

## ПОДСЕКЦИЯ «АНТРОПОЛОГИЯ»

### Морфогенетическая характеристика студентов РГУФК и МГУ на примере полиморфизма гена ACTN-3

*Акмулина Анна Борисовна (Москва, miab@mail.ru)*

Формирование физических параметров человека зависит не только от тренировок, связанных с физическими нагрузками, немаловажным фактором здесь так же может являться и генетический аспект. Накопленные знания в области спортивной генетики дают представление о полигенной природе проявления выносливости и скоростно-силовых характеристик человека. С целью выявления кандидатов, потенциально предрасположенных к определенным видам спорта, были изучены антропогенетические и морфофункциональные характеристики. На примере полиморфизма гена *ACTN3* были сопоставлены данные комплексного морфофункционального и антропогенетического обследования 125 студентов РГУФК (61 девушка и 64 юноши) и 274 студентов МГУ (122 девушки и 152 юноши).

Выявлены достоверные различия ( $p<0,05$ ) по обхватным размерам тела между генотипами гена *ACTN3* у юношей-студентов РГУФК. Юноши с генотипом RR характеризуются экстремитальным типом развития обхватных размеров тела (повышенными значениями обхватов плеча, предплечья, бедра и голени, а также пониженными значениями обхватов груди, талии и бёдер). Для студентов с генотипом RX характерен трункальный тип обхватных параметров (повышенные значения обхватов груди, талии и бёдер). Предполагается, что увеличение обхватов осуществляется за счёт увеличения мышечной ткани. Полученные результаты подтверждают литературные данные, согласно которым носители аллеля R характеризуются высокими скоростно-силовыми показателями за счёт хорошего развития быстрых мышечных волокон, в состав которых входит белок *ACTN3*.

Для девушек-студенток РГУФК получены достоверные ( $p<0,05$ ) ассоциации генотипов гена *ACTN3* с мышечными радиусами и объединённым комплексом антропометрических признаков. Девушки с генотипом RX имеют пониженные значения массы тела, в первую очередь за счёт грацильности скелета (пониженные значения диаметров плеч, запястья и колена), хорошее развитие мускулатуры проксимальных отделов конечностей (повышенные значения обхватных размеров плеча и бедра в сочетании с пониженным показателем жировой складки на плече) и брюшного пресса (повышенные значения обхвата талии в сочетании с пониженной жировой складкой на животе). Студентки с генотипом RR отличаются массивностью скелета конечностей, большим обхватом груди, хорошим развитием мускулатуры на дистальных отделах конечностей. Девушки с генотипом XX занимают промежуточное положение. У студентов МГУ достоверных различий по полиморфизму гена *ACTN3* и морфофункциональным характеристикам не установлено.

### Оценка социальной и биологической адаптации по маркерам физического стресса (на примере антропологической серии из ранне средневекового могильника Мамисондон, Северная Осетия)

*Березина Наталья Яковлевна (Москва, berezina.natalia@gmail.com)*

Изучение древнего населения по антропологическим материалам позволяет поднять ряд вопросов, связанных с реконструкцией образа жизни, степенью адаптации к окружающей среде, оценкой нормы реакции на природные и социальные условия обитания группы. Это становится возможным благодаря комплексному антропологическому анализу.

В 2007–2008 гг. в результате работы Северо-Осетинской экспедиции института археологии РАН у с. Нижний Зарамаг Республики Северная Осетия – Алания был обнаружен могильник эпохи раннего средневековья, который получил наименование «Мамисондон». Массив изученного антропологического материала составляют останки разновозрастных индивидов обоего пола. В соответствии с археологическим контекстом, он разделен на две серии: Холм 1 и Основная часть могильника (ОЧМ). Общая численность исследованных индивидов 185 человек, 87 из которых принадлежат к серии Холм 1, а 98 – к серии ОЧМ.

Половозрастной анализ обеих серий дал картину нормального гендерного распределения погребенных с тенденцией к занижению средней продолжительности жизни на фоне средних и пониженных показателей детской смертности в сравнении с демографическими параметрами синхронных групп аланской культуры. Для уточнения причин снижения продолжительности жизни населения из Мамисондона был проведен анализ маркеров физического стресса и уровня травм черепа, как показателя агрессивности общества (Бужилова, 1995).

На фоне синхронных аланских групп мужчины Мамисондона демонстрируют средние и низкие значения показателей стресса. В женских группах также отмечены средние значения, но отмечаются высокие показатели кариеса. Рассматривая детскую выборку можно отметить, что из 30 детей погребенных на участке Холм 1 у десятерых можно было обнаружить признаки анемии и один случай цинги. Среди 19 детей из серии ОЧМ признаки анемии отмечены только у двоих.

