойствами. В последние годы УФ-В активно используется в биотехнологии для улучшения качества растений, однако механизмы адаптации к нему остаются недостаточно изученными.

Целью данного исследования было изучение роли ключевых регуляторных белков *HY5*, *SPA* и *BIC1,2* в адаптации *Arabidopsis thaliana* к УФ-В-стрессу. Предполагалось, что эти белки координируют фотозащитные механизмы через сигнальный путь *UVR8* и взаимодействие с криптохромами. *HY5*, активируемый *UVR8*, регулирует экспрессию генов, отвечающих за синтез флавоноидов (например, *CHS*), а также контролирует работу фотосистемы II, поддерживая баланс между поглощением и рассеиванием света. *SPA* стабилизирует *HY5*, предотвращая его деградацию через взаимодействие с комплексом *COPI*, что способствует накоплению антиоксидантов и флавоноидов.

Белки *BIC1,2* играют важную роль в регуляции взаимодействия между *UVR8* и криптохромами. У мутантов *bic1,2* нарушение этого взаимодействия приводит к гиперактивации *UVR8*-зависимых путей, что усиливает экспрессию генов антиоксидантной защиты (*APX*, *GPX*) и увеличивает синтез флавоноидов. Это сопровождается повышением нефотохимического тушения флуоресценции (NPQ), что защищает фотосистему II от повреждений. В то же время у мутантов *hy5* наблюдается резкое снижение фотосинтетической активности и недостаточная активация NPQ, что делает их более чувствительными к УФ-В. У *spa*-мутантов, несмотря на повышенный уровень флавоноидов, нарушение водного обмена ухудшает адаптацию к стрессу.

Баланс между активацией фотозащитных механизмов и поддержанием фотосинтеза является ключевым для устойчивости растений к УФ-В. Полученные данные открывают перспективы для разработки стратегий генетической модификации сельскохозяйственных культур с целью повышения их устойчивости к УФ-В, что особенно важно в условиях изменяющегося климата.

Работа поддержана грантом РНФ № 23-14-00266.

ПЕРОКСИД ВОДОРОДА ИНГИБИРУЕТ ПРОТЕКАНИЕ ПРОЦЕССА
STATE TRANSITIONS

Балашов Н.В., Ветошкина Д.В., Борисова-Мубаракшина М.М.

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

kbalashov@mail.ru

Фотосинтетический аппарат фотосинтезирующих организмов постоянно адаптируется к изменяющимся условиям освещения. В ходе эволюции у растений появился ряд регуляторных механизмов, позволяющих им адаптироваться как к кратковременным, так и к долгосрочным изменениям освещения. Известно, что при кратковременном изменении спектрального состава света запускается процесс state transitions, при котором происходит фосфорилирование белков Lhcb1 и Lhcb2 внешней антенны светособирающего комплекса фотосистемы 2, и их миграция от фотосистемы 2 к фотосистеме 1 за счет электростатического отталкивания. Ферментом, фосфорилирующим эти белки, является STN7 киназа. Показано, что активность этой киназы ингибируется в условиях повышенной освещенности, однако механизм ингибирования до конца не выяснен. В то же время в ряде работ было показано, что за активность STN7 киназы отвечает окислительно-восстановительное состояние ее цистеиновых остатков. В условиях повышенной освещенности в тилакоидных мембранах возрастает образование пероксида водорода, что может приводить к окислению цистеиновых остатков STN7 киназы, которые являются мишенью для пероксида водорода в белках. Таким образом, нами было предположено, что ингибирование активности STN7 киназы связано с повышенным образованием пероксида водорода в тилакоидных мембранах в условиях повышенной освещенности.

В представленной работе изучено влияние пероксида водорода на светозависимое накопление фосфорилированных белков Lhcb1 и Lhcb2. Объектом исследования являлись изолированные тилакоиды, выделенные из растений *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia-0. Было показано, что добавка к тилакоидам пероксида водорода в концентрации 250 и 500 мкМ при освещении светом низкой интенсивности (красный свет, 60 мкмоль квантов м⁻² с⁻¹) приводила к снижению светозависимого накопления фосфорилированных белков Lhcb1 и Lhcb2, имитируя условия повышенной освещенности. При этом пероксид водорода в выбранных концентрациях не влиял на скорость электронного транспорта по фотосинтетической электрон-транспортной цепи. Кроме того, нами была показана специфичность действия пероксида водорода на STN7 киназу: при добавке пероксида водорода в выбранных концентрациях не происходило снижения накопления фосфорилированного белка D1, который является продуктом другой киназы, STN8 киназы.

Полученные в ходе работы результаты доказывают, что пероксид водорода ингибирует протекание процесса state transitions за счет селективного ингибирования активности STN7 киназы.

Работа поддержана грантом РФФИ № 22-74-10088 <https://rscf.ru/project/22-74-10088/>

ЛИСТОСТЕБЕЛЬНЫЕ МХИ *FISSIDENS ADIANTOIDES* И *BRACHYTHECIUM RUTABULUM*
КАК МОДЕЛЬНЫЕ ОБЪЕКТЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТИ: ВЛИЯНИЕ
РЕЖИМА ВЫСУШИВАНИЯ НА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИЙ АППАРАТ И
ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ

Богданова Е.М., Муртузова А.В., Курбатова Л.Е., Тютерева Е.В.

ФГБУН Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург, Россия

EBogdanova@binran.ru

Мхи не обладают активной регуляцией водного баланса, но развили уникальные адаптационные механизмы, позволяющие выживать в экстремальных условиях. Они способны переносить почти полное высыхание, сохраняя при этом работоспособность фотосинтетического аппарата.

Для изучения механизмов устойчивости мхов к засухе были проведены эксперименты с *Fissidens adiantoides* (семейство *Fissidentaceae*) и *Brachythecium rutabulum* (семейство *Brachytheciaceae*). Оба вида мохообразных широко распространены в Европе и характеризуются высокой экологической пластичностью.

Fissidens adiantoides (семейство *Fissidentaceae*) произрастает в тенистых и влажных местах умеренного климата. Благодаря особой морфологии листьев и разветвленной системе ризоидов он способен эффективно поглощать влагу и быстро восстанавливать жизнеспособность после пересыхания. Его адаптации к засухе включают накопление осмолитиков, предотвращающих повреждение клеток, и активацию антиоксидантных механизмов, защищающих мембраны и белки от окислительного стресса (Pursell and Allen, 2017). *Brachythecium rutabulum* (семейство *Brachytheciaceae*) широко распространен в Европе и встречается в различных условиях – от влажных лесов до сухих каменистых склонов. В своем исследовании Marschall M. et al. (2004) указывали, что защитные механизмы *B. rutabulum* включают перераспределение световой энергии между ФС2 и каротиноидами, переход хлорофилла в феофитин и накопление каротиноидов, предотвращающих фотоповреждение.

В течение четырех дней образцы подвергались высушиванию разными методами: традиционным (в эксикаторе с сухой подложкой), с использованием увлажненного субстрата (чашка Петри с влажной бумагой), ступенчатым высушиванием (постепенное снижение влажности) и частичной сушкой (предварительная акклиматизация при высокой влажности с последующим обезвоживанием). Оценка устойчивости проводилась по потере воды, жизнеспособности гаметофитов (тетразолиевый тест) и состоянию фотосинтетического аппарата (анализ содержания пигментов и флуоресценции хлорофилла с использованием ОЛР-кинетики и ЛР-теста). В результате проведения исследования нами описаны оптимальные условия высушивания, которые способствуют сохранению активности фотосистемы II и сохранению жизнеспособности гаметофитов изученных видов мха.

ВЛИЯНИЕ АЛЬТЕРНАТИВНОЙ ОКСИДАЗЫ НА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ РАСТЕНИЙ ПРИ НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ

**Бражникова А.В.^{1,2}, Балашов Н.В.¹, Найдов И.А.¹,
Трубицина Л.И.³, 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

³Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина – обособленное
подразделение ФИЦ Пушинский научный центр биологических исследований РАН,
Пушино, Россия

brazhnikovanastasia@yandex.ru

Митохондрии многих высших растений содержат нечувствительную к цианиду альтернативную оксидазу (АОХ), активность которой усиливается в условиях стресса, предотвращая образование активных форм кислорода и развитие окислительного стресса в этих органеллах. Однако влияние функционирования АОХ на функциональное состояние других органелл, в частности хлоропластов, в стрессовых условиях все еще не до конца изучено.

В настоящей работе, используя растения *Arabidopsis thaliana* дикого типа (Columbia) и мутантные растения с гиперэкспрессией АОХ (XX2), частичным подавлением её экспрессии (AS12) и нокаутом гена АОХ (SALK-084897), оценивали влияние пониженной температуры воздуха на активность фотосинтетического аппарата хлоропластов. Через 10 дней нахождения растений при 6°C в растениях дикого типа и с нокаутом АОХ наблюдалось значительное ($P < 0.1$) снижение эффективного квантового выхода фотосистемы 2. Напротив, в мутантных растениях с изменённым содержанием АОХ этот показатель не уменьшался, даже незначительно увеличивался в мутантах AS12. Энергозависимый компонент нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла *a* (qE) оставался неизменным в линиях XX2 и AS12, в то время как в растениях дикого типа и с нокаутом АОХ он существенно снижался, что указывает на потерю способности к диссипации энергии в тепло в этих растениях. Также, только у растений дикого типа и растений с нокаутом АОХ было обнаружено увеличение содержания пероксида водорода в листьях.

Для дальнейшего исследования была разработана генетическая конструкция с амплификацией гена АОХ и трансформацией в клетки *E. coli*. Функциональная активность рекомбинантной АОХ была подтверждена с помощью оценки скорости поглощения кислорода индуцированными и неиндуцированными клетками. В присутствии цианида калия скорость дыхания контрольных клеток была снижена на 90%, в то время как в клетках с гиперэкспрессией АОХ – лишь на 31%. Ингибиторы *n*-пропилгаллат и салицилгидроксамовая кислота (SHAM) снижали интенсивность дыхания клеток с гиперэкспрессией АОХ на 36% и 20% соответственно.

Таким образом, изменение содержания АОХ является необходимым фактором для регулирования фотосинтетической активности растений при пониженной температуре. Гиперэкспрессия АОХ в клетках *E. coli* существенным образом влияет на дыхательную активность клеток, поддерживая интенсивность дыхания на значительном уровне даже в условиях ингибирования активности цитохром с оксидазы.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 23-14-00396);
<https://rscf.ru/project/23-14-00396/>

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ НА АКТИВНОСТЬ ФОТОСИСТЕМЫ 2 В ХЛОРЕНХИМЕ ВЕТВЕЙ *MALUS* × *DOMESTICA* BORKH.

Грязнова У.В., Савченко Т.В., Тихонов К.Г.

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

ulyana.gr@yandex.ru

В последние годы резко возрос интерес к исследованиям, направленным на изучение особенностей фотосинтетического аппарата, локализованного в нелистовых органах растений.

В данной работе в качестве объекта исследования использовались ветви одного из самых распространенных культурных древесных растений – яблони домашней *Malus domestica*. Сорт «Богатырь», выбранный для изучения, отличается экологической стойкостью и скороплодностью, что является значительными преимуществами при выращивании в Европейской части России. Целью данной работы стало изучение влияния температуры на активность фотосистемы 2, находящейся в фотосинтезирующей ткани ветвей *M. domestica*.

Изучение зависимости величин эффективного квантового выхода фотосистемы 2 $Y(II)$ от температуры воздуха показало прямую зависимость этих параметров. Однако она ограничена двумя участками: при температуре ниже 0 °C и выше 10 °C зависимость выходила на плато. Также была отмечена разница показателей $Y(II)$ в весенний и осенний периоды при одинаковой температуре, что говорит о разном состоянии фотосинтетического аппарата в эти сезоны. Фотосинтетическая активность ветвей *M. domestica* в осенний период начала падение после периода дефолиации в конце октября-начале ноября, т.е. после начала фазы глубокого покоя. При этом зимние образцы ветвей показывают быстрый рост $Y(II)$ при их адаптации к комнатной температуре (22 °C), при этом наибольший прирост фотосинтетической активности замечен в течение первых 30 минут от начала адаптации.

Фотосинтетический аппарат ветвей *M. domestica*, собранных в разные сезоны, отличается своей устойчивостью к обработке высокой температурой (45 °C). Особую стойкость показали летние ветви – после обработки их показатели $Y(II)$ и переменной флуоресценции (F_v/F_m) снизились в незначительной степени. С другой стороны, у зимних ветвей была замечена высокая чувствительность и снижение величин $Y(II)$ и F_v/F_m уже при получасовой обработке высокой температурой.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 24-16-00142).

РОЛЬ БАКТЕРИЙ ИЗ РОДА *AZOSPIRILLUM* В АДАПТАЦИИ *TRITICUM AESTIVUM* К ЗАГРЯЗНЕНИЮ ПОЧВЫ НИКЕЛЕМ И СВИНЦОМ

Еремина А.А., Гуреева М.В., Гуреев А.П.

ФГБОУ ВО Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

anya.kryuu@gmail.com

Pb и Ni – это химические элементы, которые относятся к классу тяжёлых металлов (ТМ). Накапливаясь в окружающей среде и, в частности, в почве, они поглощаются корнями растений и влияют на их физиологические процессы, что в конечном итоге приводит к снижению урожайности ценных с/х-ых культур, к которым в том числе относится и пшеница, играющая важнейшую роль в обеспечении глобальной продовольственной безопасности. На сегодняшний день применение ризосферных бактерий рассматривается как перспективный метод повышения устойчивости растений к различным стрессам. Поэтому целью нашего исследования стало изучение эффективности применения бактерий из рода *Azospirillum* в борьбе с негативными процессами, развивающимися в пшенице в ответ на загрязнение почвы ТМ.

В ходе эксперимента мы использовали семена пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L.) сорта Курьер. В опытных группах семена прорастали в почве, в которую вносились Pb и Ni в предельно допустимой концентрации. Часть семян подвергалась предварительной инокуляции следующими штаммами бактерий: *Azospirillum picis* В-2897^T, *A. brasilense* В-1547^T, *Niveispirillum irakense* В-2893^T. Результаты эксперимента показали, что применение *A. brasilense* и *N. irakense* способствовало увеличению длины проростков. При этом *A. picis* в присутствии Ni также оказала стимулирующий эффект. Масса проростков увеличивалась в группах, которые подвергались одновременному действию Ni и *A. picis*, Ni и *N. irakense*, Pb и *A. picis*. С помощью рентгенофлуоресцентной спектрометрии мы выявили, что предварительная обработка семян приводила к меньшему накоплению ТМ в растении.

В нашей работе мы изучили экспрессию генов, кодирующих глутатион-S-трансферазу (*gst*) и NADPH-зависимую дифлавиноксидоредуктазу (*ndor-1*). Эти гены кодируют ферменты, участвующие в детоксикации ксенобиотиков. Продукт *ndor-1* обеспечивает биотрансформацию токсичного метаболита, а продукт *gst* ответственен за последующую конъюгацию соединения с глутатионом. Оба металла снижали уровень экспрессии *ndor-1*. Уровень экспрессии *gst* снижался только в присутствии Pb. При этом *A. picis* нивелировала негативное действие Pb, в результате чего уровень экспрессии обоих генов повысился относительно группы с металлом. Предварительная инокуляция *N. irakense* также предотвратила отрицательное влияние Ni на экспрессию *gst*.

При изучении совместного действия ТМ и бактерий на пигментный состав пшеницы было обнаружено, что металлы снижают концентрацию хлорофилла а. В образцах с Pb был также отмечен рост концентрации хлорофилла b. Изменение обоих показателей в совокупности привело к нарушению соотношения пигментов в опытной группе с этим

металлом. Бактерии не повышали уровень хлорофилла, но нормализовали соотношение хлорофилл а/хлорофилл b, приблизив его к 1:1.

В рамках этой работы был поставлен полевой эксперимент, результаты которого показали, что внесение ТМ в почву способствовало снижению таких показателей, как средняя длина стебля и колоса, среднее количество зёрен в колосе. Бактерии снижали токсический эффект Ni по всем трём показателям. При токсичности, вызванной Pb, бактерии не способствовали улучшению показателей продуктивности.

Таким образом, мы показали, что инокуляцию семян бактериями из рода *Azospirillum* можно рассматривать как потенциально эффективный способ нейтрализации токсического действия ТМ на с/х-ые культуры.

Работа поддержана грантом РФФИ № 23-24-00277.

ГЕНОТИПИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ СОРТОВ *ACTINIDIA KOLOMIKTA* И *A. ARGUTA*

Зятева Е.С., Лебедев В.Г.

Филиал ФГБУН Государственного научного центра Института биоорганической химии им.
академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушино, Россия

liza_zyateva@mail.ru

Актинидия является малораспространенной плодовой культурой, интерес к которой значительно вырос в последние годы. Среди нескольких десятков видов из рода *Actinidia* в России наиболее популярны самые зимостойкие *A. kolomikta* (Rupr. Et Maxim) Maxim. и *A. arguta* Planch. Плоды этих видов отличаются приятным вкусом, высоким содержанием витамина С и других биологически активных веществ, а лианы можно использовать в качестве декоративных растений. Селекцией новых сортов этих видов занимаются в России, Китае, Польше и других странах. Клональное микроразмножение обеспечивает возможность быстрого производства большого количества высококачественного посадочного материала. Цель работы заключалась в оценке генотипических эффектов при оптимизации клонального размножения актинидии.

В качестве объектов исследования использовали четыре сорта *A. kolomikta*: Adam (мужской), Находка, Отличница, Университетская (женские), а также два женских сорта *A. arguta*: Geneva и Великанша. Растения культивировали на стандартной среде MS. В экспериментах оценивали влияние хелатированной формы железа (ЭДТА Fe и ЭДДГА Fe), концентрации 6-БАП (0,5 и 0,25 мг/л), минерального состава среды (стандарт и 1/2) и сахарозы (30 и 15 г/л) на высоту растений, количество побегов и междоузлий, и длину междоузлий.

По всем ростовым показателям сорта *A. arguta* превосходили сорта *A. kolomikta*: высоте (7,1-9,5 и 2,6-5,9 см), количеству побегов (2,1-3,1 и 1,0-1,5 шт/эксплант), количеству междоузлий (11,1-14,3 и 3,9-10,6 шт/побег) и их длине (5,6-7,4 и 3,3-6,1 мм). Сорта *A. kolomikta* не различались между собой по высоте и количеству побегов, но сорт Adam выделялся минимальным количеством междоузлий, а междоузлия Университетской и Отличницы были короче, чем у Находки и Adam. Форма железа, уменьшение концентрации минеральных солей и сахарозы не оказали существенного эффекта на рост растений актинидии *in vitro*. Снижение концентрации 6-БАП не повлияло на ростовые показатели при культивировании на стандартной среде MS, но на средах с уменьшенным содержанием минеральных солей или сахарозы привело к уменьшению высоты растений и количества междоузлий, причем только для сортов *A. kolomikta*. В процессе культивирования актинидии на среде с цитокинином было отмечено спонтанное корнеобразование, но без существенных различий между видами. Количество корней было максимальным у сорта Geneva (9,5-14,0 шт/эксплант) и минимальным у сорта Университетская (2,1-4,9 шт/эксплант). Самые длинные корни отмечались у сорта Adam (2,3-4,3 см), а самые короткие у сорта Отличница (0,7-1,0 см).

Полученные результаты могут быть использованы для разработки эффективной технологии клонального микроразмножения сортов актинидии различного происхождения.

ПОДБОР УСЛОВИЙ ТСХ-РАЗДЕЛЕНИЯ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ, ХАРАКТЕРНЫХ ДЛЯ ВЕРЕСКОВЫХ РАСТЕНИЙ

Касьянова А.П., Березина Е.В., Брилкина А.А.

ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского», Нижний Новгород, Россия

anastasiakasyanova22@mail.ru

Растения семейства *Ericaceae* (Вересковые) – богаты фенольными соединениями, которые имеют разные биологические свойства: противовоспалительные, антиоксидантные или антибактериальные, которые находят своё применение в фармакологии. Качественный состав растений можно изучать различными методами, такими как тонкослойная хроматография (ТСХ), высокоэффективная жидкостная хроматография или масс-спектрометрия. Метод ТСХ является наиболее распространённым и доступным способом определения веществ, но для фенольных соединений не установлена универсальная методика определения. Целью работы является выявление лучших условий тонкослойной хроматографии для фенольных соединений вересковых.

Экстракты фенольных соединений получены из растительных образцов брусники обыкновенной (*Vaccinium vitis-idaea* L.) и голубики щитковой (*Vaccinium corymbosum* L.) в 80- % этаноле. Для определения качественного состава данных видов использовали стандарты фенольных соединений (ФС): арбутин, ванилин, катехин, кверцетин, морин, ресвератрол, рутин, эскулин, ванилиновая, галловая, кофейная, о-кумаровая, п-кумаровая, салициловая и хлорогеновая кислоты. Тонкослойную хроматографию проводили с использованием двух типов хроматографических пластин: TLC Plates ALUGRAM Xtra SIL G / UV254 «Macherey-Nagel» (Германия) и Sorbfil ПТСХ-П-В-УФ «Сорбполимер» (Россия).

При проведении ТСХ был изначально выбран универсальный тип сольвента – бутанол:уксусная кислота: вода (БУВ) в соотношении 4:1:5. Этот состав сольвента не разделил изучаемые соединения хорошо и большинство ФС оказались на одном значении R_f , в связи с этим, соотношение компонентов было изменено на соотношение 6:1:2, тем самым повышая гидрофобность растворителя. Данное соотношение позволило немного лучше разделить ФС, но большинство из них также осталось в близком значении R_f друг от друга. Опираясь на полученные результаты, было подобрано ещё два типа соотношений БУВ – 6:1:10 и 6:2:2, увеличивая долю воды и кислоты соответственно. Также был использован сольвент – хлороформ:уксусная кислота:вода (6:1:2), который ещё больше увеличил гидрофобность, чем БУВ (6:1:2) и позволил лучше разделить соединения.

Хроматограммы проявляли двумя видами проявителей: 3% $FeCl_3$ и анисовым альдегидом (АНС). В этих проявителях большинство веществ хорошо обнаруживаются. При проявлении 3% $FeCl_3$ почти все пятна имеют разное окрашивание, но некоторые приобретают окраску не сразу и имеют одинаковый цвет, в отличие от АНС, который проявляет пятна сразу, но не все, однако, вещества, которые имели одинаковый цвет пятен в 3% $FeCl_3$, в АНС окрашиваются по-разному, в том числе и в УФ-лучах. Благодаря этому удаётся отличить друг

от друга вещества по разному значению R_f для тех веществ, которые окрашиваются одинаково. При проведении ТСХ в разных сольвентах и при нанесении проявителей удалось определить в растительных экстрактах хлорогеновую кислоту и эскулин.

Таким образом, были проанализированы разные соотношения и состав сольвента и выявлено, что в данных системах растворителей хорошо разделяются арбутин, эскулин, рутин, галловая, хлорогеновая и салициловая кислоты, но необходимо проводить двумерную тонкослойную хроматографию в разных типах сольвентов для более точного разделения других соединений.

ИЗУЧЕНИЕ ПОСТКРИОГЕННОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ ВИНОГРАДА (*VITIS VINIFERA* L.) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ УСОВЕРШЕНСТВОВАННОГО МЕТОДА «DV-BIOTECH»

Кирсанова А.С.^{1,2}, Ерастенкова М.В.¹, Ситников М.Н.¹, Ухатова Ю.В.¹

¹ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических
ресурсов растений имени Н.И. Вавилова», Санкт-Петербург, Россия

²«ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский университет ИТМО»»,
Санкт-Петербург, Россия

kir.alesya@mail.ru

Виноградарство – одна из ведущих отраслей агропромышленного комплекса России. Основные культивируемые сорта винограда относятся к виду *V. vinifera*. В полевых условиях этот вид значительно подвержен воздействию стрессовых факторов, что делает актуальной разработку методов сохранения ценного посадочного материала. Одной из наиболее эффективных стратегий сохранения растений считается метод криоконсервации. В данном исследовании оценена регенерационная способность почек винограда *V. vinifera* в культуре *in vitro*, предложен модифицированный протокол криоконсервации «DV-biotech» и определены оптимальные условия для подготовки растений к замораживанию и восстановлению после криосохранения.

Материалы и методы. Исследование проводилось в ЦКП «Лаборатории искусственного выращивания и оздоровления генофонда растений» на базе ФГБНУ «Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР)». В качестве объектов были выбраны 6 сортов винограда *V. vinifera*, из ампелографической коллекции ВИР: 'Мускат Южнодагестанский' (к-41662); 'Баян Ширей' (к-41782); 'Рислинг' (к-41824); 'Изабелла' (к-41805); 'Кишмиш Тумут' (к-41689); 'Чёрный ДОС ВИР' (к-41699).

На первом этапе оценивалась жизнеспособность и скорость побегообразования. Для этого 30 черенков с одной почкой культивировали *in vitro* на средах Мурасиге-Скуга (МС), без гормонов и с добавлением 1 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП). Для каждого сорта определяли показатель коэффициента микрклонального размножения (КМР) в трёхкратной повторности. Образцы выращивали в условиях световой комнаты: +24-25°C, фотопериод- 16 часов. Измерения КМР у *in vitro* образцов проводили в асептических условиях каждые 5 суток в течение 40 дней.

В работе использовались 3 методики криоконсервации растений: 1. Оригинальный метод «DV-biotech» - рассматривался как контрольный; 2. Модифицированный метод криоконсервации с предшествующей ей акклиматизацией (+4°C) растений в течении 2 месяцев; 3. Модифицированный метод криоконсервации с прекультивацией микрочеренков в течение 3 недель на специальных средах. Для каждой из модифицированных методик оценивалась регенерационная способность 30 почек в 2 повторностях.

Результаты и обсуждение. По результатам оценки, показатели КМР у исследуемых сортов варьировались от 1,3 до 3,8 на среде МС и от 3,9 до 10,4 на среде МС с БАП, что,

возможно, свидетельствует о высоком влиянии на побегообразование у данного фитогормона. Сорт 'Мускат Южнодагестанский' по результатам регенерации был выбран для дальнейшей работы по апробации и модификации методики криоконсервации.

Обе модифицированные методики криоконсервации превзошли контрольный метод (22%) по показателю регенерации почек. Уровень посткриогенной регенерации для методики с предварительной культивацией равнялся 22% для пазушных почек и 41,7% для апикальных. Процент образования растений-регенерантов для методики с акклиматизацией перед криоконсервацией составил 42,2%.

Выводы. В процессе исследования были выявлены генотипы винограда с высоким показателем регенерационной способности в культуре *in vitro*. Также был апробирован протокол «DV-biotech» для криоконсервации винограда, с использованием методик прекультивирования и акклиматизации растений.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ АРБУСКУЛЯРНОЙ МИКОРИЗЫ И
ДЕФИЦИТА ВОДЫ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ АКВАПОРИНОВ
В МОДЕЛЬНОМ РАСТЕНИИ *MEDICAGO LUPULINA*

Копылова Н.В.^{1,2}, Кудряшова Т.Р.², Крюков А.А.²

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

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

ninzinya@mail.ru

Арбускулярная микориза (АМ) – широко распространенный симбиоз, улучшающий минеральное питание и повышающий устойчивость растений к различным стресс-факторам. В ходе симбиоза морфологические изменения в клетках корня влияют на экспрессию генов аквапоринов, что обеспечивает эффективное поглощение воды и питательных веществ и адаптацию к дефициту воды. Несмотря на данные о дифференциальной регуляции генов аквапоринов у растений инокулированных грибами арбускулярной микоризы (АМГ) при водном дефиците, клеточные и молекулярные механизмы этих реакций остаются неясными. С целью прояснения этих механизмов, данное исследование направлено на оценку изменений в уровне экспрессии генов аквапоринов при развитии АМ-симбиоза и его отсутствии в условиях дефицита воды.

В ходе работы использовалась высокоотзывчивая на инокуляцию АМ линия *MIS-1 Medicago lupulina*, отличительной чертой которой является проявление признаков карликовости в отсутствие инокуляции АМ-грибом, а также высокоэффективный штамм RCAM00320 *Rhizophagus irregularis*, отобранный из коллекции ФГБНУ «ВНИИСХМ». Для выявления генов аквапоринов, наиболее чувствительных к водному стрессу, был проведен эксперимент с использованием двух вариантов: растения, инокулированные корнями *P. australis*, микоризованными *R. irregularis* штаммом RCAM00320, и контрольные растения, без инокуляции. Для моделирования почвенной засухи содержание воды в почве поддерживалось на уровне 40% от полной влагоемкости (ПВ). Учет параметров роста и сбор образцов для последующих анализов производились в фазу начала развития второго настоящего листа (21-е сутки) и фазу начала цветения (48-е сутки). Для оценки продуктивности растений измеряли такие параметры как высота главного стебля, сырая и сухая масса надземной части и корневой системы. Для оценки экспрессии методом ПЦР-РВ были выбраны следующие гены: *NIP3.1*, *NIP4.1*, *TIP4.1*, *XIP1.1*, *TIP5.1*, *TIP3.1*, *NIP4.2*, *NIP7.1*, *PIP2.3*, *PIP1.3* и *PIP1.4*.

Для всех проанализированных генов аквапоринов наблюдалась дифференциальная экспрессия в корнях и листьях, в зависимости от стадии развития растения. В условиях засухи колонизация АМГ вызывала снижение экспрессии *NIP3.1*, *NIP4.1*, *NIP4.2*, *PIP2.3*, *PIP1.4*, *XIP1.1*, *TIP3.1*, *TIP4.1*, а также повышение экспрессии *NIP7.1*, *PIP1.3* в корнях на 21-е сутки развития растения. При этом к фазе цветения большинство генов продемонстрировали значительное увеличение экспрессии в корнях АМ растений, за исключением *TIP4.1*, *TIP3.1*, *PIP2.3*. В листьях микоризованных растений на 21-сутки

развития отмечалось увеличение экспрессии *TIP5.1*, *NIP4.2*, *PIP1.4*, *PIP1.3*, *NIP7.1*, *XIP1.1*, и подавление *TIP4.1*, *NIP4.1*, *TIP3.1*, *PIP2.3*. В фазу цветения АМГ способствовали подавлению экспрессии *NIP4.1*, *NIP7.1*, *TIP3.1*, *NIP4.2*, *PIP2.3*, в то время как экспрессия других генов аквапоринов увеличивалась. Кроме того, у растений с АМ наблюдались положительные физиологические эффекты, включая увеличение сухой массы надземных частей и корней, а также большую высоту по сравнению с растениями, не образующими АМ-симбиоз.

Полученные результаты подтверждают важную роль арбускулярной микоризы в модуляции экспрессии генов аквапоринов у люцерны при дефиците воды. В дальнейшем планируется сравнительный анализ экспрессии генов аквапоринов в микоризованных растениях люцерны при дефиците воды и при нормальном увлажнении.

Работа поддержана грантом РФФ № 24-26-00181.

НАКОПЛЕНИЕ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ *BRACTEACOCCLUS MINOR* ПРИ РОСТЕ В АФОТИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ НА СРЕДЕ, ОБОГАЩЕННОЙ ГИДРОКАРБОНАТОМ

Кочубей А.В., Яковийчук А.В., Пшеничный Д.В., Дукова И.С., Ковецкий О.В.

ФГБОУ ВО Мелитопольский государственный университет, Мелитополь, Россия

KochubeyA92@yandex.ru

Зелёные водоросли (*Chlorophyta*) – одна из самых многочисленных групп, среди которых особое место занимают микроводоросли. Микроводоросли – группа фотоавтотрофных организмов, а также организмов, способных к гетеротрофному, миксотрофному и фотогетеротрофному существованию (Xiao et al. 2020). Многие из них изучаются как перспективные объекты для использования в биотехнологических производствах (Maltsev et al. 2020). Известно, что комбинации способа получения энергии и способа усвоения углерода у микроводорослей очень разнообразны, что проявляется в большом разнообразии типов обмена веществ и продуктов метаболизма. С точки зрения осуществления автотрофного роста, первоочередное значение имеет свет (Park et al. 2021).

Существует практика применения абиотического стресса, в том числе темнового, с целью стимулирования синтеза экономически ценных метаболитов. При этом в качестве источника углерода может быть использован гидрокарбонат (HCO_3^-) (Pancha et al. 2017; Kim et al. 2019).

Вид *Bracteacoccus minor* (Schmidle ex Chodat) Petrová выбран для исследований как перспективный продуцент вторичных метаболитов (Maltsev et al. 2020). Этот вид встречается в различных почвенных и водных экосистемах. В качестве объекта исследования использовали штамм SAMU MZ-Ch 39. Для эксперимента использовали культуру, выращенную на среде ВВМ на протяжении 15 при стандартном освещении. Для изучения накопления вторичных метаболитов культуру клеток *B. minor* переносили в свежеприготовленную среду ВВМ и далее выращивали: 1 – при стандартном освещении (контроль); 2 – при полном затемнении и с добавлением HCO_3^{2-} в концентрации $6,75 \text{ г/л}^{-1}$ в среду ВВМ. Содержание вторичных метаболитов, а именно аскорбиновой кислоты, α -токоферола и фенольных соединений было изучено на ранней логарифмической фазе после 96 часов культивирования. При росте штамма *B. minor* в заданных экспериментальных условиях содержание α - токоферола понижалось в 4,7 раз в сравнении с контролем. Культивирование на ВВМ в стандартных условиях показало наивысшую концентрацию аскорбиновой кислоты в биомассе штамма, составляющую $10,3 \pm 0,85 \text{ мг/г}$. В условиях полного затемнения с добавлением гидрокарбоната содержание аскорбиновой кислоты на 38% ниже относительно контроля. Содержание фенольных соединений достоверно снижалось на 36,6% в афотических условиях с добавлением гидрокарбоната относительно стандартных условий.

Работа поддержана грантом РФФ № 24-74-00132.

РОЛЬ РИЗОСФЕРНЫХ БАКТЕРИЙ В СНИЖЕНИИ ТОКСИЧНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ЦИНКА НА ПШЕНИЦУ МЯГКУЮ (*TRITICUM AESTIVUM* L.)

Крюкова В.А., Гуреева М.В., Гуреев А.П.

ФГБОУ ВО Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

vera.kryukova2017@yandex.ru

Цинк (Zn) выступает одним из природных компонентов почвы в наземных экосистемах. Но в последнее время развитие промышленности и антропогенной деятельности приводит к существенному загрязнению почвы. Повышенная концентрация Zn оказывает негативный эффект на сельскохозяйственные культуры. Среди зерновых культур пшеница *Triticum aestivum* L. занимает ведущее место как наиболее ценная продовольственная культура в большинстве стран мира. На основе микробиологических препаратов создаются инокулянты, которые способны также оказывать стимулирующий эффект на сельскохозяйственные культуры. Представители рода *Azospirillum* ассоциируются со многими сельскохозяйственными культурами и способствуют росту и урожайности этих культур.

В полевом эксперименте было изучено влияние совместной инокуляции металла и *Azospirillum* на показатели урожайности пшеницы. Нами были инокулированы семена пшеницы бактериями рода *Azospirillum* и *Niveispirillum*, такими как *A. brasilense*, *A. picis*, *A. baldaniorum*, *N. irakense* и посажены в почву, обработанную тяжелым металлом. Высокая концентрация Zn вызывала уменьшение длины стебля и колоса. В тех группах, в которых семена выращивались в загрязненной Zn почве и одновременно были инокулированы *A. baldaniorum*, длина стебля и колоса увеличивалась относительно контроля и загрязненной почвы. Также стимулированию длины относительно контроля способствовала *N. irakense*. Zn также приводил к снижению количества зерен в группе, при этом *A. brasilense*, *A. picis*, *A. baldaniorum* повышали количество семян относительно пшеницы, выращенной в загрязненной почве. В горшечном эксперименте Zn приводил к снижению Mg, Si, K в проростках, в то время бактерии поддерживали уровень макро- и микроэлементов в проростках. Причем *A. baldaniorum* увеличивал уровень Mg и K. Также токсический уровень Zn способствовал снижению биомассы пшеницы, при этом *N. irakense* увеличивал массу корней по отношению к группе, выращенной в загрязненной почве, а *A. brasilense* увеличивал массу побегов по отношению к контролю. Zn вызывал увеличение уровня МДА, при этом *N. irakense* в 3 раза снижал его уровень в побегах, аналогичные данные были получены при измерении концентрации глутатиона в побегах. Минимальная концентрация была обнаружена в группе Zn + *A. brasiliense*. В корнях минимальная концентрация МДА наблюдалась в группе, выращенной в загрязненной цинком почве с инокулированными бактериями *N. irakense* и *A. brasiliense*. Zn вызывал увеличение экспрессии генов, отвечающих за синтез глутатиона и его конъюгацию с тяжелыми металлами, в том числе Zn. Бактерии препятствовали повышению экспрессии данных генов, что может указывать на то, что растения, инокулированные микроорганизмами, испытывали меньше окислительного стресса от выращивания на почве с добавлением Zn. Таким образом, мы показали, что многие штаммы *Azospirillum* обладают потенциалом для смягчения токсического действия Zn и повышения продуктивности пшеницы.

Работа поддержана грантом РФФ № 23-24-00277.

ВЛИЯНИЕ СВЕТОВОЙ СРЕДЫ РАЗЛИЧНОГО СПЕКТРАЛЬНОГО СОСТАВА НА ПРОДУКТИВНОСТЬ И БИОХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ РАСТЕНИЙ САЛАТА

Кулешова Т.Э., Удалова О.Р., Хомяков Ю.В., Панова Г.Г.

ФГБНУ Агрофизический научно-исследовательский институт, Санкт-Петербург, Россия

kuleshova@agrophys.ru

Световая среда является одним из важнейших факторов, влияющих на физиологические параметры растений. При правильном выборе условий освещения можно контролировать рост растений и регулировать биохимический состав, что является перспективной экологически безопасной альтернативой химическим регуляторам роста.

Цель данной работы заключалась в исследовании особенностей влияния полноспектрального состава фотосинтетически активной радиации, моделирующей солнечное освещение, на морфологические и биохимические параметры листовых культур. Объектом исследования служили растения салата (*Lactuca sativa* L.), различающихся эффективностью работы фотосинтетического аппарата: сорта Балет, Кокарда (коллекция ФГБНУ ФИЦ ВИР), Меркурий (ГК «Гавриш»), Дубрава (ООО «Флагман»), Робин (АО «ССП «Сортсемовощ»). Растения выращивали в регулируемых условиях интенсивной светокультуры на агробиополигоне ФГБНУ АФИ. Источником света служили разработанные нами светодиодные светильники со спектральным составом в видимой области, приближенным к солнечному свету: AFI-3000 – когда солнце находится у горизонта и AFI-5000 – близким к освещению в полдень с соотношением синего:зеленого:красного диапазонов спектра 11%:35%:54% и 25%:38%:37%, соответственно. На основании ранее полученных результатов формировали одинаковую, благоприятную по величине плотность фотосинтетического потока фотонов – 180 ± 20 мкмоль/(м²·с), фотопериод – 14 часов/сутки.

При освещении салата в процессе развития источником света AFI-3000 в получаемой растительной продукции наблюдалось достоверное увеличение содержания сухого вещества на 19% и 23% для сортов салата Дубрава и Кокарда; фоточувствительных пигментов – суммы хлорофиллов на 31%, 36%, 48% и каротиноидов на 27%, 39%, 26% для сортов Меркурий, Балет, Робин; дисахаров на 22% и 56% для сортов Дубрава и Балет; магния на 27% для сорта Кокарда и в виде тенденции на 5-14% для остальных сортов; железа на 20% для сорта Меркурий, меди на 20%, 53%, 18% для сортов Меркурий, Балет, Робин по сравнению с освещением светильниками AFI-5000. Использование варианта освещения с большей долей содержания синей составляющей в спектре (AFI-5000) привело к повышению количества моносахаров на 36%, 16%, 17% для сортов салата Меркурий, Дубрава, Балет; витамина С на 20%, 32% для сортов Дубрава, Балет; калия на 22%, 21% для сортов Робин и Кокарда; марганца на 59%, 68%, 59% для сортов Меркурий, Дубрава, Балет и цинка на 15-41% для исследованных сортов. Значимое уменьшение содержания нитратов на 19% для сорта Робин отмечалось при применении светильников AFI-3000 и в виде тенденции на 13% и 9% для сортов Меркурий и Дубрава при облучении AFI-5000. Достоверных различий в содержании азота, фосфора и кальция отмечено не было. Общая урожайность растений салата сорта Меркурий, Дубрава,

Балет, Робин, Кокарда за один вегетационный период (30 дней) была в диапазоне 2,1-5,7 кг/м² с одного яруса при облучении светильниками AFI-3000 и 1,7-6,3 кг/м² с одного яруса для варианта AFI-5000.

На основе полученных данных можно предположить, что большая доля красного диапазона в спектре освещения приводила к более интенсивному синтезу фотосинтетических пигментов, дисахаров и меди, а увеличенная составляющая синей области спектра формируемой световой среды способствовала накоплению витамина С, калия, цинка и марганца.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ СТЕВИИ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ СТЕВИОЗИДА

Куцов С.В.¹, Орехова А.А.², Васильченко Е.Н.¹, Черкасова Н.Н.¹, Ткаченко О.В.¹

¹ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свёклы и сахара
им. А.Л. Мазлумова, Россия, Воронеж

²ФГБОУ ВО Воронежский государственный университет инженерных технологий,
Россия, Воронеж

KutsovSV@bk.ru

В лабораторных исследованиях по молекулярной биологии, физиологии, генетике, и цитологии растений одну из ведущих ролей играют методы культивирования растительных клеток *in vitro*. Эти методы нашли также и прикладное применение в сельском хозяйстве. Особенно востребованы клональное микроразмножение, межвидовая гибридизация, гиногенез, генетическая трансформация, клеточная селекция с использованием селективных систем *in vitro*, мутагенез для расширения спектра формообразования, создания константных линий, ускорения селекционного процесса.

Актуальность выведения высокопродуктивных сортов и гибридов *Stevia rebaudiana* значительно возросла в конце XX – начале XXI века в связи с растущим интересом к здоровому питанию, профилактике ожирения и сахарного диабета. Широкое распространение *Stevia rebaudiana* в сельском хозяйстве ограничено рядом факторов, включая относительно низкую урожайность, вариабельность гликозидного состава и сложности, возникающие при селекции.

Stevia rebaudiana Bertoni – многолетнее травянистое растение семейства *Asteraceae*, достигающее высоты 0,8-1,0 м. В стевии содержатся 17 аминокислот, эфирные масла, апигенин, кампестерол, стевиол, флавоноиды и гликозиды (18 – 20 %), такие как стевиозид и ребаудиозид А, В, Е и др. Гликозиды придают этому растению сладко-горький вкус. Наибольшее скопление гликозидов находится в листьях и цветках. *Stevia rebaudiana Bertoni* характеризуется незначительной калорийностью, однако интенсивность ее сладости в 250-300 раз превышает аналогичный показатель сахарозы. Комплексный биохимический состав листьев и цветков обуславливает высокую фармакологическую ценность.

Одним из основных факторов, лимитирующим широкое использование сахарозаменителя из *Stevia rebaudiana Bertoni* является его горький привкус, присущий готовому продукту из-за вариабельности гликозидного состава. Концентрация и соотношение различных стевиолгликозидов (например, стевиозида и ребаудиозида А) в листьях и цветках *Stevia rebaudiana* характеризуются высокой степенью вариабельности, обусловленной генотипом, условиями культивирования и фазой онтогенеза. При этом содержание ребаудиозида А, характеризующегося наиболее благоприятными органолептическими свойствами, как правило, невелико. Добиться оптимального гликозидного состава можно при помощи клонального микроразмножения стевии с заданными свойствами.

Высокая интенсивность сладости, низкий гликемический индекс и нулевая калорийность определяют *Stevia rebaudiana* как ценный природный подсластитель, что обуславливает приоритетность селекции высокопродуктивных сортов и гибридов с целью удовлетворения растущего спроса на натуральные подсластители и реализации всего потенциала данной культуры.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о необходимости соблюдения строгих асептических условий на этапе инициации культуры *Stevia rebaudiana in vitro*. Оптимальные показатели прорастания и развития проростков наблюдались при использовании двухэтапной стерилизации: предварительная обработка 96 % этанолом (экспозиция 10 секунд) с последующей обработкой 10 % раствором хлорамина в течение 10 минут.

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ БИКАРБОНАТА И КАРБОАНГИДРАЗ В ПОДДЕРЖАНИИ pH ЛЮМЕНА ТИЛАКОИДОВ

Маркин Р.В., Иванов Б.Н., Козулева М.К.

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

romanmarkin998@gmail.com

Фотосинтетический электронный транспорт сопряжен с созданием на тилакоидной мембране градиента pH, когда в тилакоидный люмен поступают H⁺. Градиент pH необходим для синтеза АТФ, транспорта ионов, запуска ряда регуляторных процессов. Определенное значение pH в люмене также поддерживается за счет буферной емкости люмена тилакоидов. Буферная емкость поддерживается боковыми группами аминокислотных остатков обращенных в люмен частей мембранных белков (Gerland et al., 2020) и слабыми органическими основаниями, такими как путресцин (Ioannidis et al., 2006). Было выдвинуто предположение, что в буферную емкость люмена может вносить вклад бикарбонат/CO₂-буферная система, функционирующая с помощью тилакоидных и люменальных карбоангидраз (КА) – ферментов, катализирующих взаимоконверсию бикарбоната и CO₂ (Иванов и Руденко, 2024).

В этой работе при помощи ряда подходов оценивалось влияние добавки бикарбоната в суспензию тилакоидов гороха посевного (*Pisum sativum*) на процессы, зависящие от величины pH люмена и которые поэтому можно использовать в качестве косвенного показателя изменений pH люмена. Возможное участие тилакоидных КА определяли с использованием сульфонамидных ингибиторов КА: гидрофильного мафенида и липофильного этоксизоламида.

Увеличение концентрации бикарбоната в среде с 0,4 до 10,4 мМ не влияло на эффективность донирования электронов к фотосистеме 1 редокс-медиатором N,N,N',N'-тетраметил-*p*-фенилендиамином, не чувствительного к изменениям pH люмена, но приводило к увеличению эффективности донирования от 2,6-дихлорфенолиндофенола, чувствительного к изменениям pH люмена. Это указывает на то, что добавка бикарбоната приводит к защелачиванию люмена тилакоидов. Ингибиторы КА также увеличивали эффективность донирования электронов к фотосистеме 1 от 2,6-дихлорфенолиндофенола, что указывает на то, что ингибируемая ими КА препятствует защелачиванию люмена.

Увеличение концентрации бикарбоната до 10,4 мМ также приводило к трехкратному уменьшению концентрации NH₄Cl, необходимой для достижения полумаксимального эффекта разобщения электронного транспорта на изолированных тилакоидах гороха. Поскольку разобщитель «уравнивает» pH внутри и снаружи тилакоидной мембраны, то меньшие концентрации разобщителя указывают на меньшую разницу между pH люмена тилакоидов и pH внешней среды, что обусловлено защелачиванием люмена при добавке бикарбоната.