Межгрупповой анализ черепных травм показал, что частота встречаемости этого показателя агрессивности в группе Холм 1 (13,8%) заметно превышает таковую для серии ОЧМ (2,5%) и несколько выше, чем в синхронных группах аланской культуры. В серии Холм 1 травмы закономерно чаще встречаются в мужской выборке, то в серии ОЧМ – этот показатель одинаково низок и в мужской и в женской части населения. Вероятно, обнаруженные травмы черепа отражают период социального обострения, который выявился на примере мужской части выборки.

Анализ маркеров стресса показал, что несмотря на общую невысокую продолжительность жизни исследуемых групп, полученная демографическая характеристика отражает особенности населения, которое не переживает острых и фатальных стрессовых ситуаций (длительное голодание, последствия эпидемий, войн и других катастрофических явлений), но вместе с тем не отличается высоким уровнем и комфортностью жизни. Эти наблюдения требуют специального анализа дополнительных биологических показателей.

### **Закономерности распределения аллелей аполипопротеина Е (APOE) среди мирового народонаселения**

*Боровкова Надежда Павловна (Москва, borovkova.nadya@gmail.com)*

В работе представлен генетико-антропологический анализ полиморфизма гена аполипопротеина Е (APOE) среди мирового народонаселения. Аполипопротеины принадлежат к белковым фрагментам липопротеиновых частиц, которые функционируют как переносчики липидов в крови. Этим белкам свойственен генетически детерминированный структурный полиморфизм и этнические различия в распределении частот аллелей. Пропорции трех аллелей APOE варьируют в популяциях человека в следующих весьма широких пределах: APOE\*2 - 0-0.37; APOE\*3 - 0.36-0.98; APOE\*4 – 0-0.49. Аллель APOE\*4 является фактором риска болезни Альцгеймера (БА), сердечно-сосудистых и ряда других заболеваний. Установлено, что риск ишемической болезни сердца среди носителей \*4 выше на 42 процента по сравнению с обладателями других генотипов. Риск возникновения БА у гетерозигот по аллелю \*4 выше в 3-5 раз, а у гомозигот – до 10 раз по сравнению с другими генотипами. Полиморфизм гена APOE является в своем роде уникальным явлением для *Homo sapiens*, поскольку у других млекопитающих, включая приматов, обнаружена лишь одна форма белка ароE, которая более всего схожа с человеческой изоформой ароE\*4. Аллели APOE\*3 и \*2 появились в результате последовательных одноклеточных замен. Возникает вопрос, почему \*4 приобрел столь высокие частоты в некоторых популяциях, поскольку большинство фактов свидетельствуют о его «вредности». Учеными предложены различные теории, указывающие на благоприятные свойства APOE\*4.

По результатам отечественных и зарубежных исследований сформирована база данных о частотах аллелей APOE в 372 популяциях мира. Установлены этноантропологические и экологические особенности распределения полиморфизма APOE. В работе рассмотрена гипотеза об адаптивной ценности аллеля APOE\*4 в популяциях, у представителей которых наблюдается сниженная эффективность синтеза витамина D в коже в результате слабой

инсоляции или в случае выраженной пигментации кожи. Витамин D выполняет свои биологические функции в организме в форме образующихся из него активных метаболитов, синтез которых происходит в клетках почек. Аполипопротеин Е поступает в клетки почек вместе с витамин D связывающим белком, поскольку и тот, и другой прикрепляются к рецептору липопротеинов низкой плотности (ЛПНП). Изоформы ароE проявляют разную аффинность к рецептору ЛПНП, и в случае ароE\*4 это средство повышено. Предполагается, что обладатели изоформы ароE\*4 способны лучше усваивать витамин D из пищи. Выявлено, что темнопигментированные группы населения, а также популяции, локализованные в северных регионах Евразии, характеризуются статистически достоверным увеличением пропорции аллеля АРОЕ\*4. Полученные наблюдения согласуются с гипотезой о преимуществе обладателей этого аллеля в популяциях, восполняющих недостаточный синтез витамина D в коже за счет его поглощения с пищей.