Таким образом, с помощью двух независимых подходов показано, что добавка бикарбоната в среду реакции приводит к защелачиванию люмена выделенных тилакоидов. Эффект ингибиторов КА указывает на участие тилакоидных КА в поставке неорганического углерода в люмен и катализе взаимоконверсии CO_2 и бикарбоната в люмене. Какая (какие) из них ответственна за наблюдаемые эффекты, пока не установлено.

РОЛЬ КРИПТОХРОМА 1 В РЕГУЛЯЦИИ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ
SOLANUM LYCOPERSICUM ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ СИНЕГО И ЗЕЛЕННОГО СВЕТА

Мейстер Д.В.¹, Верещагин М.В.¹, Глушко Г.В.¹, Кособрюхов А.А.², Креславский В.Д.²,
Абрамова А.А.¹, Пашковский П.П.¹

¹ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия

²Институт фундаментальных проблем биологии РАН – обособленное подразделение ФГБУН
ФИЦ Пушчинский научный центр биологических исследований РАН, Пушино, Россия

diana-msr@mail.ru

Криптохромы (CRY1a, CRY1b и CRY2) – фотосенсоры синего и ультрафиолетового А света. Синий свет активирует криптохромы и фототропины, тогда как зелёный свет может восприниматься как рецепторами синего света, так и другими светочувствительными молекулами и рецепторами, включая фитохромы (phyA, phyB), фототропины (PHOT1, PHOT2) и белки ZEITLUPE-подобной группы. Изучение совместного действия синего и зелёного света позволяет выявить влияние этих спектров на механизмы фотосинтетической регуляции, особенно у растений с нарушенной функцией криптохрома 1.

В работе исследованы растения *S. lycopersicum* дикого типа и мутанты *cry1* при освещении синим (450 нм), зелёным (525 нм) и их сочетанием. Анализ включал параметры флуоресценции (Fv/Fm, qP), газообмена (Pn, gs, Tr), нефотохимическое тушение (NPQ), содержание хлорофиллов и каротиноидов, а также параметры фотосинтеза на основе углекислотных кривых Pn/Ci.

У дикого типа синий свет усиливал эффективность фотохимических реакций, транспирацию и проводимость устьиц. У *cry1* эти показатели изменялись слабо, что подтверждает участие CRY1 в активации первичных светозависимых процессов. При зелёном освещении у WT наблюдалось снижение транспорта электронов, TPU и Pn, несмотря на высокое значение V_{сmax}. У мутантов *cry1* снижение было менее выраженным, а при увеличении концентрации CO₂ наблюдалась активизация карбоксилирования, что может быть связано с участием фототропинов и фитохромов в компенсации дефицита CRY1.

Комбинированное освещение увеличивало содержание пигментов у обеих линий. У *cry1* наблюдалось усиление фотосинтетического отклика и максимальной скорости фиксации CO₂, что отражает функциональную перестройку регуляторных каскадов. Результаты подтверждают участие криптохрома 1 в контроле световой стадии фотосинтеза и устьичной проводимости, а также выявляют адаптационные механизмы при его отсутствии.

Работа поддержана грантом РФФ № 23-14-00266.

ХОЛОДОУСТОЙЧИВОСТЬ *SOLANUM LYCOPERSICOIDES* ОБУСЛОВЛЕНА
АЛЬТЕРНАТИВНЫМ МЕХАНИЗМОМ, РАНЕЕ НЕ ВЫЯВЛЕННЫМ
В СЕМЕЙСТВЕ *SOLANACEAE*

Миловская И.Г.¹, Воронков А.С.¹, Иванова Т.В.¹, Пиотровский М.С.¹, Тихонов А.Н.²,
Трубицин Б.В.², Трофимова М.С.¹, Кузнецов Вл.В.¹, Пашковский П.П.¹

¹ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия

²ФГОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»,
Москва, Россия

irina.20152016@mail.ru

Мембраны являются первыми структурами клетки, реагирующими на изменения температуры, и их текучесть играет ключевую роль в устойчивости растений к холоду. Традиционно считалось, что более высокая ненасыщенность жирных кислот (ЖК) в мембранах способствует их текучести, что коррелирует с повышенной холодоустойчивостью. Однако механизм этой связи остается не до конца изученным.

В данном исследовании анализировались свойства плазматической мембраны у двух контрастных по устойчивости к холоду видов томатов: *S. lycopersicum* (теплолюбивый) и *S. lycopersicoides* (горный, холодоустойчивый). Используя методы газохроматографического анализа (ГЖХ-МС) и электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), мы сравнили жирнокислотный (ЖК) состав мембран и их текучесть.

Показано, что у *S. lycopersicoides* в контрольных условиях индекс ненасыщенности мембран выше, чем у *S. lycopersicum*, что могло бы указывать на их большую текучесть. Однако данные ЭПР свидетельствуют об обратном: мембрана *S. lycopersicoides* оказывается жестче, чем у *S. lycopersicum*. Это противоречие указывает на то, что жесткость мембраны определяется не только уровнем ненасыщенности липидов, но и другими факторами, такими как организация липидного бислоя, наличие стеролов или белковых комплексов.

Дополнительно обнаружено, что у *S. lycopersicoides* отсутствует четкая "типизация" мембранных фракций: их ЖК-состав различается между различными мембранными компартментами в меньшей степени, чем у *S. lycopersicum*. Это может быть адаптивной стратегией, обеспечивающей универсальность мембран при колебаниях температуры.

Полученные данные демонстрируют, что жесткость плазматической мембраны у холодоустойчивого горного томата не связана напрямую с ненасыщенностью липидов, что требует пересмотра традиционных представлений о регуляции мембранной текучести в адаптации растений к холоду.

Работа поддержана грантом РНФ № 23-14-00266.

АКТИВНОСТЬ ПЕРОКСИДАЗЫ В ЛИСТЬЯХ ГАЛОФИТОВ ЛИТОРАЛИ БЕЛОГО МОРЯ НА ПРИМЕРЕ *TRIGLOCHIN MARITIMA* L.

Павлова М.А., Терехова Е.Н.

ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет», Петрозаводск, Россия

mariya-leta@yandex.ru

Пероксидаза – фермент класса оксидоредуктаз, использующий в качестве акцептора электронов перекись водорода H_2O_2 . Это один из базовых ферментов антиоксидантной системы, встречающийся как у растений, так и у животных. В клетке пероксидазы присутствуют как в свободной форме в цитоплазме, так и в связанной с клеточной стенкой форме. Они участвуют в дыхании и фотосинтезе, например, в качестве катализатора окисления дыхательных хромогенов в дыхательные пигменты. Активность пероксидазы чувствительна к стрессу, поэтому ее изменение может стать его индикатором. Активность пероксидазы была исследована в листьях триостренника приморского (*Triglochin maritima* L.), обитающего на литорали в условиях приливно-отливной динамики Белого моря. Образцы для исследования были отобраны на прибрежной территории Поморского берега Белого моря вблизи д. Растьяноволок (Беломорский район) в 2023 году.

Исследование активности пероксидазы проводили на базе кафедры ботаники и физиологии растений ПетрГУ методом спектрофотометрии на спектрофотометре СФ-2000. Среда инкубации для определения активности фермента и подбор условий осуществлялись согласно методике (Ershova et al., 2022). Субстратом реакции является перекись водорода, донором водорода – гваякол. Исследования проводились в диапазоне pH 5 – 8.5.

Наибольшую активность пероксидаза листьев *Triglochin maritima* проявила в кислой среде (pH 5.0). Во время прилива она составила 54,77 мкмоль тетрагваякола (ТГ)/мг. По мере выщелачивания среды активность снижалась: при pH 7.0 она составила 45,09 мкмоль ТГ/мг, а при pH 8.5 – 32,48 мкмоль ТГ/мг. Во время отлива закономерность сохранилась: при pH 5.0 – 32,37 мкмоль ТГ/мг, pH 7.0 – 28,18 мкмоль ТГ/мг, а при pH 8.5 – 23,42 мкмоль ТГ/мг.

Достоверно показано, что активность пероксидазы повышается во время прилива. Среднее значение активности в прилив – 44,12 мкмоль ТГ/мг, а в отлив – 27,99 мкмоль ТГ/мг (t-тест $\ll 0.05$).

Пик активности пероксидазы при pH 5.0 подтверждается исследованиями на других растениях (например, на топинамбуре (Степура и др., 2010), на сосне европейской (Ershova et al., 2022)).

Повышение активности пероксидазы, в целом, говорит о том, что организм включает свои защитные механизмы, испытывая некий стресс. Во время прилива растения триостренника приморского полностью покрыты морской водой и испытывают воздействие сразу нескольких неблагоприятных факторов среды: засоление, затопление, гипоксия. В данном исследовании было показано, что значительное повышение активности фермента происходит именно в прилив.

Таким образом, можно заключить, что пероксидаза в листьях *Triglochin maritima* L. имеет свой оптимум активности в кислой среде (pH 5.0) и повышает ее в условиях заливания листьев морской водой, что связано с ролью пероксидазы в регулировании пула АФК.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда Российской Федерации (тема № 23-67-10006).

ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИЙ НОВЫХ РЕГУЛЯТОРНЫХ ПЕПТИДОВ, УЧАСТВУЮЩИХ
В СИСТЕМНОМ КОНТРОЛЕ КЛУБЕНЬКООБРАЗОВАНИЯ У РАСТЕНИЯ ЛЮЦЕРНЫ
MEDICAGO TRUNCATULA, С ПОМОЩЬЮ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВЕКТОРОВ

Петренко В.А., Лебедева М.А., Бердиган Р.Д., Лутова Л.А.

ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

drpetrenko@yandex.ru

Мутуалистическое взаимодействие растений семейства Fabaceae с ризобиями, группой азотфиксирующих бактерий – исключительное явление, позволяющее растениям за счёт эндогенных микроорганизмов усваивать атмосферный азот и проявляющееся в виде образования из клеток нерегулярной меристемы боковых органов – симбиотических клубеньков. В ризосфере растение выделяет флавоноиды – индукторы бактериальных генов, отвечающих за синтез Nod-факторов, которые в свою очередь, связываясь с LysM-подобными рецепторами в корнях растений, запускают сигнальный каскад, запускающий клубенькообразование. Растения обладают системой авторегуляции клубенькообразования (AON) для ограничения количества инфекций, вызванных ризобиями, и числа клубеньков, поскольку данное симбиотическое взаимодействие требует энергетических затрат.

CLE-пептиды являются негативными регуляторами клубенькообразования, действуя по механизму обратной отрицательной связи (Reid et al., 2011). Экспрессия генов, кодирующих CLE-пептиды, активируется на ранних стадиях развития клубенька в корнях бобовых растений, инокулированными ризобиями. Ранее мы показали, что у люцерны *Medicago truncatula* со сверхэкспрессией гена *MtCLE35* не происходит образования клубеньков, поскольку подавляется экспрессия генов, задействованных в программе их развития (Lebedeva et al. 2024).

Помимо ранее описанных как негативных регуляторов клубенькообразования пептидов *MtCLE12*, *MtCLE13* и *MtCLE35*, в этом семействе есть не охарактеризованные пептиды, среди них - *MtCLE29*, похожий по последовательности аминокислотного состава на *MtCLE35* – они отличаются только одной аминокислотой (аргинин в *MtCLE29* и гистидин в *MtCLE35* на 10 позиции CLE-домена). Согласно результатам qPCR и доступным RNA-seq транскриптомным данным (MtExpress V3, NCBI BioProject PRJNA391316), уровень экспрессии *MtCLE29* повышен в развивающихся клубеньках. Для выявления роли данного белка в системной регуляции образования клубеньков нами были получены конструкции со сверхэкспрессией гена *MtCLE29*. Кроме того, анализируя аминокислотные последовательности пептидов CLE, мы обнаружили, что пептид *MtCLE14* имеет четыре аминокислотных повторности, соответствующих CLE-домену *MtCLE35*.

Другое семейство системно действующих пептидов - CEP, напротив, являются положительными регуляторами клубенькообразования. С помощью исследований с прививкой и расщеплением корня было выявлено, что *MtCEP7* системно увеличивает количество клубеньков (С. Laffont et al. 2020). Чтобы установить взаимодействие негативных *MtCLE35* и позитивных *MtCEP7* регуляторов образования клубеньков, нами создан

плазмидный вектор со вставкой гена *MtCEP7* под конститутивным промотором (35S::*MtCEP7*).

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).

ОСОБЕННОСТИ ФОТОСИНТЕЗА РАСТЕНИЙ *ARABIDOPSIS THALIANA* С НОКАУТОМ
ГЕНОВ ХЛОРОПЛАСТНЫХ КАРБОАНГИДРАЗ *AKA1* И *BKA1* ПРИ АККЛИМАЦИИ К
ВЫСОКОЙ ОСВЕЩЕННОСТИ

Рупперт М.Ю., Руденко Н.Н., Игнатова Л.К., Надеева Е.М.,
Ветошкина Д.В., Иванов Б.Н.

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

ms.maria502@mail.ru

Карбоангидраза (КА, карбонатгидролизаза, КФ 4.2.1.1.) – фермент, широко представленный в разных типах организмов, катализирующий обратимую реакцию превращения углекислого газа (CO_2) в водной среде в ион бикарбоната (HCO_3^-) и протон (H^+). В клетках большинства высших растений с С3-типом фотосинтеза обнаружено около 20 генов, кодирующих КА трех семейств: α , β и γ . Вдобавок представители этих семейств имеют несколько изоформ, которые располагаются в различных компартментах растительной клетки. КА играют важную роль в жизнедеятельности растений, поскольку участвуют в поставке неорганического углерода ($\text{C}_{\text{неорг}}$) различным метаболическим путям, обеспечивают поддержание определенного уровня рН растительной клетки, а также участвуют в синтезе различных фитогормонов.

Основным участником цикла Кальвина-Бенсона, каскада биохимических реакций, которые, в конечном счете, образуют глицеральдегид-3-фосфат – ключевой интермедиат синтеза различных углеводов, является рибулозобисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа (РБФК/О), фермент стромы хлоропластов, необходимый для непосредственной ассимиляции $\text{C}_{\text{неорг}}$. Остается невыясненным вопрос о возможной поставке РБФК/О его непосредственного субстрата (CO_2) самыми распространенными изоформами КА в данном компартменте – αKA1 и βKA1 . Спонтанное превращение HCO_3^- в CO_2 может лимитировать процесс фотосинтеза и оказывать влияние на скорость синтеза органических веществ, а значит и на продуктивность растения.

Для исследования участия роли КА в возможной поставке CO_2 РБФК/О были проведены следующие эксперименты. Растения *A. thaliana* дикого типа (экотип «Columbia») (ДТ) и гомозиготные растения с нокаутированным геном *At3g52720*, кодирующим αKA1 ($\alpha\text{KA1-KO}$), а также гомозиготные растения с нокаутированным геном *At3g01500*, кодирующим βKA1 ($\beta\text{KA1-KO}$), выращивали при низкой интенсивности света (НС, 50-70 мкмоль квантов $\cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$). Часть растений адаптировали в течение 14-28 дней к высокой интенсивности света (ВС, 400 мкмоль квантов $\cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$), так как мутантные растения, зачастую, лучше всего проявляют различия с ДТ в стрессовых условиях. Проводили оценку следующих характеристик: КА активности стромальных препаратов, скорости электронного транспорта, параметров газообмена, величины протон-движущей силы и ее компонентов, уровня экспрессии генов, кодирующих хлоропластные КА и маркеры стресса, а также уровня содержания крахмала и пероксида водорода в листьях.

Скорость ассимиляции CO_2 при НС была ниже в мутантных растениях по обеим КА, чем в растениях ДТ, при этом содержание CO_2 в хлоропластах при НС было ниже в $\beta\text{KA1-KO}$, чем в ДТ и $\alpha\text{KA1-KO}$. Разность величин рН на тилакоидной мембране при НС в $\beta\text{KA1-KO}$ была выше, а в $\alpha\text{KA1-KO}$ – ниже, чем в ДТ. Нокаутирование генов αKA1 и βKA1 приводило к изменению содержания пероксида водорода в листьях – при НС оно было выше, а при ВС – ниже, чем в ДТ. Аналогичным образом в мутантных растениях изменялись уровни экспрессии генов-маркеров стресса.

Выявленные отличия между $\alpha\text{KA1-KO}$ и $\beta\text{KA1-KO}$ и растениями ДТ указывают на необходимость функционирования обеих КА стромы в обеспечении $\text{C}_{\text{неорг}}$ цикла Кальвина-Бенсона, но роль βKA1 состоит, по-видимому, в ускорении поставки $\text{C}_{\text{неорг}}$ в хлоропласты, тогда как роль αKA1 – в непосредственной конвертации HCO_3^- стромы в CO_2 .

Работа была поддержана фондом РФ (грант № 23-14-00396).

ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИЕ ПИГМЕНТЫ В ЛИСТЬЯХ ЧЕСНОКА ОЗИМОГО

Середин Т.М., Карев Д.А., Молчанова А.В.

ФГБНУ «Федеральный научный центр овощеводства», Московская область, Одинцовский
городской округ, пос. ВНИИССОК, Россия

timofey-seredin@rambler.ru

На основании проведенных нами исследований на пяти сортообразцах чеснока озимого различного эколого-географического происхождения были изучены основные фотосинтетические пигменты: хлорофилл А, хлорофилл В и каротиноиды. Материалом для исследований послужили сорта чеснока озимого: Дубковский и Стрелец, а также образцы из республики Дагестан и из зарубежья: Чехия и Испания. В ранее сделанных исследованиях мало информации в литературных источниках таких наблюдений, как фотосинтетический состав листовой массы чеснока озимого. В основном была изучена биохимия луковиц чеснока, поэтому нами было сделано исследование основных фото пигментов, для возможности употребления в пищу молодых растений чеснока озимого целиком. Максимальное содержание хлорофилла *a* было отмечено у образца из Испании и составило 0,81 мг/г. В группу со средним содержанием компонента можно отнести образец из Дагестана и из Чехии. Минимальное содержание нами было отмечено у сорта Дубковский. Исходя из полученных нами данных отмечено, что по содержанию хлорофилла *b*, в зелёных листьях чеснока озимого наблюдался в пределах от 0,23 до 0,55 мг/г. Максимальное накопление хлорофилла В выявлено у сортообразца из Испании. Такая же тенденция была ранее нами отмечена и по содержанию хлорофилла *a*. По каротиноидному составу минимальное значение было отмечено у сорта Стрелец. А в группу с максимальным содержанием каротиноидов можно отнести образцы из Дагестана и Испании.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОМОТОРА ГЕНА ДЕФЕНЗИНА *Sm-D1* ЗАВИСИТ ОТ ТРАНСГЕННЫХ СПОСОБОВ ОЦЕНКИ

Трофимов А.С., Стрельникова С.Р., Комахин Р.А.

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной
биотехнологии», Москва, Россия

recombination@iab.ac.ru

Растительные антимикробные пептиды (АМП) – важные компоненты врожденного иммунитета. Одним из семейств АМП являются дефензины, содержащиеся преимущественно в семенах и проростках. Ранее из семян растения *Stellaria media* выделили дефензин Sm-D1, проявляющий высокую активность против фитопатогенных грибов и оомицетов, однако структурно-функциональная организация промотора его гена осталась неизученной.

Настоящая работа посвящена изучению промотора гена *Sm-D1* с использованием различных методов. Для этого проанализировали уровень мРНК гена *Sm-D1* в разных органах *S. media*. Установили, что экспрессия *Sm-D1* в цветках выше и в листьях, стеблях, корнях ниже, чем уровень экспрессии референсного гена актина. Для изучения функциональной организации промотора *Sm-D1* клонировали его последовательность длиной около 800 п.н. В геноме *S. media* обнаружили две полиморфные Sm-D1-подобные промоторные последовательности, одна из которых принадлежит известному антимикробному гену *Sm-D1.2*.

Первоначально различные промоторные варианты поместили в бинарный вектор для агробактериальной трансформации растений типа pCAMBIA, в котором они контролировали экспрессию репортерного гена *uidA*. В этом случае промоторы гена *Sm-D1* были способны для продукции репортерного белка GUS на уровне вирусного промотора CaMV35S и выше в агроинфильтрированных растениях *Nicotiana benthamiana*. Однако, удаление энхансера 2× CaMV35S, предназначенного для управления селективным геном в области Т-ДНК бинарного вектора pCAMBIA, на порядок снижала эффективность промотора *Sm-D1* для продукции GUS. В трансгенных *Arabidopsis thaliana* активность GUS преимущественно наблюдали в листьях, стеблях и корнях, но не в цветках. Эти результаты не соответствовали оценке экспрессии *Sm-D1* в *S. media*, у которых она преобладала в цветках, а не в вегетативных органах. Кроме этого, в трансгенных растениях обнаружили альтернативный сплайсинг интрона гена *uidA*, приводящий к формированию двух транскриптов, один из которых не пригоден для трансляции функционального белка GUS. В этих условиях трудно ожидать высокой взаимосвязи между уровнем мРНК репортера *uidA* и уровнем активности его белка GUS.

Для адекватной оценки эффективности промотора *Sm-D1.2* создали новые генетические конструкции на основе pCAMBIA, в которых он управлял геном *uidA* без интрона и селективный ген контролировался растительным промотором pro-SmAMP2. В этом случае промотор *Sm-D1.2* был способен к высокой продукции GUS в пыльце и проростках и к минорной продукции репортера в стеблях и корнях трансгенных растений *Nicotiana tabacum*. Паттерн экспрессии гена *Sm-D1* в растении *S. media* хорошо согласуется с паттерном

экспрессии *uidA* под управлением промотора *Sm-D1.2* в отсутствие энхансера 2×CaMV35S в области Т-ДНК бинарного вектора в трансгенных растениях.

Таким образом, растительные промоторы должны быть функционально валидированы в бинарных векторах, не содержащих последовательности CaMV35S в области Т-ДНК. Бинарные векторы, содержащие CaMV35S для управления селективным геном в области Т-ДНК, целесообразно использовать для продукции рекомбинантных белков в вегетативных тканях растений на более высоком уровне.

Работа выполнена при поддержке государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (FGUM-2025-0004).

БИОФИКСАЦИЯ УГЛЕРОДА И НАКОПЛЕНИЕ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ *CHLOROCOCCUM OLEOFACIENS* ПРИ РОСТЕ В АФОТИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ

Черкашина С.В., Кочубей А.В., Яковийчук А.В., Мальцева И.А., Лысова Е.А.

Мелитопольский государственный университет, Мелитополь, Россия

svetlanaCherkashina23@yandex.ru

В последние годы микроводоросли находят все более массовое и разноплановое применения в качестве объектов биотехнологических производств (Posten and Feng Chen, 2016). Поглощение углерода в ходе роста микроводорослей и включение его состав органических соединений в настоящее время рассматривается как одно из перспективных направлений решения климатических проблем. Большую биотехнологическую ценность имеют микроводоросли отдела Chlorophyta, а среди них – *Chlorococcum oleofaciens* Trainor & H.C. Bold (Maltseva et al. 2024).

Чаще всего биотехнологический способ получения целевых метаболитов из микроводорослей является стресс-индуцированным. При этом для снижения затрат на получение биомассы микроводорослей тестируются условия культивирования, которые не требуют освещения (Kim et al. 2019). Целью данной работы было изучение накопления аскорбиновой кислоты, α -токоферола и фенольных соединений в биомассе штамма *Cc. oleofaciens* SAMU MZ–Ch4 и оценка его способности депонировать углерод при культивировании в стандартных условиях и при использовании афотического стресса. Для эксперимента использовали *Cc. oleofaciens* SAMU MZ–Ch4, выращенный на среде BBM при стандартном освещении до ранней стационарной фазы (15 суток). После переноса штамма в колбы со свежей средой BBM, одна часть колб (контроль) инкубировалась при стандартных условиях освещения, а вторая (экспериментальная) – в условиях без доступа света (афотические условия). Эксперимент длился 96 часов.

Было установлено, что при культивировании в условиях полного затемнения концентрация аскорбиновой кислоты в биомассе повысилась на 16% в сравнении с контролем и составила $5.51 \pm 0.2 \text{ mg g}^{-1}$ ($p \leq 0.05$). Содержание фенольных соединений достоверно снизилось на 54 % относительно контроля. При полном затемнении концентрация α -tocopherol достоверно не изменялась относительно контроля. При культивировании в афотических условиях деление и рост клеток значительно замедляются. Поглощение CO_2 штаммом *C. oleofaciens* в стандартной среде составляло $0,004 \text{ г CO}_2 \text{ л}^{-1} \text{ сутки}^{-1}$. В условиях полного затемнения поглощение CO_2 понижалось в 2 раза.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 24-74-001324; процент вклада составил 80%.

Измерение биофиксации углерода было выполнено при финансовой поддержке государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации «Секвестрационный потенциал микроводорослей и цианобактерий антропогенно-трансформированных экосистем Запорожской области в условиях возрастающей аридизации климата (FRRS-2024-0003; № 124040100028-6); процентный вклад составил 20%.

Секция 6

«ЭКОЛОГИЯ И ПОЧВОВЕДЕНИЕ»

ОЦЕНКА ЗНАЧИМОСТИ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В БИОДИАГНОСТИКЕ ПОЧВЫ ГОРОДСКИХ РЕКРЕАЦИЙ

Астанин С.С., Свистова И.Д.

Воронежский государственный педагогический университет, Воронеж, Россия

microbyrafl@gmail.com

Выявление наиболее значимых экологических факторов и определение информативных параметров для биодиагностики почвы в урбозекосистемах – актуальная задача для разных почвенно-климатических зон России. Цель работы: выявление влияния рекреационной и городской нагрузки в системе *почва – микробиом – растения* на примере разных категорий рекреаций Центрального района г. Воронежа.

Изучали показатели биодиагностики (численность экологических групп почвенных микроорганизмов, таксономическую структуру микробиома, видовой состав и структуру комплекса микромицетов, индикаторные виды грибов) и биотестирования (содержание *Azotobacter chroococcum*, фитотоксическую активность почвы). Контроль: серая лесная почва Воронежского биосферного заповедника. Варианты опыта: поверхностно преобразованная серая лесная почва пригородной лесопарковой зоны, территорий ботанических садов и дендрариев вузов и научных учреждений, урбаноземы рекреаций со статусом региональных ООПТ «Памятники природы Воронежа» и общегородских парков и скверов, расположенных в центре города. При стандартном для биодиагностики отборе почвенных проб из слоя 0-20 см под проекцией кроны типичных для зоны древесных культур практически не проявлялось влияние растительных ризодепозитов. Обнаружено выраженное подщелачивание почвы городских рекреаций: рНводн возрастал на 0,7-2,1 ед., рНсол возрастал на 0,5-2,3 ед. Наиболее ярко выражено влияние уровня общегородской нагрузки на почвенный микробиом рекреаций (важнейший фактор – близость к транспортным развязкам, промышленным предприятиям и селитебным зонам). Оценивали содержание валовых и подвижных форм 6 тяжелых металлов, нефтепродуктов и бенза(а)пирена в почве городских рекреаций. Градация рекреаций по уровню городской нагрузки позволила выделить наиболее однородные группы по показателям биоиндикации и биотестирования почвы.

Обнаружено нарушение таксономической структуры микробиома (возрастание доли бактерий и снижение доли мицелиальных форм), а также его экологической структуры (снижение азотфиксации и иммобилизации азота в почве). Изучена видовая структура комплекса микромицетов, выявлено снижение видового разнообразия с 19-21 до 9-11 видов за счет снижения доли редких видов. Установлены виды грибов, чувствительные, устойчивые и индикаторные на городскую нагрузку. Фитотоксическая активность почвы возрастала в 2,8-6 раз и достигала 50%. Важнейшим фактором является накопление токсигенных (оппортунистических) видов микромицетов в урбаноземах. К ним относятся *Penicillium daleae*, *P. notatum*, *P. rubrum*, *P. viridicatum*, *Spergillus fumigatus*, *A. wentii*, *Talaromyces flavus*.

Таким образом, для микробиома почвы рекреационных зон крупного промышленного центра наиболее значимыми экологическими факторами являются кислотность почвы и

содержание Сорг., а также уровень загрязнения поллютантами. Статус ООПТ для городских рекреаций не соблюдается. Гемеробийные мероприятия позволяют снизить негативную тенденцию: почвенный фитотоксикоз был заметно ниже в недавно реконструированных рекреациях с внесением реплантоземов. В качестве информативных показателей биоиндикации городской и пригородной почвы рекреаций предлагается оценивать общую численность бактерий и микромицетов, их соотношение, процентное содержание и диаметр обросших колоний *Azotobacter chroococcum* вокруг почвенных комочков на среде Эшби и вычисления на основании этих данных суммарного индекса токсичности по Р.Р. Кабирову, Р.Х. Хазиповой, 1997 г., фитотоксическую активность почвы и долю индикаторных видов микромицетов.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ АЗИАТСКИХ СТАД КЕТЫ В
ПЕРИОД ПРЕДНЕРЕСТОВЫХ МИГРАЦИЙ В СЕВЕРО-ЗАПАДНОЙ ЧАСТИ ТИХОГО
ОКЕАНА ЗА 2023-2024 гг.

Бугаева Е.А., Денисенко А.Д.

Камчатский филиал «Всероссийского научно-исследовательского института рыбного
хозяйства и океанографии» (КамчатНИРО), Петропавловск-Камчатский, Россия

e.bugaeva@kamniro.vniro.ru

Кета – наиболее широко распространенный вид среди всех тихоокеанских лососей и один из основных объектов промысла на Дальнем Востоке России. В Азии кета в основном воспроизводится на п-ове Камчатка, о. Сахалин, материковом побережье Охотского моря, бассейне р. Амур, южных курильских о-вах и о-вах Хоккайдо и Хонсю. Популяции азиатской кеты обладают сложной генетической структурой, вследствие как значительной пространственной, так и временной дифференциации стад (разные сроки нереста). Учитывая, что большое значение для успеха путины имеет прогнозирование численности кеты, возвращающейся в основные регионы воспроизводства, определение регионального состава рыб в смешанных морских уловах посредством применения ДНК-маркеров является перспективным направлением популяционных исследований.

Для изучения популяционно-генетической структуры был использован набор из восьми микросателлитных локусов, который позволяет различать основные региональные группы кеты в бассейне Охотского моря, такие как: 1) Западная Камчатка и северная часть материкового побережья Охотского моря, 2) бас. р. Амур, 3) о. Сахалин, 4) южные Курилы. Средняя оценка точности идентификации выделенных групп, полученная в результате анализа симулированных выборок, составляет 82,7%. Высокая дискриминационная способность референтной базы позволяет нам проводить идентификацию рыб из основных центров воспроизводства. Полученные результаты привлекаются в качестве индикаторной информации для оценки численности поколений западнокамчатской кеты, которая должна возвратиться в места воспроизводства.

В данной работе представлены данные о региональном составе морских смешанных скоплений производителей кеты охотоморского бассейна в период преднерестовых миграций 2023-2024 гг. Результаты идентификации уловов летней траловой съемки 2023 г. свидетельствуют о том, что в региональном составе исследованных выборок преобладал северный комплекс стад (Западная Камчатка и северная часть материкового побережья Охотского моря) – 74%. Доля кеты о. Сахалин составила 26%. По материалам съемки 2024 г. региональный состав производителей кеты имеет сходные тенденции, что и в 2023 г. В данном случае доля «северной» кеты составила 94%, а «южной» кеты (о. Сахалин, о. Итуруп и р. Амур) – 6%.

В целом можно заключить, что полученные оценки регионального состава производителей кеты за 2023-2024 гг. являются типичными для северо-западной части Тихого океана, когда основу нерестовых подходов составляет кета северных регионов охотоморского

бассейна. Отметим, что доля комплекса стад кеты Западной Камчатки и северной части материкового побережья заметно возросла в 2024 г. (94%), по сравнению с 2023 г. (74%). Обратная ситуация наблюдалась у «южной» кеты: наиболее высокие оценки численности производителей были получены в период преднерестовых миграций 2023 г. (26%), тогда как в 2024 г. её доля снизилась до 6%.

ПОВРЕЖДЕНИЕ ЯСЕНЯ ЭНТОМОВРЕДИТЕЛЕМ *AGRILUS PLANIPENNIS* F. В РАЗНЫХ ПРИРОДНЫХ ЗОНАХ ВОРОНЕЖСКОЙ ОБЛАСТИ

Бушуева А.С.^{1,2}, Кулаков Е.Е.²

¹Воронежский государственный лесотехнический университет им. Г.Ф. Морозова,
Воронеж, Россия

²Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и
биотехнологии, Воронеж, Россия

bushueva.anst@yandex.ru

Воронежская область территориально разделена на две природные зоны – лесостепь и степь. Юг области занимают степи, со своим уникальным луговым разнообразием и рельефом, за который отвечают склоны Страны Среднерусской возвышенности, на севере распространена лесостепная зона с преобладанием лесных массивов и более прохладным климатом. Такое видимое разделение по природно-климатическим факторам позволяет проводить сравнительный анализ биоценозов и выявлять дифференциацию между изучаемыми явлениями и признаками.

Объектами исследования послужили насаждения *Fraxinus*, поврежденные инвазивным видом энтомовредителя – ясеновой изумрудной узкотелой златкой (далее ЯИУЗ) (лат. *Agrilus planipennis* F.), появление которой стало катастрофическим явлением для лесных экосистем и городского озеленения. По литературным данным своё распространение во вторичном ареале она начала с Московской области, двигаясь в разные направления от места первоначального обнаружения. В последние годы отмечено появление ЯИУЗ и на юге страны: в Ростовской, Самарской, Астраханской областях, Краснодарском крае и на юге Поволжья (Республика Адыгея) в то время, как из Центрально-чернозёмного региона в настоящее время произошла миграция вредителя в другие субъекты РФ. Однако, в Воронежской области этот вопрос остается до сих пор актуальным, поскольку многие насаждения находятся в активной стадии заражения.

Для выявления очагов, оценки их интенсивности и зависимости от биометрических параметров в разных природных зонах нами было проведено обследование лесных участков по данным лесопатологического обследования 2024 года. Изучено сходное количество участков в лесостепной и степной зонах, с одинаковым классом возраста и долей ясеня в породном составе.

По результатам исследования было выявлено, что в лесостепной зоне встречаемость отработанных деревьев от запаса породы составляет 98%, в то время как в степной зоне процент мёртвых деревьев значительно меньше – 41%, а процент деревьев, находящихся в стадии заражения – 51%. Средневзвешенный индекс категория состояния породы на участках в лесостепной зоне в среднем составляет – 5,0; в степной – 4,43, при этом полнота насаждения в лесостепной зоне варьируется от 0,8 до 0,9, степной на каждом из участков – 0,7. Запас на га в лесостепной и степной зоне – 201 м³ и 260 м³ соответственно.

Из полученных данных видно, что в настоящее время в степной зоне повреждение насаждений ясеня продолжают. По материалам исследований достоверно установлена прямая связь между основными биометрическими параметрами и скоростью повреждения насаждений. В насаждениях, имеющих высокую полноту и запас древесины в значительной степени больше наблюдается урон, причиненный фитофагом.

ОСОБЕННОСТИ ВОДНОГО ОБМЕНА ЛИСТЬЕВ БЕРЕЗЫ ПОВИСЛОЙ
(*BETULA PENDULA* L.) В РАЗЛИЧНЫХ ТИПАХ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ЮЖНО-УРАЛЬСКОГО
РЕГИОНА

Галимов Р.Р.

Уфимский Институт биологии – обособленное структурное подразделение Федерального
государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального
исследовательского центра РАН, Уфа, Россия

ramil_galimov_98@mail.ru

Адаптация водного обмена (ВО) является одним из важнейших условий выживания растительных организмов в экстремальных лесорастительных условиях. ВО в условиях промышленного загрязнения отличается проявлением как специфических, так и неспецифических адаптивных реакций (АР). В Южно-Уральском регионе выбрано пять промышленных центров с разными типами загрязнения для характеристики их воздействия на ВО листьев берёзы и качественной оценки выявленных АР: Стерлитамакский промышленный центр (СПЦ) – полиметаллическое загрязнение; Карабашский медеплавильный комбинат (КМК) – полиметаллическое загрязнение в сочетании с сернистым ангидридом; Учалинский горно-обогатительный комбинат (УГОК) – полиметаллическое загрязнение в условиях отвалов медно-колчеданной горнорудной промышленности; Кумертауский бурогольный разрез (КБР) – полиметаллическое загрязнение в условиях отвалов бурогольного разреза; Уфимский промышленный центр (УПЦ) – нефтехимическое загрязнение. В каждом промцентре в соответствии с розой ветров выделены зоны сильного загрязнения и контроль. Измерялись следующие параметры: интенсивность транспирации (ИТ), относительное содержание воды (ОСВ), дефицит водного насыщения (ДВН). Выявлены следующие особенности:

– В СПЦ, КМК и УГОК выявлена относительная независимость между параметрами ВО, когда наблюдаются различия в их адаптивных реакциях к одному и тому же типу промышленного загрязнения: 1. В СПЦ при отсутствии изменений ДВН (оценивается как «нейтральная» АР) происходит уменьшение ИТ и увеличение ОСВ относительно контроля («умеренно-стрессовая» АР). У ОСВ в промзоне нарушена естественная суточная динамика в сторону «умеренно-стрессовой» АР, в то время как у ИТ и ДВН наблюдается естественная ненарушенная суточная динамика, что характеризуется «умеренно-толерантной» АР. Общая реакция ВО в СПЦ «умеренно-стрессовая». 2. В КМК в условиях загрязнения уменьшаются ИТ и ДВН относительно контроля («умеренно-стрессовая» АР) при отсутствии изменений ОСВ («нейтральная» АР). В промзоне наблюдается естественная ненарушенная суточная динамика изменения ИТ, характеризующаяся «умеренно-толерантной» АР, в то время как у ОСВ и ДВН она нарушена в сторону «умеренно-стрессовой» АР. Общая реакция ВО в КМК «умеренно-стрессовая». 3. В УГОК в условиях загрязнения выявлено снижение ИТ относительно контроля («умеренно-стрессовая» АР), снижение ОСВ и увеличение ДВН («умеренно-толерантная» АР). В промзоне наблюдается естественная ненарушенная суточная

динамика изменения ОСВ и ДВН, характеризующаяся «умеренно-толерантной» АР, в то время как у ИТ изменения в течение дня отсутствуют («нейтральная» АР). Общая реакция ВО в УГОК «умеренно-толерантная».

– В УПЦ и КБР относительная независимость между параметрами ВО отсутствует: 1. В УПЦ в условиях загрязнения выявлено уменьшение ИТ относительно контроля («умеренно-стрессовая» АР), значительное увеличение ОСВ и значительное снижение ДВН («стрессовая» АР). У всех трёх параметров в промзоне нарушена естественная суточная динамика в сторону «умеренно-стрессовой» АР. Общая реакция ВО в УПЦ «умеренно-стрессовая». 2. В КБР в условиях загрязнения выявлено увеличение ИТ относительно контроля («умеренно-толерантная» АР), значительное снижение ОСВ и значительное увеличение ДВН («толерантная» АР). У всех трёх параметров в промзоне отсутствуют нарушения естественной суточной динамики, оцениваемые «толерантной» АР. Общая реакция ВО в КБР «толерантная».

Таким образом, аэротехногенное полиметаллическое загрязнение, полиметаллическое с примесью сернистого ангидрида и нефтехимическое подавляют ВО листьев берёзы, вызывая «умеренно-стрессовые» и «стрессовые» АР, что свидетельствует о низком адаптивном потенциале берёзы к данным типам загрязнения, в то время как полиметаллическое загрязнение в условиях медно-колчеданных и буроугольных отвалов стимулирует усиление ВО, вызывая «умеренно-толерантные» и «толерантные» АР, что свидетельствует о высоком адаптивном потенциале берёзы к данным типам загрязнения. Выявлено нарушение суточной динамики ВО в КМК и УПЦ и отсутствие нарушений в остальных типах загрязнения. Показана относительная независимость между параметрами ВО, что свидетельствует об экологической пластичности берёзы по отношению к разным типам загрязнения.

ТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ СОРБЕНТОВ НА ОСНОВЕ БЕНТОНИТА И ПАВ РАЗНЫХ ТИПОВ ПО ОТНОШЕНИЮ К ПОЧВЕННЫМ БАКТЕРИЯМ

Герцен М.М.

Тульский государственный педагогический университет им. Л.Н. Толстого, Тула, Россия

mani.gertsen@gmail.com

Активное использование тяжелых металлов в промышленности, быту, сельском хозяйстве, медицине и других областях приводит к их широкому распространению в окружающей среде, что вызывает серьезные опасения относительно их воздействия на состояние экосистем и здоровье человека. В отличие от органических загрязнителей, соединения тяжелых металлов могут сохраняться в объектах окружающей среды длительное время, не подвержены биологическому или химическому разложению, а претерпевают только трансформацию соединений. Одной из важных проблем, касающихся использования сорбционных агентов для ремедиации почвенных или водных экосистем, загрязненных тяжелыми металлами, является потенциальная токсичность данных материалов для аборигенных микроорганизмов, участвующих в процессе биоразложения токсикантов. Природные глинистые минералы, модифицированные органическими агентами, представляют собой перспективные сорбенты тяжелых металлов, однако необходимо исследование их токсического действия.

В качестве объекта исследования выбран бентонит Саригюхского месторождения и амфотерные (АПАВ) (кокоамфодиацетат динатрия, кокоиминодипропионат натрия) и неионогенные (НПАВ) (лаураминоксид, кокамид диэтаноламин, алкилполиглюкозид) ПАВ, использованные для синтеза органоглин. Токсикант – раствор $Pb(NO_3)_2$. Тестирование токсичности разработанных органоглин проводили по отношению к автохтонным почвенным микроорганизмам. Использовали серую лесную пахотную почву (0-20 см) (д. Журавка). Отобранную почву очищали от растительных остатков и других включений, перетирали в фарфоровой ступке и пропускали через сито с диаметром отверстий 3 мм. По визуальному тесту варианты эксперимента с органоглинами и их комплексами с катионами Pb^{2+} позволяют различить единичные и смешанные бактериальные колонии различной морфологии и структуры и посчитать КОЕ/мл. Установлено, что минимальное число КОЕ соответствует варианту с добавлением раствора нитрата свинца в питательную среду – $1,1 \cdot 10^6$ КОЕ/мл. В контроле (бентонит) – $9,6 \cdot 10^6$ КОЕ/мл. Внесение органоглин уменьшает число КОЕ по сравнению с контролем; величина уменьшения численности определяется применяемым ПАВ. Для органоглин минимальное число КОЕ соответствует модификации кокоиминодипропионатом натрия (АПАВ): $3,1 \cdot 10^6$ КОЕ/мл и лаураминоксидом (НПАВ): $3,2 \cdot 10^6$ КОЕ/мл. Максимальное количество КОЕ соответствует органоглине на основе алкилполиглюкозида (НПАВ): $8,6 \cdot 10^6$ КОЕ/мл. При внесении в культуральную среду продуктов взаимодействия органоглин с Pb^{2+} происходит увеличение числа КОЕ в сравнении с чистыми органоглинами: максимальное число КОЕ соответствует продукту взаимодействия органоглины с алкилполиглюкозидом с Pb^{2+} : $14,6 \cdot 10^6$ КОЕ/мл.

Работа поддержана грантом автономной некоммерческой организации «Научно-образовательный центр мирового уровня» ТулаТЕХ» на основании Соглашения о целевом финансировании, направленного на создание и развитие студенческих конструкторских бюро на базе образовательных организаций высшего образования – участников научно-образовательного центра мирового уровня «ТулаТЕХ» № 8 от 28.11.2023 г.

ВЗАИМОСВЯЗЬ ПОЧВЕННОГО И РАСТИТЕЛЬНОГО ПОКРОВА В МЕЗОРЕЛЬЕФЕ ТИПИЧНЫХ И ЮЖНЫХ ТУНДР СЕВЕРА ЗАПАДНОЙ СИБИРИ

Гинзбург А.П.

Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН,
Пушино, Россия

ginzburgap@yandex.ru

В криолитозоне севера Западной Сибири многолетнемерзлые породы (ММП) имеют сплошное распространение, а мощность сезонноталого слоя (СТС) варьирует от 80–130 см в южных до 50–90 см в типичных тундрах. Неглубоко залегающий в почвах мерзлотный водоупор и доминирование в рельефе территории склонов обеспечивают преимущественно механическое латеральное перемещение больших объемов вещества. Эти процессы отражены в структуре почвенно-растительного покрова, являются важным фактором ее современной динамики и ключом к изучению ритмов природных процессов в прошлом.

Исследованы 6 почвенно-ландшафтных профилей в мезорельефе типичных и южных тундр на севере Западной Сибири. На них описаны сочетания почв и фитоценозов. Наиболее частым вариантом строения почвенно-ландшафтного профиля является сочетание слабовыпуклого автоморфного участка, плавно переходящего в пологий склон, который, в свою очередь, оканчивается резкой бровкой и переходит в более крутой склон, и замыкается в нижней части обширной областью аккумуляции.

Почвы в автоморфных позициях рельефа относятся к криоземам (на супесях) и глееземам (на суглинках). Признаки альфегумусового процесса в профилях криоземов также многочисленны, но не играют определяющей роли для диагностики типа почв. В отдельных случаях в автоморфных позициях на слоистых аллювиальных песках встречаются псаммоземы. Фитоценозы автоморфных позиций – кустарничково-мохово-лишайниковые тундры.

Солифлюкции подвержены практически все склоны, о чем свидетельствует ряд черт морфологического строения профилей криоземов на склонах: суглинистые прослои в песчаных горизонтах и погребенные фрагменты органогенных горизонтов. В структуре фитоценозов на склонах преобладают травяно-кустарничковые ассоциации на суглинистых отложениях, а на менее текучих песчаных и супесчаных склонах встречается также ерник и ивняк. В нижних частях склонов, не подверженных процессам термоденудации, кровля ММП сильно заглублена, вероятно, из-за способности ивняков к снегоудержанию. Почвы в подножиях таких склонов относятся к стратоземам, верхний горизонт которых является делювиальным наносом, перемещенным из верхних частей склона, и перекрывающим гумусовый горизонт погребенного криозема.

На термоденудационных обрывистых склонах, обнажающих активно вытаивающие залежи пластовых льдов, образуются практически вертикальные «стенки отрыва», по которым разрушаемый профиль криозема и тающие подстилающие ММП выносятся тальными водами в

ложе термоцирка. Эти отложения, в сравнении с современными криоземами, обогащены некоторыми элементами из-за морского происхождения ММП. По мере врезания ручьев и постепенного осушения поверхности ложа, на нем образуются фитоценозы с высоким видовым разнообразием, на первом этапе в основном галофильные. Замедлившим свой рост термоциркам соответствуют уже не вскрывающие льдов крутые обрывистые стенки с фрагментарной растительностью, а в чашах термоцирков на водно-аккумулятивных стратоземах развиты кустарниково-пушицево-осоково-разнотравные фитоценозы.