*Работа выполнена при поддержке гранта РГНФ по проекту № 09-01-00445а. Научный руководитель – д.б.н., проф. Спицын В.А.*

**Особенности структуры радужки в связи с её цветом**  
*Дорогеева Анна Алексеевна (Москва, ankada@mail.ru)*

В отечественной антропологии цвет глаз чаще всего определяют по шкале Бунака, включающей 3 типа пигментации, каждый из которых подразделен еще на 4 класса. Дополнительно в шкале предлагается выделять подгруппы по различным деталям пигментного рисунка (Бунак, 1941). На современном оборудовании при увеличении показано, что детали пигментного рисунка на фоновом цвете определяются особенностями структуры радужки (Вельховер, 1992). Структура радужки является объектом исследований иридологов, которые на базе многолетних исследований предложили несколько схем классификации структурных особенностей радужки (Вельховер, 1992; Deck, 1980; Jensen, 1982). Наиболее распространенная классификационная схема отечественного офтальмолога Е.С. Вельховера (1992) определяет 6 иридологических типов: радиальный тип, радиально-волнистый, радиально-лакунарный, гомогенный, гомогенно-лакунарный, лакунарный.

В современный период антропологии, к сожалению, уделяют мало внимания особенностям цвета и структуры радужки. Однако в последнее время с появлением новых инструментальных методов интерес возобновляется. Так применение специального прибора – иридоскопа и полученных с его помощью цифровых фотографий позволяет на качественно новом высоком уровне изучать особенности структуры и цветности радужки. В связи с этим, целью данной работы было изучение структуры радужки у юношей и девушек с различным цветом глаз.

Материалом для данного исследования послужили результаты иридологического обследования 2-х, контрастных по цвету глаз групп русских и калмыцких студентов. Общий объем выборки составил 579 человек.

Цвет глаз (светлый, смешанный, темный) определялся по шкале Бунака. При помощи прибора «Иридоскоп И-5» получены цифровые фотографии радужки и исследовались детали цвета и структуры радужки по схеме Вельховера с 6 иридологическими типами. Для статистической обработки данных был использован пакет программ STATISTICA- 6.0.

В русской выборке преобладают радиально-волнистый и радиально-лакунарный варианты организации структуры радужки, в калмыцкой гомогенный и гомогенно-лакунарный. У русских юношей чаще, чем у девушек встречается радиально-лакунарный и лакунарный иридологические типы ( $p<0,05$ ).

При изучении особенностей структуры радужки у людей с различным цветом глаз выявлены следующие тенденции: в темном типе цвета глаз чаще встречаются гомогенный и гомогенно-лакунарный варианты; в смешанном и светлом типах – радиально-волнистые. Отмеченные тенденции характерны для обоих полов.

В сравнительном анализе частот встречаемости различных структурных вариантов радужки внутри 3-х цветовых типов, в смешанном и светлом типах цвета радужки у юношей достоверно чаще, чем у девушек встречается лакунарный структурный тип ( $p<0,05$ ).

*Работа выполнена при поддержке гранта РГНФ-БРФФИ № 09-06-00879 а/Б.*

**Измерительная система для изучения функциональных и онтогенетических аспектов изменчивости респираторного отдела лицевого скелета**  
**Евтеев Андрей Алексеевич (Москва, evteandr@gmail.com)**

Применение традиционных краинометрических программ (Алексеева-Дебеца и Howells) в современных краинометрических исследованиях, ставящих задачи анализа функционального значения и онтогенеза структур черепа, сталкивается с целым рядом трудностей. В связи с этим применяемые в работах краинометристов наборы линейных измерений сильно варьируют, некоторые авторы формируют собственные, альтернативные «традиционным» программы. Анализ литературных данных позволяет выделить две основные группы критических замечаний в адрес традиционных программ, а также линейных измерений вообще: 1) используемые наборы признаков плохо отражают геометрические особенности объекта, взаимное пространственное расположение размеров остается неизвестным; 2) зачастую традиционные размеры дают слишком общее или неполное представление о строении черепа, затрудняющее его изучение с биологической точки зрения. Многие размеры измеряются между точками, относящимися к различным функциональным и онтогенетическим отделам черепа, а на некоторых важных структур в традиционных программах размеры не предусмотрены вовсе.

Для преодоления упомянутых недостатков в мировой науке предлагается и используется целый ряд методических новаций: методы геометрической морфометрии, применение новейших технических средств и др. Однако, по всей видимости, технические и вычислительные новации как таковые не способны полностью преодолеть специфику традиционных измерительных программ, и для создания более точных и современных морфометрических подходов нуждаются в анализе и пересмотре сами эти программы.

Предлагаемая краинометрическая система для респираторного отдела лицевого скелета ставит своей целью преодоление недостатков традиционных программ и разработана специально для изучения функциональных и онтогенетических аспектов изменчивости. Система содержит 29 краинометрических точек и 48 линейных размеров, из которых лишь незначительная часть предлагается впервые автором. Основу программы составляют известные точки и признаки, отобранные на основе анализа литературных данных исходя из целей и задачей составления программы, в том числе включен целый ряд размеров программы Р.Мартина. Программа направлена на описание следующих структур: носовых костей, лобных отростков верхнечелюстных костей, латеральной части средней поверхности тела и скулового отростка верхнечелюстной кости, носовой полости и параназальных синусов. Набор точек предлагаемой системы составлен таким образом, чтобы его можно было успешно использовать в качестве набора «меток» (landmarks) для анализа методами геометрической морфометрии.