Ярко выраженные в рельефе бровки, особенно сложенные песками, как правило, затронуты дефляционными процессами с сопутствующим образованием котловин выдувания с оголенными поверхностями. Дефляция ограничивает развитие и без того бедных по составу растительных сообществ.

Работы проведены при финансовой поддержке РФФ, проект № 25-17-00010.

ОСОБЕННОСТИ ТРАНСФОРМАЦИИ ЛИШАЙНИКОВ В УСЛОВИЯХ КРИОЛИТОЗОНЫ ЗАПАДНОЙ СИБИРИ

Гончарова Е.Д.

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

gonchkate03@gmail.com

Лишайники занимают около 8% поверхности суши, доминируя в наземном покрове экстремальных ксерофитных местообитаний, а также составляя неотъемлемый компонент растительного покрова холодных гумидных областей. Являясь частью первичной сукцессии, лишайники оказывают существенное влияние на процесс почвообразования, участвуя в выветривании горных пород и формировании мелкозема, при этом, их роль в образовании органического вещества (ОВ) почв малоизучена. Лишайники широко представлены в зоне прерывистого распространения многолетнемерзлых пород на северной границе северной тайги Западной Сибири. Лишайники составляют до 50% проективного покрытия на торфяниках, до 100% в «беломошниках» и до 30% в зеленомошниках. Детрит лишайников сохраняется в толще сфагновых торфов или на поверхности торфяных почв в виде прослоек лишайникового детрита, при этом слабо накапливается в сосняках-«беломошниках» и не накапливается в зеленомошниках. Трансформация лишайников в условиях криолитозоны Западной Сибири и их роль в формировании органического вещества почв и торфяников не изучены, что составляет актуальность и новизну работ в этой области.

Целью исследования являлось изучение изменения химического состава лишайников (на примере *Cladonia stellaris* и *Cl. stygia*) в процессе их биодеструкции в поверхностных горизонтах почв типичных биогеоценозов криолитозоны Западной Сибири, а также выявление взаимосвязи скорости деструкции с физико-химическими показателями и биологической активностью почв. Также были изучены образцы лишайникового детрита, накопленного между слоями торфов, как одного из этапов деструкции.

Потеря массы лишайников возрастала в ряду торфяник – беломошник – зеленомошник, коррелировала с базальным дыханием, дегидрогеназной активностью поверхностных горизонтов почв и температурой. Содержание водорастворимого азота коррелировало с фенолоксидазной активностью, базальным дыханием и температурой. Сравнение лишайникового детрита с лишайниками после года полевого эксперимента показало потерю полисахаридов и относительное накопление фенольных соединений в процессе разложения. Скорость минерализации торфов по показателям базального дыхания увеличивалась в ряду политриховый торф – сфагновый торф – лишайниковый детрит, что согласуется с содержанием полисахаридов и свидетельствует об относительно высокой скорости разложения ОВ лишайников.

ВЛИЯНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ РАСТИТЕЛЬНО-
МИКРОБНЫХ ТОПЛИВНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ, ВКЛЮЧАЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМЫ
RHODOCOCCUS И *SHEWANELLA*

Гронина А.Д., Волченко Н.Н., Самков А.А., Худокормов А.А.,
Круглова М.Н., Моисеева Е.В.

Кубанский государственный университет, Краснодар, Россия

antoninagronina@mail.ru

Проблема загрязнения окружающей среды остается актуальной на протяжении длительного времени. В настоящее время идут активные поиски эффективного способа очистки окружающей среды от тяжелых металлов. Перспективными в этом направлении являются растительно-микробные топливные элементы (РМТЭ). Это гибридная технология, сочетающая в себе преимущества растений и микроорганизмов, помещенных в электрохимические ячейки различного дизайна. Её основой является технология микробных топливных элементов – биотехнологических устройств, в которых микроорганизмы за счёт анаэробного дыхания генерируют маломощный электрический ток. Способность растений выводить поллютанты из почвы за счёт их поглощения и аккумуляции в органах и тканях широко используется в технологиях фиторемедиации, а внесение в систему микроорганизмов существенно увеличивает положительный эффект.

В данной работе изучалась возможность использования систем на основе риса *Oryza sativa* и микроорганизмов родов *Shewanella*, *Rhodococcus* для выведения из среды ионов тяжелых металлов – меди и никеля – и генерации при этом энергии. Растительно-микробный топливный элемент представлял собой цилиндрический пластиковый сосуд, заполненный минеральным субстратом (керамзитом или песком) с жидкой питательной средой – раствором Кнопа. Микроорганизмы вносились в виде суспензии, подбор концентраций солей тяжелых металлов осуществлялся на основе анализа наиболее часто встречающихся значений. Электроды изготавливались из углеродного войлока «Карбопон» и графитовых стержней. К электродам прикреплялись провода с резиновой изоляцией. В цепи МТЭ были включены резисторы с сопротивлением 1 кОм. Анод площадью 38,5 см² располагался в донном слое (анаэробные условия), катод такого же размера лежал на поверхности раздела фаз – жидкой и воздушной (аэробные условия).

В результате была показана возможность функционирования микробных топливных элементов на основе риса в присутствии тяжелых металлов и бактерий. Было установлено негативное действие на рис катионов тяжёлых металлов, которое сглаживалось в присутствии микроорганизмов. Анализ электрогенеза РМТЭ показал большие величины в присутствии Cu²⁺ – от 150 до 1900 мкВт/м², в присутствии Ni²⁺ – от 18 до 490 мкВт/м². Внесение микроорганизмов дало стимулирующий эффект в случае РМТЭ с присутствием меди – от 200 до 6260 мкВт/м². Оценка изменения содержания тяжелых металлов в водной среде РМТЭ показала снижение их концентраций в течение 35 суток опыта: меди – на 93%, никеля – на 90%.

ДИНАМИКА РЕГИОНАЛЬНОГО СОСТАВА И РАСПРЕДЕЛЕНИЯ СМЕШАННЫХ
СКОПЛЕНИЙ МОЛОДИ КЕТЫ В ОХОТСКОМ МОРЕ В 2019–2021 гг. ПО РЕЗУЛЬТАТАМ
ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ

**Денисенко А.Д., Муравская У.О., Савенков В.В., Пильганчук О.А.,
Бабушкин Д.В., Шпигальская Н.Ю.**

Камчатский филиал ГНЦ РФ «Всероссийский научно-исследовательский институт-рыбного
хозяйства и океанографии» (КамчатНИРО), Петропавловск – Камчатский, Россия

a.denisenko@kamniro.vniro.ru

Кета является одним из важнейших объектов рыбного промысла в регионах охотоморского бассейна. Анадромный образ жизни кеты создает сложные взаимодействия между популяциями, требующие изучения их миграций и распределения молоди. Для эффективного управления промыслом и прогнозирования нерестовых подходов необходимо знать региональный состав смешанных скоплений кеты в акватории Охотского моря в период её посткатадромной миграции к местам нагула.

Материалом для исследования послужили выборки сеголетков кеты отобранные в период проведения осенней траловой учетной съемки в 2019, 2020, 2021 годах из наиболее результативных тралений. Всего для генетической идентификации было отобрано 37 выборок в количестве 1776 экз. Для определения региональной принадлежности особей использовали восемь микросателлитных локусов: *Ssa20.19*, *One101*, *Oke3*, *Oki1b*, *Oki23*, *Ogo2G*, *Oke11*, *Ots102*. Референтная база данных частот аллелей включает 31 выборку (1547 особей) из различных регионов воспроизводства кеты в охотоморском бассейне. Были определены четыре региональные группировки, для которых в программе ONCOR получены оценки разрешающей способности: о. Сахалин – 73,2%, Западная Камчатки и Северная часть материкового побережья Охотского моря (ЗК + СчМПОМ) – 77,0%, бассейн р. Амур – 87,4%, о. Итуруп – 93,5%.

Распределение молоди кеты в Охотском море в 2019–2021 гг. демонстрирует сложную пространственно-временную динамику. В северной части акватории (55°–56° с. ш.) доминируют особи ЗК + СчМПОМ, где их доля составляет до 58%, что связано с направлением миграционных путей этих популяций. В средних широтах (51°–54° с. ш.) наблюдается более равномерное распределение представителей региональных групп, что отражает зону смешения миграционных потоков. В данном районе доля кеты из бассейна р. Амур и о. Итуруп возрастает, достигая значительных показателей, особенно в юго-восточной части исследуемой области. Южные районы моря (48°–50° с. ш.), включая прибрежные воды о. Сахалин и Курильских островов, характеризуются преобладанием особей из бассейна р. Амур (58%), о-вов Итуруп и Сахалин. По долготному градиенту также наблюдаются четкие закономерности: в западном районе (146°–148° в. д.) преимущественно встречалась кета из бассейна р. Амур и о. Сахалин, тогда как восточный район (153°–155° в. д.) характеризуется преобладанием особей с о. Итуруп, где их доля достигает 90%. Так же результаты генетической идентификации свидетельствуют о межгодовой изменчивости состава смешанных скоплений.

Так, в 2020 г. наблюдалось большее количество особей бассейна р. Амур в юго-западной части моря, в 2021 г. выявлено снижение доли кеты из группы рек ЗК + СчМПОМ в северной части района съемки, а в 2019 г. отмечено увеличение присутствия особей с о. Итуруп в центральной части исследуемой акватории.

Анализ молоди кеты из уловов учетных осенних траловых съемок в Охотском море в 2019–2021 годы с применением генетических методов идентификации, позволил определить доли и распределение сеголетков из четырех основных регионов воспроизводства: ЗК + СчМПОМ, бассейн реки Амур, о. Сахалин и о. Итуруп. Полученные результаты расширяют представление о биологических особенностях кеты, и так же востребованы при подготовке научно обоснованных рекомендаций в целях рационального управления рыбными запасами.

ОСОБЕННОСТИ ОБРАЩЕНИЯ С ОТХОДАМИ В МЕДИЦИНСКИХ УЧРЕЖДЕНИЯХ КОТ-Д'ИВУАРА (НА ПРИМЕРЕ ГОРОДА БУАКЕ)

Диоманде М.Х.Ж.

Российский государственный гидрометеорологический университет,
Санкт-Петербург, Россия

hass.diomande@yahoo.fr

Медицинские учреждения производят отходы, которые могут представлять реальную угрозу для здоровья человека и оказывать негативное влияние на качество окружающей среды. Проблема обращения с медицинскими отходами особенно остро стоит в развивающихся странах. По оценкам, проведенных ВОЗ, в 22-х развивающихся странах доля медицинских учреждений, не применяющих надлежащие методы обезвреживания отходов, варьировалась в пределах 18-64%.

В медицинских учреждениях Кот-д'Ивуара (государственных и частных) ежедневно образуется около 25,6 т твердых отходов, что составляет более 9,3 тыс. т в год. Объемы медицинских отходов в стране возрастают: так количество образующихся отходов в период 2009-2016 гг. увеличилось на 94% вследствие расширения спектра медицинских услуг и их доступности для населения. Морфологический состав образующихся медицинских отходов: 62% - отходы, представляющие эпидемиологическую опасность; 36% - твердые коммунальные отходы; 2% - химические и фармацевтические отходы.

Объектом исследования являлась система обращения с медицинскими отходами в одном из Университетских больничных центров Кот-д'Ивуара, расположенного в городе Буаке. В университетском больничном центре Буаке образуются жидкие и твердые отходы. Твердые отходы собирают ежедневно и транспортируют с помощью колесных тележек в специальное хранилище, расположенное на территории медицинского учреждения. Результаты проведенного исследования свидетельствуют, что количество накопленных отходов возрастает. В 2023 объем образования твердых отходов (биомедицинских и бытовых) составлял 789, 2 т, из которых 92%, составили бытовые отходы, и только 8%, (65,7 т) приходилось на инфекционные биомедицинские отходы (острые и не острые предметы). За первые девять месяцев 2024 года (январь-сентябрь) было образовано более 655,1 т твердых отходов, из которых 93%, также составили бытовые отходы, биомедицинские отходы - 7%. Биомедицинские отходы хранят за пределами больницы и периодически сжигают в специальной печи, которая не имеет системы газоочистки. Отсутствие специализированного предприятия для обезвреживания медицинских отходов, сжигание отходов без соблюдения требований к обеспечению экологической безопасности, приводит к тому, что медицинские учреждения Кот-д'Ивуара являются источником загрязнения окружающей среды и создают дополнительные риски здоровью населения.

Для решения проблемы обращения с медицинскими отходами в Кот-д'Ивуаре необходимо принять решения на государственном и муниципальном уровнях о совершенствовании системы управления отходами, разработать и внедрить нормативно-

правовые акты, регламентирующие деятельность медицинских учреждений и муниципальных органов в этой области. Кроме того, каждое медицинское учреждение должно уделять особое внимание обучению персонала, ответственного за обращение с отходами, должно быть оснащено оборудованием для сортировки и надлежащей упаковкой в соответствии со стандартами и рекомендациями Всемирной организации здравоохранения.

ОСОБЕННОСТИ МИГРАЦИИ РЫЖЕЙ ВЕЧЕРНИЦЫ (*NYCTALUS NOCTULA*) НА
КУРШСКОЙ КОСЕ (КАЛИНИНГРАДСКАЯ ОБЛАСТЬ) ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ОТЛОВОВ
ПАУТИННЫМИ СЕТЯМИ

Евдокимова А.И.¹, Шапкин О.А.^{2,3}

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

²Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург, Россия

³Дарвинский государственный заповедник, Череповец, Россия

squamata.bio@gmail.com

Фауна рукокрылых Европы представлена 48 видами, для шести из которых характерны дальние миграции свыше 1000 км. Одним из самых крупных миграционных коридоров для птиц, насекомых и рукокрылых является Куршская коса. Вдоль нее мигрирует и такой представитель дальних мигрантов среди рукокрылых как рыжая вечерница (*Nyctalus noctula*), которая может совершать миграции на расстояние до 1546 км. Данные о пространственных перемещениях и фенологии этого вида в Балтийском регионе немногочисленны и нуждаются в расширении. Знание особенностей миграции и факторов, от которых она зависит, дает возможности для прогнозирования изменений пролета, разработки эффективных мер по охране летучих мышей, а также для изучения переноса патогенов этими млекопитающими. Целью исследования стало выявление особенностей пролета рыжей вечерницы на Куршской косе.

С конца июля по конец сентября 2024 года был проведен отлов рукокрылых на полевом стационаре «Фрингила» биологической станции «Рыбачий» ЗИН РАН. Для отлова использовалась паутинная сеть (Ecotone Hair net 18X4 m), которая устанавливалась на границе лесного массива и песчаных дюн (55.089274, 20.736853). Для повышения эффективности отлова около сети ставился садок с 5-7 летучими мышами, которые приманивали других особей звуковыми сигналами. Отлов проводился в течение 4-6 часов после сумерек, захватывая ночной пик активности рукокрылых. Всего было поймано 392 особи рыжей вечерницы. Для каждого животного во время кольцевания были определены пол и возраст. Для анализа миграционной активности в зависимости от погодных условий были взяты открытые данные о ночных температуре, влажности, атмосферном давлении, скорости и направлении ветра в пос. Рыбачий, в 11 км от места отлова. Статистическая обработка данных была проведена с использованием языка программирования R.

Первые регистрации мигрирующих рыжих вечерниц наблюдались 31 июля, последние – 3 сентября. Максимальное число отловов за ночь пришлось на 7.08 (n = 107) и 13.08 (n = 93), пик миграционной активности в 2024 году пришелся на конец первой трети августа. Согласно нашим данным, пролёт рыжих вечерниц не идёт непрерывно. Животные выбирают дни с наименьшей силой ветра, которая обычно не превышает 2 м/с (Коэффициент корреляции Спирмена $\rho = -0.43$, p-value = 0.04). Нам не удалось выявить значимых корреляций с другими погодными факторами в 2024 году, такими как температура ($\rho = 0.04$, p-value > 0.5),

направление ветра ($\rho = 0.13$, $p\text{-value} > 0.5$), влажность ($\rho = 0.25$, $p\text{-value} > 0.1$), и атмосферное давление ($\rho = -0.09$, $p\text{-value} > 0.5$).

Анализ половозрастного состава показал, что в отловах преобладают самки (59%, Хи-квадрат Пирсона с поправкой Йетса, $p\text{-value} = 0.02$). Разделение на возрастные группы у многих рукокрылых уже к августу становится затруднительным, так как наблюдается сильная оссификация эпифизов метакарпальных элементов, по которым проводится определение. В связи с этим, у 70% пойманных особей мы не смогли точно определить возраст, а среди остальных наблюдались в основном особи текущего года рождения (75%). У рыжих вечерниц для определения возраста также используют состояние зубов. По этому признаку большинство отловленных особей также можно отнести скорее к молодым, так как мы не наблюдаем заметно сточенных клыков.

ОЦЕНКА РЕПАРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК ДИКОРАСТУЩИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Зоткина А.С., Огибин Н., Шилова В.С., Черникова Н.П., Бутенко Е.В.

Южный Федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии,
Ростов-на-Дону, Россия

zotkina@sfnedu.ru

Дикорастущие виды лекарственных растений, произрастающие на почвах Юга России, являются важнейшим ресурсом в экономике страны, т.к. способны стать источником биологически активных соединений, обладающих, в том числе, и противомикробной активностью. Но в условиях развития технологий и возрастающей антропогенной нагрузки многие из поступающих в почву потенциально токсичных веществ обладают генетической активностью, что приводит к неконтролируемым изменениям: происходит отбор специфических генотипов, изменение экспрессии генов, повреждение наследственных структур растений, животных и микроорганизмов, обитающих в почве. Воздействие антропогенных факторов на почву практически неизбежно, и в связи с этим актуальность приобретает контроль генотоксичности факторов окружающей среды. Существующие методы тестирования генотоксичности не подходят для работы с дикорастущими видами растений в естественных условиях произрастания, т.к. разработаны, в основном, для лабораторных линий тест-объектов.

Гены системы репарации растений – это гены, которые отвечают за восстановление повреждений в ДНК растений. Эти повреждения могут возникать под воздействием различных факторов, таких как ультрафиолетовое излучение, химические вещества, окислительный стресс или ошибки в процессе репликации ДНК. Таким образом, экспрессия генов репарации в тканях дикорастущих видов растений может отражать генотоксичность факторов среды их обитания. Проблемой в изучении экспрессии генов дикорастущих лекарственных растений является отсутствие полных аннотированных геномов для большинства дикорастущих видов. Так, на территории Ростовской области произрастает свыше 1700 видов растений, относящихся к 82 семействам. При этом в общедоступной базе данных Ensemble Plant представлены геномы только для 33 видов, из них всего 2 (*Artemisia absinthium* L., *Cichorium intybus* L.) произрастает на территории Ростовской области.

Возможным подходом к решению проблемы может быть праймеров для анализа экспрессии генов репарации при помощи сравнительного анализа экзонов исследуемых генов растений для поиска консервативных участков, пригодных для конструирования праймеров.

Целью данной работы явилась разработка универсальных праймеров для анализа транскрипционной активности генов репарации растений: *LIG1*- ДНК-лигазы-1, *PCNA1* - пролиферирующего клеточного ядерного антигена и *POLB* – полимеразы В в тканях растений семейства *Asteracea*.

Последовательности генов 15 растений семейства *Asteracea* были взяты из базы данных Ensemble Plants, поиск ортологов был проведен при помощи алгоритма BLAST, множественное выравнивание осуществлялось при помощи программы Clustal Omega.

В результате были выявлены консервативные для *Asteracea* участки генов системы репарации, и на основе анализа частоты встречаемости отдельных нуклеотидов, были сконструированы праймеры для проведения ПЦР в реальном времени. Разработанная тест-система может быть использована для оценки генотоксического влияния факторов окружающей среды на дикорастущие виды растений семейства *Asteracea*, что может быть использовано в экологических исследованиях.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 22-77-10097) в Южном федеральном университете.

ОСОБЕННОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ПОЛЕВОЙ МЫШИ
(*APODEMUS AGRARIUS* PALLAS, 1971) В ПАРКАХ МОСКВЫ И ПРИГОРОДЕ

Карманова Т.Н., Феоктистова Н.Ю., Мещерский С.И., Мещерский И.Г., Суров А.В.

Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва, Россия

karmanovs94@mail.ru

Важной особенностью городской среды являются фрагментация и изоляция зеленых зон, что приводит к созданию мозаик обычно небольших, географически изолированных участков (например, парков и скверов), подходящих для обитания гемисинантропных видов животных. Такая фрагментация может приводить к снижению численности, сокращению потока генов, потере генетического разнообразия внутри сообществ и увеличению доли инбредных особей в популяциях. Во многочисленных исследованиях популяций грызунов в городах показано, что в пределах города, в отличие от загородных популяций, у гемисинантропов формируются самостоятельные генетические группировки (демы) и обмен между ними происходит редко.

В задачу данного исследования входила оценка генетического разнообразия популяций полевой мыши на территории города Москвы в сравнении с Подмосковными популяциями. Модельным объектом была выбрана полевая мышь, поскольку классически полевую мышь относят к группе гемисинантропов.

Исследования проводились в 4 парках г. Москвы и в 2 локальных популяциях в Подмосковье. Сравнение генетической структуры популяций мегаполиса с популяциями, населяющими пригородные районы, было призвано пролить свет на глубину генетических изменений у этого вида, вызванных жизнью в урбоценозе. Было проанализировано генетическое разнообразие по гену цитохрома *b* и 12 микросателлитным маркерам. Анализ гаплотипического разнообразия по гену цитохрома *b* показал большее сходство между парками правого (Нескучный сад, Филевский парк и Битцевский лесопарк) и левого (Терлецкий парк и Главный ботанический сад) берегов р. Москвы, что может отражать историческую связь этих территорий. Однако анализ микросателлитных маркеров продемонстрировал, что все население полевых мышей из Битцевского лесопарка (VI зона урбанизации), Терлецкого парка и Ботанического сада генетически связано с населением пригородных территорий (Звенигород). Наиболее обособленной оказалась популяция в самом центральном парке города (Нескучном саду, III зона). Она четко изолирована и в настоящее время представляют собой отдельный генетический кластер. Следующей по обособленности после Нескучного сада является популяция Филевского парка (IV зона). В целом, генетическое разнообразие было ниже в центральной части города и выше в популяциях, связанных с пригородом. Так, средние значения аллельного богатства и ожидаемая гетерозиготность (A_R и H_o) были самыми высокими в Битцевской лесопарке (4.905; 0.717) и самыми низкими в Нескучном (3.768; 0.661). Генетические дистанции между популяциями исследованных парков города, хотя в целом и невелики (от 4.2 до 10.4 %), но, тем не менее, между Нескучным садом и остальными парками города дистанция была больше (от .8.0 до 10.4%), чем между

расположенными на гораздо более дальнем расстоянии друг от друга загородных популяций (4.2%).

Таким образом, на примере полевой мыши показано, что городские локальные популяции этого вида, обитающие вблизи границ города, демонстрируют более высокую генетическую изменчивость и менее дифференцированы от популяций, населяющих загородные территории, чем от локальных популяций в центре города. Генетическое разнообразие последних является сниженным. Эти результаты подтверждают важность создания экологических коридоров для сохранения генетического разнообразия городской популяции гемисинантропных видов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 24-24-20023.

ХАРАКТЕРИСТИКА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ И ГРАНУЛОМЕТРИЧЕСКОГО СОСТАВА АЛЛЮВИАЛЬНЫХ ЛУГОВЫХ ПОЧВ ДОЛИНЫ РЕКИ БЕЛОЙ ПОСЛЕ РЕКУЛЬТИВАЦИИ

Крицкий К.А.¹, Власенко В.П.²

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

²Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина,
Краснодар, Россия

k.kritsky@yandex.ru

Речные долины и дельты являются аккумуляторами материалов различного гранулометрического состава и зависимости скорости водных потоков и их состава в пойме могут откладываться пески, галечники и гравий и др. Эти материалы весьма интенсивно используются в строительстве, именно поэтому часто происходят нарушения в целостности почвенного покрова долинных территорий в следствии их добычи (разработки). Исследованные нами почвы не были нарушены, но стали местом складирования (3 года) отработанных нижних слоёв грунта (не имеет признаков засоления и загрязнения). После отвал был перевезён, поверхность выровнена и высажена культурная растительность (овёс, люцерна).

Цель работы: дань оценку физико-химическим показателям и гранулометрическому составу аллювиальных луговых почв после рекультивации, а также рекомендации о возможном сельскохозяйственном использовании данных почв (земельных участков – 1,07 га). Объект исследования: почвенный покров земельных (с.-х. назначения) участков, находящихся на 1-ой террасе долины р. Белая, Белореченского р-на (с/п Верхневеденеувский)

В отобранных образцах почв были проведены следующие виды анализов (лаборатории ФГБУ ЦАС «Краснодарский» и ООО «Кубаньгипрозем»): гумус по Тюрину (ГОСТ 26213-21); рН водной суспензии потенциметрически (ГОСТ 26483-85); гигроскопическая вода (ГОСТ 28268-89); гранулометрический (зерновой) состав по Качинскому (ГОСТ 12536-14); подвижный фосфор и обменный калий по Мачигину в мод. ЦИНАО (ГОСТ 26205-91).

Аллювиальные луговые почвы формируются в основном в центральной пойме и имеют признаки кратковременного переувлажнения в виде охристых пятен железа (окисный глей) с поверхности. Мощность гумусового и рыхлого слоя составляет в среднем 37-38 см (А+В) глубже 38 см залегают сплошные слои галечника – почвообразующие породы или горизонт С.

По содержанию гумуса в почвенном профиле эти почвы микрогумусные (1,7-2,1 %), запасы гумуса в гумусовом профиле с учётом содержания галечника в профиле (40,0 % от массы почвы) очень низкие и составляют 36,7 т/га. Сумма поглощенных оснований (S) в верхнем слое этих почв средняя – 11,6-12,2 мг-экв на 100 г почвы. В составе поглощенных катионов кальция (Ca) занимает 63,8-70,5%, магний (Mg) 29,5-36,2 %, почвы вскипают от действия HCl с поверхности. Содержание в почве (А горизонт) подвижного фосфора и обменного калия очень низкое и низкое и, соответственно, равно – 1,3 и 7,7 мг на 100 г почвы. Реакция почвенной среды в профиле почв слабощелочная (рН вод. 8,2-8,5).

Гранулометрический состав аллювиальных луговых почв разнообразен – от тяжело- до легкосуглинистого, количество физической глины в верхнем горизонте А от 49,0-25,3% (<0,01 мм), преобладающими являются песчаная (1,0-0,05 мм) – 64,3 % и пылеватая (0,05-0,001 мм) 25,1 % фракции. Илистой фракции, играющей роль структурообразователя в легкосуглинистых разновидностях мало – 17,0-17,5 % (<0,001 мм).

Бонитет данных почв по методике ГИЗРа составляет 25 баллов – почвы низкого качества. Сопоставление материалов почвенного обследования 1994 г, предоставленных ООО «Кубаньгипрозем» и проведенные работы в соответствии с проектом рекультивации позволили восстановить плодородие аллювиальных луговых почв до уровня 1994 г (средневзвешенное содержание гумуса – 2,1%) что подтверждает наличие плодородного слоя мощностью 37-38 см.

В связи с большим содержанием галечника в профиле на фоне легкосуглинистого грансостава данные почвы имеют повышенную фильтрационную способность и низкую влагоемкость, что может отрицательно сказываться на водном и питательном режимах растений. Почвы данного участка, без соответствующих мелиораций, можно отнести к категории пригодных под пастбища.

ВЛИЯНИЕ ЗНАЧЕНИЯ pH ДЛЯ ВЫРАЩИВАНИЯ САЖЕНЦЕВ ХВОЙНЫХ ПОРОД ДЕРЕВЬЕВ НА ВЕРТИКАЛЬНОЙ ФЕРМЕ

Михайлова Е.С., Крюк В.А., Просеков А.Ю.

Кемеровский Государственный Университет, Кемерово, Россия

vika.kryuk.95@mail.ru

Использование современных технологий, позволит увеличить выход стандартных сеянцев с ЗКС с единицы площади, за счет интенсификации выращивания посадочного материала в полностью контролируемых условиях. Одна из таких перспективных технологий выращивания сеянцев с ЗКС, в условиях полностью закрытых культивационных сооружений - вертикальные фермы. Для полноценного роста и развития сеянцев хвойных пород деревьев необходим подбор оптимальных условий (значения pH, изменение спектров света, минеральное питание).

Цель данного исследования рассмотреть необходимые значения pH почвы для хвойных пород деревьев.

В ходе работ проводили исследования показателя pH почвы, с целью выявления наиболее благоприятного для нормального развития проростков. Так как у *Pinus sibirica* трудно добиться высокой всхожести, подбор pH почвы – это важный этап при выращивании сеянцев. В ходе исследования установлено, что наиболее высокая всхожесть 95-98% pH почвы 5, наилучшая всхожесть 95% у *Picea obovata* отмечена при pH почвы 4,0-4,5, для *Pinus sylvestris* pH почвы была в приделе 4,5.

Установлено, что при повышении кислотности почвы (т.е. снижения pH), массы сеянцев увеличивается. Результаты этих испытаний можно использовать для отклонения гипотезы о том, что сеянцы хвойных пород деревьев лучше всего растут при pH от 5,2 до 6,6. В большинстве этих испытаний дополнительные удобрения (N, калием [K] и фосфором [P]) поддерживались постоянными, независимо от обработки pH, что указывает на то, что повышение кислотности до pH ниже 5,0 может повысить эффективность использования питательных веществ (например, поглощение N массой) в хвое. Когда увеличивается и масса сеянцев, и концентрация азота, то эффективность использования питательных веществ увеличивается соответственно. Возможные причины большего поглощения азота на более кислых почвах включают более низкое потребление азота почвенными микроорганизмами, снижение выщелачивания нитратов NO₃, и меньшую активность нематод.

Таким образом можно сделать вывод, что хвойные растения любят слабокислый грунт. Обычно рекомендуют показатель pH от 4 до 5.5 единиц. Однако для каждого отдельного вида он может изменяться.

ИССЛЕДОВАНИЕ ХИМИЧЕСКОГО МУТАГЕНЕЗА НА ШТАММ-ПРОДУЦЕНТ
ПОЛИГИДРОКСИАЛКОНОАТОВ *CUPRIAVIDUS NECATOR* H16, КУЛЬТИВИРУЕМЫЙ
НА ОТРАБОТАННЫХ КУЛИНАРНЫХ МАСЛАХ

Лысенко М.Е., Кузнецова А.П., Аль-Шехадат Р.И.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего
образования «Национальный исследовательский университет ИТМО», факультет
биотехнологий (BioTech), Санкт-Петербург, Россия

lysenkomilolika@gmail.com

Полигидроксиалконаты (ПГА) представляют собой биополимеры, которые образуются в некоторых бактериях при недостатке питательных веществ или в стрессовых условиях. Перспективным продуцентом ПГА является бактерия *Cupriavidus necator* H16, благодаря высокому уровню метаболизма и адаптационным свойствам. В исследованиях данная способность применяется для производства ПГА путем культивирования бактерий на ряде нетрадиционных субстратов, таких как глицерин, лактоза и отработанные кулинарные масла (ОКМ). Многообещающим сырьем является ОКМ, так как оно не только решает проблему их утилизации, но и снижает стоимость производства ПГА. Однако нативный штамм *C. necator* неэффективно усваивает ОКМ, поэтому необходим поиск путей для оптимизации данного процесса. Высокоэффективным и при этом экономически выгодным методом селекции штаммов является химический мутагенез с использованием метилметансульфоната и этилметансульфоната, которые приводят к изменениям в G-C пары. Целью работы является повышение эффективности синтеза ПГА штаммом *C. necator* H16 путем химического мутагенеза и культивирования на отработанных кулинарных маслах.

В ходе нашей работы был проведен химический мутагенез с использованием этилметансульфоната в концентрациях 0,5%, 1% и 2%. Этот мутаген вызывает образование мутаций, что позволяет ускорить процесс селекции бактерий, способных использовать ОКМ в качестве единственного источника углерода и увеличить синтез ПГА. Культивирование нативного *C. necator* H16 проводилось в солевой среде, содержащей ОКМ, такие как пальмовое, подсолнечное масла и масложировая смесь с добавлением мутагена. Начальная концентрация мутагена составляла 0,5-1% в среде, однако была снижена до 0,25% из-за гибели клеток. Воздействие мутагена на культуру оценивалось изменением оптической плотности в пробах через 6, 24, 48 и 72 часа. Данные пробы параллельно высевались на агарной среде BSM и через 48-72 часов проверялись на изменения в концентрации запасенного штаммом полимера. Количество полимера оценивалось по уровню флюоресценции при длине волны 350 нм у предварительно окрашенного Нильским синим инокулята перед посевом. Штаммы с наиболее ярким свечением содержали максимальное количество полимера и отбирались для дальнейших исследований.

В ходе работы изучена гипотеза о воздействии химического мутагенеза на способность штамма-продуцента, помещенного в неблагоприятные условия культивирования, синтезировать ПГА. Результаты показали, что для видимого эффекта химического мутагенеза необходимы незначительные концентрации мутагена. Это может быть связано со сложностью используемого субстрата, поэтому дальнейшие исследования необходимо направить на поиск оптимальных условий и определение концентрации используемого мутагена для эффективной продукции полимера.

ВИДОВОЙ СОСТАВ ЗЕЛЁНЫХ ЛЯГУШЕК *PELOPHYLAX ESCULENTUS* – КОМПЛЕКСА В ПРЕДЕЛАХ СЕВЕРНОЙ ГРАНИЦЫ АРЕАЛА ИХ РАСПРОСТРАНЕНИЯ

Маркелова Д.Р., Петрова В.В., Баженова Д.Э.

Череповецкий государственный университет, Череповец, Россия

drmarkelova@chsu.ru

Pelophylax esculentus – комплекс представляет собой многочисленную группу бесхвостых амфибий, широко распространенных в пределах Поволжья. Он включает три вида зеленых лягушек – озерную, *P. ridibundus* (Pallas, 1771), прудовую, *P. lessonae* (Camerano, 1882), и съедобную лягушку, *P. esculentus* (Linnaeus, 1758), произошедшую в результате гибридизации первых двух видов. Озерная лягушка в Волжском бассейне представлена двумя генетически дифференцированными формами – «западной», *P. ridibundus*, и «восточной», *P. cf. bedriagae*. Распространение и встречаемость данных форм в северной части ареала почти не изучено. Анализ морфологии отдельных особей и популяций имеет значение для выявления новых диагностических признаков видов, отвечает более точной их идентификации в естественной среде, что можно использовать при разработке стратегий экологического мониторинга популяций, сохранения биоразнообразия и защиты особенно уязвимых видов.

Целью исследования явилось выявление видового состава *Pelophylax esculentus* – комплекса в пределах северной границы его ареала: побережье Рыбинского водохранилища (Ярославская область).

Сбор данных проводился в летние полевые сезоны 2023 и 2024 года. Было обследовано 12 прудов, площадь исследования составила 2 170 м². Всего проанализировано 90 особей рода *Pelophylax*. В полевых условиях осуществлялась первичная оценка их видовой принадлежности. Оценивались такие стандартные морфологические характеристики зеленых лягушек, как форма и относительные размеры внутреннего пяточного (метатарзального) бугра, относительная длина голени и окраска резонаторов самцов, а также признаки, зависящие от внешних факторов среды - длина тела и фоновая окраска дорсальной и вентральной сторон тела.

В результате нам удалось идентифицировать два вида: *P. ridibundus* и *P. lessonae*, среди которых доминирующим оказался вид *P. lessonae* (98% от всей выборки), встречающийся во всех исследуемых водоемах, а две особи были идентифицированы как *P. ridibundus*. Следует отметить, что идентификация видов комплекса *Pelophylax esculentus* сопряжена с определенными трудностями из-за морфологического сходства и перекрытия признаков между видами. В связи с этим верификация видов была осуществлена нами также с использованием мультиплексной полимеразной цепной реакции.

Данные молекулярно-генетического анализа показали, что достоверно на обследованной территории присутствуют виды *P. lessonae* и *P. ridibundus*. Кроме того, молекулярный анализ ядерной и митохондриальной ДНК зеленой лягушки, первично идентифицированной как *P. lessonae*, показал ее принадлежность к «восточной» форме *P. cf.*

bedriagae, тогда как по литературным данным в Ярославской области ранее были отмечены только такие виды комплекса как *P. lessonae*, *P. ridibundus* и их гибрид.

Вопрос видовой самостоятельности лягушки *P. cf. bedriagae*, исследование границ ее ареала, изучение возможности ее гибридизации, представляют определенный научный интерес. Полученные нами данные молекулярно-генетического анализа расширяют зону симпатрии и вероятности гибридизации «западной» и «восточной» форм озерной лягушки в Поволжье до 58° с.ш., хотя ранее она отмечалась не выше 56° с.ш.

Благодаря присутствию на исследованной территории двух родительских видов, можно также ожидать наличие их гибрида, *P. esculentus*, для которого характерно сосуществование с особями хотя бы одного из родительских видов и постоянное возвратное скрещивание с ними для поддержания генетического разнообразия.

КИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗЫ ЛИЧИНОК И ИМАГО *MUSCA DOMESTICA* L.

Маслакова К.Ю., Силиванова Е.А.

Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной энтомологии и
арахнологии – филиал Тюменского научного центра Сибирского отделения Российской
академии наук, Тюмень, Россия

k.y.maslakova@gmail.com

Комнатная муха, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) является модельным организмом для исследования физиологии и биохимии насекомых, а также тестирования инсектицидных препаратов и изучения механизмов инсектицидной резистентности. Необходимым этапом является оценка ферментов системы детоксикации насекомых, среди которых важное место занимает фермент глутатион-S-трансфераза. В данной работе нами проведено определение кинетических параметров глутатион-S-трансферазы в гомогенатах из личинок и имаго *M. domestica*. V_{max} и K_m рассчитывали при помощи графиков Лайнуивера-Берка. В эксперименте были использованы: лабораторная линия Lab_TY; природные популяции Nik, Gyl и Tav, собранные в животноводческих помещениях Тюменской области и отличающиеся уровнем устойчивости к пиретроидным инсектицидам. Результаты исследования представлены в таблице 1.

Таблица 1. Значения K_m и V_{max} в личинках и имаго *M. domestica* разных линий.

	Lab_TY			Nik			Gyl			Tav		
	Lar	Fem	Mal	Lar	Fem	Mal	Lar	Fem	Mal	Lar	Fem	Mal
n	9	12	10	14	10	11	12	12	12	12	12	10
K_m (мкМ±S.D.)	0,573± 0,242	0,461± 0,098	0,438± 0,105	0,343± 0,082*	0,596± 0,273	0,345± 0,112	0,424± 0,084	0,252± 0,039*	0,233± 0,046*	0,668± 0,396	0,437± 0,199	0,561± 0,402
V_{max} (мкМ/мин/мг белка±S.D.)	0,546± 0,183	0,708± 0,095	0,617± 0,081	0,387± 0,087*	0,665± 0,191	0,460± 0,103*	0,481± 0,079	0,446± 0,037*	0,443± 0,057*	0,650± 0,286	0,663± 0,144	0,552± 0,191

Примечание: n – выборка; Lar – личинки; Fem – самки; Mal – самцы, * – статистически значимые отличия по сравнению с особями Lab_TY ($p < 0,05$; критерий Данна).

При сравнении кинетических параметров фермента у особей личиночной стадии наименьшие значения V_{max} и K_m отмечены у личинок популяции Nik: в 1,4 и 1,7 раза соответственно меньше, чем у личинок лабораторной культуры. Среди имаго наиболее низкие значения V_{max} и K_m были у особей популяции Gyl: в 1,6 и 1,8 раза соответственно у самок, в 1,4 и 1,9 раза соответственно у самцов меньше относительно особей лабораторной культуры.

Полученные результаты демонстрируют отличия в значениях кинетических параметров между лабораторной и природными популяциями *M. domestica*, что может быть

следствием регулярного применения инсектицидов в хозяйствах. Варьирование исследованных параметров между природными популяциями свидетельствует о разной инсектицидной нагрузке на популяции в животноводческих помещениях, что необходимо учитывать при разработке эффективных программ по контролю численности насекомых ветеринарного значения.

Работа выполнена Всероссийским научно-исследовательским институтом ветеринарной энтомологии и арахнологии ТюмНЦ СО РАН в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № FWRZ-2022-0022).

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ШТАММА ЦИАНОБАКТЕРИЙ РОДА *NOSTOC*

Невзорова Ю.В.¹, Давыдов Д.А.², Редькина В.В.³

¹Институт проблем промышленности Севера - обособленное подразделение ФИЦ Кольский научный центр РАН, Апатиты, Россия

²Полярно-альпийский ботанический сад-институт им. Н.А. Аврорина – обособленное подразделение ФИЦ Кольский научный центр РАН, Апатиты, Россия

³Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН – обособленное подразделение ФИЦ Пущинский научный центр биологических исследований РАН, Пущино, Россия

junevzorova@mail.ru

Деградация земель представляет собой глобальную угрозу для благополучия человека и окружающей среды. Она приводит к эрозии, потере питательных веществ, снижению водоудерживающей способности и уменьшению толщины слоя почвы, наиболее полезного для роста растений. Воздействие атмосферных выбросов предприятий цветной металлургии, в частности в г. Мончегорск (Мурманская область), привело к формированию техногенных пустошей с сильно деградированными почвами из-за токсичного воздействия тяжелых металлов (ТМ), одним из которых является медь. В качестве инструмента контроля эрозии и восстановления плодородия почв предлагаются микроводоросли, естественные колонизаторы разнообразных субстратов. В связи с этим, целью данного исследования являлась оценка биотехнологического потенциала штамма цианобактерий рода *Nostoc*.

Объектом данного исследования выступал штамм из коллекции культур Полярно-альпийского ботанического сад-института им. Н. А. Аврорина (ПАБСИ) *Nostoc* sp. LK-20-1 (<https://isling.org/cyano>).

Предварительный скрининг показал, что этот штамм был способен к росту на среде BG-11 с повышенным содержанием меди (2 мг/л). Время акклиматизации к данному уровню загрязнения составило три месяца. В данном исследовании проводилась повторная оценка его жизнеспособности на среде с концентрацией меди от 10 мкг/л до 2 мг/л в течение месяца. Эксперимент содержал три повторности.

Установлено, что при концентрациях меди на уровне 10, 50 и 500 мкг/л рост не отличался от контроля. В пробе с концентрацией 2 мг/л Cu рост наблюдался лишь в одной из трех повторностей, однако сформированная биопленка сохраняла нормальную пигментацию и признаки здоровой культуры. По завершении эксперимента было определено остаточное содержание меди в растворе методом атомно-абсорбционной спектроскопии (Shimadzu-AA7000G, Shimadzu Corp., Киото, Япония) с электротермической атомизацией (ПНД Ф 14.1:2:4.140-98). Установлено, что процент удаления меди живой биомассой варьировался от 7.4% (при 10 мкг/л) до 40% (при 500 мкг/л). Наибольший процент удаления меди (69.04 и 66.82%) был зарегистрирован в двух пробах с концентрацией меди на уровне 2 мг/л, где не произошло роста культуры. Предварительно можно заключить, что мертвая биомасса более эффективна в качестве биосорбента, а обратная экскреция меди в окружающую среду является

одним из механизмов адаптации к высокому уровню загрязнения тяжелыми металлами. Однако для подтверждения гипотезы требуются дальнейшие исследования.

Таким образом, штамм *Nostoc* sp. LK-20-1 оказался способен к росту при концентрации меди до 2 мг/л и способствовал удалению ТМ из раствора. Данный штамм является кандидатом для дальнейших экспериментов по разработке технологий очистки.

Работа выполнена в рамках темы НИР по госзаданию № 1023032200038-4.

ВЛИЯНИЕ ДОБАВЛЕНИЯ МАТЕРИАЛОВ ИЗ БЕДНЫХ ВЕРМИКУЛИТ-
ЛИЗАРДИТОВЫХ РУД НА ИЗМЕНЕНИЕ СВОЙСТВ
ТЕХНОГЕННО ЗАГРЯЗНЕННОЙ ПОЧВЫ С ГЛУБИНОЙ

Петрова А.Г.^{1,2}, Слуковская М.В.^{1,2}

¹Лаборатория природоподобных технологий и техносферной безопасности Арктики,
Кольский научный центр РАН, Апатиты, Россия

²Институт химии и технологии редких элементов и минерального сырья им. И.В. Тананаева,
Кольский научный центр РАН, Апатиты, Россия

pet.anna93@mail.ru

Разработка и добыча полезных ископаемых на Кольском полуострове оказывает влияние на ландшафты и экосистемы как в местах добычи, так и на прилегающие территории. Одной из главных задач для регионов Крайнего Севера является сохранение устойчивости экосистем в условиях техногенного воздействия. Минералогические и химические характеристики вермикулит-лизардитовых бедных руд, заскладированных в процессе добычи флогопита, позволяют использовать их в качестве сорбционно-активного материала, нейтрализующего токсичные соединения тяжелых металлов. При обогащении из них был получен зернистый продукт (VL) с содержанием целевых минералов ~30%, а также хвостовой продукт, состоящий преимущественно из пироксенов с содержанием целевых минералов ~7% (PR).

На техногенно загрязненной территории вблизи медно-никелевого предприятия «Кольская ГМК» (г. Мончегорск, Мурманская область) были сформированы экспериментальные участки площадью 1 м² каждый. VL и PR вносили в загрязненную торфяную почву в количестве 25, 50, 75 об. %, термоактивированный продукт LT (VL, обожжённый в муфельной печи при 700 °С) – 1, 5, 10 об.%. Поверх почвосмесей были выложены рулонные газоны из овсяницы тростниковой, предварительно выращенные на 1 см слое термовермикулита. Через три года был проведен отбор почв по слоям 0–10, 10–20, 20–30 см.

Загрязненная торфяная почва характеризовалась кислой реакцией среды (рН 4,15). Внесение 50 об. % VL и PR приводило к увеличению рН в слое 0-10 до нейтрального и слабощелочного (рН 7,4–8,23), при этом с глубиной рН снижался до среднекислого. В серии LT при внесении 10% рН увеличивался до слабокислого (4,59–5,02). Исходная торфяная почва на участке рекультивации имела высокое содержание водорастворимой фракции металлов, которое увеличивалось с глубиной: от 9,8 до 132,5 мг/кг для Cu, от 53 до 170 мг/кг – для Ni. Внесение лишь 25% минерального материала в слое 0-10 уже оказывало эффект на снижение концентрации металлов в водорастворимой фракции: в серии VL для Cu до 2,5 мг/кг, а Ni – до 0,8 мг/кг, в серии PR – до 6 и 2 мг/кг, соответственно. В серии LT при внесении 10% материала содержание Cu и Ni составляло 14,5 и 10,5 мг/кг, соответственно.

Зернистый VL продукт является более сорбционно-активным, по сравнению с PR, в слое 10-20 см отмечено высокое накопление водорастворимой фракции Cu – 10,5 мг/кг; Ni –

2,7 мг/кг. В сериях PR и LT отмечено накопление подвижных форм Cu и Ni по глубине почвенного горизонта. Концентрации Ca и Mg увеличивались при внесении минерального материала. Максимальное накопление отмечено в серии LT при внесении 10%, с глубиной концентрации Ca увеличивались до 197,5 мг/, Mg до 117,5 мг/кг, что связано с наличием этих элементов питания в исходной почве.

Результаты исследования показали, что внесение 10 об. % LT недостаточно для снижения токсичности почв. Добавление минеральных материалов в количестве 25 об. % является минимальным, а оптимальная доза внесения для поддержания баланса элементов питания в почве составляет ≥ 50 об. % – VL, ≥ 75 об. % – PR.

Работа поддержана грантом РФФ 21-77-10111.

ИССЛЕДОВАНИЕ СКРЫТОГО БИОРАЗНООБРАЗИЯ *PELTOGASTERELLA GRACILIS*
(CIRRIPEDIA: RHIZOCERPHALA)

Петруняк А.М.¹, Лянгузова А.Д.^{1,2}, Крупенко Д.Ю.¹, Полюшкевич Л.О.³,
Арбузова Н.А.^{1,2}, Ласкова Е.П.¹, Миролюбов А.А.²

¹Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра зоологии беспозвоночных,
Санкт-Петербург, Россия

²Зоологический институт РАН, лаборатория по изучению паразитических червей и
протистов, Санкт-Петербург, Россия

³Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра эмбриологии,
Санкт-Петербург, Россия

aleksandrpetrunyak27@gmail.com

Rhizocerphala, или корнеголовые ракообразные – уникальная группа высокоспециализированных паразитических усонюгих раков. Они паразитируют на других ракообразных, преимущественно на десятиногих. В связи с глубокой адаптацией к эндопаразитическому образу жизни, данная группа утратила типичные для свободноживущих усонюгих раков черты строения, в том числе наличие сегментации и конечностей. В теле взрослой самки выделяют две функциональные части: интерну, сеть разветвленных трофических столонов внутри тела хозяина, и экстерну, мешкообразную репродуктивную структуру, расположенную снаружи покровов хозяина. Количество четких морфологических признаков у корнеголовых крайне мало, что делает проблему криптических видов особенно актуальной в этой группе. Объектом нашего исследования, *Peltogasterella gracilis*, встречается по меньшей мере на десяти видах раков-отшельников из рода *Pagurus*. Учитывая широкий круг хозяев и некоторые различия в морфологии экстерны и интерны паразитов из разных хозяев, мы предполагаем наличие генетической изменчивости среди особей *P. gracilis*, встречающихся на разных хозяевах. Целью нашей работы является исследование внутривидового генетического разнообразия паразитов из разных хозяев. Материал был собран в период с 2021 по 2024 год на морской биологической станции «Восток» ННЦМБ ДВО РАН. В настоящий момент мы выделили ДНК из более чем 20 особей *Peltogasterella gracilis*, обнаруженных в *Pagurus middendorffii*, *P. gracilipes*, *P. ochotensis*, *P. proximus* и *P. pectinatus*. Нами было проведено секвенирование фрагмента участка 18S рДНК для каждого из паразитов, встречающихся на четырех видах хозяев: *Pagurus middendorffii*, *P. pectinatus*, *P. ochotensis* и *P. gracilipes*. Филогенетические деревья были построены методом Байесовского анализа при помощи программы MrBayes, а также на сервере CIPRES. Для построения сети гаплотипов нами была использована программа Popart. Кроме того, для подтверждения видовой принадлежности хозяев, мы также планируем провести секвенирование фрагментов 18S рДНК, полученных из мышц раков-отшельников. В качестве промежуточного результата нами было показано, что паразиты из *Pagurus ochotensis* и *P. gracilipes* имеют две нуклеотидные замены во фрагменте 18S рДНК по сравнению с паразитами из *P. middendorffii* и *P. pectinatus*. Однако одна особь из *P. ochotensis* имеет дополнительную нуклеотидную замену. Основываясь на этих данных, мы предполагаем наличие генетической изменчивости среди особей, встречающихся на *P. ochotensis*, тогда как паразиты из *P. middendorffii* и *P. pectinatus* являются генетически однородными.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 24-24-00133.

БАЗАЛЬНОЕ ДЫХАНИЕ МИКРОБНОЙ БИОМАССЫ НАРУШЕННОГО ТОРФЯНИКА (НА ПРИМЕРЕ ТАРМАНСКОГО БОЛОТНОГО МАССИВА)

Плотникова Е.С.¹, Солдатова Е.А.¹, Самохина Н.П.²

¹Институт лесоведения РАН, с. Успенское, Россия

²Научно-технологический университет «Сириус», Федеральная территория Сириус, Россия

baikalogin@gmail.ru

Активность микробного сообщества является важным индикатором состояния и качества почв. Изменение типа землепользования влияет на почвенную структуру, увлажнение, растительность, приводя не только к угнетению микроорганизмов, но и к потере органического вещества почвы. Целью данного исследования было оценить активность микроорганизмов в почвах нарушенной торфяной залежи.

Были изучены несколько участков в пределах Тарманского болотного массива (Тюменская область), осушенного в 1960-70 гг. для добычи торфа: (1) до 1987 г. происходила добыча торфа, после подвергся вторичному заболачиванию, влажный разнотравно-тростниковый луг, *Sapric Drainic Histosol*, остаточная мощность органогенных горизонтов 50 см; (2) до 1987 г. происходила добыча торфа, после чего периодически использовался в сельскохозяйственных целях, злаково-разнотравный луг, *Sapric Drainic Histosol*; (3) участок с забалансовыми запасами, используемый как сенокос и пастбище, злаково-разнотравный луг, *Drainic Histosol*; (4) участок с забалансовыми запасами, периодически используемый как сенокос, злаково-разнотравный луг, *Drainic Histosol*; (5) осушенный участок с ненарушенной торфяной залежью (мощность 70-100 см), разнотравно-тростниковый луг, *Sapric Drainic Histosol*. Остаточная мощность органогенных горизонтов на участках 2, 3, 4 – 10-20 см. Пробы отбирались на глубине 0-10, 10-20 и 20-30 см. В воздушно сухих почвах определялась текущая влажность, наименьшая влагоемкость (WHC), pH_{KCl} , содержание органического (SOC) и неорганического углерода (SIC), общего азота (TN). Скорость базального дыхания (V_{BR}) определяли по интенсивности выделения CO_2 из предварительно инкубированной почвы (7 сут, температура 20°C, влажность 90% от WHC) в трех аналитических повторностях с помощью газоанализатора LI-830 (LI-COR, США). Углерод микробной биомассы (C_{mic}) определяли методом субстрат-индуцированного дыхания. Микробный метаболический коэффициент (qCO_2) рассчитывался как соотношение V_{BR} к C_{mic} .

Почвы участков 1 и 5 имеют слабокислый и близкий к нейтральному pH – от 5,01 до 6,33. Почвы 2, 3 и 4 участков преимущественно имеют нейтральную и щелочную реакцию, с pH – 6,62-8,32. Высокие значения водородного показателя связаны со сравнительно низким содержанием органического вещества и наличием карбонатов. Наибольшие значения V_{BR} и qCO_2 характерны для участков с сохранившимися органогенными горизонтами (1 и 5). Средняя скорость базального дыхания в слое почвы 0-30 см составляет 102,51 $мкгCO_2-C/г*сут$, qCO_2 – 0,12 $мкгCO_2-C/г*сут$. Для сухих луговых участков с малой (до 20 см) мощностью органогенных горизонтов и относительно небольшим содержанием SOC характерна низкая дыхательная активность (17,77 $мкгCO_2-C/г*сут$) и qCO_2 (0,09 $мкгCO_2-C/г*сут$) в слое почвы 0-

30 см. Низкие значения метаболического коэффициента говорят о малой доступности органического вещества для микробного сообщества, снижении активности микробиоты и скорости оборота SOC. Значения V_{BR} положительно коррелируют с C_{mic} ($r_p=0,97$), SOC ($r_s=0,70$), TN ($r_s=0,76$). Также обнаружена отрицательная взаимосвязь значений скорости базального дыхания с pH ($r_p=-0,62$).

Работа поддержана грантом РФФ № 23-77-10012.

ОЦЕНКА КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ САНИТАРНО-ПОКАЗАТЕЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПОЧВ г. БАЛАКОВО

Пряникова О.А., Голубев Д.М.

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

olesya170297@mail.ru

Почва является благоприятной средой для различных микроорганизмов, среди которых присутствуют санитарно-показательные и используются в диагностике биологического загрязнения бактерии. Уровень почвенного загрязнения определяет степень ее опасности для живых организмов. Санитарно-показательные микроорганизмы – это представители облигатной микрофлоры человека и животных, присутствие которых указывает о биологическом загрязнении почвы.

Целью исследования было выявление санитарно-значимых микроорганизмов в антропогенно нарушенных почвах г. Балаково. Балаково – крупный промышленный центр Саратовской области.

Для изучения микробиологических показателей антропогенно преобразованных почв использовали санитарно-показательные микроорганизмы: КМАФАнМ (количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов), БГКП (бактерии группы кишечной палочки), бактерии *Clostridium perfringens*. В работе исследовали 20 образцов почв. Площадками опробования были урбанозёмы, индустриозёмы, культурозёмы и природные почвы. Для выделения МАФАнМ применяли метод последовательных разведений, для определения БГКП – титрационный метод, для установления перфрингенс-титра осуществляли посев почвенных разведений в среду Вильсона-Блер.

Анализ проведенных исследований показал, что количество МАФАнМ было выше в культуроземах (от 5,7 до 7,4 lg КОЕ/г) и природных почвах (от 4,7 до 9,8 lgКОЕ/г), чем в урбанозёмах (от 5 до 7,2 lgКОЕ/г) и индустриозёмах (от 5,2 до 7,02 lgКОЕ/г). Анализ полученных данных показал, что ни в одной из проб не было обнаружено БГКП и *Clostridium perfringens*, что свидетельствует об отсутствии фекального загрязнения, как давнего, так и недавнего.

Вывод. Уровень микробиологической активности (МАФАнМ) в культуроземах и природных почвах выше по сравнению с урбано- и индустриозёмами. Это связано с более высоким содержанием органического вещества и меньшим уровнем загрязнения тяжелыми металлами. Можно предположить, что уровень санитарно-показательной микрофлоры в почвенных пробах, подвергшихся антропогенному воздействию, коррелирует с уровнем интенсивности данного воздействия.

РАЗНООБРАЗИЕ И ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЧВЕННЫХ ПРОКАРИОТ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ПЕРХЛОРАТА НАТРИЯ

Савченко В.Е.^{1,2}, Веденев Д.А.¹, Белов А.А.¹, Чепцов В.С.¹

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

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

vesavchenko21@gmail.com

Высокие концентрации перхлоратов способны обеспечивать существование жидкой воды в условиях Марса, что потенциально создает среду, в которой может быть обнаружена микробиологическая активность. Предельные концентрации перхлоратов, при которых может быть обнаружен рост микроорганизмов, установлены лишь для некоторых видов, при этом лимитирующие концентрации для микроорганизмов в целом не установлены.

В модельном эксперименте было изучено влияние перхлората натрия на сообщество гетеротрофных аэробных бактерий. В образцы аридной почвы были внесены растворы перхлората натрия (NaClO_4) или хлорида натрия (NaCl) до конечной концентрации 5% (0,6 М) и 10% (0,8 М). В качестве контроля была использована дистиллированная вода. Образцы были проинкубированы в термостате при 28°C в течение 30 дней.

По результатам высокопроизводительного секвенирования генов 16S рНК установлено, что при воздействии перхлоратов на микробные сообщества *in situ* доминирующими филумами являлись Actinomycetota и Pseudomonadota. Также в значительном количестве были обнаружены представители филума Bacteroidota.

При увеличении концентрации перхлората наблюдалось пропорциональное снижение численности культивируемых бактерий. Среди них наиболее устойчивыми оказались представители родов *Bacillus*, *Peribacillus* (филум Bacillota) и *Arthrobacter*, *Janibacter*, *Kocuria* (филум Actinomycetota).

Анализ метаболической активности почвенных микробных сообществ был проведен с помощью мультисубстратного тестирования (МСТ). Как при добавлении NaClO_4 , так и при добавлении 0,8 М NaCl выявлено снижение разнообразия потребляемых субстратов и удельной метаболической работы. Микробиота образцов, содержащих дистиллированную воду, была наиболее активной. Для образцов с 0,6 М NaClO_4 наблюдалось большее снижение разнообразия потребляемых субстратов, чем для образцов с NaCl в той же концентрации, однако, уровень метаболической работы при этом оставался сопоставимым. Спектры потребления для нативных образцов и образцов с 0,6 М NaCl были схожи, что позволяет предполагать бактериостатический эффект хлорида в данной концентрации. При концентрации 0,8 М наблюдалось одинаковое снижение разнообразия субстратов для образцов с NaClO_4 и NaCl , однако, можно заметить большее снижение удельной метаболической работы для образцов, содержащих перхлорат. При этом стоит отметить, что использованные в эксперименте концентрации солей не приводят к гибели микробного сообщества *in situ*.

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ОРГАНИЧЕСКОГО УГЛЕРОДА В СТРУКТУРНЫХ ПУЛАХ СЕРОЙ ЛЕСНОЙ ПОЧВЫ РАЗНОГО ЗЕМЛЕПОЛЬЗОВАНИЯ

Соколов Д.А.

Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения
Российской академии наук – обособленное подразделение ФИЦ «Пушчинский научный центр
биологических исследований РАН», Пушино, Россия

daimon08@list.ru

Твердые органические частицы (РОМ, размер 0.05–2 мм) и минерально-ассоциированное органическое вещество (МАОМ, размер <0.05 мм) были отнесены к группе структурных пулов ПОВ (Семенов и др., 2023), которые характеризуют его целостность и автохтонность, обеспечивают сохранность органического углерода, выполняют депонирующую, агрегирующую, протекторную и другие функции.

Использовались образцы серой лесной почвы (Luvic Retic Greyzemic Phaeozems (Loamic)), отобранные на юге Московской области под вторичным лесом возрастом свыше 75 лет с доминированием березы и со старопахотного участка, засеянного в год отбора ячменем. Подразделение ПОВ на РОМ, распределенное во фракции песка, и тонкодисперсное МАОМ в составе пыли и глины производили гранулометрическим фракционированием в трехкратной повторности. Содержание $C_{\text{орг}}$ в почве и в гранулометрических фракциях РОМ и МАОМ определяли сухим сжиганием на CN-анализаторе Vario Cube (Elementar, Германия), предварительно растирая образцы до частиц размера <0.25 мм.

В гумусовых горизонтах целинной и пахотной серой лесной почвы в виде РОМ вместе с фракцией песка находилось 18 и 8% массы почвы соответственно, а на МАОМ вместе с пылью и глиной приходилось 82 и 92%. В нижних горизонтах содержание фракции РОМ + песок уменьшалось до 3–6%, а МАОМ – увеличивалось до 94–97% от массы почвы. Концентрации углерода во фракциях РОМ и МАОМ коррелировали между собой и с $C_{\text{орг}}$ в массе почвы. Во фракции РОМ содержалось в 1.4–2.5 раза больше органического углерода, а отношение C/N было шире в 1.4–1.8 раза, чем в интактном образце почвы. В отличие от РОМ, концентрация углерода и отношение C/N во фракции МАОМ были соответственно в 1.1–1.4 и 1.2–1.3 раза меньше по сравнению с интактным образцом почвы. Отношение C-РОМ/C-МАОМ в верхних горизонтах почвы под лесом и пашней равнялось 0.60 и 0.26 соответственно, и уменьшалось с глубиной до 0.05 при всех рассмотренных видах землепользования. Размеры пулов C-МАОМ и C-РОМ коррелировали друг с другом и зависели от глубины почвенного слоя, тогда как влияние землепользования на соотношение пула обнаруживалось только для поверхностных горизонтов. В серой лесной почве в зависимости от глубины в профиле и землепользования от 59 до 93% $C_{\text{орг}}$ представлено фракцией минерально-ассоциированного органического вещества (C-МАОМ), сосредоточенного в гранулометрической фракции <0.05 мм. Соответственно, 5–35% $C_{\text{орг}}$ содержится в виде твердых органических частиц (C-РОМ) размером 0.05–2 мм. Определение размеров и соотношений структурного пула почвенного

органического вещества рекомендуется для оценки секвестрирующей и депонирующей способности почвы в программах мониторинга углерода и рекарбонизации агроэкосистем.

Работа выполнена в рамках Госзадания, рег. № 122040500037-6.

Литература.

Семенов В.М., Лебедева Т.Н., Лопес де Гереню В.О., Овсепян Л.А., Семенов М.В., Курганова И.Н.
Пулы и фракции органического углерода в почве: структура, функции и методы определения // Почвы и окружающая среда. 2023b. Т. 6. № 1. с199.

ОСОБЕННОСТИ РАЦИОНА ПИТАНИЯ СЕВЕРНОГО КОЖАНКА (*EPTESICUS NILSSONII*)
ДАРВИНСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО ПРИРОДНОГО
БИОСФЕРНОГО ЗАПОВЕДНИКА

Солнцева С.А.¹, Петрова В.В.¹, Шапкин О.А.^{1,2}

¹Череповецкий государственный университет, г. Череповец, Россия

²Дарвинский государственный природный биосферный заповедник, Россия

fiery.claw1817@yandex.ru

На территории Дарвинского государственного природного биосферного заповедника (ДГПБЗ) обитает около 9 видов рукокрылых. Северный кожанок единственный представитель рода кожаны (*Eptesicus*). Так как многие летучие мыши разных видов могут охотиться в сходных местообитаниях – они могут быть конкурентами за пищевые ресурсы. Поэтому необходимо знать особенности питания видов для будущей оценки степени перекрытия их трофических ниш.

Целью нашего исследования стало изучение рациона питания северного кожанка (*Eptesicus nilssonii*) на территории Дарвинского государственного природного биосферного заповедника. В задачи входило определение таксономической принадлежности фрагментов насекомых в пробах экскрементов северного кожанка ДГПБЗ, и выявление отрядов и отдельных семейств насекомых, доминирующих в его рационе.

Сбор материала проводился с июня по август 2019 года на территории ДГПБЗ. После отлова зверьки помещались в мешочки из хлопчатобумажной ткани на 9-10 часов, а затем выпускались в месте отлова. Фекальные шарики, собранные из мешочков, помещались в пронумерованные зип-пакеты. Пробы экскрементов северного кожанка исследовались по стандартной методике. Всего нами было обработано 15 проб от 15 особей северного кожанка (1 проба: 0,03 г. – 0,1 г.; количество фекальных шариков варьируется от 6 до 24 штук в пробе).

Результаты исследования показали, что рацион питания северного кожанка составляет семь отрядов насекомых: Diptera, Coleoptera, Lepidoptera, Hymenoptera, Heteroptera, Neuroptera, Trichoptera. Также в фекальных пробах отмечены личинки и имаго клещей отряда Mesostigmata, яйца насекомых и некрупные куски сетки. У всех особей в пробах были обнаружены фрагменты отрядов Lepidoptera и Mesostigmata. Невозможно точно утверждать, что отряд Lepidoptera преобладает в рационе кожанка, т.к. встречались только чешуйки с крыльев этих насекомых, которые не выводятся сразу из организма мышей и встречаются в фекалиях на протяжении длительного времени. Клещи являются представителями эктопаразитофауны рукокрылых, и могли попасть в пищеварительный тракт кожанка случайно, в результате вылизывания животными летательных перепонки и шерсти, поэтому частью рациона не считаются. Доминантами в рационе питания кожанка стали отряды Coleoptera и Diptera. Они встретились соответственно в пробах 14 и 13 особей. Субдоминантами стали два отряда: Hemiptera и Neuroptera, каждый из них встретился в 10 пробах. Реже всего встречались фрагменты отрядов Hymenoptera и Trichoptera, они отмечены в 7 и 4 пробах соответственно.

Главной особенностью в питании северного кожанка стало присутствие в рационе питания отряда Hemiptera. Были определены фрагменты этого отряда, принадлежащие подотрядам Auchenorrhyncha и Heteroptera. Среди фрагментов отряда Diptera присутствовали фрагменты семейства *Chironomidae* – комары-звонцы, а также фрагменты подотряда Brachycera. Подобные пищевые предпочтения можно объяснить территориальными особенностями обитания северного кожанка. Он охотится в основном на лесных опушках или в самом лесу, также может промысливать, например собирательством насекомых с коры деревьев.

Таким образом, был выявлен спектр питания северного кожанка, обитающего на территории ДГПБЗ. И основной чертой рациона является достаточно обильное присутствие отряда Hemiptera.

КОМПЛЕКСНАЯ БИОИНДИКАЦИЯ В г. ДУБНА И ЗАКАЗНИКЕ КЛЕТИНСКИЙ БОР

Сырцева М.Н.^{1,3}, Подберезный А.А.^{1,3}, Кукушкина Д.В.^{2,3}

¹ГБОУ Школа № 171, Москва, Россия

²Гимназия 53, Пенза, Россия

³РОО «Летняя школа», Тверская область, Россия

Mariana.syrtsseva@mail.ru

Метод биоиндикации позволяет напрямую оценить степень антропогенного воздействия на биогеоценоз. Наилучшего результата удастся добиться, если проводить биоиндикацию одновременно по нескольким различным группам живых организмов. Ранее подобные исследования в заказнике не проводились, что делает его интересным объектом для изучения.

Целью исследования является оценка антропогенного воздействия посредством комплексной биоиндикации на деревьях вида Ель обыкновенная (*Picea abies* L.) в г. Дубна и на территории государственного природного заказника «Клетинский бор».

Работа проводилась в промежуток с 21 июля по 4 августа 2024 года. Также в работу были включены данные по анализу состояния хвои из локации без антропогенного воздействия из Республики Финляндия, полученные в 2020 г. в качестве контрольной группы.

В работе комплексно использовались метод лишеноиндикации и биоиндикации по хвое Ели европейской. С ближней и дальней от загрязнителя сторон (или южной и северной в заказнике) собиралась хвоя с побега предыдущего года, эпиризные лишайники и лишайники с веток. Оценка состояния хвои производилась по стандартной методике. Исходя из процентного соотношения видов лишайников рассчитывался индекс полеотолерантности для каждой локации.

Доля хвои с некрозами в Клетинском Бору статистически значимо выше, чем в г. Дубна, что указывает на большую степень повреждения в связи с антропогенным воздействием. Заказник расположен на берегу реки Волга. По данным сайта гизметпо вышше по течению в 2024, 2023 и 2022 г. наблюдалось превышенное содержание меди и марганца в воде, что могло стать причиной некрозов у растений.

В Клетинском Бору дисперсия индекса полеотолерантности статистически более значима, чем в г. Дубна. Это говорит о сильной неоднородности состояния заказника в различных контрольных точках.

Длина хвои ели в Дубне больше, чем в Клетинском Бору и контрольной локации в Финляндии. Количество хвои на 10 см побега в Дубне статистически меньше, чем в заказнике, что обусловлено ускоренным ростом побегов в длину. Вероятно, это связано с повышенным содержанием CO₂ в воздухе в связи с транспортной нагрузкой в городе.

Таким образом, по результатам комплексной оценки в г. Дубна наблюдается среднее по степени между умеренным и сильным антропогенное воздействие. В Клетинском Бору наблюдается сильное антропогенное воздействие.

ОСОБЕННОСТИ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ХВОИ И ПОБЕГОВ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ (*PINUS SYLVESTRIS* L.) В УСЛОВИЯХ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ ПРОМЫШЛЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ

Уразбахтин А.А.

Уфимский институт биологии – обособленное структурное подразделение Федерального
государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального
исследовательского центра РАН, Уфа, Россия

urazbaxtin1998@mail.ru

Специфические комплексы загрязнителей неоднозначно влияют на растительные организмы, произрастающие в защитных насаждениях буферных зон предприятий. В публикациях последних лет имеется достаточно упоминаний как об отрицательном, так и положительном влиянии техногенеза на древесные растения, особенно на морфологию ассимиляционного аппарата, непосредственно контактирующего с поллютантами. Выбрано пять промышленных центров Южно-Уральского региона с разными типами загрязнения для характеристики их воздействия на морфологические параметры хвои и побегов сосны и качественной оценки выявленных адаптивных реакций: Стерлитамакский промышленный центр (СПЦ) – полиметаллическое загрязнение; Карабашский медеплавильный комбинат (КМК) – полиметаллическое загрязнение в сочетании с сернистым ангидридом; Учалинский горно-обогатительный комбинат (УГОК) – полиметаллическое загрязнение в условиях отвалов медно-колчеданной горнорудной промышленности; Кумертауский бурогольный разрез (КБР) – полиметаллическое загрязнение в условиях отвалов бурогольного разреза; Уфимский промышленный центр (УПЦ) – нефтехимическое загрязнение. В каждом промцентре в соответствии с розой ветров выделены зоны сильного загрязнения и контроль. Измерялись следующие параметры: масса абсолютно сухих побегов и укороченных побегов с двумя хвоинками, длина хвои, ширина хвои, толщина хвои, площадь хвои, длина и диаметр побегов текущего года генерации.

В СПЦ при увеличении массы (на 25%), длины (на 11,5%) и площади хвои (на 3,3%) наблюдается уменьшение ее ширины (на 5,9%) и толщины (на 12%) – изменения оцениваются как «умеренно-толерантная» адаптивная реакция; у побегов наблюдается значительный рост массы (на 44%), длины (на 15%) и диаметра (на 19,9%) – «толерантная» адаптивная реакция. В КМК незначительно увеличиваются ширина (на 6,8%), толщина (на 2%) и площадь хвои (на 2,9%) при отсутствии изменений ее длины и массы – «умеренно-толерантная» адаптивная реакция; у побегов наблюдается снижение массы (на 16,7%), длины (на 15,5%) и диаметра (на 13,7%) – «умеренно-стрессовая» адаптивная реакция. В УПЦ при уменьшении массы (на 12,9%), длины (на 5,3%), толщины хвои (на 11,8%) значительно увеличивается его ширина (на 20,4%), и незначительно площадь (на 4%) – «умеренно-стрессовая» адаптивная реакция; у побегов значительно увеличиваются масса (на 27,3%) и длина (на 30,3%) при неизменном диаметре – «толерантная» адаптивная реакция. В УГОК наблюдается значительное подавление массы (на 25%) и менее значимое длины (на 5,3%), ширины (на 6,2%), толщины

(на 5,7%) и площади хвои (на 8,3%) – «стрессовая» адаптивная реакция; у побегов при незначительном увеличении длины (на 13,5%) масса и диаметр остаются неизменными («нейтральная» адаптивная реакция. В КБР при отсутствии изменений ширины и толщины хвои наблюдается увеличение ее массы (на 25%), длины (на 7,4%) и площади (на 4,5%) – «умеренно-толерантная» адаптивная реакция; у побегов незначительно увеличивается длина (на 9,4%), но уменьшается масса (на 10%) и диаметр (на 12,9%) – «умеренно-стрессовая» адаптивная реакция. Таким образом, нефтехимическое загрязнение и полиметаллическое на отвалах медно-колчеданных руд подавляют ростовые процессы хвои и в этих условиях прослеживается общее направление в сторону «стрессовой» адаптивной реакции, что свидетельствует о низком адаптивном потенциале сосны к данным типам загрязнения, а при аэротехногенном полиметаллическом загрязнении и полиметаллическом на бурогольных отвалах наблюдается стимуляция роста тех или иных морфологических параметров хвои и в этих условиях прослеживается общее направление в сторону «толерантной» адаптивной реакции, что свидетельствует о высоком адаптивном потенциале сосны к данным типам загрязнения. Реакции морфологических параметров побегов на разные типы загрязнений являются неоднозначными по сравнению с хвоей: в КМК и КБР ростовые процессы подавляются и в этих условиях прослеживается общее направление в сторону «стрессовой» адаптивной реакции, а в СПЦ и УПЦ наблюдается стимуляция роста тех или иных морфологических параметров побегов и в этих условиях прослеживается общее направление в сторону «толерантной» адаптивной реакции; в УГОК изменения отсутствуют – «нейтральная» адаптивная реакция. В целом можно говорить о выявленной закономерности – наличии противоположных адаптивных реакций у хвои и побегов на один и тот же тип загрязнения.

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ Cs-137 В ПОЧВАХ ТУЛЬСКОЙ ОБЛАСТИ ЗОНЫ АВАРИИ НА ЧАЭС

Федоров Д.А., Ромодин Л.А., Содбоев Ц.Ц.

Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский
биофизический центр имени А.И. Бурназяна, Москва, Россия

swimmerdan@mail.ru

Обеспечение возможности ведения безопасного сельскохозяйственного производства в условиях радиоактивного загрязнения после аварии на Чернобыльской АЭС (ЧАЭС) является актуальной задачей. В результате аварии наибольшему радиоактивному загрязнению подверглись сельскохозяйственные угодья Тульской области. На загрязненных радионуклидами территориях были проведены контрмеры по реабилитации почв: радиоактивно загрязненный слой почвы переворачивался и закапывался на глубину. И тем самым техногенные радионуклиды выводились из корнеобитаемого слоя растений, чтобы снизить загрязнение продуктов растениеводства. Настоящая работа посвящена изучению вертикального распределения Cs-137 в пахотных горизонтах агроэкосистем Плавского района Тульской области, пострадавшей после аварии на Чернобыльской АЭС. Для проведения исследований были использованы методы измерения радиоактивности в счетных образцах на приборе СКС-99 «Спутник» с детектором NaI. Отбор проб почвы для измерения удельной активности Cs-137 был проведен в 2021 и 2022 гг., пробы отбирались на глубину 20 см.

Проведенный анализ удельной активности Cs-137 в верхних слоях пахотных горизонтов почвы показал, что $104,9 \pm 7,1$ Бк/кг (0–5 см), $107,3 \pm 5,0$ Бк/кг (5–10 см), $111,5 \pm 6,7$ Бк/кг (10–20 см). Практически равномерно распределение Cs-137 в пределах пахотного горизонта агроценоза обусловлено ежегодным механическим перемешиванием при проведении полевых агротехнических работ. В 20-сантиметровом слое удельная активность Cs-137 составила 323,7 Бк/кг, что соответствует плотности загрязнения в 2,6 Ки/км². Таким образом, данные территории относятся к зоне проживания с льготным социально-экономическим статусом в соответствии с распоряжением Правительства РФ от 28 марта 2023 г. N 745-р «Об утверждении перечня населенных пунктов, находящихся в границах зон радиоактивного загрязнения вследствие катастрофы на Чернобыльской АЭС» (документ вступил в силу 01 января 2024 г.). В Суворовском районе плотность поверхностного радиоактивного загрязнения 0,69 Ки/км².

Установленные закономерности распределения Cs-137 в почвенном профиле пахотных почв следует принимать во внимание и при оценке радиационно-экологической обстановки на территориях Тульской области, подвергшихся радиоактивному загрязнению в отдаленный период времени после аварии на ЧАЭС. Известно, что Cs-137 активно всасывается корнями растений и мигрирует по пищевым цепочкам в организм животных и человека. На загрязненных территориях Cs-137 препятствует получению экологически чистых продуктов питания животного и растительного происхождения.

РОЛЬ ЭНДОКРИННОГО ДИЗРАПТОРА БИСФЕНОЛА А В ИЗМЕНЕНИИ СТРУКТУРЫ КОЖНЫХ ПОКРОВОВ *EISENIA FOETIDA*

Цховребов В.Н., Пермякова С.С.

Южно-Уральский государственный медицинский университет, Челябинск, Россия

jellybellybean@bk.ru

Современная экология сталкивается с многочисленными вызовами, связанными с воздействием химических загрязнителей на организм живых существ. Одним из самых распространенных загрязнителей является эндокринный дизраптор бисфенол А, широко используемый в производстве пластиковых изделий и других потребительских товаров. Он проявляет способность вмешиваться в гуморальную регуляцию, что может негативно отражаться на физиологии различных организмов. Дождевые черви, такие как *Eisenia foetida*, представляют собой важный компонент почвенных экосистем, играя ключевую роль в разложении органических веществ и поддержании здоровья почвы. Учитывая важность дождевых червей для экосистемы, а также потенциальные угрозы, связанные с загрязнением окружающей среды, изучение влияния бисфенола А на данную группу организмов становится актуальной задачей.

В связи с этим целью настоящего исследования является анализ структурных изменений кожных покровов *Eisenia foetida*, вызванных влиянием эндокринного дизраптора бисфенола А. Объектом исследования выступили 20 особей *Eisenia foetida* с длиной тела 3–4 см, разделенные на две экспериментальные группы: контрольная группа, включающая 10 интактных особей и опытная группа, включающая 10 особей, выращенных в условиях повышенной концентрации бисфенола А. Обе группы содержались в стандартных условиях, однако в контейнер, где содержалась опытная группа червей, предварительно была внесена порция бисфенола А в концентрации 100 мкг на 1 кг субстрата. Длительность эксперимента составила около 3 месяцев, до достижения червями длины тела 7–8 см. Далее из объектов исследования были изготовлены тотальные поперечные срезы, окрашенные гематоксилином и эозином, ШИК-реакцией по Мак-Манусу, трихромом по Маллори. Оценку полученных препаратов производили с использованием программно-аппаратного комплекса «Видео Тест – Морфология 5.0». Статистическую обработку полученных данных производили с использованием программного обеспечения IBM SPSS Statistics 23.

В ходе анализа полученных данных, нами было установлено, что бисфенол А в концентрации 100 мкг на 1 кг субстрата, приводит к значимому уменьшению толщины эпидермиса и, покрывающей его, кутикулы. Количество базальных эпителиоцитов эпидермиса не претерпевало изменений, как и их показатель ядро-цитоплазматического отношения. Однако процентное соотношение слизистых и поддерживающих клеток эпителия кожных покровов сместилось в сторону первых. Вероятно, это можно рассмотреть, как защитный адаптационный механизм, возникающий на фоне воздействия эндокринного дизраптора и уменьшения общей толщины кожи. На фоне увеличения количества слизистых клеток их ядро-цитоплазматическое отношение сместилось в сторону ядра, а наполненность

цитоплазмы гранулами с секретом и вовсе уменьшилась, что в свою очередь говорит об истощении функциональных возможностей данных клеток. Аналогичная ситуация наблюдается и с поддерживающими клетками, что объясняет истончение кутикулы, компоненты которой они производят.

Исследование влияния бисфенола А на структуру кожных покровов дождевых червей *Eisenia foetida* позволило выявить несколько ключевых аспектов, подчеркивающих значимость этого вопроса для экологии и охраны окружающей среды. Бисфенол А демонстрирует токсические свойства, которые могут приводить к значительным изменениям в структуре кожных покровов дождевых червей. Учитывая большой спектр выполняемых покровами функций, можно предположить, что это отражается на общем состоянии данной группы организмов, их жизнеспособности, а значит и на снижении плодородия почвы, и в целом изменении экосистем.

ВЛИЯНИЕ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЙ НА СОСТОЯНИЕ МУЖСКОЙ ГЕНЕРАТИВНОЙ СФЕРЫ СОСНЫ ГОРНОЙ В ВОРОНЕЖСКОЙ ОБЛАСТИ

Чугреев М.Ю.

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

michael.yurievich@yandex.ru

Сосна горная (*Pinus mugo* Turra) – широко распространенный в озеленении и защитных посадках вид хвойных. В качестве показателя приспособленности интродуцированного вида к местным условиям произрастания можно рассмотреть результаты оценки влияния экологических условий на состояние его генеративной сферы.

Проведено исследование жизнеспособности пыльцы и адаптационного потенциала деревьев сосны горной, произрастающих при низком (Коллекционно-маточный дендрарий (КМД)), фоновом (Экспериментально-показательный дендрарий (ЭПД)) и при сильном техногенном загрязнении (в центре города, в Кольцовском сквере (КС)). Определено влияние на изучаемые показатели морфологической формы: в КМД изучались деревья желто- и краснопыльничковой формы, в остальных местах – только краснопыльничковая.

Жизнеспособность пыльцы всех деревьев была высокой и варьировала при стандартной температуре проращивания от $76,2 \pm 2,9$ до $94,4 \pm 1,4\%$. При повышении температуры у половины деревьев из КМД наблюдалось достоверное снижение числа проросшей пыльцы (в 1,2 раза). У остальных значимых изменений не происходило. Четкого влияния морфологической формы дерева на качество пыльцы не прослеживалось.

В процессе исследования встречались различные аномалии пыльцы: пыльцевые зерна с деформированным телом, оптически пустые, двусторонне прорастающие пыльцевые трубки, а также образующие ветвления и вздутия. У дерева из КС встречаются оптически пустые зерна, образующие скопления. При повышенной температуре возрастает количество вздутий, некоторые зерна вместо прорастания набухают.

Однофакторный дисперсионный анализ показал наличие достоверных различий между деревьями – Р-значение при обеих температурах проращивания было значительно ниже 0,05. Двухфакторный дисперсионный анализ средних значений подтверждает различия между деревьями и демонстрирует наличие влияния температуры проращивания на число проросших пыльцевых зерен (Р-значение составило 0,018 и 0,037, соответственно). Это говорит о том, что в 2024 году адаптационный потенциал деревьев сосны горной был снижен. Вероятно, это связано с погодными условиям во время созревания и вылета пыльцы.

Таким образом, на мужскую генеративную сферу горной сосны воздействует комплекс факторов, включающий в себя уровень техногенного загрязнения места произрастания и метеорологические условия во время созревания пыльцы и пыления. Значимых различий в качестве пыльцы двух морфологических форм изучаемого вида в данных условиях не наблюдается.

ПРОСТРАНСТВЕННОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ И МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ГРЕБЕНЧАТОЙ КРЕВЕТКИ (*PANDALUS HYP SINOTUS* BRANDT, 1851) РОССИЙСКИХ ВОД ЯПОНСКОГО МОРЯ

Чульчечкова Д.А.^{1,2}, Жмаев Д.Н.²

¹Тихоокеанский филиал федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии»,
Владивосток, Россия

²Дальневосточный Федеральный университет, Владивосток, Россия

chulchekova.da@dvfu.ru

Гребенчатая креветка (*Pandalus hypsinotus* Brandt, 1851) – один из наиболее крупных промышленно востребованных видов каридных креветок Дальневосточных морей России. В Японском море *P. hypsinotus* распространена вдоль всего российского материкового побережья, а также близ о. Сахалин. Однако в последние годы наблюдается тенденция к снижению промысловых запасов гребенчатой креветки во всех промысловых подзонах Японского моря.

Таким образом, целью данной работы является выявление особенностей пространственного распределения и морфометрических характеристик гребенчатой креветки Японского моря, а также поиск их связей с условиями окружающей среды.

P. hypsinotus – глубоководный вид, встречающийся в российских водах Японского моря на глубинах от 20 до 700 м. Для гребенчатой креветки, как и для многих других видов десятиногих ракообразных, в целом характерно увеличение размеров тела с глубиной. Так, по данным 2023 года было выявлено, что на юге Приморья в марте-апреле наблюдалось увеличение размеров тела пойманных креветок на глубинах свыше 400 м, однако на более мелководных станциях попадались особи с длинами тела промыслового размера (более 130 мм), что связано с сезонными миграциями яйценосных самок в прибрежные районы для выпуска личинок, кормовая база которых сосредоточена именно на мелководье. На севере Приморья прослеживалась классическая тенденция на увеличение размерных показателей с глубиной. В водах западного Сахалина отмечалась картина, противоположная наблюдаемой в северном Приморье (с глубиной размеры тела креветок уменьшались), что вероятно связано с сильным антропогенным воздействием в данном районе, сопряжённым с промыслом.

В данный момент считается, что в Японском море обитает только одна популяция гребенчатой креветки, поскольку пелагические личинки свободно мигрируют по всей акватории, в результате чего «правило» панмиксии вполне соблюдается, а явной разнородности в популяции не отмечается. *Pandalus hypsinotus*, пойманная в северо-западной части Японского моря в марте-апреле 2023 года, была исследована на предмет морфометрических особенностей. При анализе ряда морфометрических характеристик (различные линейные измерения тех или иных частей тела креветки) использовался метод канонического дискриминантного анализа, в результате которого была построена прогностическая модель, выявившая коэффициенты, разделяющие проанализированную

выборку на 2 довольно отличающиеся друг от друга группировки, обозначенные авторами как группа «северного района» и группа «южного района», поскольку эта разобщённость имеет связь именно с географическим параметром. Таким образом, наблюдается явная тенденция в расхождении морфометрических показателей гребенчатой креветки более южных и северных станций, а также общая неоднородность скоплений в Японском море.

Вполне вероятно, что полученный результат демонстрирует существующую в популяции япономорской гребенчатой креветки гетерогенность, проявляющуюся при изменении географического распределения особей. Данное расхождение связано с множеством внешних факторов окружающей среды, биотических и абиотических; также не стоит исключать и антропогенное воздействие на гребенчатую креветку и заселённые ей биотопы.

К ВОПРОСУ ЭКОЛОГИИ *HEDYSARUM GMELINII* SUBSP. *SETIGERUM* (TURCZ. EX
FISHER ET MEYER) KURBATSKY

Шишмарева М.Л.

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

shishmarevamarina201720162002@gmail.com

В ходе флористико-геоботанических исследований нижнего течения реки Орлик кафедрой ботаники Бурятского государственного университета им. Доржи Банзарова были изучены сообщества с участием *Hedysarum gmelinii* subsp. *setigerum* в местности Хулээр.

Узкоспециализированный ксеропетрофит, факультативный кальцефит *Hedysarum gmelinii* subsp. *setigerum* (Turcz. Ex Fisher et Meyer) Kurbatsky – южно-сибирский горно-степной стержнекорневой каудоксовый травянистый многолетник. Это бесстебельное или с укороченными стеблями растение высотой до 30 см, густо-серебристое от обильного опушения. Соцветие – густая многоцветковая кисть. Цвет венчика варьирует от розового до розово-лилового. Произрастает в горно-степном, высокогорном и степном поясах, по каменистым, щебнистым, часто карбонатным крутым склонам, на каменисто-щебнистых степях. Встречается в Горном Алтае, Хакасия, Красноярском крае, Туве, Иркутской области, Республике Саха (Якутия), заходит в Северную Монголию. В Бурятии отмечен в следующих флористических районах: Саяно-Байкальский район, нагорье Байкальское, степные и лесостепные районы Бурятии.

Hedysarum gmelinii subsp. *setigerum* является кормовым, широко применяется в народной медицине, обладает высокой декоративностью. Исследования биологически активных веществ выявили наличие в надземной части флавоноидов (большая часть которых обладает противовирусной активностью), лигнанов, гликозидов, фенолкарбоновых кислот, алкалоидов, стериннов.

На территории исследования копеечник щетинистый отмечен на вершине останца (1540 м н.у.м.) с юго-западной экспозиции во вздутоплодниково-разнотравно-овсяницево-сообществах с участием *Betula fruticosa* Pall.. Вид отмечен на склоне крутизной до 30°. В фитоценозе роль *Hedysarum gmelinii* subsp. *setigerum* не велика – его обилие в пределах + по шкале обилия видов Браун-Бланке. Общее проективное покрытие сообщества с участием копеечника не превышает 40%.

Травяной ярус представлен *Phlojodicarpus villosus* (Turcz. ex Fisch. & C.A. Mey.) Ledeb., *Vupleurum bicaule* Helm, *Carex pediformis* C.A. Mey., *Thalictrum foetidum* L., *Androsace incana* Lam., *Pedicularis* sp., *Kobresia* sp., *Festuca* sp., *Gypsophila sambukii* Schischk., *Aster alpinus* L., *Patrinia sibirica* (L.) Juss., *Youngia tenuifolia* (Willd.) Babc. & Stebbins, *Orostachys spinosa* (L.) C.A. Mey., *Pulsatilla patens* (L.) Mill. Кустарниковый ярус сложен *Berberis sibirica* Pall. и *Betula fruticosa* Pall. с обилием + и 1 соответственно.

Таким образом, в районе исследования *Hedysarum gmelinii* subsp. *setigerum* встречается на крутых склонах юго-западной экспозиции в составе степной кальцефитной растительности.

Исследование выполнено в рамках инициативного гранта ФБГОУ ВО «Бурятский государственный университет им. Д. Банзарова» № 24-06-01.

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ОВСА ПОСЕВНОГО (*AVENA SATIVA*),
ВЫРАЩЕННОГО НА ПОЧВЕ ИЗ РАЙОНА С НЕФТЯНЫМ ЗАГРЯЗНЕНИЕМ

Янгирова Л.Я.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего
образования «Тюменский государственный университет», Тюмень, Россия

Lianochka137@mail.ru

На сегодняшний день загрязнение почвы нефтепродуктами представляет собой одну из ключевых экологических угроз, которая оказывает негативное воздействие на экосистемы и экономику. Нефтепродукты (бензин, масла, дизельное топливо) содержат вредные вещества, которые могут накапливаться в почвах, снижая плодородие и качество почвы, а также уменьшая урожайность сельскохозяйственных культур. Нефтяное загрязнение может ослабить роль растений в борьбе с изменением климата, снижая их фотосинтетическую активность (способность поглощать диоксид углерода).

В рамках данной работы был проведен эксперимент по выращиванию овса на почве с территории нефтеперекачивающей станции Кондинского района. Почва для выращивания овса была взята на участке нефтяного разлива (опыт 1) и в 2,5 км от него (опыт 2).

Варианты эксперимента	Число растений	Длина растений, см	Длина корня, см	Длина гипокотыля, см	Кол-во листьев, шт	Количество корней, шт	Длина листьев, см
Контроль	100	27,90 ± 0,12	17,30 ± 0,46	6,90 ± 0,10	1,80 ± 0,03	4,90 ± 0,10	22,20 ± 0,24
Опыт 1	100	3,40 ± 0,20*	1,70 ± 0,07*	1,60 ± 0,06*	1,00 ± 0,02*	2,70 ± 0,06*	3,20 ± 0,15*
Опыт 2	100	18,90 ± 0,07*▲	13,00 ± 0,03*▲	6,10 ± 0,11*▲	1,30 ± 0,04*▲	3,70 ± 0,04*▲	14,9 ± 0,08*▲

Анализ морфометрических показателей позволяет заключить, что присутствует статистически достоверное снижение всех оцененных параметров овса в опыте 1 и опыте 2 в сравнении с контролем (таблица). Наибольшие отличия отмечены для растений, выращенных на почве с участка разлива. Так, у овса в опыте 1 выявлено уменьшение длины растений, листьев и корней в 7-10 раз, а количества листьев и корней в 1,8 раза относительно контроля, что вероятно, связано с высокой для растений концентрацией нефтепродуктов в почве. У растений в опыте 2 уменьшение морфометрических показателей относительно контрольных растений не более чем в 1,5 раза.

Когда растения находятся в окружении нефти, ее компоненты проникают в корневую систему, что может привести к ограничению роста корней и повреждению их структуры. Это

может привести к уменьшению поглощения воды и питательных веществ, а также снижению устойчивости растений к различным стрессовым условиям.

Проведенное исследование показало, что нефтяное загрязнение отрицательно повлияло на морфометрические параметры растений. Это может свидетельствовать о том, что загрязнение почвы нефтью может оказывать серьезное негативное воздействие на рост и развитие растений, что имеет важное значение в контексте экологической безопасности и охраны окружающей среды.

Секция 8

«НЕЙРОБИОЛОГИЯ»

РАЗДЕЛЕНИЕ ЭЭГ ПАТТЕРНОВ ВООБРАЖАЕМОГО ДВИЖЕНИЯ НОГ

Баёва Л.В.¹, Григорьев Н.А.^{1,2}, Гордлеева С.Ю.^{1,2}

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

²АНО «Неймарк», Нижний Новгород, Россия

bayovalarisa@gmail.com

Современный подход к реабилитации пациентов с нарушениями двигательной активности в результате различных нейротравм включает применение идеомоторной тренировки. Для улучшения результативности тренировки используются нейроинтерфейсы моторно-воображаемого типа. Командами для подобных нейроинтерфейсов выступают воображаемые движения. Воображаемое движение – это ментальное состояние, которое по своему контенту (совокупности операций, необходимых для его реализации) и структуре (отделам мозга, участвующим в его формировании) аналогично реально выполняемому движению.

Основной проблемой при распознавании паттернов ЭЭГ активности ассоциированных с воображаемым движением ног является их разделение между собой. Области коры головного мозга, ответственные за движения ног располагаются в глубине межполушарной щели, что затрудняет регистрацию исходящих сигналов. Исследование заключалось в изучении возможности разделения паттернов ЭЭГ моторного воображения ног при использовании различных схем расположения электродов.

В ходе эксперимента испытуемым требовалось выполнять 3 типа команд: воображаемое движение правой и левой ногой, и отдых. Сначала проводилось обучение классификатора, затем определялась точность классификации.

Регистрация осуществлялась при помощи электроэнцефалографа NVX52. Было использовано 4 варианта схемы постановки электродов для записи ЭЭГ: две схемы опирались на систему 10-20 и включали 6 и 32 электрода; в третьей схеме использовалось 12 электродов, расположенных по системе 10-5; разработанная в данном исследовании четвертая схема включала 12 электродов по системе 10-5, в которой группы электродов справа и слева были смещены к центру (12СЦ). Пространственная фильтрация воображаемых движений осуществлялась при помощи алгоритма Common Spatial Patterns, классификация с помощью линейного дискриминантного анализа.

Испытуемые были разделены на две группы по 6 человек в каждой: 3 женщины и 3 мужчины возрастом $21,2 \pm 0,8$ лет (среднее \pm стандартное отклонение) в первой ($0,6 \pm 0,22$ баллов при определении ведущей ноги) и 5 женщин и 1 мужчина возрастом $21,5 \pm 1,37$ лет во второй ($0,7 \pm 0,18$ баллов при определении ведущей ноги). Первая группа записывалась со схемами, содержащими 32 и 6 электродов, вторая с 12 и 12СЦ.

Наибольшая точность классификации наблюдалась при использовании схемы с 32 электродами – $41,59 \pm 6,33\%$, наименьшая точность была у схемы с 12 электродами – $35,21 \pm 1,99\%$. На ЭЭГ десинхронизация сенсомоторного ритма наблюдалась для схемы с 32

электродами на электроде С1 для правой ноги, для схемы с 12 электродами наблюдалась синхронизация ритма. Полученные результаты показали наибольшую результативность схемы с 32 электродами для задачи разделения паттернов ЭЭГ моторного воображения ног. Низкий уровень классификации для всех схем монтажа вероятно связан с выбранными методами классификации сигнала.

КООРДИНАЦИЯ ПОВЕДЕНИЯ ДРЕВНЕЙШЕГО МНОГОКЛЕТОЧНОГО БЕЗ НЕРВНОЙ
СИСТЕМЫ – *TRICHOPLAX ADHAERENS* – СО СТОРОНЫ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ
ТРАНСМИТТЕРОВ

Борман С.И.^{1,2}, Никитин М.А.², Ивашкин Е.Г.³, Воронежская Е.Е.¹

¹Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

²Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. Белозерского,
Москва, Россия

³Институт проблем экологии и эволюции им А.Н. Северцова РАН, Москва, Россия

simkha.borman@gmail.com

Trichoplax adhaerens – древнее многоклеточное животное из типа Placozoa, не имеет нейронов, но демонстрирует сложное скоординированное пищедобывательное и локомоторное поведение. Placozoa питаются биопленками бактерий и водорослей, переваривая и всасывая их всей нижней поверхностью тела. Как трихоплакс координирует свое поведение без нервных и мышечных клеток? Предполагается, что поведение клеток *T. adhaerens* координируется по принципу «объемной передачи» (volume transmission) – когда одни клетки выделяют биологически активные молекулы, а другие имеют рецепторы к ним. Мы проанализировали наличие рецепторов и физиологическую роль веществ, считающихся классическими нейромедиаторами у животных с нервной системой: ГАМК, глутамат и серотонин (5-НТ) – у *T. adhaerens*.

Мы обнаружили у *T. adhaerens* большое разнообразие рецепторов: 14 ионотропных глутаматных (iGluR), 34 метаботропных глутаматных (mGluR) и 37 ГАМК-В-подобных (GABA-B-like). Добавление 0,1 мМ L-глутамата вызывает пищевые циклы у *T. adhaerens* при отсутствии пищи, а добавление 1 мМ ГАМК вызывает подавление пищевого поведения.

У *T. adhaerens* отсутствуют типичные рецепторы к серотонину, однако обнаруживается неспецифическая гидроксилтрансфераза ароматических аминокислот, по последовательности сходная с фенилаланингидроксилазой, а также ферменты, способные осуществлять ковалентное связывание 5-НТ с белками – транслугаминазы. Функциональные эксперименты подтверждают наличие системы синтеза и захвата 5-НТ специфическими клетками *T. adhaerens*. Аппликация 5-НТ и повышение его синтеза сами по себе не оказывают эффектов на пищевое поведение. Однако добавление 5-НТ приводит к восстановлению пищевого поведения у животных с пониженным уровнем серотонина (после инкубации в блокаторе синтеза 5-НТ – параклорофенилаланине).

Таким образом, у *T. adhaerens* низкомолекулярные вещества, ставшие впоследствии передатчиками между специфическими нервными клетками, действуют по принципу всех сигнальных молекул – принципу объемной передачи. В таком случае координация на уровне всего многоклеточного организма осуществляется через паттерн экспрессии рецепторов и динамику секреции разных веществ клетками. Кроме того, возможно также действие 5-НТ по более древнему – нерцепторному – механизму. *T. adhaerens* является уникальной моделью для детального исследования таких регуляций.

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЙ СОДЕРЖАНИЯ НА ДОМИНИРОВАНИЕ САМОК КРЫС В НОРМЕ И ПОСЛЕ РАННЕГО ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

Брошевицкая Н.Д., Павлова И.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт высшей нервной
деятельности и нейрофизиологии Российской Академии Наук, Москва, Россия

multibroshka@mail.ru

Введение. Известно, что ранний постнатальный период характеризуется высокой чувствительностью к различного рода негативным воздействиям и стрессам. Согласно гипотезе «двойного удара» острый стресс в первые дни жизни оказывает серьезное негативное воздействие и делает организм более уязвимым к последующим стрессовым воздействиям, эффект от которых вызывает отклонения в поведении уже во взрослом возрасте. Ранее нами уже было продемонстрировано, что воздействие ЛПС способно оказать воздействие на социальное поведение самцов, но не самок, увеличивая у них проявления агрессии и доминирования. Была выдвинута гипотеза, что условия содержания с негативным эффектом (социальная изоляция и перенаселенность) усугубят последствия инъекции ЛПС, и мы сможем наблюдать изменения в поведении у самок.

Методика. В данном исследовании мы использовали в качестве «первого удара» липополисахаридную модель раннего провоспалительного стресса, в которой одной половине крыс на 3-й и 5-й дни жизни делалась инъекция бактериального липополисахарида (ЛПС), имитирующая бактериальную инфекцию. Второй половине делали инъекцию физиологического раствора (ФИЗ), контроль. Уже во взрослом возрасте самок крыс помещали в различные условия содержания, как стрессовые (социальная изоляция, перенаселенность), так и благоприятные (обогащенная среда). После длительного содержания в разных условиях у крыс в возрасте 5 мес проводили оценку уровня доминирования с помощью классического теста с трубой.

Результаты. Длительное содержание в условиях социальной изоляции привело к увеличению уровня доминирования у самок ФИЗ и ЛПС групп, что выразилось в увеличении числа побед в трубе. Длительное содержание в условиях обогащения среды, наоборот, уменьшало число побед среди самок ЛПС и ФИЗ групп, что говорит о меньшем уровне доминирования у животных данных групп по сравнению с группами крыс, содержащихся в стандартных условиях. Разницы в уровне доминирования между группами крыс, содержащихся в условиях перенаселенности и в стандартных, обнаружено не было.

Заключение. В рамках данной работы было впервые показано, что самки оказались подвержены влиянию негативного воздействия социальной изоляции и демонстрировали изменения в социальном поведении, что выразилось в изменении уровня доминирования.

ВВЕДЕНИЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА ВЫЗВАЛО НАРУШЕНИЕ ФИЗИЧЕСКОГО РАЗВИТИЯ И СТАНОВЛЕНИЯ СЕНСОМОТОРНЫХ РЕФЛЕКСОВ У КРЫС

Васильева Е.А., Мустакимов С.Р., Россомахин Р.А.

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

liza.vasiljeva2012@yandex.ru

Возникновение нейровоспаления в ходе раннего онтогенеза и развития мозга представляет собой фактор риска проявления когнитивного дефицита и нейродегенерации в более взрослом возрасте. Воспалительные заболевания матери опосредованно влияют как на пренатально, так и на постнатально возникающие нарушения нейрогенеза в гиппокампе плода, приводя к его дисфункции. Цель исследования – изучение влияния нейровоспаления в пренатальный период на созревание центральной нервной системы крыс. Эксперименты проводились на крысах линии Vistar в возрасте P3-30, где P0 – день рождения. Нейровоспаление индуцировалось при помощи введения внутривентрикулярно липополисахарида (ЛПС) в дозе 500 мкг/кг беременным самкам крыс на сроке E14-15. После рождения у потомства анализировали физическое развитие (изменение массы тела, темп прорезывания резцов и отлипания ушей, появление шерсти, открытие глаз), формирование сенсомоторных рефлексов (переворачивание на плоскости, отрицательный геотаксис, избегание обрыва, маятниковый рефлекс, поднимание головы, реакция на акустический стимул, обонятельная реакция, переворот в воздухе). Для анализа созревания нейронной сети гиппокампа с помощью внеклеточного электрода регистрировали эффекты селективного агониста ГАМК(A) рецепторов – изогувацина (10 мкМ, 2 мин) на популяционную активность (частоту МПД) пирамидных нейронов CA3 области гиппокампа.

Анализ данных показал, что в потомство животных с пренатальным введением ЛПС имело сниженную массу тела по сравнению с контрольной группой в течение первого постнатального месяца. Физическое развитие и своевременность становления сенсомоторных рефлексов также отставали в экспериментальной группе животных по сравнению контролем.

«Возбуждающее» действие ГАМК в мозге новорожденных крыс играет важную роль в развитии нейронных сетей, а также может являться одним из факторов для более высокой восприимчивости к судорогам и низкому порогу возникновения эпилептиформной активности в гиппокампе животных. Поэтому в следующей серии экспериментов сравнивали возникновение функционального ГАМКергического торможения в развивающемся гиппокампе крыс из контрольной группы и группы ЛПС в двух возрастных периодах: P7-P12 и P15-P21. В контроле изогувацин увеличивал частоту МПД в 63% случаев (32 из 52 срезов, N = 14) в ходе второй постнатальной недели. Наконец, на третьей постнатальной неделе изогувацин вызывал угнетение спонтанной активности нейронов, и только в 14% наблюдалось усиление популяционной активности нейронов гиппокампа (n = 14, N = 5), что демонстрирует переключение вектора действия ГАМК с «возбуждающего» на тормозной.

В гиппокампе крыс с пренатальным введением ЛПС наблюдалось больше срезов, которые в ответ на аппликацию изогувацина отвечали усилением популяционной активности нейронов. Так, в течение второй постнатальной недели – в 67% срезов (16 из 24 срезов, $N = 10$, $p < 0,05$). В течение третьей постнатальной недели, как и в контрольной группе, изогувацин демонстрировал преимущественно ингибирующее действие изогувацина ($n = 21$, $N = 9$; $p > 0,05$), но в некоторых срезах наблюдалось возбуждение.

Таким образом, вызванное липополисахаридом нейровоспаление в период беременности вызывало отставание как физического развития потомства, выраженное в двигательных и координационных нарушениях, так и в замедлении физиологического переключения вектора действия ГАМК с «возбуждающего» на тормозной в нейронах гиппокампа крыс.

ВЛИЯНИЕ ТРАВМЫ СПИННОГО МОЗГА НА НАРУШЕНИЕ СПОСОБНОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ПАМЯТИ

Ветлугина А.¹, Коновалова С.П.¹, Шиц Д.Д.³, Сысоев Ю.И.^{2,3}, Мусиенко П.Е.^{1,2,3}

¹Направление «Нейробиология», Научный центр генетики и наук о жизни,
Научно-технологический университет «Сириус», Федеральная территория Сириус, Россия

²Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

³Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный
университет, Санкт-Петербург, Россия

morpho.peleides.1997@gmail.com

Травмы спинного мозга (ТСМ) являются одной из главных причин инвалидизации, требуют длительной и интенсивной реабилитации и влияют на качество жизни всесторонне, затрагивая не только двигательные и сенсорные функции, но и вызывая глубокие изменения в центральной нервной системе (ЦНС). Одной из ключевых структур, подверженных воздействию ТСМ, является гиппокамп – область мозга, критически важная для процессов обучения, памяти и эмоциональной регуляции. Целью данного исследования было выявить эффекты ТСМ на когнитивные функции.

Исследование было выполнено на крысах-самцах линии Wistar в возрасте 3 месяцев. ТСМ моделировали методом левосторонней латеральной гемисекции, также в исследовании присутствовала группа ложнооперированных животных. Для оценки когнитивных функций животных использовались такие тесты, как узнавание нового объекта (НОР), социальность, Т-лабиринт, открытое поле и приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ). Оценка когнитивных функций проводилась на одних и тех же животных до и после гемисекции. Оцениваемые когнитивные функции включали память, социальную адаптацию, уровень тревоги и депрессии. Статистическая значимость различий между группами оценивалась с помощью критерия Краскела-Уоллиса и принималась при $p < 0.05$. НОР показал, что группа с ТСМ ($\mu=21,5$; $\sigma=6,5$) испытывает большие сложности с запоминанием объектов, чем те же животные до гемисекции ($\mu=41,4$; $\sigma=1,9$), а также по сравнению с группой без ТСМ после гемисекции ($\mu=34,8$; $\sigma=2,7$). Исходя из этого можно сделать вывод, что ТСМ негативно влияет на формирование объективной памяти, однако требуется дальнейшее гистологическое подтверждение изменений в гиппокампальном нейрогенезе и нейровоспалении, влияющих на этот процесс. Таким образом, травма спинного мозга предположительно приводит к общему нейровоспалению, что, в свою очередь, приводит к снижению нейрогенеза в гиппокампе, негативно влияя на способность животного к формированию объективной памяти.

Результаты получены при финансовой поддержке исследования, реализуемого в рамках государственной программы федеральной территории «Сириус» «Научно-технологическое развитие федеральной территории «Сириус» (Соглашение № 18-03 от 10.09.2024).

ОСТРЫЕ ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ И НЕЙРОХИМИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ РЕЗЕРПИНА
У ЛЕОПАРДОВОЙ *DANIO RERIO*

Голушко Н.И.^{1,2}, Галстян Д.С.¹, Мартынов Д.Д.^{1,2}, Козлова А.Д.²,
Смолянинова В.А.³, Калувев А.В.^{1,2,4}

¹Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова МЗ РФ,
Санкт-Петербург, Россия

²Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный
университет, Санкт-Петербург, Россия

³Российский научный центр радиологии и хирургических технологий
имени академика А.М. Гранова, Санкт-Петербург, Россия

⁴Направление «Нейробиология», Научный центр генетики и наук о жизни,
Научно-технологический университет «Сириус», Федеральная территория Сириус, Россия

abvaxk21@bk.ru

Одним из важных подходов к изучению механизмов развития и лечения депрессивных состояний в биомедицине является модель депрессии, индуцируемая резерпином. Резерпин ингибирует везикулярные транспортеры моноаминов VMAT1/2, приводя к подавлению моноаминергической нейротрансмиссии. Целью исследования было оценить острые поведенческие эффекты резерпина у взрослых зебр аданио.

В исследовании использовались 36 взрослых короткоплавниковых зебр аданио (леопардовая форма), разделенные на две группы: экспериментальная (обработка 40 мг/л резерпина) и контрольная. Перед тестированием рыбы помещались в пластиковый стакан (0,25 л) с раствором препарата на 20 минут. Резерпин растворяли в 2 мл диметилсульфоксида (DMSO); такой же объем DMSO добавляли в емкость с контрольной группой. Поведение рыб оценивали на 3-й, 7-й и 14-й день после воздействия резерпина с использованием теста нового аквариума (НТА). Анализировали такие поведенческие параметры, как частота и длительность пребывания в верхней части аквариума, пройденное расстояние. Запись и обработка данных проводились с использованием Noldus EthoVision XT11.5. Для оценки уровня моноаминов в мозге использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Рыб эвтаназировали в ледяной воде, затем производили декапитацию, выделяли головной мозг, замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C . Статистический анализ выполняли с использованием критерия Манна-Уитни, статистическая значимость устанавливалась при $p < 0,05$.

Результаты показывают, что на 3-й и 7-й дни после острого воздействия резерпин вызывал гиполокомоцию, что выражалось в статистически значимом снижении пройденного расстояния ($p=0.0007$ на 3-й день, $p=0.0381$ на 7-й день). Кроме того, на 3-й день у обработанных резерпином рыб наблюдалось значительное снижение числа перемещений в верхнюю часть аквариума. Однако на 14-й день, напротив, дистанция передвижения оказалась увеличенной по сравнению с контролем ($p=0.0196$). Нейрохимический анализ показал

снижение уровней дофамина ($p=0.0406$) и серотонина ($p=0.0181$) в мозге рыб на 3-й день после воздействия резерпина.

Таким образом, зебраданию обладают высокой чувствительностью к действию резерпина, что выражается в снижении двигательной активности в тесте нового аквариума с последующим восстановлением поведения на 14-й день. Снижение уровней дофамина и серотонина на 3-й день после воздействия указывает на способность резерпина вызывать депрессивноподобные эффекты.

Работа поддержана грантом РФФИ № 23-25-00412.

ИЗУЧЕНИЕ НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРЕПАРАТА ОМАВЕЛОКСОЛОНА В МОДЕЛИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ У МЫШЕЙ ЛИНИИ CD1

Державина В.М.¹, Ларюшкин Д.П.^{1,2}, Крицкая К.А.², Бережнов А.В.²

¹Национальный исследовательский ядерный университет «Московский инженерно-физический институт», Москва, Россия

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

dervar@yandex.ru

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) является одной из ведущих причин смертности и инвалидности во всем мире, особенно среди людей трудоспособного возраста. Вторичное повреждение мозга после ЧМТ, обусловленное окислительным стрессом и воспалительными процессами, представляет собой одну из ключевых мишеней для потенциальных терапевтических стратегий. Омавелоксолон (Omaveloxolone, RTA-408) – синтетический активатор транскрипционного фактора Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2), который играет важную роль в защите клеток от окислительного стресса и воспаления, что делает его перспективным средством для терапии ЧМТ.

Настоящее исследование направлено на оценку терапевтического потенциала RTA-408 при экспериментальной ЧМТ у мышей с акцентом на нейровоспалительные и окислительные процессы в остром периоде травмы. Мыши были разделены на четыре группы (n=15 в каждой): контрольная группа подвергалась анестезии и процедуре формирования краниального окна без нанесения травмы, интраперитонеально вводилось кунжутное масло (100 мкл); экспериментальная группа подвергалась ЧМТ с использованием импактора (RWD Life Science, Китай) и получала перитонеально кунжутное масло (100 мкл); группа Контроль + RTA-408 аналогична контрольной, но с введением RTA-408 в кунжутном масле (100 мкл); экспериментальная группа + RTA-408 подвергалась ЧМТ и получала RTA-408 в кунжутном масле (100 мкл).

После 5-дневного курса терапии животные проходили поведенческие тесты, включая ротарод (для оценки двигательной координации и моторной функции) и лабиринт Барнса (для анализа когнитивных способностей). По итогам поведенческих тестов, группа Контроль+RTA-408 показала наилучшие результаты, в то время как группа ЧМТ продемонстрировала значительное снижение когнитивных и моторных функций. В группе ЧМТ+RTA-408 наблюдалось умеренное улучшение по сравнению с ЧМТ, что указывает на возможную нейропротекторную активность RTA-408.

МРТ-исследование выявило выраженный отек головного мозга в группе ЧМТ, в то время как в группе ЧМТ+RTA-408 отмечалось уменьшение отека.

Таким образом, активация Nrf2 с помощью RTA-408 способствует снижению окислительного стресса и воспалительных реакций, что приводит к улучшению когнитивных

и моторных функций, а также уменьшению отека мозга после ЧМТ. Полученные результаты подтверждают перспективность RТА-408 как потенциального терапевтического средства для лечения ЧМТ, что требует дальнейших исследований.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ПНЦБИ РАН № 075-00607-25-00 (1024032700128-8-1.6.4 «Разработка препаратов для терапии повреждений мозга и эпилепсии: исследования *in vitro* и *in vivo*»).

АВТОМАТИЧЕСКОЕ ОБНАРУЖЕНИЕ ДЛИТЕЛЬНЫХ ЛИМБИЧЕСКИХ РАЗРЯДОВ ЛИМБИЧЕСКОЙ ЭПИЛЕПСИИ В ЗАПИСЯХ ЭЛЕКТРОЭНЦЕФАЛОГРАММЫ

**Джафарова А.С.¹, Грищенко А.А.¹, Сулейманова Е.М.², Виноградова Л.В.²,
Корнилов М.В.¹, Сысоев И.В.^{3,1}**

¹Саратовский национальный исследовательский государственный университет
имени Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия

²Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

³Санкт-Петербургский государственный университет имени Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия

dzhafarovaan@gmail.com

Лимбическая эпилепсия представляет собой одну из наиболее сложных форм эпилепсии, которая характеризуется генерализованными разрядами в лимбической системе мозга. Основная сложность её изучения заключается в диагностике, так как разряды могут быть кратковременными, скрытыми в шуме фоновой активности, а их паттерны варьируются в зависимости от индивидуальных особенностей. Традиционные методы диагностики, такие как визуальный анализ электроэнцефалограмм (ЭЭГ), требуют значительных временных затрат и высокой квалификации специалистов, что делает процесс трудоёмким и субъективным. В связи с этим разработка автоматизированных методов анализа ЭЭГ является важной задачей, способной значительно ускорить и упростить диагностику.

В рамках нашего исследования была поставлена цель – разработать алгоритм автоматического обнаружения лимбических разрядов на основе анализа записей ЭЭГ. Для этого были использованы 72 записи ЭЭГ средней длительностью около 5 часов, полученные от 8 крыс линии Wistar. У животных спонтанные генерализованные лимбические разряды были вызваны введением пилокарпина. В данной работе основное внимание было уделено анализу длинных разрядов, длительностью более 15 секунд.

Для автоматического обнаружения лимбических разрядов были выделены их ключевые характеристики: продолжительная длительность (более 15 секунд), высокая амплитуда и средняя частота 7-8 Гц. В ходе анализа длинных разрядов было выявлено, что в большинстве случаев начальная частота разряда превышала среднюю частоту: наблюдалось быстрое повышение частоты в начале разряда, а затем её снижение. Эти особенности легли в основу алгоритма автоматического обнаружения [1].

Сравнительный анализ методов показал, что наиболее подходящим инструментом для решения задачи является вейвлет-преобразование. Этот метод обладает рядом преимуществ: он позволяет одновременно анализировать временные и частотные характеристики сигнала, что особенно важно для изучения сложных паттернов, таких как лимбические разряды. В качестве базового вейвлета был выбран «мексиканская шляпа», который хорошо подходит для выделения локальных особенностей сигнала и позволяет эффективно обнаруживать характерные изменения в ЭЭГ.

Для оценки эффективности алгоритма были рассчитаны показатели специфичности и чувствительности. Специфичность отражает долю правильно обнаруженных разрядов среди всех, выделенных алгоритмом, а чувствительность показывает, насколько часто алгоритм правильно выделяет разряды, не пропуская их. В ходе экспериментов специфичность составила 60-70%, а чувствительность – 70-80%. Эти результаты подтверждают, что разработанный алгоритм обладает достаточной точностью для автоматического обнаружения лимбических разрядов.

Работа поддержана грантом РФ № 25-22-00406.

Литература.

Ершова А.С., Грищенко А.А., Сулейманова Е.М., Виноградова Л.В., Сысоев И.В. Разработка метода автоматической разметки пик-волновых разрядов у крыс-фармакологических моделей абсансной эпилепсии. // Уфа. Современная нейробиология, 2022, 111-117.

КОМПЕНСИРУЮЩАЯ РОЛЬ ПРОТОН-АКТИВИРУЕМЫХ ИОННЫХ КАНАЛОВ В ГЛУТАМАТЕРГИЧЕСКИХ СИНАПСАХ

Евланенков К.К., Жигулин А.С.

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) – натриевые ионные каналы, широко распространенные в ЦНС и ПНС позвоночных животных. Активируются при быстром снижении рН во внеклеточной среде. ASICs участвуют в широком спектре физиологических и патофизиологических процессов, включая синаптическую передачу, синаптическую пластичность, память, обучение, страх, восприятие боли, депрессию, эпилепсию, инсульт и др. Несмотря на значительный прогресс в изучении ASICs, их конкретная роль при синаптической передаче остается не выясненной. Кислое содержимое синаптических везикул при высвобождении в синаптическую щель может активировать постсинаптические ASICs и блокировать NMDA- и AMPA-рецепторы. Соответственно, возможная роль ASICs при синаптической передаче – компенсация уменьшения ответа глутаматных рецепторов вследствие ингибирования протонами, обеспечивая тем самым стабильность ответа при колебаниях рН.

Эксперименты проводились на изолированных пирамидных нейронах крыс 2 и 3 слоя медиальной префронтальной коры. Регистрация токов осуществлялась методом локальной фиксации потенциала в конфигурации «целая клетка» при потенциале фиксации -80 мВ.

Экспериментальный протокол состоял из нескольких последовательных записей: 1) регистрация ответа нейрона на совместную аппликацию 3 мМ глутамата и 10 мкМ глицина при рН 7.6; 2) регистрация ответа на резкое снижение рН до 5.0; 3) регистрация суммарного ответа протон-активируемых ионных каналов и AMPA/NMDA-рецепторов на одновременную аппликацию 3 мМ глутамата, 10 мкМ глицина и пониженного рН; 4) сначала регистрировался ответ на снижение рН в отсутствие глутамата и глицина (ответ ASICs), а затем – ответ на аппликацию глутамата и глицина с тем же рН (ответ только глутаматных рецепторов, ASICs десенситизированы к этому моменту). Для контроля стабильности записей первые 2 ответа повторялись в конце протокола.

Суммарный ответ, ответы ASICs и глутаматных рецепторов сравнивались с ответом на глутамат и глицин при рН 7.6. Пиковые и стационарные компоненты ответа глутаматных рецепторов уменьшались с закислением, рН₅₀ ингибирования составило 6.97 (IC₅₀ = 0.11 мкМ ± 0.02 мкМ) и 6.88 (IC₅₀ = 0.13 мкМ ± 0.02 мкМ) соответственно. Ответы ASICs увеличивались с закислением внеклеточного раствора с рН₅₀ 6.19 (EC₅₀ = 0.64 мкМ ± 0.13 мкМ). При рН 6.5 глутаматные рецепторы и ASICs вносили практически равный вклад в суммарный ответ. Суммарный ответ при рН от 7 до 6 не уменьшался больше чем на 20 ± 7 % (при рН 6.8, n=5) от ответа при рН 7.6.

Совокупный ответ от протон-активируемых ионных каналов и глутаматных рецепторов является довольно стабильным в широком диапазоне pH. Таким образом, ASICs способны компенсировать ингибирование AMPA/NMDA-рецепторов протонами при высвобождении глутамата в синаптическую щель в процессе синаптической передачи. Взаимодействие между ASICs и глутаматными рецепторами может играть ключевую роль в регуляции синаптической передачи и пластичности, особенно в условиях значительных колебаний pH в синаптической щели, например, при высокой нейронной активности или при патологических состояниях.

ПРОТЕКТОРНЫЕ ЭФФЕКТЫ РАСТИТЕЛЬНОГО ЭКСТРАКТА *PRUNELLA GRANDIFLORA* В ОТНОШЕНИИ ЭТОПОЗИДА НА ДРОЗОФИЛИНОЙ МОДЕЛИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Жудловский Д.Г.¹, Бобков Я.Н.¹, Антосюк О.Н.², Костенко В.В.¹

¹Институт Фундаментальной Медицины и Биологии, Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия

²Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия

dgzhudlovskiy@kpfu.ru

Болезнь Альцгеймера (БА) характеризуется накоплением в мозгу Аβ амилоидных бляшек и нейрофибрилярных клубков. Аβ бляшки представляют собой скопления процессированных фрагментов белка-предшественника амилоида (App). Растительные экстракты рода *Prunella* имеют в своем составе природные антиоксиданты и ингибиторы ацетилхолинэстеразы, в частности розмариновую кислоту, что позволяет рассматривать их в качестве потенциальных лекарственных средств для терапии БА. Используя систему UAS/Gal4, нами были получены гибриды *Drosophila Melanogaster*, у которых наблюдалась конститутивная сверхэкспрессия UAS-APP под контролем Gal4.

В ходе эксперимента мухи со сверхэкспрессией культивировались на среде с добавлением этопозида (0.04 мкг/мл), обладающего цитотоксическим действием, 10% спиртового экстракта *Prunella grandiflora*, смеси данных компонентов и на контрольной среде. Методики включали в себя оценку смертности мух на предимагинальной стадии, жизнеспособности имаго, продолжительности жизни и индекса локомоторной активности полученных гибридов, а также анализ уровня экспрессии App по интенсивности флуоресценции в головном ганглии мух и анализ экспрессии генов стресс-ответа (*p53*, *Gadd45*, *BrcA*, *DeBcl*, *cat*) методом qPCR.

Было установлено, что экстракт при введении мухам со сверхэкспрессией App не вызывает достоверных изменений предимагинальной гибели и количества жизнеспособных имаго по сравнению с контролем. Экстракт обладает геропротекторным действием, увеличивая медианную продолжительность жизни самок мух со сверхэкспрессией по сравнению с мухами из других опытных групп. *P. grandiflora* характеризуется нейропротекторным действием, увеличивая двигательную активность самок со сверхэкспрессией по сравнению с контрольной и экспериментальными группами, особенно выраженный эффект наблюдался у старых особей. В группе *Prunella* выявлено снижение интенсивности флуоресценции головного ганглия по сравнению с другими опытными группами. Результаты qPCR демонстрируют значительное снижение экспрессии генов, ассоциированных со стрессом и апоптозом в группах, получавших экстракт и экстракт совместно с этопозидом, по сравнению с группой, получавшей только этопозид.

ИЗМЕНЕНИЕ РАБОТЫ ГЛЮКОКОРТИКОИДНОЙ СИСТЕМЫ ПОТОМСТВА САМОК КРЫС, ПЕРЕЖИВШИХ ПРЕНАТАЛЬНУЮ ГИПОКСИЮ, ПРИВОДИТ К НАРУШЕНИЯМ ГЛИМФАТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

Зуган Е.А.^{1,2}, Исаков И.Э.¹, Потапова С.С.², Ветровой О.В.²

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»,
Санкт-Петербург, Россия

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Институт физиологии им. И.П. Павлова» Российской академии наук,
Санкт-Петербург, Россия

st106940@student.spbu.ru

Пренатальная гипоксия способна приводить к различным отклонениям, в частности, в работе глюкокортикоидной нейроэндокринной системы. В предыдущих работах мы показали нарушения циркадианной динамики глюкокортикоидов у переживших пренатальную гипоксию самок крыс. Нами была выдвинута гипотеза о том, что данные изменения в организме самок могут негативно влиять на развитие их потомства. Данное исследование направлено на изучение изменений работы глюкокортикоидной и глимфатической систем мозга.

Работа проведена на крысах линии Вистар. Самок крыс на 14-16 сутки беременности подвергали действию тяжелой гипобарической гипоксии (3 сеанса по 3 ч при 180 мм.рт.ст. с интервалами между сеансами 24 ч). К контрольным и пренатально гипоксированным самкам в возрасте трёх месяцев подсаживали интактных самцов. Дальнейшее исследование проводили на самцах второго поколения.

Потомки пренатально гипоксированных самок проявляли сниженную исследовательскую активность (открытое поле), тревожное (приподнятый крестообразный лабиринт) и депрессивное (тест Порсолта) поведение, а также ухудшение пространственной памяти (водный лабиринт Морриса). В их плазме крови и гиппокампе обнаружено увеличение концентрации кортикостерона, сопровождающееся уменьшением экспрессии глюкокортикоидных рецепторов (ГР) в гиппокампе при отсутствии изменений относительного содержания мРНК *nr3c1* и повышении транскрипции глюкокортикоид-зависимых генов. Ответом на действие глюкокортикоидных рецепторов, являющихся транскрипционными факторами, выступает снижение относительного содержания мРНК *aqp4* и белка AQP4 в гиппокампе, сопровождающееся накоплением бета-амилоида, что в совокупности указывает на снижение эффективности работы глимфатической системы и, предположительно, вызывает нарушение пространственной памяти.

Таким образом, последствия пренатальной гипоксии оказывают негативное влияние даже на второе поколение, проявляясь в опосредованных гиперпродукцией глюкокортикоидов нарушениях эффективности работы глимфатической системы очистки гиппокампа от

токсических продуктов и ассоциированном с этим тревожно-депрессивным поведением и нарушением пространственной памяти.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ (соглашение № 075-15-2020-921 от 13.11.2020).

ИЗМЕНЕНИЯ ОБЪЕМОВ НИЖНЕЙ ТЕМЕННОЙ И СУПРАМАРГИНАЛЬНОЙ ИЗВИЛИН У ПАЦИЕНТОВ С ПЕРВИЧНОЙ ДЕПРЕССИЕЙ ПОСЛЕ COVID-19: МРТ-ИССЛЕДОВАНИЕ

Иерусалимский Н.В.^{1,2}, Самогаева И.С.^{1,2}, Каримова Е.Д.^{1,2}, Зинчук М.С.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

Гипотеза. COVID-19 приводит к специфическим морфологическим изменениям в головном мозге, которые могут способствовать развитию первичного депрессивного эпизода в рамках постковидного синдрома. Эти изменения, обусловленные нейровоспалением, повреждением микрососудов и иммунными реакциями, значительно отличаются от структурных изменений, наблюдаемых у пациентов с депрессией, не связанной с COVID-19.

Цель исследования. Выявить структурные особенности головного мозга (ГМ) у пациентов, страдающих от первичного депрессивного эпизода после перенесенного COVID-19.

Методика. Группы испытуемых: 32 пациента с первичной депрессией после перенесенного COVID-19 (средний возраст 49 ± 13 лет), 32 пациента с первичной депрессией (средний возраст 49 ± 18 лет), 32 здоровых испытуемых (средний возраст 49 ± 15 лет). МРТ ГМ проводили на сканере EXCEL ART VantageAtlas-X («Toshiba», Япония) с индукцией магнитного поля 1,5 Тл в стандартных режимах. Определение морфометрических характеристик структур ГМ проводилось с помощью пакета программ FreeSurfer 7.2.0 (<https://surfer.nmr.mgh.harvard.edu/>). Далее был применён ковариационный анализ по факторам: группа (контроль, депрессия, COVID-19), пол и ковариант: возраст. Для коррекции эффекта множественных сравнений была применена поправка Холма-Бонферрони. Для апостериорных сравнений был применён критерий Тьюки.

Результаты. У пациентов с постковидной депрессией по сравнению с депрессивным эпизодом выявлено: снижение объема супрамаргинальной извилины в левом полушарии, снижение объема нижней теменной извилины и увеличение объема супрамаргинальной извилины в правом полушарии. У пациентов с постковидной депрессией по сравнению со здоровым контролем выявлено: снижение объема парацентральной извилины в левом полушарии и снижение объема энторинальной коры в правом полушарии. У пациентов с депрессивным эпизодом по сравнению со здоровым контролем выявлено: увеличение объема третьего желудочка, левого латерального желудочка и левого сосудистого сплетения.

Выводы. Обнаружено различие морфологических коррелятов для групп пациентов с первичным депрессивным эпизодом по сравнению с группой контроля, а также между пациентами с постковидной депрессией и депрессией в отсутствие COVID-19.

ДЕЙСТВИЕ КУРСОВОГО ПРИЕМА ТЕТРАЦИКЛИНОВОГО АНТИБИОТИКА
(ДОКСИЦИКЛИН) НА СТЕПЕНЬ МОТОРНОГО ДЕФИЦИТА У КРЫС
В ЛПС-ИНДУЦИРОВАННОЙ МОДЕЛИ НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ

Кукушкина Е.С.¹, Лебедева Е.Я.¹, Майстренко В.А.²

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

²Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

eskukushkina@mail.ru

Нейровоспаление – одно из ключевых звеньев развития нейродегенеративного процесса, приводящего к дисфункциям центральной нервной системы. Поиск фармакологических агентов, предотвращающих или снижающих выраженность нейровоспаления, ведется уже давно, причем реперофилирование ранее одобренных терапевтических агентов служит одним из перспективных подходов. Это связано с тем, что данный подход является менее ресурсозатратным по сравнению с иными направлениями разработки лекарственных средств. Целью данной работы стало изучение моторного дефицита, как проявления развития нейродегенеративного процесса, у крыс при курсовом применении доксициклина в условиях развития нейровоспаления.

Было использовано 4 группы самцов крыс *Wistar*, по 5 голов в каждой: 1-я группа – ФИЗ (0,9% раствор натрия хлорида), 2-я – ЛПС (липополисахарид), 3-я – ДОКС (доксициклин), 4-я – ДОКС+ЛПС. Животные групп ДОКС и ДОКС + ЛПС в течение двух недель ежедневно внутривентрикулярно получали раствор доксициклина (25 мг/кг). На 15-й день эксперимента крысам из группы ДОКС+ЛПС однократно внутривентрикулярно вводили ЛПС (1 мг/кг). В этот же день группе ФИЗ однократно внутривентрикулярно вводили 1 мл 0,9% раствора натрия хлорида, а группе ЛПС – ЛПС из *Escherichia coli* O55:B5 (Sigma, США) в дозе 1 мг/кг. Моторный дефицит оценивали в тесте «Сужающаяся дорожка» до введения исследуемых объектов, через 1 месяц и через 2 месяца после введения ЛПС. Установка состоит из двух сужающихся платформ разной ширины, длиной 165 см и темной камеры на узком конце установки. Для каждой конечности грызуна отдельно подсчитывали количество постановок конечности на нижнюю доску (ошибок), количество соскальзываний с верхней доски на нижнюю, а также общее количество шагов, произведенных от стартовой линии до захода животного в темную камеру. Степень выраженности моторного дефицита рассчитывали отдельно для передних и задних лап, а также общее значение для каждой крысы по формуле: $\frac{\text{Ошибка} + 0,5 \cdot \text{Соскальзывание}}{\text{Общее количество шагов}} * 100\%$.

Обнаружено, что через 1 месяц после введения ЛПС, степень моторного дефицита задних конечностей у крыс группы ЛПС была выше в среднем на 12% ($p < 0,01$), чем у крыс первой (ФИЗ) и четвертой (ДОКС+ЛПС) групп, и на 10% ($p < 0,05$), чем у крыс, получавших только антибиотик. Общий моторный дефицит у крыс с введенным ЛПС был выше в среднем на 17% ($p < 0,01$), в сравнении с остальными группами. Через 2 месяца после введения ЛПС, степень выраженности моторного дефицита задних конечностей оставалась на 6% ($p < 0,05$)

выше у крыс, получавших только ЛПС, относительно контрольной группы. Расчет общего моторного дефицита показал, что значения исследуемого показателя были превышены на 10% ($p < 0,05$) у крыс группы ЛПС по сравнению с группой ФИЗ. При определении степени выраженности моторного дефицита передних лап во всех временных точках статистически значимых отличий между группами не выявлено. Таким образом, доксициклин можно рассматривать в качестве потенциального препарата в коррекции нейровоспаления.

РИСК РАЗВИТИЯ НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ У ЖИВОТНЫХ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ГЛЮКОКОРТИКОСТЕРОИДОВ В МОДЕЛИ ЭНДОТОКСИНЕМИИ

Лебедева Е.Я.¹, Кукушкина Е.С.¹, Майстренко В.А.²

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

²Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

lena988902@yandex.ru

Введение. Одним из основных регуляторов ответной реакции организма на возникшее воспаление считают гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую систему, эффекторными молекулами которой являются глюкокортикостероиды (ГКС). Известно, что на периферии ГКС выступает в качестве противовоспалительного агента, оказывающего влияние на основные компоненты воспаления. Церебральные же эффекты ГКС не так однозначны: проведенные исследования находят подтверждения, как противовоспалительной активности ГКС, так и провоспалительной, ингибирующей течение нейровоспаления. Целью данного исследования стало выявление показателей нейровоспаления после введения глюкокортикостероидов (Дексаметазон/Метипред) при экспериментальной эндотоксинемии.

Ход эксперимента. Для достижения поставленной цели самцов крыс Wistar разделили по 10 голов на 6 группы: 1 группа – интраперитонеальное (и/п) введение физ. р-ра; 2 группа – и/п ЛПС, 1 мг/кг животного, 3 группа – и/п дексаметазон 2 мг/кг, 4 группа – и/п дексаметазон 2 мг/кг за час до введения ЛПС, 5 группа – и/п метипред 2 мг/кг, 6 группа – и/п метипред 2 мг/кг за час до введения ЛПС. На временных точках 48 часов и 10 дней после начала эксперимента у животных из каждой группы отбирали префронтальную кору и гиппокамп для выделения тотальной мРНК и проведения ОТ-ПЦР в реальном времени с оригинальными праймерами к IL-1 β , TNF- α , iNOS, IBA-1. Данные нормировали на уровне мРНК Cysc. Значимость полученной информации подтверждена методами статистического анализа. Статистический анализ был выполнен в программе GraphPad Prism 9.1.1 (GraphPad Software, США).

Результаты и выводы. В клетках коры на временной точке 48 часов в ответ на введение пресептической дозы ЛПС наблюдалось увеличение уровня экспрессии мРНК IL-1 β в 1,5 раза в группе с ЛПС по сравнению с контролем. В группах препаратов не было обнаружено достоверных изменений в сравнении с контролем. Наблюдали увеличение уровня мРНК TNF α в группах терапии в 1,5 раза по сравнению с контролем и группами с введением только препаратов, что иллюстрирует воспалительный процесс. В группах препаратов не было обнаружено достоверных изменений в сравнении с контролем. В клетках коры на временной точке 10 дней выявили двукратное увеличение уровня мРНК IL-1, TNF- α в группе патологии по сравнению с исследуемыми показателями в контрольной группе; тогда как в группах с совместным введением ЛПС и исследуемыми препаратами уровень IL-1, TNF- α превышает контрольное значение в среднем в 1,5-1,8 раза, следовательно, введение ГКС не усугубляет

течение воспалительного процесса, но не подавляет его. Реакция клеток гиппокампа была иной. На первой временной точке уровень экспрессии показателей ИЛ-1, TNF- α в группах терапии достоверно отличался от контроля, так же от контроля отличались и значения в группах с введением только ГКС, следовательно, введение ГКС не только не подавляет нейровоспаление, но и усугубляет его течение. Уровень экспрессии iNOS, IBA-1 в группах терапии так же иллюстрирует воспалительный ответ, однако в группах с введением только препаратов выявлена статистическая значимость с группой патологии и отсутствует различие с контролем, введение ГКС не вызывает увеличения данных провоспалительных факторов. Неоднозначность полученных результатов подчеркивает необходимость дальнейших исследований как механизмов действия ГКС, так и биомаркеров нейровоспаления.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПАРКИНСОНИЧЕСКОГО СИНДРОМА ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ ПАРАКВАТА

Любанский И.А., Мариевский В.Е., Симухина С.А., Зайнуллина Л.Ф.

ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Россия

lubanskii_ia@academpharm.ru

Болезнь Паркинсона (БП) – нейродегенеративное заболевание, являющееся вторым по распространенности после болезни Альцгеймера и проявляющееся преимущественно двигательными нарушениями (тремор, постуральная неустойчивость, мышечная ригидность и др.), а также некоторыми немоторными симптомами (расстройства сна, изменение поведения и др.). В основе развития заболевания лежит гибель дофаминергических нейронов экстрапирамидной системы головного мозга, вызванная накоплением белка α -синуклеина, активацией перекисного окисления липидов, нарушениями со стороны убиквитин-протеасомной системы. Одним из используемых веществ для моделирования паркинсонического синдрома (ПС) является паракват (PQ), относящийся к группе пестицидов. Механизм действия параквата реализуется через трансмембранный транспорт основания PQ с помощью нейтрального переносчика аминокислот и заключается в окислении PQ, а также продукции активных форм кислорода, что запускает перекисное окисление липидов, приводит к образованию промежуточных окисленных форм дофамина, и как следствие ведет к повреждению мембран митохондрий и вызывает накопление белка α -синуклеина.

Исследование выполнено на мышцах-самцах линии C57Bl/6. ПС моделировали внутрибрюшинным введением раствора PQ (10 мг/кг) в 0,9% NaCl (группа активного контроля) на 1, 5, 8, 12, 15, 19 дни. Пассивный контроль получал физиологический раствор аналогичным образом. Ежедневно мышам вводили плацебо (вода очищенная для контрольных групп) и леводопу (50 мг/кг) (группа леводопы). На 6, 13, 20 дни эксперимента проводился тест «вращающийся стержень» с предварительным обучением.

На первой неделе эксперимента наблюдалось снижение времени удерживания мышей группы активного контроля на стержне на 39,3% в сравнении с пассивным контролем ($p < 0,001$). На второй неделе эксперимента наблюдалось снижение времени удержания мышей группы активного контроля на стержне на 64,1% ($p < 0,001$), что объясняется накоплением PQ в головном мозге и активной фазой токсического воздействия вещества. В течение третьей недели наблюдалось снижение времени пребывания активного контроля на стержне на 64% ($p < 0,001$) в сравнении с группой пассивного контроля. В то же время терапия леводопой статистически значимо увеличивала время удержания мышей на стержне на 36,1% ($p < 0,001$) на первой, 67,2% ($p < 0,001$) на второй и 60,7% ($p < 0,001$) на третьей неделях эксперимента.

Таким образом, проведена успешная валидация модели ПС с использованием параквата, которая может быть использована в качестве инструмента для поиска новых потенциальных противопаркинсонических лекарственных средств.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации №FGFG-2025-0004.

КОМБИНАЦИЯ ЛАДАСТЕНА С ФАБОМОТИЗОЛОМ СНИЖАЕТ ВЫРАЖЕННОСТЬ
ДВИГАТЕЛЬНЫХ НАРУШЕНИЙ НА МОДЕЛИ ПАРКИНСОНИЧЕСКОГО СИНДРОМА,
ВЫЗВАННОГО 6-ГИДРОКСИДОФАМИНОМ

Мариевский В.Е., Зайнуллина Л.Ф.

ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических
технологий», Москва, Россия

marievskii_ve@academpharm.ru

Болезнь Паркинсона (БП) является нейродегенеративным заболеванием, преимущественно проявляющимся двигательными нарушениями (брадикинезией, тремором покоя и др.). Подобные симптомы обусловлены гибелью дофаминергических нейронов экстрапирамидной системы головного мозга. В настоящее время фармакотерапия БП носит симптоматический характер, поэтому поиск новых противопаркинсонических лекарственных средств с высокой эффективностью и хорошей переносимостью остается актуальной задачей. Производное адамантана – ладастен обладает дофаминпозитивным воздействием, проявляющимся в стимуляции биосинтеза дофамина *de novo*. В свою очередь, фабомотизол ранее показал себя эффективным нейропротектором в экспериментальных моделях паркинсонизма. Учитывая потенциальное дофаминпозитивное действие ладастена, а также нейропротективные свойства фабомотизола, можно предположить синергичное действие при комбинировании данных препаратов на модели паркинсонического синдрома (ПС).

Исследование выполнено на мышах-самцах линии С57Bl/6. ПС моделировали унилатеральным введением раствора, содержащего 6-гидроксидофамин (ГОДА) (5 мкг в 2 мкл), 0,9% NaCl и 0,02% аскорбиновую кислоту в правый стриатум. Ложно-оперированным животным вводили контрольный раствор без 6-ГОДА. На следующий день после операции животным вводили (перорально на протяжении 14 дней, ежедневно) комбинацию ладастена (100 и 50 мг/кг) с фабомотизолом (10 мг/кг), леводопу (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 тесте «вращающийся стержень».

Время удержания мышей группы активного контроля в тесте «вращающийся стержень» при постоянной скорости уменьшалось в 5 раз ($p < 0,0001$), по сравнению с группой пассивного контроля, а время удержания при нарастающей скорости уменьшалось в 2 раза ($p < 0,001$), что свидетельствует о наличии двигательного дефицита и нарушениях в координации движений, характерных при БП. Введение комбинации ладастена с фабомотизолом привело к восстановлению двигательной активности мышей в тесте «вращающийся стержень», при этом наибольшее время удерживания при постоянной скорости вращения достигалось на фоне введения комбинации с ладастеном в дозах 50 и 100 мг/кг и было в 5 раз ($p < 0,0001$ и $p < 0,001$ соответственно) выше времени нахождения активного контроля, а при нарастающей скорости вращения – в 2,1 раза ($p < 0,0001$) для комбинации с ладастеном в 50 мг/кг и в 1,9 раза ($p < 0,01$)

для комбинации с ладастеном в 100 мг/кг по сравнению с активным контролем. При введении леводопы наблюдалось достоверное увеличение пребывания мышей на стержне в 5 раз ($p < 0,001$) при постоянной и в 2,2 раза ($p < 0,0001$) при нарастающей скорости вращения по сравнению с активным контролем.

Таким образом, полученные результаты указывают на наличие противопаркинсонической активности комбинации ладастена с фабомотизолом, проявившейся в снижении выраженности двигательных нарушений при ПС, моделируемом интрастриатным унилатеральным введением 6-ГОДА.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № FGFG-2025-0004.

РОЛЬ АКТИВАЦИИ Gq-СОПРЯЖЕННОГО КАСКАДА В АСТРОЦИТАХ НА СЕТЕВЫЕ И
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПРОЦЕССЫ В НЕЙРОНАХ ГИППОКАМПА МЫШИ *IN VITRO*
В НОРМЕ И В МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Мифтахов Р.Р., Зюзина А.Б., Фортыхина П.А., Балабан П.М., Бородинова А.А.

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

rasimmiftahov200@gmail.com

Введение. Астроциты составляют до половины всех клеток головного мозга и, наряду с нейронами, принимают активное участие в формировании и функционировании синапсов, образуя трехчастный синапс. Нарушение работы астроцитов сопряжено с развитием нейродегенеративных заболеваний, в частности, болезни Альцгеймера (БА). Для поиска способов восстановления функций астроцитов при патологии активно используют хомогенетический подход, основанный на использовании вариантов G-белок сопряженных дизайнерских рецепторов, активируемых исключительно дизайнерскими препаратами (DREADD). В частности, стимуляция Gq-сопряженного варианта DREADD рецепторов hM3Dq в астроцитах приводит к кальций-зависимому выделению глиотрансмиттеров, модулирующих синаптическую пластичность. На сегодняшний день в литературе представлено очень мало работ по использованию хомогенетического подхода для модуляции работы астроцитов при нейропатологии и оценке такого влияния на функции нейронов. Таким образом, целью исследования стала оценка значимости активации Gq-сопряженного DREADD рецептора в астроцитах на электрофизиологические и молекулярные процессы в срезах гиппокампа мышей в норме и при моделировании БА.

Методы. Работу проводили на мышах линии B6SJL и B6SJL-Tg (5xFAD), моделирующих БА, в возрасте 6-8 месяцев. Для селективной экспрессии hM3Dq в астроцитах области CA1 гиппокампа использовали вирусный вектор AAV2/5. Через 30 дней после инъекции вектора была проведена запись и оценка амплитуды полевых возбуждающих постсинаптических потенциалов (fEPSP) на срезах гиппокампа зараженных мышей. В качестве активатора DREADD был выбран селективный агонист – Compound 21. Далее эти срезы были использованы для оценки уровня экспрессии немедленных ранних генов *Fos*, *Egr1* и *Arc* при помощи количественного ПЦР (qPCR) анализа.

Результаты. В ходе экспериментов мы обнаружили, что специфическая активация Gq-сопряженного сигнального каскада в астроцитах гиппокампа в покое не вызывает изменений амплитуды fEPSP и уровня экспрессии генов *Fos*, *Egr1* и *Arc* как в норме, так и при моделировании патологии. При этом, было выявлено значимое увеличение амплитуды fEPSP при хомогенетической стимуляции астроцитов после индукции долговременной потенциации по сравнению с контрольной группой в норме, тогда как у мышей 5xFAD в ходе пилотных экспериментов статистически значимых различий не наблюдалось. Уровень экспрессии немедленных ранних генов на фоне активации Gq-сопряженного каскада в астроцитах у здоровых и больных мышей не изменялся.

Вывод. Хемогенетическая стимуляция Gq-сопряженного каскада в астроцитах в норме способна влиять на позднюю фазу долговременной потенциации в срезах гиппокампа мышей линии B6SJL. При этом, аналогичная активация астроцитов в срезах гиппокампа мышей линии 5xFAD, моделирующих БА, не приводила к изменению синаптической пластичности. Полученные данные свидетельствуют о различиях в механизмах нейроглиальной коммуникации в норме и при нейропатологии, а также поднимают вопрос о значимости отдельных сигнальных путей в гиппокампе здоровых мышей и мышей с БА.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 24-15-00149.

ИЗОМЕРИЗАЦИЯ ПО 7 ОСТАТКУ АСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТЫ В-АМИЛОИДА УСКОРЯЕТ РАЗВИТИЕ ПАТОЛОГИИ В МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Мухина К.А.¹, Рыбак А.Д.^{1,2}, Кечко О.И.¹, Миткевич В.А.¹, Макаров А.А.¹

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

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

kristina.mukhina@gmail.com

Болезнь Альцгеймера (БА) – наиболее распространенное нейродегенеративное заболевание, характеризующееся накоплением фосфорилированного тау и бляшек, состоящих из β -амилоида (A β). Распространенной модификацией A β является изомеризация остатка аспарагиновой кислоты Asp7 (isoA β), который может составлять до 50% обнаруживаемого амилоида в мозговой ткани при БА. IsoA β значительно более токсичен для нейрональных клеток, чем A β , а также обладает большей склонностью к олигомеризации. Целью нашего исследования было сравнить эффекты A β и isoA β на поведенческие, биохимические и молекулярные изменения в модели БА, а именно на нейровоспалении, окислительном стрессе и холинергической системе.

Методы. Для создания острой модели БА мыши BALB/c были подвергнуты нейрохирургическим операциям путем инъекции A β или isoA β в желудочек мозга. Поведение животных оценивали в тестах «Открытое поле» и «Социальные взаимодействия» спустя 2 и 3 недели после инъекции. Гомогенаты мозга анализировали на биохимические и молекулярные маркеры с использованием таких методов, как анализ TBARS, метод Элмана, измерение продукции ROS, анализы активности холинэстеразы, вестерн-блоттинг, ОТ-ПЦР и ИФА через месяц после инъекции.

Результаты. IsoA β вызывает более ранние поведенческие изменения, чем A β , в частности, повышенный уровень агрессии и тревожности, характерный для ранних стадий БА. Эти изменения связаны с активацией микроглии и астроцитов, увеличением количества Iba1 и GFAP, в ответ на isoA β , что приводит к усилению продукции провоспалительных факторов, таких как IL-1 β и NF- κ B. Хотя A β повышает уровень цитокинов, он не активирует клетки мозга. IsoA β вызывает патологию тау, снижая общий уровень тау и увеличивая долю фосфорилированного тау. Оба пептида вызывают окислительный стресс; однако isoA β значительно снижает уровень восстановленного глутатиона, а также приводит к увеличению количества индуцируемой NO-синтазы. Также интактный A β и isoA β отличаются по их влиянию на NADPH оксидазы. IsoA β вызывает значительные изменения в холинергической системе, повышая уровень субъединицы α 4 никотинового ацетилхолинового рецептора, в отличие от интактного A β . Эти результаты подчеркивают отчетливые и потенциально более вредные эффекты isoA β в прогрессировании болезни Альцгеймера, что требует дальнейшего изучения его роли в нейродегенеративных процессах.

Выводы. IsoA β – более токсичный вариант амилоида, который усугубляет воспаление, усиливает окислительный стресс, нарушает холинергическую систему и приводит к поведенческим нарушениям.

Работа поддержана грантом РФФ № 19-74-30007.

ОНТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ГАМКЕРГИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ ВЫЗВАННОЙ КВАНТОВОЙ СЕКРЕЦИИ АЦЕТИЛХОЛИНА В НЕРВНО-МЫШЕЧНОМ СИНАПСЕ МЫШИ

Невский Е.С.¹, Маломуж А.И.¹, Петров К.А.^{1,2}

¹Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия

²Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова ФИЦ КазНЦ РАН,
Казань, Россия

nevskywissen@gmail.com

Гамма-аминомасляная кислота (ГАМК) является основным тормозным нейромедиатором в синапсах ЦНС. Однако, к настоящему моменту накоплены данные, указывающие на возможную сигнальную роль этой аминокислоты и в периферических синапсах, включая нервно-мышечный контакт, где функцию нейромедиатора выполняет ацетилхолин (АХ). Так, на препарате диафрагмы крысы было продемонстрировано, что аппликация ГАМК снижает количество квантов АХ, выделившихся в ответ на электрическую стимуляцию двигательного нерва, и этот эффект опосредуется активацией пресинаптических метаботропных ГАМК_B рецепторов. В процессе развития организма ГАМКергическая сигнализация нередко претерпевает значительные изменения, вплоть до того, что оказывает противоположный физиологический эффект. Настоящее исследование посвящено оценке изменений ГАМКергического механизма регуляции нейросекреции АХ в нервно-мышечном синапсе в процессе онтогенеза.

В работе анализировали влияние агониста (баклофена, 10 мкМ) и блокатора (CGP 55845, 5 мкМ) ГАМК_B рецепторов на процесс вызванной квантовой секреции АХ при одиночной электрической стимуляции двигательного нерва. Эксперименты проводили на нервно-мышечном препарате *m. Levator Auris Longus* мыши на вторые, четырнадцатые и шестидесятые сутки после рождения. Методом микроэлектродного внутриклеточного отведения потенциалов регистрировали миниатюрные и вызванные потенциалы концевой пластинки (ПКП), и анализировали величину квантового состава (количество квантов АХ, выделившихся в ответ на одиночный стимул).

Аппликация баклофена приводила к снижению количества выделяемых квантов АХ на $51.8 \pm 3.8 \%$, тогда как добавление CGP 55845, в свою очередь, сопровождалось повышением квантового выхода на $33.0 \pm 6.9 \%$. На четырнадцатые сутки постнатального развития наблюдалась противоположная картина: баклофен увеличивал, а CGP 55845 снижал количество выделяемых квантов АХ (на $29.5 \pm 5.4 \%$ и $30.1 \pm 3.8 \%$, соответственно; в контроле квантовый состав на данном этапе развития был равен 7.7 ± 0.4). У половозрелых двухмесячных животных контрольная величина квантового ответа составляла 19.6 ± 0.6 , снижалась на $23.9 \pm 3.4\%$ в присутствии агониста и не изменялась при аппликации блокатора ГАМК_B рецепторов.

Анализируя полученные данные, можно сделать следующие выводы: (i) в нервно-мышечном синапсе млекопитающего активен путь регуляции секреции АХ, опосредуемый

активацией ГАМК_B рецепторов; (ii) у мышей на вторые сутки после рождения активация ГАМК_B рецепторов эндогенной ГАМК приводит к угнетению вызванной секреции АХ; (iii) на двухнедельном сроке наблюдается “инверсия” модуляторного действия эндогенно выделяющейся ГАМК, что выражается в увеличении секреции АХ в ответ на активацию ГАМК_B рецепторов. Данные изменения коррелируют по времени с переходом от полинейрональной к мононейрональной иннервации мышечных волокон. Механизм и роль такого переключения модуляторного действия ГАМК ещё предстоит выяснить в ближайшем будущем.

Работа поддержана грантом РФФ № 24-15-00249.

ЭФФЕКТ L-КАРНИТИНА И МИЛДРОНАТА НА ВТОРИЧНЫЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОСЛЕ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ

Нестерова В.В.¹, Гуреев А.П.¹, Иванов М.Э.², Плотников Е.Ю.², Силачев Д.Н.²

¹Кафедра генетики, цитологии и биоинженерии, Воронежский государственный университет,
Воронеж, Россия

²НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского (Московский государственный
университет имени Ломоносова), Москва, Россия

n3sterova.vero@yandex.ru

По оценкам, во всем мире от 64 до 79 миллионов человек в год страдают от черепно-мозговых травм (ЧМТ) различной степени тяжести. Они являются второй по значимости причиной смерти. Митохондриальные дисфункции, возникающие в пораженном участке коры, являются одним из самых ключевых вторичных повреждений, который можно рассматривать в качестве перспективной мишени для терапевтического вмешательства. В качестве потенциальных препаратов для лечения вторичных дисфункций мы использовали пищевую добавку L-карнитин, а также его антагонист сердечный препарат милдронат. Анестезированным мышам проводили краниотомию стоматологическим буром (JessNail DM206, Китай), а после производили удар в правое полушарие стереотаксическим импактором 68099 II Precise Impactor (RWD, Китай).

В нашем эксперименте в группе мышей, получавших инъекции L-карнитина после ЧМТ, был максимальный уровень белковых маркеров воспаления и транскриптов *Tnf*, *Ptgs2* в крови, а также экспрессии маркера активации глии в мозге *Gfap*. Усиление воспалительных процессов, вероятно, связано с L-карнитин-зависимым изменением структуры сообщества кишечного микробиома, что способствовало увеличению производства ТМАО. Однако, у мышей, получавших L-карнитин, не снижалось количество копий мтДНК после ЧМТ. Это совпадало с тем, что в данной экспериментальной группе мышей наблюдалась максимальная экспрессия гена *Tfam*, что в целом может свидетельствовать об активации митохондриального биогенеза. Увеличение энергетической обеспеченности поврежденного региона мозга может способствовать ускорению регенерации после полученной травмы.

Милдронат является антагонистом L-карнитина и способствует переключению метаболизма на окисление глюкозы. Мы наблюдали, что у мышей, получавших инъекции милдроната после ЧМТ, было снижено количество воспалительных маркеров и увеличена экспрессия генов, которые участвуют в регуляции ангиогенеза, в частности *Vegfa*, *Angpt1*, *Eng* и *Pecam1*. Известно, что PECAM-1 может образовывать комплекс с eNOS и регулировать производство NO. Таким образом, мы можем предполагать, что участие милдроната в метаболизме NO, вероятно, может опосредовать его эффект на ангиогенез на фоне ЧМТ и способствовать улучшению мозгового кровотока и поддержанию функциональности гематоэнцефалического барьера в первые сутки после травмы.

В целом, наши исследования показывают, что L-карнитин стимулирует митохондриальный биогенез и поддерживает уровень митохондриальной массы в

поврежденном участке мозга, но вызывает увеличение интенсивности воспалительных процессов. Милдронат снижает системное и локальное воспаление в поврежденном участке мозга, улучшает ангиогенез, хотя не оказывает позитивного влияние на целостность и количество копий мтДНК. Вероятно, комбинированная терапия милдронатом и L-карнитином может оказаться наиболее перспективным подходом к терапии ЧМТ, но данный вопрос нуждается в дальнейшем изучении

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант РНФ № 24-74-00149).

ИЗМЕНЕНИЕ СВЯЗАННОСТИ ЭКГ И ЭЭГ СИГНАЛОВ У ЗДОРОВЫХ МУЖЧИН ВО ВРЕМЯ ПРОБЫ С ПАССИВНЫМ ОРТОСТАЗОМ

Новиков М.Ю.¹, Киселев А.Р.¹, Журавлев М.О.^{1,2}

¹Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической
медицины Минздрава России, Москва, Россия

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

mynder@mail.ru

Тестирование на наклонном столе (тилт-тест) более 50 лет используется в медицине для изучения адаптации сердечного ритма и артериального давления к изменениям положения тела. Однако отсутствие точных методов объективного анализа такой динамики является существенным ограничением. Разработка таких методов, в частности исследования синхронизации сигналов ЭЭГ и ЭКГ, позволила бы углубить знания о вегетативной регуляции и нейрокардиальных взаимодействиях, а также способствовать разработке диагностических и терапевтических подходов.

Целью работы стала разработка подобного метода анализа синхронизации ЭЭГ и ЭКГ во время тилт-теста у здоровых добровольцев. Использовались непрерывное вейвлет-преобразование и вейвлет-бикогерентность для оценки динамики нейрокардиального взаимодействия у 17 участников. Тест проводился с подъемом стола до 45 градусов на 15 минут после 15 минут в горизонтальном положении.

Динамика ритма сердечно-сосудистой системы претерпела явные существенные изменения во время тилт-теста. В среднем частота сердечных сокращений увеличилась с 1,0 – 1,05 Гц в горизонтальном положении до 1,3 – 1,4 Гц в вертикальном. Максимальные различия в характеристиках ритмической структуры ЭЭГ при вертикализации наблюдаются только для низкочастотных диапазонов колебаний - дельта, δ (1-4 Гц) и тета, θ (4-8 Гц). В то же время статистически значимых различий в показателях ЭЭГ до и после вертикализации выявлено не было. Что касается синхронизации между сигналами ЭКГ и ЭЭГ в основных диапазонах частот, нам удалось выявить значимое увеличение синхронизации при вертикализации между сигналами ЭКГ и ЭЭГ в полосе частот Δf_1 [0,25; 0,75] Гц для всех каналов ЭЭГ. При переходе к частотам Δf_2 [0,75; 1,5] Гц и Δf_3 [1,5; 2,5] Гц синхронизация, наоборот, уменьшается. В диапазоне Δf_1 [0,25; 0,75] Гц для затылочных каналов O2, O1, P4, P3, T6, T5, T4 и лобных каналов F4, Fp2 мы наблюдаем увеличение степени синхронизации от первых пяти до вторых пяти минут вертикализации. В диапазоне Δf_2 [0,75; 1,5] Гц показатель синхронизации более разнороден в горизонтальном положении, а после вертикализации для каналов ЭЭГ P4, C4, F4, Fp2, T3, F8, F7, Cz, Fz синхронизация немедленно уменьшается и остается сниженной в течение всей фазы вертикализации; для каналов O2, O1, F3, Fp1, T6, T5 уменьшение меры синхронизации происходит ступенчато.

Выявленные изменения синхронизации ЭЭГ и ЭКГ при вертикализации подтверждают активацию адаптационных механизмов. Предложенный метод анализа синхронизации

сигналов является инновационным подходом к изучению нейрокардиальных взаимодействий. Низкочастотные компоненты variability сигнала P-QRS-T могут стать перспективным показателем для дальнейших исследований, включая расширение групп здоровых испытуемых и пациентов с кардиологическими нарушениями.

Работа поддержана грантом РФФИ № 24-24-00333 «Поличастотные колебательные ритмы кровотока: сетевое моделирование функциональных связей сердечно-сосудистой и нервной систем человека», 2024-2025 гг.

ОЦЕНКА СТЕПЕНИ МИЕЛИНИЗАЦИИ СОМАТОСЕНСОРНОЙ КОРЫ КРЫСЫ ПОСЛЕ ОДНОКРАТНОЙ ВИБРИССЭКТОМИИ

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

Миелинизация необходима для нормального функционирования мозга. У крыс миелинизация начинается с 10-го постнатального дня (ПД). Было показано, что длительная сенсорная депривация вибрисковой системы, начинающаяся с 1 ПД до взрослого возраста (60 ПД), приводит к уменьшению количества миелина в корковом представительстве вибрисс – IV слое соматосенсорной коры поля баррелей (S1BF). Однако, не было проведено работ, исследующих процесс миелинизации в условиях сенсорной депривации после завершения формирования вибрисскового анализатора (9 ПД у крыс). Поэтому, целью нашей работы является оценить степень миелинизации соматосенсорной коры в области представительства вибрисс при ограничении сенсорной афферентации вибрисковой системы крысы во вторую неделю постнатального онтогенеза.

Исследование было проведено на 42 крысах Wistar. Сенсорная депривация была сформирована путем однократной вибриссэктомии. На 9 ПД вибриссы ножницами обстригали до уровня шерсти. Животные были разделены на три группы: вибриссэктомированные (VE, n=13), ложновибриссэктомированные (Sham, n=16) и интактные (Int, n=13). Для исследования миелинизации были выбраны следующие временные точки: 10-й ПД, 14-й ПД и 18-й ПД. Оценка миелинизации была проведена на фронтальных 50 мкм срезах головного мозга, иммуногистохимически окрашенных антителами к основному белку миелина (МВР) по стандартному протоколу. Для визуализации ядер нейронов была использована среда для заключения с DAPI. На увеличении $\times 200$ проводили полуколичественный анализ II/III, IV, V и VI слоев коры в области S1BF. Границы между слоями определяли по плотности расположения ядер нейронов, окрашенных DAPI. Оценку миелинизации ткани проводили по двум параметрам: наличию и яркости радиально направленных миелинизированных волокон, проходящих через несколько слоев, и наличию разнонаправленных миелинизированных волокон внутри одного слоя (РМВ). Для полуколичественной оценки была разработана балльная шкала. Для первого параметра: наименьший балл соответствовал отсутствию окрашенных волокон – 0, наибольший балл соответствовал большому количеству яркоокрашенных волокон – 9. Для второго параметра минимальной оценкой являлось отсутствие таких волокон (0 баллов), а максимальной (6 баллов) считалось количество больше 6 групп. Различия между группами были выявлены при помощи теста Краскела-Уоллиса по фактору «группа» с пост-проверкой U-критерием Манна-Уитни. Тест проводили отдельно для каждого возраста и для каждого слоя коры без поправки на множественные сравнения.

Мы наблюдали постепенное увеличение интенсивности окрашивания МВР и заполнение миелинизированными волокнами областей коры от VI к II/III слоям с 10-го по 18-й ПД. На 10-й и 14-й ПД не было выявлено значимой разницы между тремя

экспериментальными группами. На 18-й ПД было обнаружено значимое снижение уровня миелинизации радиально направленных волокон в ПШ слоях коры в группах VE и Sham по сравнению с группой Int ($p=0.04$). Количество РВМ в группах Sham и VE также ниже на уровне тенденции ($p=0.06$). Однако не было выявлено значимых различий между группами Sham и VE по обоим параметрам.

Таким образом, показано, что как ограничение сенсорного притока, так и манипуляции с крысятами при проведении процедуры стрижки вибрисс, во вторую неделю постнатального развития, приводят к нарушению миелинизации волокон во ПШ слоях сенсомоторной коры.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ОРГАНОВ ЦУКЕРКАНДЛЯ И НАДПОЧЕЧНИКОВ В АНТЕНАТАЛЬНОМ И РАННЕМ ПОСТНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДАХ 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

Введение. Органы Цукеркандля (ОЦ), мозговое вещество надпочечников и параганглии других локализаций образуют единую симпато-адреналовую систему. Эта система играет важную роль в поддержании гомеостаза организма человека со времени своего возникновения во внутриутробном периоде и на протяжении всей последующей жизни человека. По мере своего развития в различные периоды онтогенеза симпато-адреналовая система претерпевает значительные перестройки. Некоторые органы этой системы (ОЦ, каротидные тела и др. параганглии) достигают своего максимального развития во внутриутробном или раннем постнатальном онтогенезе и через определенное время после рождения подвергаются инволюции, тогда как другие (мозговое вещество надпочечников в составе комплексного органа) активно функционируют на протяжении всей жизни человека. При этом развитие ОЦ и надпочечников происходит в тесной анатомической связи друг с другом, что поднимает вопрос о морфогенетической и функциональной роли ОЦ в развитии такого сложного эндокринного органа как надпочечник. С этой целью в настоящей работе выполнено сравнение морфологических особенностей ОЦ и надпочечников в динамике раннего развития человека.

Материалы и методы. Исследованы надпочечники и органы Цукеркандля от 23 эмбрионов, предплодов, плодов человека и новорожденных возрастами от 8-9 недель постменструального срока (п.м.) до 11 дней постнатальной жизни доношенного срока (37 недель). Было произведено стандартное гистологическое исследование серийных срезов органов, окрашенных гематоксилином и эозином. Также было выполнено иммуногистохимическое исследование с антителами к ферментам синтеза катехоламинов: тирозингидроксилазе (ТН), допамин-β-гидроксилазе (DBH), фенилэтаноламин-N-метилтрансферазе (PNMT), а также к ВП-тубулину, S100, ферменту синтеза стероидных гормонов CYP21A2 и к пронейральному транскрипционному фактору ASCL1. Также была выполнена попытка детектировать апоптозы методом Tunnel (ApopTag® Peroxidase *In situ* Apoptosis Detection Kit).

Результаты и выводы. На самой ранней изученной стадии (8-9 п.м.) в развивающихся ганглиях, параганглиях и надпочечнике было выделено 2 морфологических типа клеток: крупные (LCs) и мелкие (SCs). Их соотношения, паттерны расположения и иммуногистохимические характеристики менялись по ходу развития. Характер этих изменений позволил выдвинуть следующие гипотезы: 1) Зачатки ОЦ могут служить

поставщиками клеток для мозгового вещества надпочечников; 2) среди LCs можно выделить 2 субпопуляции клеток – первично мигрировавшие крупные клетки (LCs) из зачатков ОЦ и вторичные крупные клетки (LCs), дифференцировавшиеся из мелких клеток (SCs); 3) предполагается связь появления фермента синтеза адреналина PNMT у предплода 12 п.м. с процессом синаптогенеза. Таким образом, ОЦ играют важную роль в морфогенезе надпочечников человека.

ДЕЙСТВИЕ УРИДИНА И УРИДИНМОНОФОСФАТА НА ЭНЕРГЕТИЧЕСКУЮ
АКТИВНОСТЬ КРЫС В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА
ИНДУЦИРОВАННОЙ ЛАКТАЦИСТИНОМ

**Полякова Т.В.^{1,2}, Булгин И.В.^{1,2}, Медведева В.П.^{1,2}, Миронов В.В.^{1,2},
Миронова Г.Д.², Хундерякова Н.В.²**

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и
экспериментальной биофизики РАН, Пушино, Россия

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

Renithier996@yandex.ru

Болезнь Паркинсона (БП) – это нейродегенеративное заболевание, характеризующаяся прогрессирующей дегенерацией дофаминергических нейронов в компактной части чёрной субстанции и относящиеся к «протеинопатиям», так как одной из причин ее развития является накопление внутри нейронов нерастворимых белковых агрегатов, образующих тельца Леви, что связывают с нарушением работы убиквитин-протеасомной системы (УПС). Лактацистин – это селективный необратимый ингибитор системы моноаминоксидазы, который с недавних пор используется для дегенерации дофаминергических нейронов в моделях БП.

Работа посвящена разработке нового подхода симптоматического лечения БП. В качестве лечебного средства нами были выбраны природные нуклеотиды Уридин и его производное Уридинмонофосфат (УМФ), которые, как показано в наших работах (Uspalenko N.I., et al 2023), оказывали выраженный защитный эффект на других моделях БП. Целью исследования является сравнение действия Уридина и УМФ на активность фермента митохондрий сукцинатдигидрогеназы СДГ и цитоплазмы активность лактадегидрогеназы ЛДГ в лимфоцитах в модели БП с введением лактацистина (ЛЦ).

В работе использовались самцы крыс линии Wistar массой 280 - 300 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария. Все эксперименты выполнены с учетом рекомендаций Европейской конвенции о гуманном обращении с лабораторными животными. Для моделирования БП крысам вводился селективный ингибитор ферментативной активности протеасом ЛЦ в дозе 4 мкг/мкл в компактную часть черной субстанции. Уридин и УМФ вводили внутривентрикулярно в дозе 30 мг/кг в течение 28 дней после инъекции ЛЦ.

Определение активности СДГ, биомаркеры аэробного дыхания митохондрий, и ЛДГ, биомаркера анаэробного дыхания – гликолиза, проводили цитобиохимическим (ЦБХ) методом в иммобилизованных лимфоцитах крови на мазках (Kondrashova, M.N., et al 2009).

Введение крысам лактацистина привело к достоверному ($p \leq 0,05$) увеличению в 2 раза активности СДГ (контроль $0,6 \pm 0,3$ у.е.; БП $1,2 \pm 0,85$ у.е. (у.е.- количество ДФ)), и активности ЛДГ, которая также увеличивалась в 2 раза ($p \leq 0,01$) (контроль $1,9 \pm 0,8$; БП $2,8 \pm 1,4$ у.е). Введение уридина достоверно снижало на 36 % повышенную активность СДГ

(гиперактивацию митохондрий), по-видимому, за счет механизма активации митоК_{ATP}-канала, и активности ЛДГ на 23% . Введение УМФ привело к снижению активностей СДГ – 26%, а ЛДГ - 15% у больных животных.

В нашей работе в модели БП при ингибировании убиквитин-протеосомного комплекса в черной субстанции мы обнаружили гиперактивацию СДГ и ЛДГ в лимфоцитах крови, которую ранее мы наблюдали при адреналиновом стрессе, кардиомиопатиях и гипертонии. А введенный уридин и УМФ привели к снижению гиперактивации до значений приближенных к контролю, приводя энергетический обмен к физиологической норме.

Работа поддержана грантом РНФ № 25-25-00282.

НАЛИЧИЕ НАРУШЕНИЙ В СОЦИАЛЬНОМ ПОВЕДЕНИИ КРЫС ЛИНИИ
КРУЩИНСКОГО-МОЛОДКИНОЙ

Рибик А.А., Мидзяновская И.С.

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии, Москва, Россия

rebik_anastasiya@mail.ru

Изучение линий крыс, генетически предрасположенных к эпилепсии, является многообещающим для разработки новых животных моделей коморбидности расстройств аутистического спектра и эпилепсий. Большинство подобных исследований выполнялись на фармакологических моделях провокаций судорожных припадков [1,3], что ставит вопрос о побочном влиянии химических агентов. Животные модели с генетически predetermined нарушениями, считаются более приближенными к естественно возникшим заболеваниям.

Мы проанализировали поведение взрослых самцов крыс (N=16) линии Крушинского-Молодкиной (КМ, с латентной генетической аудиогенной эпилепсией) в серии поведенческих тестов. В качестве контрольной группы выступали самцы линии Вистар (N=12), того же возраста. В тесте «социального предпочтения» присутствие социального стимула (незнакомое здорового самца линии Вистар) вызывало повышенную тревожность и сниженную исследовательскую активность у крыс КМ; резко сниженное время и число контактов со стимульным животным, сниженную горизонтальную подвижность, параллельно с усилением реакций короткого груминга и замириания. Подсадка второго стимульного животного (тест «социальной новизны») вызывало усиление этих поведенческих особенностей у КМ (сниженное время контакта, выраженная реакция замириания). Таким образом, у крыс линии КМ наблюдалась сниженная мотивация к внутривидовому взаимодействию при повышенных реакциях тревоги и страха. В то же время, в тесте «распознавания нового объекта» у крыс КМ не наблюдалось снижения исследовательских реакций на экспонированные небольшие предметы. При этом, в отличие от контрольных крыс Вистар, крысы КМ не делали различия между новым и уже знакомым объектами. У крыс линии КМ наблюдались сниженная локомоторная активность и повышенный уровень тревожности в тесте «крестообразный приподнятый лабиринт», что согласуется с полученными ранее данными других исследований [2].

Наблюдаемый дефицит социального поведения крыс КМ в тестах на социальное взаимодействие не сопровождался проявлениями локомоторной гиперактивности, характерными для некоторых других моделей коморбидности эпилепсии и сопутствующего социального дефицита (как, например, для вальпроатной модели). Таким образом, мы можем предположить, что крысы линии КМ могут служить моделью для изучения механизмов коморбидности генетической эпилепсии и социальных дефицитов, без сопутствующих признаков синдрома дефицита внимания и гиперактивности.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства образования и науки Российской Федерации на 2023-2025 годы.

Литература.

1. Crawley J.N., What's Wrong with My Mouse? Behavioral Phenotyping of Transgenic and Knockout Mice, John Wiley and Sons, 2000: 329 pp ISBN:978-0-471-47192-9
2. Surina N.M., Poletaeva I.I., Fedotova I.B., Kalinina T.S., Volkova A.V., Malikova L.A., Rayevsky K.S. Anxiety and predisposition to audiogenic epilepsy in rats of different genotypes Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2011. T.151. №1. С.47-50.
3. Gilby K.L. A new rat model for vulnerability to epilepsy and autism spectrum disorders. Epilepsia. 2008 Nov;49 Suppl8:108-10. doi:10.1111/j.1528-1167.2008.01851.x. PMID:19049604.

РОЛЬ ADAR1 В РЕГУЛЯЦИИ ГЛУТАМАТЕРГИЧЕСКОЙ НЕЙРОТРАНСМИССИИ

Рязанцева П.Е., Гайдин С.Г.

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

polina.ryazantseva@mail.ru

Глутаматная токсичность приводит к глобальному повышению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} и последующей активации апоптотических каскадов, что является одной из главных причин гибели нейронов при различных патологических состояниях нервной системы. Приток Ca^{2+} в нейроны в условиях глутаматной эксайтотоксичности обусловлен ионотропными рецепторами глутамата (iGluRs) и потенциал-зависимыми кальциевыми каналами, однако проницаемость таких iGluRs как AMPA- и каинатные рецепторы не является конститутивной и определяется помимо субъединичного состава статусом редактирования мРНК соответствующих субъединиц при участии действующих на РНК аденозиндезаминаз первого и второго типов (ADAR1 и ADAR2). В научной литературе достаточно детально описана роль ADAR2 в редактировании GluA2 субъединиц AMPA-рецепторов и GluK1 и GluK2 субъединиц каинатных рецепторов, в то время как о роли ADAR1 в регуляции активности и кальциевой проводимости рецепторов информация практически отсутствует. Целью исследования являлось изучение влияния фермента ADAR1 на активность iGluRs и потенциал-зависимых кальциевых каналов.

Объектом исследования являлась нейрон-глиальная культура гиппокампа (возраст культуры 7-8 дней) новорождённых крыс линии Wistar. Ингибирование ADAR1 осуществлялось 8-азааденозином (5 мкМ). Вклад ADAR1 в регуляцию активности, в первую очередь кальциевой проницаемости рецепторов, оценивали методом флуоресцентного кальциевого имиджинга с использованием ратиометрического Ca^{2+} -чувствительного зонда Fura-2 AM. Для активации iGluRs и потенциал-зависимых кальциевых каналов использовались селективные агонисты и высокая концентрация KCl (35 мМ), соответственно.

Нами было установлено, что ингибирование ADAR1 приводило к достоверному снижению амплитуд кальциевых ответов нейронов на добавление агониста AMPA-рецепторов, 5-фторвиллардина (FW). Аналогичное снижение амплитуд было продемонстрировано и в экспериментах с аппликацией FW в присутствии антагонистов NMDA- (D-AP5) и каинатных рецепторов (UBP310), добавленных для исключения вклада в кальциевый ответ FW-индуцированной деполяризации и последующей секреции глутамата, способного вызывать дополнительный кальциевый приток в результате воздействия на указанные iGluRs. Так как изменение активности ADAR может влиять на количество кальций-проницаемых AMPA-рецепторов (calcium-permeable AMPA, CP-AMPA), мы проверили, какой эффект оказывает ингибирование ADAR1 на количество нейронов, содержащих CP-AMPA-рецепторы (CP-AMPA-нейроны). Для идентификации CP-AMPA-нейронов использовали кратковременную аппликацию 5-фторвиллардина (500 нМ) в присутствии D-AP5, UBP310, и неселективного блокатора потенциал-зависимых кальциевых каналов, дилтиазема (300 мкМ).

Ингибирование ADAR1 приводило к достоверному снижению в культурах количества СР-АМРА-нейронов с 6 до 1%. Так как СР-АМРА-рецепторы опосредуют значительный приток Ca^{2+} , то снижение амплитуды кальциевых ответов может быть обусловлено, в том числе, уменьшением количества СР-АМРА-нейронов.

Таким образом, полученные данные позволяют рассматривать ADAR1 как перспективную мишень для изучения регуляции функций глутаматных рецепторов, в частности АМРА-рецепторов.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ПНЦБИ РАН № 075-00607-25-00 (1024032700128-8-1.6.4 «Разработка препаратов для терапии повреждений мозга и эпилепсии: исследования *in vitro* и *in vivo*»).

ОЦЕНКА ФОРМЫ ПОЛЕЙ МЕСТА НЕЙРОНОВ ТРЕТЬЕГО СЛОЯ ЭНТОРИНАЛЬНОЙ КОРЫ

Савочкин А.В.¹, Мысин И.Е.²

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

²Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия

andrey.20041@mail.ru

Гиппокамп и энторинальная кора играют ключевую роль в пространственном кодировании. В гиппокампе хорошо описаны клетки места и параметры их полей. Энторинальная кора (медиальная и латеральная) изучены меньше. Для исследования нейронной активности используются методы регистрации концентрации кальция внутри нейронов, что позволяет анализировать активность клеток во время навигации животного по лабиринту.

Цель нашей работы – описать параметры пространственной активности нейронов третьего слоя энторинальной коры. Использованы данные из статьи “Lateral entorhinal cortex subpopulations represent experiential epochs surrounding reward” (John B. Issa), в которой регистрировалась кальциевая активность нейронов у мышей, пробегающих виртуальный лабиринт длиной 310 см. Мы предположили, что клетки третьего слоя энторинальной коры имеют несколько полей места, аналогичных полям места нейронов поля CA1 гиппокампа. Поля места нейронов поля CA1 часто аппроксимируются гауссианами, поэтому мы использовали сумму гауссовых функций для аппроксимации активности нейронов в энторинальной коре. Использовали 7 гауссиан, для каждого компонента находили амплитуду, центр и размер поля места. Отбор значимых компонент проводился на основе амплитуды, превышающей среднее значение кальциевого сигнала более чем на три стандартных отклонения.

Были выявлены поля места у нейронов третьего слоя энторинальной коры, их размеры в диаметре и количество варьировали в зависимости от исследуемой области. Установлено, что в гиппокампе (CA1) размер полей места составляет 35–70 см, при этом средний размер равен 52.5 ± 8.75 см, а среднее число полей места на нейрон – 2. В латеральной энторинальной коре (ЛЭК) поля мест имели размеры 60–90 см, среднее значение составило 75 ± 7.5 см, число полей – 2. В медиальной энторинальной коре (МЭК) размеры варьировали от 45 до 65 см, со средним значением 55 ± 5 см, а число полей на один нейрон составляло 2–3.

Таким образом, в энторинальной коре выявлены клетки с пространственно-избирательной активностью, однако размеры их полей мест превышают аналогичные показатели гиппокампа. Кроме того, в МЭК наблюдалось большее количество полей мест на один нейрон. Результаты подтверждают наличие полей мест у нейронов третьего слоя энторинальной коры, что указывает на её роль в пространственном кодировании. Увеличенные размеры полей мест в сравнении с гиппокампом могут свидетельствовать о различиях в обработке пространственной информации. Дальнейшие исследования помогут уточнить вклад ЛЭК и МЭК в механизмы навигации и эпизодической памяти.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ МЕХАНИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ НА СПОНТАННУЮ АКТИВНОСТЬ ТРОЙНИЧНОГО НЕРВА КРЫСЫ

Сапкулова А.С., Гафуров О.Ш.

Институт фундаментальной медицины и биологии, кафедра физиологии человека и животных, Казанский федеральный университет, Казань, Россия

a.sapkulova@yandex.ru

Понимание механизмов обработки сенсорной информации в менингеальной оболочке имеет важное значение для изучения процессов, связанных с мигренью и другими неврологическими расстройствами. Происхождение головной боли, которая является основой мигрени не совсем понятно, однако известно, что головная боль возникает в менингеальной оболочке, в периферической тригеминоваскулярной системе. В менингеальной оболочке расположена сеть нервных волокон тройничного нерва, которая расположена в непосредственной близости от кровеносных сосудов. Было показано, что нервные волокна в менингеальной оболочке обладают высокой чувствительностью к механической стимуляции, которая приводит к значительному увеличению частоты генерации потенциалов действия (ПД). Механическое воздействие может вызвать активацию нервных волокон тройничного нерва и способствует возникновению особого типа головной боли - мигрени.

Исследование проводилось с использованием препаратов полушария черепа крысы с сохраненной твердой мозговой оболочкой. Регистрация поводилась с помощью внеклеточного электрода. Регистрировали ПД от периферического отростка тройничного нерва крысы. Механическая стимуляция осуществлялась с помощью стимулирующего электрода, соединённого с тензодатчиком, который показывает силу прижатия электрода в граммах. Электрод прижимался к различным участкам менингеальной оболочки вблизи средней менингеальной артерии. Применялись механические стимулы различной длительности и силы прижатия к менингеальной оболочке. Электрод прижимался к исследуемой области с силой 0.1гр, 0.2гр, 0.4гр, 0.8гр на 30 секунд. После прижатия электрод поднимали на 30 секунд для отдыха препарата.

В ходе исследования мы получили следующие результаты: прижатие стимулирующего электрода с силой 0.1гр не приводило к достоверному увеличению частоты ПД; прижатие стимулирующего электрода с силой 0.2гр и 0.4гр приводило к достоверному увеличению частоты ПД; прижатие стимулирующего электрода с силой 0.8гр приводило к чрезмерному воздействию на менингеальную оболочку. Оболочка деформировалась и разрывалась, однако достоверного увеличения частоты ПД обнаружено не было. Также мы обнаружили, что разная сила прижатия стимулирующего электрода по-разному влияет на период отдыха препарата после воздействия. Например, после подъема электрода, прижатого силой 0.2гр на 30 секунд, частота ПД в течение 30 секунд отдыха снижалась до контрольного значения. В то время как после подъема электрода, прижатого силой 0.4гр на 30 секунд, частота ПД в течение 30 секунд отдыха продолжала достоверно увеличиваться. Можно предположить, что во втором случае происходит повреждение нервных волокон, которое приводит к дальнейшему росту частоты

ПД. С другой стороны, оптимальная стимуляция с силой прижатия электрода 0.2гр вызывает достоверное увеличение частоты ПД, не повреждая чувствительные нервные волокна.

Таким образом, полученные данные помогли определить методику механической стимуляции чувствительных волокон менингеальной оболочки крысы для проведения дальнейших исследований, направленных на изучение влияния механического воздействия на афферентные волокна тройничного нерва крысы.

НАРУШЕНИЯ ОБМЕНА ДОФАМИНА У КРЫС С НОКАУТОМ ГЕНА ТРИПТОФАНГИДРОКСИЛАЗЫ-2

Свиридова В.М.^{1,2}, Жуков И.С.^{1,3}, Аленина Н.⁴, Гайнетдинов Р.Р.³, Карпенко М.Н.¹

¹Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

²Институт мозга человека имени Н.П. Бехтеревой РАН, Санкт-Петербург, Россия

³Институт трансляционной биомедицины СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

⁴Центр молекулярной медицины имени Макса Дельбрюка, Берлин, Германия

v.kudrinskaja2011@yandex.ru

Серотонин является ключевым нейромедиатором, регулирующим настроение, эмоции и когнитивные функции. Снижение его уровня в мозге, вызванное, например, нарушением работы триптофангидроксилазы 2 (ТРН2), ассоциировано с развитием аффективных расстройств, таких как депрессия, фобии, обсессивно-компульсивное расстройство, генерализованное тревожное расстройство и посттравматическое стрессовое расстройство. Поскольку серотонинергическая система находится в тесном функциональном взаимодействии с дофаминергической системой, которая играет ключевую роль в регуляции мотивации, процессов вознаграждения, моторного контроля и когнитивных функций, весьма вероятно, что у животных с нарушением синтеза и/или обмена серотонина будет нарушен и обмен дофамина. В связи с этим, целью данного исследования было оценить содержание дофамина и его метаболитов в различных областях ЦНС крыс с нокаутом гена ТРН2.

Исследование выполнено на взрослых самках крыс линии Dark Agouti, разделенных на две группы (n=15): контрольная группа – крысы дикого типа и экспериментальная группа – крысы с нокаутом гена ТРН2 (ТРН2-КО). Концентрацию серотонина, дофамина (ДА) и его метаболитов 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) и гомованилиновой кислоты (ГВК) измеряли с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией в клетках гиппокампа, стриатума и продолговатого мозга лабораторных животных.

Как и ожидалось, у крыс ТРН2-КО наблюдалось катастрофическое (ниже пределов обнаружения) снижение уровня серотонина во всех исследуемых структурах мозга, что подтверждает критическую роль ТРН2 в его синтезе. Помимо изменений в серотонинергической системе, у крыс ТРН2-КО было обнаружено снижение уровня дофамина в 2,8 и в 7,1 раз в стриатуме и продолговатом мозге соответственно, при этом концентрация его метаболитов ДОФУК и ГВК не изменилась. Следовательно, у ТРН2-КО животных наблюдается увеличение обмена дофамина. Действительно, в стриатуме соотношение ДОФУК/ДА увеличилось в 3,6 раза, ГВК/ДА – в 2,7 раза, а суммарное соотношение (ДОФУК + ГВК)/ДА – в 3,4 раза. В продолговатом мозге наблюдалось еще более выраженное увеличение обмена дофамина: ДОФУК/ДА – в 5,1 раза, ГВК/ДА – в 6,1 раза и (ДОФУК + ГВК)/ДА – в 5,6 раза. В гиппокампе значимых изменений в уровне дофамина и его метаболитов выявлено не было.

Полученные данные демонстрируют, что нокаут гена TRH2 приводит не только к снижению уровня серотонина, но и к нарушению функционирования дофаминергической системы в стриатуме и продолговатом мозге.

Содержание, размножение и генотипирование нокаутных животных выполнены при поддержке СПбГУ, шифр проекта: 117033714.

Работа по определению содержания дофамина, серотонина и их метаболитов в ЦНС поддержана государственным заданием ФГБНУ «ИЭМ»: FGWG-2024-0015.

ВЛИЯНИЕ ЭПИЛЕПТИЧЕСКОГО СТАТУСА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ СИСТЕМ ИНСУЛИНОПОДОБНОГО ФАКТОРА РОСТА И АКТИВАЦИЮ ПЛАЗМИНОГЕНА В МОЗГЕ КРЫС НА ЛИТИЙ-ПИЛОКАРПИНОВОЙ МОДЕЛИ

Селиванова Е.М., Карань А.А., Сулейманова Е.М.

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

solntseva.yelizaveta@mail.ru

Введение. Эпилепсия остается одним из наиболее распространенных неврологических заболеваний, характеризующихся повторяющимися спонтанными приступами. Несмотря на успехи в диагностике и лечении, многие аспекты эпилептогенеза, особенно молекулярные механизмы, остаются недостаточно изученными. Особый интерес представляет роль систем инсулиноподобного фактора роста (IGF) и активации плазминогена. Малоизученный ген *Igfbp5*, регулирующий активность системы IGF, может играть ключевую роль в нейропротекции и нейродегенерации. Система активации плазминогена участвует в регуляции большого количества процессов, включая нейродегенерацию, активацию микроглии и проницаемость гематоэнцефалического барьера. В нашей работе мы изучили экспрессию генов *Igfl1*, *Igflr*, *Igfbp5*, *Serpine1*, *Plat* и *Plaur* в различных структурах мозга крыс на литий-пилокарпиновой модели эпилепсии.

Методы. Исследование проводилось на взрослых самцах крыс линии Wistar. Эпилептический статус (эпистатус) индуцировали с помощью внутрибрюшинного введения хлорида лития и пилокарпина, контрольным животным вводили физиологический раствор. Экспрессия генов изучалась методом qPCR с использованием нормировочных генов *Osbp*, *Ywhaz* и *Hprt1*.

Результаты. В латентный период (7 дней после индукции эпистатуса) наблюдалось значительное повышение экспрессии *Igfl1* в вентральном гиппокампе и фронтальной коре; снижение *Igflr* в вентральном гиппокампе и энторинальной коре; повышение *Igfbp5* в вентральном гиппокампе, соматосенсорной и фронтальной коре; повышение *Plat* в дорсальном гиппокампе; повышение *Plaur* в энторинальной коре. В хронический период (5 месяцев после индукции) экспрессия *Igfbp5* и *Igflr* была значительно понижена в дорсальном гиппокампе и соматосенсорной коре, соответственно, а *Plaur* – повышена в энторинальной коре. Таким образом, наши результаты свидетельствуют о значительном изменении экспрессии компонентов исследуемых систем после эпистатуса.

Заключение. Наше исследование помогает расширить понимание молекулярных процессов, связанных с системами инсулиноподобного фактора роста и активации плазминогена, происходящих при эпилептогенезе. Результаты исследования могут быть использованы при поиске потенциальных мишеней для разработки новых подходов к лечению эпилепсии.

Работа поддержана грантом РФФ № 24-25-00448.

МОДЕЛЬ ГЕНЕРАЦИИ ТЕТА-РИТМА В МЕДИАЛЬНОЙ СЕПТАЛЬНОЙ ОБЛАСТИ ГИППОКАМПА

Скороход С.Н.¹, Дубровин С.В.², Мысин И.Е.³

¹НИУ ВШЭ, Институт когнитивных нейронаук, Москва, Россия

²Научно технологический университет Сириус, Сириус, Россия

³Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия

seriosey-s@yandex.ru

Наиболее выраженной электрической активностью гиппокампа является тета-ритм (4-12 Гц). Тета-ритм является электрофизиологическим коррелятом процессов внимания и памяти. В современной литературе существует мнение, что тета-ритм в гиппокампе возникает при ритмическом входе со стороны медиальной септальной области (МСО). Пейсмейкерами тета-ритма являются две проекционные субпопуляции ГАМКергических нейронов МСО, которые разряжаются на противоположных фазах тета-ритма. Теоретический механизм генерации тета-ритма может заключаться в тормозных связях между популяциями, когда популяции работают поочередно подавляя активность друг друга. Целью данного исследования было разработать модель взаимодействий между двумя популяциями МСО, которые лежат в основе формирования септального тета-сигнала.

Модель должна удовлетворять следующим критериям: (1) обе популяции должны быть быстро-разряжающимися; (2) сдвиг фаз между популяциями проекционных ГАМКергических клеток должен соответствовать примерно 150° , (3) силы двусторонних связей между двумя субпопуляциями проекционных ГАМКергических нейронов должны быть отличающимися. В данной работе нами представлена модель нейронной сети генерирующей тета-ритм, и удовлетворяющей вышеперечисленным требованиям.

Для создания паттерна попеременного торможения, популяции интернейронов были связаны между собой пластичными синапсами Цодыкса-Марккрама. Активность популяции описывается системой дифференциальных уравнений средне-полевой модели для нейронов Ижикевича.

Параметры модели Ижикевича, и модели синапса Цодыкса-Марккрама для каждого типа клеток взяты из базы данных hipposatprome.org. Неизвестные параметры модели оптимизируются методом градиентного спуска и SNPE, а целевая функция для частоты разрядов популяций задана периодической функцией общего вида.

Исследуется следующие параметры модели:

- сила связей между популяциями и внутри каждой популяции
- входной ток на каждую популяцию
- гетерогенность популяций

Обнаружено, что с увеличением силы входного тока растет амплитуда ритма.

При малой гетерогенности популяций генерируется более медленный ритм, который модулирует более быстрый ритм более или менее сильно в зависимости от силы связей. Увеличение силы связей между популяциями препятствует затуханию ритма при малых входных токах.

Разработанная модель демонстрирует, что механизмы взаимного торможения и синаптической пластичности способны порождать устойчивые ритмы, соответствующие экспериментально зарегистрированным.

Работа поддержана грантом РФФ № 25-24-00080.

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МАГНОЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ И
ПАРВОЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ НЕЙРОННЫХ СИСТЕМ ВО ВЗАИМОСВЯЗИ С
КОГНИТИВНЫМИ НАРУШЕНИЯМИ ПРИ ШИЗОФРЕНИИ
И ШИЗОТИПИЧЕСКОМ РАССТРОЙСТВЕ

Смолянинова В.А., Федорова А.С., Моритц А.А., Ляпунов С.И., Шошина И.И.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

smolyaninova-2000@list.ru

Шизофрения и шизотипическое расстройство характеризуются общими нейрофизиологическими механизмами нарушений процессов зрительного восприятия, в частности изменением контрастной чувствительности. Контрастная чувствительность отражает функциональное состояние магноцеллюлярной и парвоцеллюлярной нейронных систем, осуществляющих обработку пространственно-частотных характеристик зрительных стимулов. Имеются исследования, где выявлена взаимосвязь дефицита контрастной чувствительности с когнитивными нарушениями при шизофрении, в то время как при шизотипическом расстройстве такие данные отсутствуют. Ввиду этого, выявление специфики сенсорно-когнитивного фенотипа при шизофрении и шизотипическом расстройстве представляет особую значимость для точного определения биологических маркеров когнитивных дисфункций данных расстройств.

Целью настоящего исследования является изучение взаимосвязи механизмов работы магноцеллюлярной и парвоцеллюлярной нейронных систем и когнитивных нарушений при шизофрении и шизотипическом расстройстве.

Выборку исследования составили участники группы здорового контроля ($n=30$, 18 женщин и 12 мужчин, средний возраст 31.0 ± 10.4 год), пациенты с диагнозом параноидная шизофрения ($n=37$, 32 мужчины и 5 женщин, средний возраст 35.6 ± 10.6 лет) и пациенты с диагнозом шизотипическое расстройство ($n=11$, 7 мужчин и 4 женщины, средний возраст 22.6 ± 3.4 года). Контрастную чувствительность регистрировали с использованием визоконтрастометрии при предъявлении элементов Габора с пространственной частотой от 0.4 до 10.0 цикл/град. Для диагностики когнитивных нарушений использовали нейропсихологические методики для оценки кратковременной и долговременной памяти, пространственной ориентировки и переключаемости внимания, гибкости когнитивного контроля, зрительного гнозиса, управляющих функций, уровня обобщения и абстрагирования. Статистический анализ выполняли с помощью H -критерия Краскела Уоллиса и корреляционного анализа Спирмена в пакете программ IBM SPSS Statistics 26.

Установлено достоверное снижение контрастной чувствительности у двух групп пациентов относительно группы здорового контроля в диапазоне средних пространственных частот, отражающих рассогласованность работы магноцеллюлярной и парвоцеллюлярной систем, и высоких пространственных частот, отражающих снижение активности парвоцеллюлярной системы. Выявлена значимая корреляционная связь при шизофрении между показателем уровня мышления с контрастной чувствительностью в диапазоне средних

пространственных частот. При шизотипическом расстройстве выявлена значимая корреляционная связь показателей гибкости когнитивного контроля, пространственной ориентировки, переключаемости внимания с контрастной чувствительностью в диапазоне средних пространственных частот, а также показателей управляющих функций и уровня мышления с контрастной чувствительностью в диапазоне высоких пространственных частот.

Согласно первичному анализу данных когнитивные дисфункции при расстройствах шизофренического спектра определяются особенностями функционального состояния и характером взаимодействия магноцеллюлярной и парвоцеллюлярной систем.

Выполнено при поддержке РФФ (проект № 24-25-00494).

ИЗМЕНЕНИЕ ЭНДОКАННАБИНОИДНОЙ МОДУЛЯЦИИ ПЕРИСОМАТИЧЕСКОГО
ТОРМОЖЕНИЯ ПИРАМИДАЛЬНЫХ КЛЕТОК ГИППОКАМПА
ПОД ВЛИЯНИЕМ СЕРОТОНИНА

Сулимова А.И.¹, Джеппи Д.Д.², Круть В.Г.², Соколов Р.А.¹, Розов А.В.^{1,2}

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

²Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный центр мозга и
нейротехнологий» Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ «ФЦМН» ФМБА
России), Москва, Россия

arina-sulimova2000@mail.ru

Серотонинергическая система ЦНС находится под контролем эндоканнабиноидной сигнализации. На уровне ядер шва происходит перисоматический контроль активности серотонинергических нейронов, а на уровне их проекционных зон – контроль высвобождения серотонина из пресинаптических окончаний. Одна из наиболее иннервируемых серотонинергическими волокнами зон ЦНС – гиппокамп, в которой все нейроны имеют разный уровень чувствительности к серотонину, однако только один тип находится под эндоканнабиноидным контролем – холицистокинин-экспрессирующие интернейроны (ССК-IN).

Существует две основных модели реализации эндоканнабиноидной модуляции. Первый феномен (вызванное деполяризацией подавление торможения (DSI)) обуславливается длительной надпороговой активностью постсинаптической клетки, в которой в результате увеличения концентрации Ca^{2+} запускается синтез эндоканнабиноидов. Последние диффундируют в направлении пресинаптического окончания и активируют расположенные там эндоканнабиноидные рецепторы 1-го типа (CB1R), что приводит к блокаде потенциал-зависимых кальциевых каналов и, как следствие, к временному подавлению выброса ГАМК. Длительность DSI не превышает одной минуты. Однако при экспериментах, направленных на изучение эффектов блокирования CB1, было выявлено длительное увеличение тормозных постсинаптических токов (ТПСТ), которое реализуется в результате высвобождения из-под хронического эндоканнабиноидного подавления торможения (CSI). При этом механизм и локус синтеза эндоканнабиноидов до сих пор не был определен. Были высказаны предположения о глиальном, постсинаптическом и пресинаптическом происхождении.

В нашей работе мы демонстрируем, что при CSI эндоканнабиноиды в ССК-IN формируются в пресинапсе в результате активации кальциевых каналов и входа Ca^{2+} для высвобождения ГАМК. В ходе экспериментов используется технология patch-clamp и метод парной регистрации связанных нейронов, пресинаптический интернейрон записывается в режиме фиксации тока, а постсинаптический – в режиме фиксации потенциала. При добавлении большого количества (2mM) хелатера Ca^{2+} EGTA в постсинаптическую клетку увеличение ТПСТ не происходит, в то время как добавление EGTA (0.4 mM) в интернейрон

ведет к значительному увеличению ТПСТ, сопоставимому с блокированием СВ1 с помощью антагониста каннабиноидных рецепторов 1-го типа AM251.

Еще одной целью нашей работы является выявление взаимовлияния между серотонинергической и эндоканнабиноидной системами. Если модуляция эндоканнабиноидной сигнализации в работе серотонинергической системы уже установлена, то обратное воздействие серотонинергической системы на эндоканнабиноидную до сих пор не было известно. Однако мы показали, что при добавлении серотонина наблюдается значительное снижение ТПСТ, происходящее в течение 5-7 минут после аппликации. Однако блокада СВ1R предотвращала вызванное серотонином подавление амплитуд ТПСТ. Таким образом, нами впервые было показано непосредственное влияние серотонина на активность эндоканнабиноидной системы.

МЕЖЛАБОРАТОРНАЯ ВАЛИДАЦИЯ ТЕСТА «РАЗРУШЕНИЯ-СТРОИТЕЛЬСТВА»
(DESTRUCTION-BUILDING TEST) ДЛЯ ПОВЕДЕНЧЕСКОГО ФЕНОТИПИРОВАНИЯ
ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ ЛИНИИ 5XFAD

Сысоева К.С.¹, Андреев А.И.^{1,2}, Ахременко Е.А.^{1,2}, Небогатиков В.О.², Орлова Е.А.²,
Устюгов А.А.², Коркотян Э.А.³

¹Лаборатория экспериментальной фармакологии –Пермский государственный национальный
исследовательский университет, Пермь, Россия

²Центр доклинических исследований Института физиологически активных веществ,
Черноголовка, Россия

³Отделение нейробиологии, Научный институт Вейцмана, Реховот, Израиль

kseniya.sysoeva.03@mail.ru

Одной из важных задач является поиск лекарств против нейродегенеративных заболеваний (НДЗ), в частности, против болезни Альцгеймера. Для успешного поиска новых средств терапии на фазе тестирования на животных необходимо создание новых специализированных поведенческих тестов, пригодных как для скрининга, так и для углубленного тестирования. Требованиями к таким тестам становятся короткие сроки, отсутствие необходимости в постоянном присутствии человека, и набор простых параметров, что реализуемо на основе многоканальных актографических комплексов.

На базе Лаборатории экспериментальной фармакологии ПГНИУ (г. Пермь) нами был разработан простой тест «разрушения-строительства» («Destruction-building test»/(DBT)), основанный на методике «Nest building test». Этот тест направлен на выявление простых поведенческих дескрипторов для быстрой оценки различий в поведении здоровых мышей и трансгенных мышей линии 5xFAD с модельной болезнью Альцгеймера.

Для отработки методики нами была проведена межлабораторная валидация в Центре доклинических исследований ИФАВ РАН (г. Черноголовка). Валидация выполнялась на гемизиготных мышах линии 5xFAD (10 особей) в возрасте 6,5 месяцев. Контрольную группу составляли животные дикого (WT) типа линии C57BL/6J (10 особей). Мыши рассаживались в индивидуальные экспериментальные камеры (установка МультиНейро-СДА-32 (ООО «НПК Открытая наука», ООО «НЕЙРОСКРИНЛАБ», при поддержке ФСИ)), со свободным доступом к еде и воде. Через сутки адаптации к новой среде в каждую клетку было помещено по одному «торфяному горшку» (разрушаемый объект, усеченная квадратная пирамида из сухого прессованного торфяного картона); материал разрушаемого объекта мог использоваться для строительства гнезда. Эксперимент длился 7 суток, на протяжении которых животные имели возможность взаимодействовать с объектом. Фиксируемыми параметрами были вес горшка и площадь разрушенной части. До начала и во время эксперимента горшки взвешивались и осуществлялась съемка горшка изнутри. На основе полученных изображений вычислялась площадь разрушенной (разгрызенной) части с помощью программы ImageJ (1.54f).

По результатам непараметрического двухфакторного дисперсионного анализа между генотипическими группами наблюдались значимые различия в весах ($p=0,0001$); post-hoc

тестирование по Вилкоксону вернуло значимость различий уже на первые сутки ($p=0,005$). Далее, 2-е сутки ($p=0,0006$), 3-и сутки ($p=0,002$), 5-е сутки ($p=0,0015$) и 7-е сутки ($p=0,0022$); веса объектов у группы 5xFAD были больше. Для различий между генотипическими группами по площади разрушенной части ANOVA ($p = 0,0038$) и тест Вилкоксона также вернули статистически значимые результаты: 1е сутки ($p=0,0027$), 2-е ($p=0,0005$), 3-и ($p=0,0037$), 5-е ($p=0,00037$) и 7-е ($p=0,0003$). Площадь разрушенной части у группы 5xFAD была меньше.

Таким образом, для всех дней эксперимента наблюдаются значимые различия между группой 5xFAD и группой WT по предложенным параметрам, как и в лаборатории в Перми; таким образом, валидация теста прошла успешно.

**ВЫРАЖЕННОСТЬ АНКСИОЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ 1-ДЕЗАМИНО-8-D-АРГИНИН-
ВАЗОПРЕССИНА У СТРЕССИРОВАННЫХ КРЫС В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГЕНДЕРНОГО
ПРИЗНАКА**

**Тимушева М.В., Апраксина Н.К., Белокоскова С.Г., Матвеевская П.А.,
Абсалямова М.Т., Цикунов С.Г.**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Институт экспериментальной медицины», лаборатория психофизиологии эмоций,
Санкт-Петербург, Россия

mariatimusheva@mail.ru

Переживание психотравмирующего события, выходящего за рамки жизненного опыта, повышенная тревожность, формирование памятного следа травмы, избегание, напоминающих травму обстоятельств, являются основой патогенетической картины посттравматического стрессового расстройства. Показано, что аргинин-вазопрессин (АВП) проявляет анксиолитические и антидепрессивные свойства. Известны гендерные отличия в реакции на стресс, что связано с различиями в гормональном фоне и нейрохимических процессах. Это делает необходимым изучение гендерных аспектов действия анксиолитиков.

Цель исследования заключалась в оценке выраженности анксиолитических свойств АВП у стрессированных крыс в зависимости от гендерного признака.

Опыты выполнены на половозрелых самках и самцах крыс породы Wistar одинакового возраста (3 мес.) массой 250–350 г ($n=110$; ♂=55/♀=55). Животные каждого пола были разделены на пять групп: С – интактные ($n=11$); СР – интраназальное введение физраствора 40 мкл/сут, 14 дней ($n=11$); VS – витальный стресс без введения растворов ($n=11$); VSP – витальный стресс с последующим интраназальным введением физраствора 40 мкл/сут, 14 дней ($n=11$); VSV – витальный стресс с последующим интраназальным введением 1-дезамино-8-D-аргинин-вазопрессина в дозе 2 мкг/сут в, 14 дней ($n=11$). Витальный стресс моделировали обстоятельствами переживания ситуации гибели сородича от действий тигрового питона в течение 40 минут [1]. После психогенной травмы через несколько недель анализировали поведение крыс в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) и «Открытое поле» (ОП). Статистическая обработка проводилась непараметрическими критериями Краскела–Уоллисаи и Данна для попарного сравнения (уровень значимости: $p < 0,05$).

Во время психотравмирующего воздействия у крыс регистрировались выраженные реакции страха, фризинг, смещенный груминг, измененное половое поведение, сбивание в кучи, в некоторых случаях ажитированное поведение. Выявлены статистически значимые изменения в уровне тревожности у самцов крыс после витального стресса и дополнительной стрессовой нагрузки. Показано статистически значимое снижение суммарной длительности пребывания в «ЗР», в «ОР» после витального стресса и увеличение пребывания в центре установки и длительности выглядываний из «ЗР».

В тесте «открытое поле» выявлено изменение исследовательской и эмоциональной активности самцов крыс исследуемых групп по сравнению с контролем.

Курсовое применение 1-дезамино-8-D-аргинин-вазопрессина привело к нормализации некоторых показателей поведения самцов в ПКЛ, а также повышению длительности «обнюхиваний» и снижению суммарной длительности «груминга» по сравнению с контролем в ОП.

Витальный стресс оказал влияние на тревожность самок крыс: выявлено статистически значимое снижение длительности пребывания в ЗР установки по сравнению с контролем ($p \leq 0.05$). В тесте «ОП» в группе «VS» была статистически значимо снижена длительность акта «локомоция», длительность общего пути в отличие от контроля. Также наблюдалось увеличение длительности акта «движение на месте» в отличие от группы «VSV», что свидетельствует об угнетении двигательной активности животных. Показатели исследовательской и эмоциональной активности между группами не отличались. Курсовое применение 1-дезамино-8-D-аргинин-вазопрессина привело к нормализации тревожности по показателю длительности пребывания в ЗР, а также двигательной активности стрессированных самок крыс, отличия между контролем и «VSV» не выявлены.

Таким образом, выявлен половой диморфизм стресс реакции у крыс на психогенное воздействие угрозы жизни по поведенческим реакциям. Кроме того показаны различия протективных свойств аргинин-вазопрессина на самцах и самках, переживших витальный стресс. В большей степени нейропротекторные свойства курсового применения 1-дезамино-8-D-аргинин-вазопрессина в дозе 2 мкг/сут в течение 14 дней сразу после перенесенной психогенной травмы проявляются на самках.

Литература.

1. Цикунов, С. Г. Нейробиология витального стресса. Новые модели психической травмы и посттравматического стрессового расстройства / С. Г. Цикунов // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2015. – Т. 13. – С. 187–188.

ПАПАИН ВЛИЯЕТ НА ПРОЦЕНТНОЕ СОДЕРЖАНИЕ И МОРФОЛОГИЮ МИКРОГЛИИ В НЕЙРОН-ГЛИАЛЬНЫХ КУЛЬТУРАХ ГИППОКАМПА

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

Микроглия, наряду с астроглией, играет важную роль в развитии нейровоспаления, которое может стать причиной или сопутствующим фактором развития нейродегенеративных заболеваний. В настоящее время для исследования нейровоспаления *in vitro* часто используются клеточные культуры первичной микроглии или иммортализованные микроглия-подобные клеточные линии. Несмотря на популярность и удобство метода, такие модели не позволяют учесть аспекты нейрон-глиальных взаимодействий при нейровоспалении. Решением данной проблемы могли бы стать смешанные нейрон-глиальные культуры, включающие микроглию, полученные с использованием трипсина и выращенные в среде Neurobasalmedium+B27 Supplement, однако в таких культурах отмечается слабая пролиферация микроглии. В литературе описаны протоколы получения первичной микроглии с использованием папаина, поэтому мы решили применить данный подход к получению нейрон-глиальных культур, содержащих микроглию, и оценить влияние папаина на популяционный состав культур.

В качестве объекта выступали смешанные нейрон-глиальные культуры гиппокампа новорождённых крыс, а также аналогичные культуры, выращенные в присутствии комбинации необходимых для пролиферации микроглии факторов, таких как TGF β , MCSF и холестерин. Для деградации внеклеточного матрикса при получении клеточной суспензии использовался раствор трипсина (TRY-культуры) или папаина (PAP-культуры). Методом флуоресцентной микроскопии была проведена оценка популяционного состава культур и физиологической активности клеток. Идентификацию нейронов и астроцитов осуществляли путём определения наличия кальциевого ответа (увеличение внутриклеточной концентрации Ca $^{2+}$) на добавление хлорида калия и аденозинтрифосфата (АТФ), соответственно. Для идентификации клеток микроглии использовался флуорогенный субстрат УДФ-глюкокоронзилтрансферазы (CDr20). Также для оценки популяционного состава был использован метод иммуноцитохимического окрашивания.

В ходе данной работы было установлено, что использование папаина способствует повышению количества микроглии в PAP-культурах, по сравнению с TRY-культурами, при этом количество астроцитов и нейронов в культуре существенно не изменялось. Также были выявлены морфологические различия. Микроглия в PAP-культурах преимущественно поляризована, в то время как кустистая морфология была более характерна для TRY-культур. Мы также продемонстрировали, что комбинация TGF β +MCSF+холестерина увеличивает количество микроглии как в PAP-, так и в TRY-культурах (до 25-30%) и способствует появлению амёбодной микроглии, характеризующейся высокой подвижностью. Однако

значительное появление амeboидной микроглии наблюдалось уже на ранних стадиях культивирования (2 DIV) в TRУ-культурах, в то время как в PAP-культурах описанная трансформация наблюдалась на седьмой день культивирования (7 DIV). Наши результаты демонстрируют, что папаин является более подходящим протеолитическим ферментом для получения смешанной нейрон-глиальной культуры гиппокампа с более высоким процентом гетерогенной микроглии и функциональных нейронов и астроцитов (трикультур).

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ПНЦБИ РАН № 075-00607-25-00 (1024032700128-8-1.6.4 «Разработка препаратов для терапии повреждений мозга и эпилепсии: исследования *in vitro* и *in vivo*»).

ВЫСОКОЧАСТОТНЫЕ ОСЦИЛЛЯЦИИ ВО ВРЕМЯ КОРТИКАЛЬНОЙ РАСПРОСТРАНЯЮЩЕЙСЯ ДЕПОЛЯРИЗАЦИИ

Тухватуллина К.Р.¹, Винокурова Д.Е.¹, Юзекаева Э.Р.¹, Закирова Г.Ф.¹, Мингазов Б.Р.¹,
Хазипов Р.Н.^{1,2}, Насретдинов А.Р.¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

²INMED, INSERM, Aix-Marseille university, Марсель, Франция

karllina@mail.ru

Введение. Распространяющаяся деполяризация (РД) – явление, обычно выражающееся в медленных сдвигах потенциала и подавлении активности в традиционном частотном диапазоне ЭЭГ. Нами было показано, что длительные высокочастотные осцилляции (ВЧО) возникают во время РД на поверхности коры крыс в противовес подавлению активности и могут служить надежным маркером для обнаружения РД.

Цель. Выяснить и оценить перспективы использования данных о ВЧО как о маркере проявления распространяющейся деполяризации.

Материалы и методы. Для записи корковой активности в диапазоне 0-16 кГц использовались многоканальные субдуральные массивы ЭКоГ, внутрикорковые зонды и хлорсеребряные проволочные электроды. Запись происходила в соматосенсорной коре крыс, находящихся под уретановым наркозом. РД вызывали эпилептической аппликацией раствора хлорида калия, ингаляцией флуотила в модели эпилепсии, уколom в модели травмы («пинприк»), введением эндотелина-1 в модели ишемии. Распространение РД также отслеживалось с помощью внутренней оптической визуализации.

Результаты. В ходе исследования было обнаружено, что при записи ЭКоГ с поверхности коры вызванные калием РД обычно сопровождалась ВЧО в диапазоне 60-150 Гц. ВЧО наблюдались в начале РД и во время отрицательного DC-сдвига РД, длились от нескольких до десятков секунд и возникали как контрапункт к депрессии активности в традиционных диапазонах ЭЭГ (0,5-45 Гц). ВЧО распространялись горизонтально вдоль коры в ассоциации с РД. Интересно, что ВЧО также присутствовали во время "изоэлектрических" РД на фоне подавленной активности. ВЧО также можно было обнаружить во время РД, вызванных высоким содержанием калия, с помощью записи ЭЭГ с поверхности черепа. ВЧО также были характерны для РД в нескольких моделях, включая ишемию, эпилепсию и травматическое повреждение мозга. Внутрикорковые записи показали, что ВЧО, связанные с РД, генерируются волной возбуждения перед РД, которая синхронизирует активность нейронной сети в локальных (~300 мкм) быстрых гамма-колебаниях и распространяется вертикально по глубине коры от поверхностных до глубоких слоев вместе с вертикальным распространением РД. В случаях частичных РД, которые не распространялись через всю глубину коры, ВЧО также поддерживались быстрой гамма-активностью в суб-СД зоне на протяжении всего временного хода РД выше. Мощность ВЧО на поверхности коры сильно коррелировала с уровнем синхронизации нейронов при быстрых гамма-осцилляциям в пред-РД и суб-РД зонах.

Выводы. Таким образом, ВЧО могут служить потенциальным маркером РД в дополнение к классическим алгоритмам выявления РД на основе DC-сдвига и подавлении АС-активности.

Исследование было поддержано грантом РФФ № 24-75-10054.

АССОЦИАЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ С РИСКОМ РАЗВИТИЯ ДЕМЕНЦИЙ У ПАЦИЕНТОВ С МЯГКИМ КОГНИТИВНЫМ СНИЖЕНИЕМ

Федосеева Е.Д., Грядунов Д.А.

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

elfed0@mail.ru

Введение. Ранее выявление признаков развития болезни Альцгеймера (БА) способствует своевременному началу профилактики, снижению интенсивности симптомов когнитивного дефицита. Начальная стадия мягких когнитивных нарушений (МКС) характеризуется высоким риском дальнейшего прогрессирования заболевания в средние и тяжёлые формы БА. Поскольку патологические процессы начинают развиваться задолго до проявления значительного снижения когнитивных функций, одним из важных направлений выявления ранней стадии деменции является анализ генетической предрасположенности к БА.

Цель. Изучение влияния генетических факторов, ассоциированных с когнитивными нарушениями, на риск развития деменций и на динамику когнитивных функций у пациентов с МКС в трехлетнем проспективном исследовании.

Материалы и методы. Исследование включало 338 пациентов с МКС, проходивших обследование в Психиатрической клинической Больнице № 1 им. Н.А. Алексеева. Выборка насчитывала 284 женщины и 54 мужчины, средний возраст составил $71,2 \pm 7,5$ лет. Оценку когнитивных функций участников исследования проводили по Монреальской когнитивной шкале (MoCA) и краткой шкале оценки психического статуса (MMSE). Также выполняли забор крови для общего и биохимического анализа. Определение генетических факторов риска развития деменции альцгеймеровского типа проводили с использованием разработанного нами ранее гидрогелевого олигонуклеотидного биочипа, предназначенного для анализа 21 маркера полигенного риска (ПГР) развития деменции и ϵ -аллелей гена *APOE*. Пациенты проходили когнитивный тренинг в «Клиниках памяти» и спустя три года были приглашены на повторное обследование. Анализировали разницу изначального балла когнитивных шкал с полученными результатами среди разных квартилей ПГР и аллелей гена *APOE*.

Результаты. Для прослеживания трехлетней динамики когнитивных показателей были оценены данные когнитивных показателей 146 из 338 пациентов. У пациентов, которые не смогли прийти на повторную оценку когнитивных способностей, изначальные когнитивные показатели были ниже, чем у лиц, оставшихся в исследовании. Пациенты с гомозиготой по аллелю $\epsilon 4$ гена *APOE* имели более низкие баллы по шкалам MoCA и MMSE при первичном обследовании, а также более высокие темпы снижения когнитивных функций. При оценке влияния ПГР на динамику когнитивных функций у пациентов с МКС статистически значимых различий не выявлено.

Выводы. Предложен комплексный подход, основанный на оценке модифицируемых и немодифицируемых факторов, влияющих на динамику когнитивного снижения.

Использование разработанного метода анализа генетических маркеров с целью прогнозирования динамики когнитивных нарушений может оказать значительное влияние на индивидуализацию профилактического лечения в клинической практике. Отсутствие значимых ассоциаций между уровнем ПГР и динамикой когнитивного снижения в течение трехлетнего периода может быть обусловлено положительным влиянием когнитивного тренинга. Для уточнения разработанной модели ПГР БА существует необходимость дальнейшей апробации на российской популяции недавно обнаруженных в зарубежных исследованиях генетических маркеров, ассоциированных с риском развития БА и с уровнями биомаркеров, характерных для данного заболевания.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Московского центра инновационных технологий в здравоохранении (Соглашение № 0803-4/23-1НИР).

ВЛИЯНИЕ УРОВНЯ ДОФАМИНА НА НЕЙРОВОСПАЛЕНИЕ У КРЫС В МОДЕЛИ ХРОНИЧЕСКОЙ МИГРЕНИ

Фокеева Н.О., Кочнева А.А., Илюшичев В.Д., Герасимова Е.В.

Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования
«Научно-технологический университет «Сириус», Сириус, Россия

nataf1306@gmail.com

Мигрень – это распространенное неврологическое заболевание со сложной патологией. Поскольку дофаминергическая система участвует в процессе регуляции боли, нарушения в передаче этих сигналов может приводить к повышенной болевой чувствительности и усугублять симптомы мигрени. Тучные клетки, локализующиеся в *dura mater*, могут вносить дополнительный вклад в развитие мигренозного приступа за счет активации и выброса провоспалительных агентов. Также считается, что нейровоспаление может играть роль в развитии и поддержании мигрени, поскольку активированные микроглия и астроциты вырабатывают провоспалительные медиаторы, которые могут нарушать целостность ГЭБ, что в совокупности может приводить к учащению приступов мигрени и их переходу в хроническое состояние.

Целью данной работы являлось исследование влияния уровня дофамина на воспалительные процессы и дегрануляцию тучных клеток у крыс в модели хронической мигрени.

В исследовании была использована модель хронической мигрени на самцах крыс линии с нокаутом дофаминового транспортера (DAT). Исследование проводилось на DAT-WT животных (животные “дикого типа”, n=9) и DAT-НЕТ животных (гетерозиготы по нокауту дофаминового транспортера, n=10). Животным внутрибрюшинно вводился нитроглицерин (НТГ) в концентрации 10 мг/кг на 1, 3, 5, 7, 9 дни эксперимента. Через сутки после последней инъекции производилась перфузия, забор мозга, выделение мозговых оболочек и их окрашивание 0.1% толуидиновым синим.

Образцы мозга окрашивались имунногистохимическим методом, анализировались гиппокамп (молекулярный слой *gyrus dentatus*, слой *stratum radiatum* CA1 и CA3 областей, hilus) и соматосенсорной коры на S100β+ и GFAP+ астроциты, Iba-1+ микроглиальные клетки; а также таламус (зона *VPM* - вентральное постеромедиальное ядро) на GFAP+ астроциты.

Для оценки активации тучных клеток оценивали степень дегрануляции. Количество клеток для каждого препарата составило не менее 100 клеток. Расчет индекса дегрануляции проводился по следующей формуле: $(A*0+B*1+B*2+Г*3)/n$,

где А – Г – степень дегранулированности клеток. А – неактивные тучные клетки, Б – клетки со слабой степенью дегрануляции, В – клетки с умеренной степенью дегрануляции, Г – сильно дегранулирующие клетки, n – общее количество клеток.

Индекс дегрануляции тучных клеток DAT-НЕТ после введения НТГ составил 0.34 ± 0.15 , n=9 и был достоверно выше относительно животных группы DAT-WT (0.23 ± 0.10 ,

$n=9$, $p<0.05$). Однако гистологический анализ с используемыми нами маркерами не показал достоверных отличий ни в количестве клеток на единицу площади, ни в площади покрытия клеток во всех исследуемых нами зонах.

Таким образом было показано, что введение НТГ, инициатора приступа мигрени, по-разному влияет на дегрануляцию тучных клеток у животных с различным уровнем дофамина. Рост дегрануляции тучных клеток приводит к повышенной выработке медиаторов воспаления, что может ухудшать течение приступа у животных линии DAT-NET. Однако различный уровень дофамина при хроническом приступе мигрени не повлиял на распределение и количество глиальных клеток, что позволяет предположить, что измененный уровень дофамина дополнительно не влияет на развитие нейровоспалительных процессов.

Работа поддержана грантом РФФ № 23-15-00328.

МИЕЛИНИЗАЦИЯ У КРЫС С РАССТРОЙСТВОМ АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА

Черкассова Р.Д.¹, Акбаров Т.Н.¹, Куликова Е.Д.², Пестерева Н.С.²

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

²Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

regina.cherkassova@mail.ru

Расстройство аутистического спектра (РАС) – это расстройство развития нервной системы, проявляющееся когнитивными и социальными нарушениями и повышенной тревожностью. Патология аутизма связана с генетическими, экологическими факторами и нейровоспалением. При медикаментозном лечении биполярного расстройства, мигрени и невралгии вальпроевой кислотой (VPA) во время беременности, существует высокий риск формирования РАС у плода. Вальпроатная модель РАС является одной из самых распространенных, поскольку у потомства животных, подвергшихся пренатальному воздействию VPA, наблюдаются ключевые симптомы РАС, такие как социальная дефицитарность и стереотипическое поведение. Терапия РАС включает поведенческую терапию и фармакотерапию.

Withania somnifera (WS) – это адаптогенное растение, которое назначается пациентам при депрессии, бессоннице и гормональных нарушениях. WS представляет интерес для изучения в контексте РАС в связи со своими нейропротекторными и противотревожными свойствами.

Целью настоящего исследования является оценка экспрессии генов, ответственных за миелинизацию, на вальпроатной модели РАС у крыс.

Методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (РТ-ПЦР) измерялась экспрессия мРНК генов *Cspg4*, *Olig2*, *Mag*. Они играют ключевую роль в процессах миелинизации и нейрогенеза, которые могут быть нарушены при РАС. *Olig2* регулирует дифференцировку олигодендроцитов, что критично для миелинизации, в то время как *Mag* и *Cspg4* участвуют в поддержании и восстановлении миелиновых оболочек и задействованы в регуляции нейропластичности. В качестве референсных генов были выбраны *PGK1* и *18S*.

На 12,5 день беременности самки крыс получали однократное введение вальпроата натрия (VPA) в дозировке 600 мг/кг веса или однократное введение физраствора объемом 1 мл. Всего было получено 26 крысят, из которых были сформированы три экспериментальные группы (контроль, WS, VPA+WS). Крысята из группы VPA+WS (n = 6), представлявшие экспериментальную модель РАС, дополнительно получали экстракт WS: до 10-го дня постнатального развития WS вводился кормящим матерям (600 мг/кг), а затем (с 11-го дня) крысята получали WS непосредственно с пищей. По такой же схеме в группе WS (n = 9) экстракт получали крысята, не подвергавшиеся вальпроатной экспозиции. Контрольная группа (n = 11) не получала ни VPA, ни WS. На 30-й день эксперимента крысята были декапитированы, у них были изъяты гиппокампы и стриатумы, на которых была поставлена

РТ-ПЦР. Статистический анализ был проведен при помощи однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA) с post-hoc тестом Тьюки.

Результаты показали, что в стриатуме крыс с моделью PAC, получавших WS, (VPA+WS) наблюдалось значительное снижение экспрессии Olig2 (VPA+WS vs. WS, $p=0.0048$), свидетельствующее о нарушенной дифференцировке олигодендроцитов при данном расстройстве. В гиппокампе было выявлено уменьшение экспрессии Cspg4 в группе VPA+WS по сравнению с группой WS ($p=0.0165$), исходя из чего можно сделать вывод о нарушениях в процессах восстановления миелиновых оболочек у крыс с PAC. Для гена Mag не было обнаружено существенных изменений между группами, что может указывать на его устойчивость к воздействию VPA и WS в данной модели. Анализ полученных данных позволяет сделать вывод о нарушении миелинизации в вальпроатной модели PAC.

Работа выполнена при поддержке государственного задания FGWG-2025-0016.

ВЛИЯНИЕ ДЕЛЕЦИИ ГЕНА CNTN6 НА МОРФОЛОГИЮ НЕЙРИТОВ И МИЕЛИНОВЫХ ВОЛОКОН В МОЗГЕ МЫШЕЙ

Шадрина М.М.^{1,2}, Тюменцева Я.А.¹, Тур Д.А.³, Ходанович М.Ю.¹

¹Национальный Исследовательский Томский Государственный университет, Томск, Россия

²Сибирский Государственный медицинский университет, Томск, Россия

³Институт Цитологии и Генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

shadrina@mail.tsu.ru

Contactin 6 (CNTN6) – это белок из семейства контактинов, который играет важную роль в нейроразвитии, включая формирование нейронных сетей, дендритный и аксональный рост и олигодендроцитогенез. Исследования на людях показали, что мутации в гене CNTN6 связаны с развитием неврологических и психиатрических заболеваний, таких как умственная отсталость и расстройства аутистического спектра. Тем не менее, на данный момент имеется крайне мало данных о морфологических изменениях нейритов и миелиновых волокон при отсутствии экспрессии CNTN6.

Целью работы является исследование морфологических изменений нейритов (аксонов) и миелиновых волокон у мышей с делецией гена контактина-6 по сравнению с их генетической основой - мышами линии C57Bl/6.

Криосрезы головного мозга 3 мышей линии C57Bl/6 (n=2 ♂ и 1 ♀, Контроль) и 3 мышей линии CNTN6^{-/-}, (n=2 ♂ и 1 ♀) были окрашены иммунофлуоресцентно первичными антителами к основному белку миелина (МВР) для анализа морфологии миелиновых волокон и к нейрофибрину-1 (NF-1) для анализа нейритов и вторичными антителами, конъюгированными с флуорохромами Alexa Fluor 488 и Alexa Fluor 488 соответственно. Проведена съемка целых срезов микропрепаратов с увеличением x10 и x20 на микроскопе Zeiss Axio Imager Z2. Морфологию нейритов и миелиновых волокон оценивали на срезах на уровне 0,86 мм, -1,46 мм и -6.48 мм от брегмы.

Выявлено нарушение в направлении нейритов и структуре миелиновых волокон по сравнению с животными линии C57Bl/6 как у самцов, так и у самок. У обоих полов наблюдались нарушения как в направлении и плотности нейритов, так и в структуре миелиновых волокон в коре больших полушарий, каудопутамен и гиппокампе по сравнению с Контролем. В частности, у всех животных CNTN6 в коре визуально отмечалась меньшая плотность аксонов, и менее четко выраженная столбчатая структура, что особенно заметно во вторичном моторной коре и первичной соматосенсорной коре. В каудопутамен у всех животных с делецией наблюдалось изменение структуры проводящих пучков, зависящее от пола: у самцов меньше пучков при их большей площади сечения, а у самки наоборот, количество проводящих пучков увеличено, но сечение пучков меньше, чем в Контроле.

В гиппокампе у самки и одного из самцов по сравнению с Контролем в зонах hippocampal fissure, stratum radiatum, dentate gyrus molecular layer миелинизированные аксоны имеют более беспорядочную структуру. Кроме того, в зоне stratum radiatum визуально

выделяется большее количество аксонов и волокон МВР. Все вышеуказанные нарушения значительно чаще наблюдались у самцов, чем у самки.

Таким образом, у мышей с делецией гена контактина-6 обнаружены четко выраженные нарушения в морфологии нейритов и миелиновых волокон по сравнению с мышами линии C57Bl/6, при этом они более выражены у самцов, чем у самок. Полученные результаты подтверждают важную роль CNTN6 в формировании нервных структур и могут служить основой для дальнейших исследований его влияния на нейроразвитие и миелинизацию.

ВЛИЯНИЕ ЛИГАНДА SIGMA1R ФАБОМОТИЗОЛА НА ПОРОГ ВОЗНИКНОВЕНИЯ СУДОРОГ, ВЫЗВАННЫХ БИКУКУЛЛИНОМ И ПИКРОТОКСИНОМ

Шангин С.В.¹, Вахитова Ю.В.²

¹ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Россия

²ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, 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 действие 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 являлась оценка противосудорожного влияния лиганда Sigma1R фабомотизола в модели судорог, индуцированных внутривенным введением пикротоксина (PIC) и бикикуллина (BIC) мышам.

В модели судорог, вызванных внутривенным введением судорожного агента, мышам ICR внутрибрюшинно (в/б) вводили антагонист Sigma1R BD-1047 (20 мг/кг) или растворитель, с последующей инъекцией фабомотизола (20 мг/кг) или его растворителя через 30 минут. Через 60 минут внутривенно (в/в) вводили PIC (0,4 мг/кг, 6 мкл/с) или BIC (0,2 мг/кг, 6 мкл/с). Минимальные дозы PIC или BIC, 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).

Введение фабомотизола в дозе 20 мг/кг статистически значимо увеличивало порог возникновения судорог, вызванных PIC ($p < 0,0001$ для КП; $p = 0,0076$ для ГКС; $p = 0,0073$ для ГТС). Введение фабомотизола в аналогичной дозе также увеличивало порог возникновения судорог, вызванных BIC ($p = 0,0004$ для КП; $p = 0,0008$ для ГКС; $p = 0,0001$ для ГТС). Предварительное введение мышам BD-1047 в дозе 20 мг/кг ослабляло противосудорожное действие фабомотизола, что оценивалось по снижению порога возникновения регистрируемых параметров ($p < 0,0001$ для КП; $p = 0,0012$ для ГКС; $p = 0,0068$ для ГТС) для PIC и ($p = 0,0051$ для КП; $p = 0,0058$ для ГКС; $p = 0,0038$ для ГТС) для BIC.

Полученные данные указывают на то, что агонист Sigma1R фабомотизол в дозе 20 мг/кг обладает собственным противосудорожным эффектом в модели PIC и VIC-индуцированных судорог у мышей. Антагонист Sigma1R BD-1047 в дозе 20 мг/кг препятствует противосудорожному действию фабомотизола, приводя показатели порога судорог к контрольным значениям. Полученные результаты подтверждают опосредованность противосудорожного действия фабомотизола агонистической активностью к Sigma1R.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № FGFG-2025-0004.

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВАЦИЯ MGLUR4 ПОЗИТИВНЫМ
АЛЛОСТЕРИЧЕСКИМ МОДУЛЯТОРОМ TCN 238 СПОСОБСТВУЕТ НЕЙРОПРОТЕКЦИИ

Шафикова Е.Р.^{1,2}, Федорова Е.В.², Черноморец И.Ю.²

¹Пушкинский естественно-научный институт – филиал «РОСБИОТЕХ», Пушкино, Россия

²Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия

uralochka-10@mail.ru

Ранее нами показано, что при нейродегенерации, вызванной нейротоксикантом хлоридом триметилолова (ТМТ) в гиппокампе, экспрессия гена *GRM4*, который отвечает за синтез метаботропного рецептора глутамата четвертого подтипа (mGluR4), возрастает через 3 недели.

Известно, что гиппокамп функционально и анатомически тесно связан с префронтальной корой (ПФК), которая играет ключевую роль в когнитивных процессах, таких как память, обучение и принятие решений. Их взаимодействие обеспечивает интеграцию информации и адаптивное поведение.

Цель данной работы заключалась в исследовании нейропротективного потенциала mGluR4 в префронтальной коре в условиях нейродегенерации, вызванной ТМТ в префронтальной коре. Для этого в экспериментах на крысах применяли позитивный аллостерический модулятор (ПАМ) TCN 238. Оценку нейропротекторного эффекта проводили методами поведенческого тестирования (реакция пассивного избегания), морфометрии (окрашивание по Нисслю), а также определением уровня мРНК в префронтальной коре для mGluR4, маркеров нейровоспаления (*Aif1*, *Gfap*, *IL1b*, *Tgfb1*) и для субъединиц NMDA-рецепторов (*Grin2a*, *Grin2b*, *Grin2c*).

Результаты показали, что через 3 недели после инъекции ТМТ в префронтальной коре животных повышается экспрессия гена *GRM4*, кодирующего mGluR4, что указывает на его вовлечённость в патологические процессы.

При фармакологической активации mGluR4 с помощью TCN 238 наблюдалось улучшение поведенческих показателей у животных. Морфометрический анализ нейронов прелимбической области ПФК показал, что TCN 238 способствовал уменьшению количества поврежденных нейротоксикантом нейронов. При этом также было выявлено повышение уровня мРНК для субъединицы NMDA-рецепторов GluN2A, что свидетельствует о снижении возбудимости нейронов неокортекса в результате действия TCN 238.

Результаты исследования подтверждают, что mGluR4 играет важную роль в процессах нейродегенерации и может служить перспективной мишенью нейропротекции. Активация mGluR4 с помощью ПАМ TCN 238 демонстрирует потенциал для снижения нейровоспаления и улучшения когнитивных функций в условиях нейродегенерации.

Работа поддержана Государственным заданием № 075-00224-24-03.

РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ ПОВРЕЖДЕНИЯ ГЛИМФАТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ *IN VITRO*

Щеглова А.И., Маргулис Б.А., Гужова И.В., Лазарев В.Ф., Дутышева Е.А.

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

AliceScheglova25@gmail.com

Глимфатическая система ЦНС играет решающую роль в поддержании гомеостаза паренхимы головного мозга. Важным звеном глимфатической системы являются астроциты, которые экспрессируют на своей поверхности каналы аквапорина-4 (AQP4) и отвечают за систему очистки, транспорта и местного иммунитета в головном мозге. Дисфункция глимфатической системы и, в частности AQP4, играет не последнюю роль в патогенезе болезни Альцгеймера, деменции с тельцами Леви, болезни Паркинсона и нормотензивной гидроцефалии. Исходя из этого, целью данного исследования является создание модели глимфатической системы *in vitro* с целью изучения роли AQP4 в патогенезе болезни Альцгеймера.

В исследовании были использованы мезенхимальные стволовые клетки человека (МСК) линий DP (из пульпы молочного зуба) и WJ1 (из Вартонова студня пупочного канатика) из «Коллекции культур клеток позвоночных» Центра коллективного пользования Института цитологии РАН. Дифференцировку проводили в течение 31 дня в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °C при помощи смены ростовых факторов. Дифференцировка в нейральные стволовые клетки (НСК) проходила в два этапа: индуцирования и пролиферации, которые длились 10 дней, а в астроциты – 21 день.

Уровень экспрессии генов оценивали методом ПЦР в реальном времени. Для НСК были выбраны следующие маркеры: Notch, Nestin, SOX2 и Actin, для астроцитов - s100b, ALDH1L1, Actin. В качестве контроля были использованы МСК WJ1 и DP и НСК, соответственно. Повышение экспрессии маркеров НСК и астроцитов свидетельствует о приобретении клетками необходимого фенотипа. Однако по данным ПЦР в реальном времени линия МСК WJ1 продемонстрировала более успешную дифференцировку в НСК, а затем в астроциты по сравнению с линией DP. Пассажи́рование с использованием аккутазы эффективно сохраняло молекулярные маркеры дифференцировки, в отличие от 0,05% трипсин-ЭДТА. Иммуноцитохимическое окрашивание МСК, НСК и астроцитов по маркеру GFAP и анализ морфологии клеток с использованием конфокальной микроскопии подтвердило результаты кПЦР. Нарушение функции глимфатической системы *in vitro* моделировалось с помощью культивирования астроцитов в присутствии комплекса GAPDH-β-амилоид и последующего анализа изменения экспрессии AQP4.

Таким образом, данный протокол дифференцировки является эффективным инструментом для создания модели повреждения глимфатической системы *in vitro* и оценки новых терапевтических подходов.

Работа поддержана грантом РФФ № 23-74-10117.

ВЛИЯНИЕ БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ В-АМИЛОИД/GAPDH НА ШАПЕРОН-ОПОСРЕДОВАННУЮ АУТОФАГИЮ

Юракова А.В., Дутышева Е.А., Гужова И.В., Маргулис Б.А., Лазарев В.Ф.

Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

aura_191520@mail.ru

Шаперон-опосредованная аутофагия (СМА) – важный клеточный механизм лизосомальной деградации белка, который играет ключевую роль в поддержании белкового гомеостаза. СМА обеспечивает деградацию поврежденных или неправильно сложенных белков. Нарушение шаперон-опосредованной аутофагии связывают с развитием различных патологий, включая болезнь Альцгеймера.

Ранее в нашей лаборатории было показано, что количество накопленных комплексов β-амилоид/GAPDH в спинномозговой жидкости пациентов с болезнью Альцгеймера коррелирует с тяжестью заболевания, а в *in vitro* исследованиях комплекс вызывает клеточную гибель. Исследование воздействия комплекса β-амилоид/GAPDH на шаперон-опосредованную аутофагию позволит предположить механизм его цитотоксичности.

В нашем исследовании мы вносили к клеточной линии MSC-Neu (клеточная линия MSC-DP, дифференцированная в нейрональный тип) комплекс β-амилоид/GAPDH и оценивали его влияние на систему шаперонов и уровень LAMP2A в лизосомальной фракции в разные временные точки. При помощи ПЦР в режиме реального времени было установлено, что уровень экспрессии генов *Hsp70* и *Hsp90* спустя 6 часов инкубации снижался относительно контроля, к 12-му часу инкубации экспрессия достигала своего максимума, после чего, к 24-му часу уровень мРНК возвращался к контрольным значениям.

С помощью Вестерн-блот анализа была показана схожая динамика. К 6 часам инкубации уровень накопления белка упал относительно контроля, к 12 часам достиг максимального значения, а затем, к 24 часам снизился, однако остался выше контрольных значений. При анализе лизосомальных фракций было выявлено, что уровень накопления белка LAMP2A изменялся аналогично: к 6-му часу уровень накопления белка снижался, пиковые значения наблюдались к 12 часам, а затем к 24 часам уровень белка уменьшался.

Таким образом, было показано, что под воздействием комплексов в клетках активизируется шаперон-опосредованная аутофагия и задействуется система шаперонов. Динамические изменения уровней экспрессии *Hsp70* и *Hsp90*, а также уровня накопления белка *Hsp70* и LAMP2A во времени могут свидетельствовать о последовательной активации систем защиты клетки: начальное снижение активности системы шаперонов, последующая компенсаторная активация и возвращение к исходным показателям. Мы предполагаем, что перегрузка системы шаперонов и нарушение лизосомальной деградации белков могут приводить к дисфункции шаперон-опосредованной аутофагии и снижает эффективность удаления цитотоксичного комплекса из клетки.

Работа поддержана грантом РФФИ № 23-74-10117.

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

А		
Абашина Т.Н.	321, 329, 368	
Абдуллаева С.Д.	230	
Абдуллатыпов А.В.	106	
Абдуллина М.И.	217	
Абдыев В.К.	181	
Абелев Г.О.	384	
Абилев С.К.	464	
Абрамов В.М.	205	
Абрамова А.А.	482, 505	
Абсалямова М.Т.	635	
Агафонова Е.Е.	5	
Агбоигба Э.Э.К.	7, 125	
Агладзе К.И.	162	
Азнабаева З.А.	231, 361	
Айзатуллина Л.М.	232	
Акбаров Т.Н.	645	
Акбирова А.Ф.	233	
Акимов М.Г.	463	
Акопджанян А.В.	234	
Аксенов-Грибанов Д.В.	304, 372	
Александрова А.А.	30	
Алексанкина В.В.	390	
Алексеев Р.З.	460, 473	
Алексеевский А.В.	107	
Аленина Н.	624	
Алиева М.К.	8	
Алхимова А.А.	386	
Аль-Шехадат Р.И.	545	
Ананьева И.Н.	339	
Андреев А.И.	430, 633	
Андреева-Ковалевская Ж.И.	248	
Андрейцев В.В.	9, 52, 116, 121	
Андрианова Н.В.	158, 427	
Анисимова А.А.	361	
Анисимова О.К.	10	
Аноятбекова А.М.	235	
Антипов С.С.	35	
Антипова Н.В.	207	
Антипова О.М.	84	
Антипова Т.В.	321	
Антонец К.С.	358	
Антонова Д.А.	345	
Антонова Н.П.	230, 285	
Антонова О.Ю.	169, 175	
Антосюк О.Н.	410, 591	
Антропова Ю.Г.	461	
Апанович С.В.	413	
Апаркина Д.Г.	11	
Апраксина Н.К.	635	
Апушкин Д.Ю.	430	
Арабчикова П.А.	387	
Арбузова Н.А.	554	
Арзамасов К.М.	432	
Армянинова Д.К.	160	
Артёмова Е.Н.	160	
Артыкбаева Г.М.	388	
Артыкова А.В.	264	
Артюхов В.Г.	128	
Архарова Н.А.	369	
Аршинова Е.С.	22	
Аршинцева Е.В.	178	
Асадуллин А.Ф.	12	
Аскерова А.Ф.	237	
Астанин С.С.	518	
Афанасьева С.О.	389	
Афонин М.Б.	92	
Ахметшина А.А.	390	
Ахременко Е.А.	430, 633	
Ачасова К.М.	394	
Ашихмин А.А.	343, 450	
Ашихмина О.О.	343	
Б		
Бабенкова П.И.	392	
Бабушкин Д.В.	532	
Бабынин Э.В.	34, 359	
Багров Д.В.	172	
Баёва Л.В.	576	
Баженова Д.Э.	546	
Базаревич М.В.	39	
Баклушинская И.Ю.	126	
Бакуменко С.С.	162	
Балабан П.М.	602	
Балашов Н.В.	483, 485	
Балобанов В.А.	52	
Балькина А.М.	439	
Барбитов Ю.А.	145	
Баскова М.В.	13	
Баталова А.А.	372	

Бахчинян Е.	186	Бугаева Е.А.	520
Башенджиева Е.О.	393	Булаев А.Г.	264
Башкирова И.Г.	238	Булгин И.В.	396, 476, 615
Бекетов Д.М.	237	Булкина А.М.	203
Белик Л.А.	15	Бунеева Е.А.	94, 242
Белов А.А.	558	Бурдинская В.О.	398
Белова Е.В.	67	Буртовская М.И.	22
Белова Ю.И.	137, 164	Буслаева Е.А.	86
Белокоскова С.Г.	635	Бут С.Ю.	311
Белопольская О.Б.	104	Бутенко Е.В.	470, 538
Бельшенко А.Ю.	275, 304, 399	Буткова Т.В.	87
Беляева А.И.	154	Бушуева А.С.	522
Бердиган Р.Д.	509	Буян М.И.	158
Бережнов А.В.	478, 585	Быкова А.В.	24
Березина Е.В.	491	Бычкова А.В.	217
Берестецкий А.О.	302	Бычкова Т.М.	384, 455
Бец В.Д.	394		
Бобков Д.Е.	191	В	
Бобков Я.Н.	410, 591	Вавилина Т.Н.	275, 304, 399
Бобровских Е.А.	17	Вайнштейн М.Б.	368
Богданов А.С.	126	Вакарина Л.Д.	169
Богданова Е.М.	154, 484	Валиахметов Э.Э.	131, 244, 381
Болихова А.К.	149	Валидов Ш.З.	7, 88, 125, 130, 131, 244, 297, 300, 381
Бондарев С.А.	12, 36	Ванина А.А.	26
Бондарь И.В.	479	Васильева Е.А.	580
Борзова П.А.	166	Васильева С.Г.	168
Борисов Е.Е.	19	Васильева Ю.А.	246, 306
Борисова А.А.	168	Васильченко А.С.	258
Борисова В.Д.	21	Васильченко Е.Н.	501
Борисова-Мубаракшина М.М.	450, 483, 485	Васин А.В.	76
Борман С.И.	578	Васина Д.В.	230, 285
Бородачева Ю.В.	479	Васькин Н.В.	401
Бородинова А.А.	602	Вафин Р.Р.	28
Бородкина А.В.	57, 74	Вахитова Ю.В.	649
Бороздина Н.А.	387	Веденев Д.А.	558
Бочаров Э.В.	62, 65, 109	Ведяйкин А.Д.	118, 144
Бочарова М.Э.	395	Верещагин М.В.	482, 505
Бочкарева М.Д.	86	Ветлугина А.	582
Бочкова М.С.	179	Ветошкина Д.В.	450, 483, 511
Брагина Н.А.	54	Ветрова О.С.	248
Бражникова А.В.	485	Ветровой О.В.	446, 457, 592
Брезгунова А.А.	158	Вильникова В.А.	402
Брилкина А.А.	491	Виноградова Д.С.	129
Бровко Ф.А.	248	Виноградова Л.В.	587, 588
Брошевицкая Н.Д.	579	Виноградова С.В.	301
Брусин С.А.	104, 227	Винокуров А.Ю.	166
Брысякин Е.Р.	169		
Брянская Е.О.	411		
Бубнова Д.В.	240		

Винокурова Д.Е.	639	Гончарова Е.П.	394
Витковская Е.В.	170	Гордлеева С.Ю.	576
Вихлянцев И.М.	434	Горенкова А.И.	154
Власенко А.И.	250	Горобец М.Г.	217
Власенко В.П.	542	Горовцов А.В.	291
Власова А.А.	403	Градова Д.А.	30
Внукова А.А.	172	Градова М.А.	217
Вологин С.Г.	317	Грачев В.А.	175
Волченко Н.Н.	531	Грачева А.И.	407
Воронежская Е.Е.	578	Грачева Е.А.	429
Воронков А.С.	506	Григорьев И.Г.	230
		Григорьев Н.А.	576
Г		Гридасова К.Ж.	32
		Гриневич А.А.	458
Гавриленкова А.А.	62, 65, 109	Грицына Ю.В.	434
Гаврилов Л.А.	252	Грищенко А.А.	587, 588
Гаврилова Е.А.	253	Громовых Т.И.	349, 369
Гайдин С.Г.	619, 637	Гронина А.Д.	531
Гайнетдинов Р.Р.	624	Грядунов Д.А.	61, 68, 641
Галева А.В.	133	Грязнова У.В.	487
Галимов Р.Р.	524	Губа Е.А.	446
Галимова Э.С.	424	Губайдуллина А.А.	190
Галлямов А.А.	27	Гужова И.В.	652, 653
Галстян Д.С.	583	Гуляев И.А.	176
Гамбарян С.П.	435, 439, 448	Гуляева Н.В.	611
Гараева Н.С.	125	Гуреев А.П.	392, 395, 427, 488, 498, 607
Гасса М.	134	Гуреева М.В.	488, 498
Гатаулина Э.Д.	401	Гурьев Н.А.	219
Гафуров О.Ш.	622	Гусев О.А.	156
Гельфенбейн Д.М.	8	Гусева Е.А.	119
Генин В.Д.	223	Гусманова Ю.Р.	34
Георгиев П.Г.	67	Гуцол А.Д.	345
Герасимова Е.В.	643		
Гербст А.Г.	405	Д	
Герцен М.М.	526	Давыдов Д.А.	550
Гильманов Х.Х.	28	Давыдова Г.А.	228
Гильмутдинова А.И.	254	Давыдова Е.Ю.	411
Гинзбург А.П.	528	Далевич Р.А.	178
Глушко Г.В.	505	Данилкович А.В.	454
Головина В.Ю.	21	Данилова О.В.	350
Головкина Д.А.	48	Данилова Ю.В.	246, 254, 306
Голубев Д.М.	557	Девятияров Р.М.	156
Голубчиков Д.О.	173	Девятов С.О.	408
Голушко Н.И.	583	Дедыш С.Н.	350
Гольц М.Е.	256	Деев И.Е.	62, 109
Гольцев М.Ю.	479	Делеган Я.А.	376
Гончаренко А.В.	160	Дементьев С.А.	54, 409
Гончарова Е.Д.	530		

Дёмин К.А.	63, 95, 291, 295	Енгальчева И.А.	356
Денисенко А.Д.	520, 532	Енукашвили Н.И.	15, 393
Державина В.М.	585	Ерастенкова М.В.	493
Деркач К.В.	438	Ератова Л.В.	166
Дерюгина А.В.	429	Еремина А.А.	488
Дерябин П.И.	57, 74	Ерофеева Е.Д.	181
Джабраилов В.Д.	162	Ерохин М.М.	50
Джафарова А.С.	587	Ефименко А.Ю.	186
Дженкова М.А.	168		
Джеппи Д.Д.	631	Ж	
Дзагурова Т.К.	293	Жалимов В.К.	434
Дзариева Ф.М.	84	Жаркова Е.К.	266, 279
Дилбарян Д.С.	258	Жданова К.А.	54
Диоманде М.Х.Ж.	534	Жданова М.И.	36
Дмитренко О.П.	45	Желонкина А.Н.	268
Дмитриева М.Е.	372	Жигулин А.С.	589
Дмитровская С.В.	260	Жиленков В.М.	399
До Ф.Т.	52, 121	Жмаев Д.Н.	570
Доколин Д.А.	262	Жогов А.Ю.	242
Долгих В.В.	136, 379	Жудловский Д.Г.	410, 591
Долгих М.Д.	179	Жуков И.С.	624
Долотова С.М.	65	Журавлев И.Е.	270
Донцова О.А.	119	Журавлев М.	37, 609
Доронина Н.В.	311, 376	Журавлев М.О.	609
Дубровин С.В.	627	Журавлева Г.А.	12, 36, 42, 145
Дудун А.А.	285	Журишкина Е.В.	325
Дукова И.С.	497		
Дутьшева Е.А.	652, 653	З	
Дынник В.В.	478	Загирова Д.Р.	39
Дьяченко И.А.	178, 475	Загитова Р.И.	252
Дюбарь А.М.	264	Зайков В.Ф.	40
Дюкина А.Р.	458	Зайнуллина Л.Ф.	599, 600
		Зайцева Ю.В.	262
Е		Закирова Г.Ф.	639
Евдокимов П.В.	173, 196	Закржевская В.Д.	411
Евдокимова А.И.	536	Заморина С.А.	179, 408
Евдокимова Е.Я.	35	Замятина А.В.	248
Евланенков К.К.	589	Запрягаева Е.Ю.	118, 144
Евменов К.С.	115	Зарайский А.А.	98
Евстюхина Т.А.	48	Захарова Н.М.	462
Егоров В.В.	76	Зацаринная Е.А.	268
Егоров К.А.	82	Згода В.Г.	119
Егорова Т.В.	168	Зейнаб Хабиб	59
Ежков В.О.	253	Землянко О.М.	42
Ежкова А.М.	253	Зиганшин Р.Х.	66
Елкина Ю.А.	264	Зиновьева А.А.	186
Ельцов О.С.	205		

Зиновьева К.Ю.	272	Калабина К.В.	147
Зинчук М.С.	594	Калаева Е.А.	128
Золотаренко А.Д.	104, 227	Калашникова Т.В.	281
Зорова Л.Д.	427	Калёнов С.В.	240
Зоткина А.С.	538	Калинина Н.И.	461
Зуган Е.А.	592	Калинина С.Н.	444
Зудова А.И.	413	Калистратова А.В.	463
Зюзина А.Б.	602	Калугина А.С.	393
Зюркалова Д.	79	Калуев А.В.	583
Зятева Е.С.	490	Камаев А.В.	378
И		Камалов Р.М.	113
Ибрагимова В.Р.	479	Каменков С.С.	186
Иванов Б.М.	84	Камышацкая О.Г.	366
Иванов Б.Н.	503, 511	Канаев П.А.	387
Иванов М.Э.	607	Кандинов И.Д.	68
Иванова А.Д.	274	Кандрашина С.С.	188
Иванова Е.С.	30	Канев И.Л.	169, 175
Иванова И.П.	471	Капаруллина Е.Н.	376
Иванова Т.В.	506	Карагяур М.Н.	199
Иванова Ю.С.	170, 219	Карань А.А.	626
Ивановская Е.В.	197	Карасева М.А.	17, 37
Иваньков А.И.	125	Каратовская А.П.	248
Ивашкин Е.Г.	578	Карев Д.А.	513
Ивашкина В.С.	415	Каримова Е.Д.	594
Ивин Ю.Ю.	172	Карманова Т.Н.	540
Игнатова Л.К.	511	Карпенко М.Н.	423, 624
Иголкин А.С.	199	Карпова Н.С.	22, 45, 100
Игонин Д.Ю.	183	Касацкий П.С.	129
Игонина И.Н.	183	Касьянов В.А.	345
Идрисова Л.Т.	233	Касьянова А.П.	491
Иерусалимский Н.В.	594	Кацюруба Е.А.	283
Илюха В.А.	444	Качаев З.М.	134
Илюшичев В.Д.	643	Каюмов А.Р.	231, 232, 253, 314, 361
Имидоева Н.А.	275, 304, 399	Каюмова Б.Р.	190
Иноземцев В.А.	185	Керимова Г.М.	237
Ионова А.Д.	277	Кечко О.И.	604
Исаков И.Э.	592	Кирилюк И.А.	409
К		Кирсанова А.С.	493
Кабанова Н.В.	59	Кирьянова Т.Д.	46, 289
Кадысева А.А.	42	Киселев А.Р.	609
Казакова В.М.	279	Клабуков И.Д.	212
Казанцева О.А.	374	Клечковская В.В.	369
Кайда А.А.	43	Клименко М.А.	176, 479
Кайшева А.Л.	87, 91	Клименко Н.С.	67
		Климова А.А.	285
		Климцева А.Е.	48
		Клишевич Н.Г.	339
		Клочкова Е.А.	130
		Кобякова М.И.	417

Коваленко И.И.	430	Косырева А.М.	19
Коваленко Н.П.	59, 419	Коцарев В.И.	291
Ковалицкая Ю.А.	214	Кочаровская Ю.Н.	376
Ковальчук А.И.	154	Кочеткова О.Ю.	169, 175
Ковган П.Е.	421, 435	Кочкина Е.Н.	422
Ковецкий О.В.	497	Кочнева А.А.	643
Ковпак А.А.	172	Кочубей А.В.	497, 516
Козарь Е.Г.	356	Кравцов Д.В.	61, 68
Козельчук Н.Я.	50	Красников Д.В.	5
Козлов А.В.	352	Креславский В.Д.	482, 505
Козлова А.Д.	583	Кривова Ю.С.	613
Козлова Ю.Н.	335	Кривошеина Д.А.	62, 109
Козулева М.К.	503	Крицкая К.А.	585
Колесникова В.В.	9, 52, 116, 121	Крицкий К.А.	542
Колесова Е.С.	53	Кроленко В.И.	358
Колоколов М.И.	54	Кропанева М.Д.	408
Колосов А.В.	264	Круглова М.Н.	531
Колосова А.А.	341, 378	Крумкачева О.А.	54, 409
Колтунова А.М.	56	Крупенко Д.Ю.	554
Коляденко И.А.	233	Крупская М.Н.	293
Комарова Л.Н.	212	Круть В.Г.	631
Комахин Р.А.	514	Крылов К.И.	63
Комина А.К.	287	Крюк В.А.	544
Комиссаров А.А.	37	Крюков А.А.	154, 495
Кондратьев М.С.	94, 128	Крюкова В.А.	498
Коневега А.Л.	129	Крючкова А.К.	65
Коновалова О.П.	358	Кудрявцева М.А.	118, 144
Коновалова С.П.	582	Кудряшова Т.Р.	154, 495
Кононкова А.Д.	39	Кузнецов Вл.В.	506
Конюшатова А.О.	57	Кузнецов Г.В.	194
Копосова О.Н.	374	Кузнецова А.П.	545
Копылов А.М.	84	Кузнецова Е.В.	390
Копылов А.Т.	87	Куканова О.В.	426
Копылова А.А.	191	Кукушкина Д.В.	563
Копылова Е.Е.	59, 419, 422	Кукушкина Е.С.	595, 597
Копылова Н.В.	495	Кулаков Е.Е.	522
Корбан С.А.	48	Кулебякин К.Ю.	186
Коренская А.Е.	150	Кулешова Т.Э.	499
Коркотян Э.А.	633	Куликов М.П.	95, 295
Корниенко М.А.	250	Куликова Д.Б.	95, 295
Корнилов М.В.	587	Куликова Е.Д.	398, 423, 645
Королев Н.А.	289	Куликова Л.И.	91
Корпусова Е.И.	193	Кулинич С.В.	304
Косицына О.А.	256	Кульбачинский А.В.	8
Кособрюхов А.А.	505	Кульминская А.А.	48, 325
Косовский Г.Ю.	70	Кулябин В.А.	272, 374
Костарева О.С.	79	Кунгуров Г.А.	131, 297
Костенко В.В.	323, 410, 591	Курашова С.С.	293
Косульников Ю.В.	154	Курбатова Л.Е.	484

Куренкова А.Д.	225	Лысова Е.А.	516
Куркин А.С.	66	Любанский И.А.	599
Курочкина Л.П.	139	Люблинская О.Г.	170, 219
Кутузова А.П.	424	Лянгузова А.Д.	554
Куцев М.Г.	56	Ляо С.	427
Куцов С.В.	501	Ляпунов С.И.	629
Кучерук О.Д.	287		
Кучур О.А.	207	М	
Кушников В.В.	27		
Кырчанова О.В.	67		
Л			
		Мавродина К.С.	242
Лабынцева О.М.	426	Мадумарова Э.Р.	314
Лаврентьева Е.В.	274	Мажейка К.И.	301
Лаврик И.Н.	125	Майорова И.В.	302
Лаврова Т.В.	425	Майстренко В.А.	595, 597
Лазарев В.Ф.	652, 653	Макаревич Е.В.	327
Лалетина И.О.	147	Макаров А.А.	604
Ларионова Т. Д.	67	Максименко О.Г.	67
Ларкин А.А.	68	Маломуж А.И.	215, 466, 605
Ларюшкин Д.П.	585	Малухина А.Д.	27
Ласкова Е.П.	554	Мальгина Е.В.	275, 304, 399
Лебедев В.Г.	490	Мальцева В.Н.	637
Лебедева Е.Я.	595, 597	Мальцева И.А.	516
Лебедева М.А.	509	Мамаева С.Н.	460, 473
Лебедева Н.А.	364	Мамонова О.В.	197
Леконцева Н.В.	52, 97	Мамчур А.А.	246, 306
Леонов А.В.	70	Манолова А.О.	611
Леонтьев Н.В.	196	Манских В.Н.	427
Лепёхина О.В.	94	Манучарова Н.А.	362
Лизоркина К.И.	415	Маргулис Б.А.	652, 653
Липатова О.Е.	372, 403	Марданов А.В.	264
Липова В.В.	426	Марданова А.М.	317
Лисицкая Л.А.	8	Мариевский В.Е.	599, 600
Литвинова Е.А.	394	Маркелова В.Е.	429
Лифинцева А.А.	463	Маркелова Д.Р.	546
Лихоманова Р.Б.	66	Маркин Р.В.	503
Лобанов А.Н.	298	Мартынкевич И.С.	15
Логвиненко Е.А.	72	Мартынов Д.Д.	583
Ложкарев Т.А.	300	Мартынова Е.И.	275
Ломтева Н.А.	468	Мартынов С.В.	313
Луиен К.Л.	369	Маслакова К.Ю.	548
Лукачева А.В.	191	Матвеевская П.А.	635
Лукина Е.Г.	302	Матвеевский С.Н.	126
Лутова Л.А.	26, 122, 509	Матвеев А.Г.	145
Лутфуллин М.Т.	317	Матишинец А.В.	307
Лысенко М.Е.	545	Матросова Е.В.	117
		Махортых С.С.	309
		Машенцева М.А.	73
		Медведева В.П.	396, 615

Мезенцев Е.С.	260, 366	Морозова Н.Е.	347
Мейстер Д.В.	505	Московский А.А.	202, 455
Меламуд В.С.	264	Мосолова А.М.	333
Меланина Ю.В.	430	Моцарь Е.В.	315
Мелехин В.В.	53, 205	Муравская У.О.	532
Мелик-Пашаев А.Э.	198	Муратова К.В.	436
Мелик-Пашаев И.Д.	115	Муртузова А.В.	484
Мелихова Т.Д.	13	Муслиенко П.Е.	582
Мельник А.П.	74	Мустакимов С.Р.	580
Мельников О.И.	311	Муталлапова Г.И.	231
Мельникова М.С.	432	Мухина К.А.	604
Меркурьев А.В.	76	Мухина М.А.	117
Месонжник Н.В.	92	Мухина Т.В.	86
Меткина А.А.	313	Мухлынина Е.А.	413
Мещерский И.Г.	540	Мысин И.Е.	621, 627
Мещерский С.И.	540	Мякишева С.Н.	458
Мещерякова Е.И.	434		
Мидзяновская И.С.	611, 617	Н	
Микулинская Г.В.	307	Нагель А.С.	248
Милетина О.О.	207	Надеева Е.М.	511
Миловская И.Г.	506	Назаров И.Р.	438
Мингазов Б.Р.	639	Найда Л.В.	439
Миндубаев А.З.	359	Найдов И.А.	485
Миндукшев И.В.	421	Наквасина М.А.	193
Минина Ю.А.	78	Насибулин А.Г.	5
Минкина Т.М.	291	Насретдинов А.Р.	639
Миролубов А.А.	554	Наход В.И.	87
Миронов В.В.	396, 615	Небогатилов В.О.	633
Миронова А.В.	232, 314	Невзорова Ю.В.	550
Миронова Г.Д.	396, 615	Невский Е.С.	605
Миткевич В.А.	604	Некрасов И.В.	88, 300
Митрофанова И.В.	315	Немчинова А.Р.	90
Митрошина И.Ю.	407	Нестеренко В.А.	347
Мифтахов А.К.	142	Нестерова В.В.	607
Мифтахов Р.Р.	602	Нечаева А.В.	264
Михайлина А.О.	52, 79	Низовцева И.Г.	150
Михайлова Д.М.	421, 435	Никитенко О.В.	384, 455
Михайлова Е.В.	32, 43	Никитин М.А.	578
Михайлова Е.С.	544	Никитина Е.В.	253
Михеева Е.И.	80	Николаев М.В.	401
Моисеева А.А.	82, 405, 436	Николаева А.А.	317
Моисеева Е.В.	531	Никольская Е.Д.	176
Моисеева Н.И.	147	Никольский К.С.	87, 91
Моисеенко В.Л.	84	Никонов О.С.	9, 52, 116, 121
Моисеенко Д.С.	199	Никонова Е.Ю.	9, 52, 116, 121
Моллаева М.Р.	176	Никулин А.Д.	97, 125
Молчанова А.В.	513	Новиков А.В.	319
Моргунова М.М.	403		
Моритц А.А.	629		

Новиков В.В.	362	Патрушев М.В.	125
Новиков М.Ю.	609	Пахомов А.А.	100
Новикова П.М.	92	Пашкевич Н.И.	450
Новикова С.Д.	94	Пашковский П.П.	482, 505, 506
Носков А.Е.	321	Паюта А.А.	262
Нурасов Р.И.	323	Певзнер И.Б.	158
Нурбеков М.К.	22, 45	Пермякова С.С.	567
		Перов Я.А.	329
О		Перчиков Р.Н.	331
		Пестерева Н.С.	645
Образумова З.В.	203	Петракова М.П.	82
Обухова Д.А.	441	Петренко В.А.	509
Огибин Н.	538	Петров А.М.	466
Одринская М.С.	611	Петров К.А.	605
Октябрьский О.Н.	281, 354	Петрова А.Г.	552
Омельченко А.В.	19	Петрова В.В.	546, 561
Онасенко К.А.	95, 295	Петровский Д.В.	91
Орехова А.А.	501	Петруняк А.М.	554
Орипова А.А.	233	Петюренко М.Ю.	113
Орленева А.П.	11	Печальнова А.С.	438
Орлов Е.Е.	98	Пещеренко С.С.	111
Орлова Е.А.	633	Пивченко А.Р.	102
Осипова Е.А.	325	Пильганчук О.А.	532
Осочук С.С.	450	Пименов О.Ю.	478
Остромышенский Д.И.	15, 393	Пиняева А.Н.	172
Отлыга Д.А.	613	Пиотровский М.С.	506
Отлыга Е.Г.	613	Пичкур Е.Б.	139
Охрименко И.С.	65	Платонова В.А.	460, 473
Ошкин И.Ю.	350	Плетенев И.А.	39
Ощепков М.С.	463	Плешко Е.М.	333
		Плотников Е.Ю.	158, 427, 607
П		Плотникова Е.С.	555
		Погодаева С.С.	207
Павлов Н.Б.	389	Погосян А.М.	104
Павлова Г.В.	84	Подаров Р.А.	54, 409
Павлова Е.В.	443	Подберезный А.А.	563
Павлова И.В.	579	Пожидаев В.М.	378
Павлова М.А.	507	Позднякова-Филатова И.Ю.	73, 78, 346
Палатников А.М.	327	Покровский А.В.	106
Паликов В.А.	389, 475	Полесскова Е.В.	129
Панкратов Т.А.	234	Полиенко Ю.Ф.	409
Панкратова П.Ю.	97	Полузеров С.А.	260
Панова А.В.	168	Полюдова Т.В.	298
Панова Г.Г.	499	Полюшкевич Л.О.	554
Панова Э.В.	444	Полякова Т.В.	396, 476, 615
Панфилова А.С.	111, 137	Пономарёв А.Л.	335
Парамонова А.В.	205	Пономаренко Е.А.	390
Паршина Е.А.	98	Пономарцев Н.В.	393
		Попова А.И.	107

Поротикова Е.В.	301	Родионова Е.Д.	455
Потапова Д.С.	337	Розов А.В.	631
Потапова С.С.	446, 457, 592	Розова О.Н.	311
Почкаева Е.И.	48	Романюк Д.А.	154
Празднова Е.В.	95, 295	Ромодин Л.А.	202, 384, 455, 566
Пригодская В.И.	339	Россوماхин Р.А.	580
Прилепский А.Ю.	203	Рохмистрова Е.Г.	426
Приставка А.А.	319	Роцектаева В.Д.	347
Провоторова Е.А.	341	Рощина М.П.	37
Пронин И.Н.	84	Рудакова Н.Л.	254
Пронин Н.А.	448	Руденко Н.В.	248
Просеков А.Ю.	544	Руденко Н.Н.	511
Прохоров Д.А.	307	Руднев В.Р.	91
Прощина А.Е.	613	Румянцева Н.А.	118, 144
Пряникова О.А.	557	Румянцева Н.Д.	210
Псурцева Н.В.	302	Рупперт М.Ю.	511
Пуговкина Н.А.	170	Русинов И.С.	107
Пузанский Р.К.	154	Рыбак А.Д.	604
Пуликова Е.П.	291	Рыбалкина А.А.	115
Путляев В.И.	173, 196	Рыжманова Я.В.	309
Пушкин С.Ю.	178	Рыкова В.С.	348
Пшатова А.Д.	343	Рябова А.С.	94
Пшеничный Д.В.	497	Рябова К.К.	40
Пыхова Е.С.	450	Рябоштан П.Ф.	452
Пятибратов М.Г.	133	Рязанов А.Н.	242
Пяткина В.А.	62, 109	Рязанцева П.Е.	619

Р

Раджабова Г.С.	452
Радченков Н.С.	454
Раев М.Б.	408
Раевский В.В.	611
Рассади́на С.Ю.	345
Ребик А.А.	617
Редекоп И.В.	110
Редькина В.В.	550
Резайкин А.В.	150
Решетняк В.С.	111
Ржевский С.Г.	113
Ризванов А.А.	190
Робустова С.Д.	203
Рогачев А.В.	125
Рогачев В.В.	208
Рогачева В.А.	314
Рогачевская О.А.	419
Рогова А.П.	346
Родин В.Д.	479

С

Сабанеева Е.В.	364
Сабсаби Н.С.	116
Савватеева Е.Н.	443
Савельев С.В.	613
Савельева О.А.	349
Савенков В.В.	532
Савочкин А.В.	621
Савченко В.Е.	558
Савченко Е.А.	84
Савченко Т.В.	487
Садовникова И.С.	395, 427
Садовникова У.В.	117
Салова В.Д.	350
Саловарова В.П.	319
Самков А.А.	531
Самотаева И.С.	594
Самохина Н.П.	555
Самыгина В.Р.	90, 139
Санникова Н.И.	54

Санникова Н.Э.	409	Соколов Д.А.	559
Сапкулова А.С.	622	Соколов М.Н.	262
Сапожникова А.П.	118, 144	Соколов Р.А.	631
Сараджи Н.Г.	193	Соколова Л.О.	128
Сафарова Д.Н.	446, 457	Солдатова Е.А.	555
Сафронова Г.В.	339	Солнцева С.А.	561
Свиридова В.М.	624	Соловьева А.И.	124
Свистова И.Д.	518	Соловьева В.В.	190
Селиванова Е.М.	626	Соломатина Л.В.	413
Селиханов Г.К.	233	Солонин А.С.	248
Семейкина А.А.	405, 436	Спангенберг В.Е.	110
Семенкова Н.Ю.	479	Спиридонов А.И.	460
Семенова Н.Ю.	15	Спиридонова З.А.	129
Семенович Д.С.	427	Спирин С.А.	107
Семина С.Е.	172	Старкова Д.С.	214
Сендерский И.В.	379	Степаненко В.Н.	13
Сергеев Г.И.	166	Степаненко Олеся В.	32, 43
Сергиев П.В.	119, 149	Степаненко Ольга В.	32, 43
Сергунова В.А.	185, 188	Степанов В.А.	356
Серебрякова И.А.	223	Степанов Н.Г.	134
Середин Т.М.	513	Стрельникова С.Р.	514
Серов Д.А.	458	Стронина Д.С.	59
Сибгатуллина Г.В.	215	Сузина Н.Е.	321, 329, 350
Сидорова В.Н.	119	Сулацкая А.И.	32, 43
Сидорова М.С.	458	Сулацкий М.И.	32, 43
Силачев Д.Н.	607	Сулейманова Е.М.	587, 588, 626
Силиванова Е.А.	548	Сулейманова Э.Р.	130
Симухина С.А.	599	Сулимова А.И.	631
Синёва О.Н.	277	Супова А.В.	370
Ситников М.Н.	493	Сурков Ю.И.	223
Сиунов А.В.	248	Суров А.В.	540
Скачкова А.Д.	352	Сутормина Л.В.	354
Скороход С.Н.	627	Суханов А.Ю.	88, 131, 300, 381
Скорынина А.В.	272	Сухачева Т.В.	390
Скрылев В.И.	121	Сыромятников М.Ю.	392
Скрыпникова К.С.	169	Сырцева М.Н.	563
Слотвицкий М.М.	162	Сысоев И.В.	587, 588
Слуковская М.В.	552	Сысоев Ю.И.	582
Смирнов К.В.	122	Сысоева К.С.	633
Смирнова А.Н.	212	Сюткин А.С.	133
Смирнова Г.В.	281, 354	Сюткина В.В.	461
Смирнова С.В.	464		
Смольянинова А.Р.	124, 393	Т	
Смольянинова В.А.	583, 629	Тайлаков М.Е.	169, 175
Смольянова Н.А.	125	Талызёноква А.Д.	411
Содбоев Ц.Ц.	384, 566	Тамбовцева В.Г.	126
Сокол М.Б.	176	Тарасов А.С.	452
Соколов А.В.	90		
Соколов В.О.	126		

Тарлачков С.В.	307	У	
Татищева Ю.А.	393	Удалова О.Р.	499
Творогова В.Е.	26, 122	Улитин А.Б.	21
Телепенина К.П.	13	Ульянова Ю.А.	134
Тельнова Т.Ю.	403	Уразбахтин А.А.	564
Теплова П.О.	415, 462	Уранова В.В.	468
Теребова Е.Н.	507	Усанина Д.И.	179
Терешин М.Н.	13	Усатых А.А.	219
Терновая Н.Д.	463	Усачев К.С.	7, 125
Тесля А.В.	258	Устюгов А.А.	633
Тикунова Н.В.	335	Ухатова Ю.В.	493
Тимганова В.П.	179	Ушмаева У.А.	233
Тимофеев С.А.	379		
Тимушева М.В.	635	Ф	
Тихонов А.Н.	506	Фадеев Р.Р.	136
Тихонов К.Г.	487	Фадеев Р.С.	417
Тихонова Т.О.	356	Федин М.В.	54
Тихонович И.А.	122	Федоренко И.С.	470
Ткаченко О.В.	501	Федорец В.А.	335
Ткачук В.А.	461	Федорина А.И.	137
Токмакова А.Р.	215	Федоров Д.А.	566
Толкачева В.А.	378	Федоров Н.В.	139
Топилина М.Ю.	133	Федорова А.С.	629
Торопцева А.В.	217	Федорова Е.В.	476, 651
Тохтуева М.Д.	205	Федорова М.С.	231, 361
Тошаков С.В.	125, 130	Федосеева Е.Д.	641
Трактиров Д.С.	398	Федосов Д.Ю.	341, 378
Трапезов О.В.	444	Федосова А.В.	378
Трахтман Н.В.	130, 131	Федотов В.Р.	129
Трахтманн Н.В.	125, 297	Федулова Л.В.	210
Тризна Е.Ю.	231, 232, 314, 361	Феоктистова Н.Ю.	540
Трофименцева Е.В.	464	Фиайос Баррионуэво К.М.	471
Трофимова М.С.	506	Филатов И.Д.	362
Трошина Д.А.	358	Филиппов В.П.	473
Трубицин Б.В.	506	Фирсов Г.А.	221
Трубицин И.В.	82	Фокеева Н.О.	643
Трубицина Л.И.	82, 485	Фоменко И.А.	102
Трушицына О.С.	268	Фомичева М.Г.	148
Тумозов И.А.	637	Фортыгина П.А.	602
Тунгусов Д.С.	217	Фофанов Г.К.	66
Тупицына А.Д.	466	Фролов М.	297, 300
Тур Д.А.	647	Фукалова А.А.	142
Туrowsкий Е.А.	208	Фуфыгина Е.С.	283
Турчанинова Е.А.	162, 203		
Тутучкина В.В.	359		
Тухватуллина К.Р.	639		
Тучина Е.С.	223		
Тюменцева Я.А.	647		
Тюрин-Кузьмин П.А.	186		
Тютерева Е.В.	484		
Тютюнник Т.В.	402		

Х			
Хазипов Р.Н.	639	Чечехин В.И.	186, 461
Хайруллина Л.Т.	323	Чечехина Е.С.	186
Харитоновна М.А.	323	Чигирева А.А.	150
Харькова А.С.	425	Чикадзе Е.Д.	366
Хасанова А.А.	118, 144	Чиркина М.В.	176
Хасаншина З.Р.	86	Чирков С.Н.	315
Хачатрян Д.С.	217	Чубаров А.С.	54
Хмеленина В.Н.	311	Чугреев М.Ю.	569
Ходанович М.Ю.	647	Чульчекова Д.А.	570
Холина А.В.	178, 475		
Хомяков Ю.В.	499	Ш	
Худокормов А.А.	531	Шадрин А.М.	272, 374
Хундеряков И.А.	476	Шадрина М.М.	647
Хундерякова Н.В.	396, 476, 615	Шайкин А.А.	368
		Шаймарданова А.А.	190
		Шалагинова И.Г.	479
Ц		Шалина Н.А.	369
Цай А.А.	478	Шалупов А.И.	217
Царегородцева Т.С.	190	Шамсиев И.Д.	479
Цвеляя В.А.	162, 203	Шангин С.В.	649
Цветков А.А.	145	Шапкин О.А.	536, 561
Цикунов С.Г.	635	Шарабарина Т.В.	223
Цховребов В.Н.	567	Шарипова Д.И.	152
		Шарко Ф.С.	315
Ч		Шаскольский Б.Л.	61, 68
Чагарова О.В.	256	Шастин П.Н.	28, 370
Чекрыгин С.А.	364	Шафикова Е.Р.	651
Челюканов М.С.	331	Шевелева А.А.	315
Чепцов В.С.	558	Шевцов М.А.	66
Черенков Д.А.	242	Шегай П.В.	212
Черкасова А.И.	147	Шелег С.А.	225
Черкасова Н.Н.	501	Шелковникова В.Н.	372
Черкассова Р.Д.	645	Шептий В.В.	227
Черкашин А.П.	419	Шестакова А.В.	411
Черкашина С.В.	516	Шестакова В.А.	212
Черкесова К.С.	158	Шидловский Ю.В.	134
Черникова Н.П.	538	Шилова В.С.	538
Черноморец И.Ю.	651	Шинелев М.В.	386
Чернышев Р.С.	199	Шитиков Е.А.	250
Чернышов С.В.	307	Шиц Д.Д.	582
Черняев К.А.	148	Шишмарева М.Л.	572
Черпак А.А.	256	Шишова М.Ф.	154
Четверина Д.А.	50	Шмидт А.А.	168
Чех Д.С.	149	Шорохова И.А.	374
		Шошина И.И.	629
		Шпаков А.О.	438
		Шпигальская Н.Ю.	532

Шумков М.С.	160	Яковский Д.С.	228
Шустова М.Н.	376	Якубова Г.Ф.	354
Шутова Т.А.	378	Якупова А.М.	156
Шухалова А.Г.	379	Якупова Р.Д.	172
		Ямпольская Т.А.	11
Щ		Янгирова Л.Я.	573
		Яровой А.С.	203
Щеглова А.И.	652	Яруллин К.И.	381
Щербакова В.А.	309	Яруллина Д.Р.	253
Щербакова Е.А.	147	Яшников А.В.	258
		Ф	
Ю		Fedin M.V.	105
Южаков А.Г.	235, 348		
Юзекаева Э.Р.	639	К	
Юнеман О.А.	613	Kolokolov M.I.	105
Юракова А.В.	653	Krumkacheva O.A.	105
Юрков А.П.	154		
Юсупов М.М.	125	Р	
Юсупова А.Ф.	7, 130	Podarov R.A.	105
Я			
Яббаров Н.Г.	176	Т	
Якимова А.О.	212	Tretyakov E.V.	105
Яковийчук А.В.	497, 516		
Яковлева Г.Ю.	283		

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

28-й Пушкинской школы-конференции молодых ученых
с международным участием

«БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА»

Материалы изданы в авторской редакции

Подписано в печать 17.04.2025. Формат 60×84/8
Усл. печ. л. 77,66

ФИЦ ПНЦБИ РАН, 2025