*Автор выражает признательность Российскому гуманитарному научному фонду (грант №09-01-00096а) за частичную финансовую поддержку работы.*

**Микроэлементный анализ волос башкирских детей и подростков в антропозоологических исследованиях**  
**Зорина Дарья Юрьевна (Москва, zorinadaria.10.3@gmail.com)**

Исследование концентраций микроэлементов является самостоятельной антропологической задачей, как изучение вариабельности показателей, отражающих интенсивность биохимических и физиологических процессов, происходящих в организме. Знания половой, возрастной и географической изменчивости минерального состава организма углубляют наши представления о роли микроэлементов в жизнедеятельности человека. Изучение детских контингентов особенно важно, поскольку периоды роста и полового созревания являются критическими в онтогенезе, когда проявляются особые потребности в одних химических элементах и чувствительность к токсическому воздействию других.

Целью настоящего исследования являлось изучение половых и возрастных изменений концентраций микроэлементов в волосах башкирских детей и подростков.

Материалом для работы послужили образцы волос сельских школьников 7–17 лет, обследованных в ходе антропозоологической экспедиции в Белорецком и Абзелиловском районах Башкирии.

Определение концентраций микроэлементов проводилось методом инструментального нейтронно-активационного анализа (ИНАА). Была изучена половозрастная изменчивость концентраций 27 химических элементов в волосах 227 мальчиков и 224 девочек школьного возраста в геохимических условиях Башкирии. Из всех рассматриваемых 7 элементов (Zn, Fe, Se, Co, Cr, Ni, As) являются эсценциальными, 7 (Br, Sc, Au, Ag, Zr, Hf, Cs) считаются условно эсценциальными, 5 (Hg, Ba, Sb, U, Th) относятся к токсичным и потенциально токсичным. Были также проанализированы Ca, относящийся к макроэлементам, La и 6 элементов-лантаноидов: Ce, Nd, Sm, Eu, Yb, Lu.

Анализ статистических распределений концентраций микроэлементов в волосах детей показал отсутствие геохимических аномалий с избыtkом или выраженным недостатком изученных химических элементов на рассматриваемой территории.

При изучении возрастной динамики элементного состава волос получены следующие результаты. Возрастные изменения были отмечены для Zn, Fe, Cr, Se, Co, Ca, As, Br, Sc, Sb, U, Th, Au. Для них была характерна как сложная динамика на изучаемом возрастном интервале, так и различные сочетания тенденций у мальчиков и девочек. У остальных элементов возрастная изменчивость содержания в волосах отсутствовала или изменения носили случайный и неупорядоченный характер.

Исследование полового диморфизма показало, что концентрации Se, Ni, As, Ca, Hg, Ba в целом были выше в волосах девочек. Для мальчиков же было свойственно более высокое содержание Fe, Sc и Co с 13–14 лет, а так же Ag в 8–14 лет. Половой диморфизм со специфической возрастной динамикой был отмечен для Zn. Для остальных элементов половых различий или четких тенденций выявлено не было.

Результаты работы могут найти применение в антропоэкологии, при изучении влияния геохимической среды на изменчивость морфологических и физиологических признаков человека и в медицине при выявлении и профилактике заболеваний биогеохимической природы.

### **Современное состояние осанки у Московских и Калмыцких студенток Иванова Елена Михайловна (Москва, elena.ivanova27@gmail.com)**

В настоящее время в российских популяциях отмечается все более увеличивающееся количество заболеваний опорно-двигательного аппарата (ОДА), среди которых ведущими являются нарушения осанки. Несомненно, медицина прикладывает большие усилия к сокращению роста патологий ОДА, но отсутствие единой объективной системы оценки состояния осанки снижает эффективность работы врачей. При визуальной диагностике легко упустить незначительные нарушения, которые в скором времени могут начать прогрессировать. Возможность объективно оценивать состояние осанки позволит более тщательно контролировать развитие нарушений ОДА. Одним из количественных методов исследования состояния ОДА является предложенная в 1973 г. В.А. Гамбурцевым гониометрия – измерение углов отклонения позвоночника от вертикальной оси. Следует отметить высокое удобство гониометрии при работе в экспедиционных условиях, когда необходимо за короткий срок обследовать как можно большее количество человек. Это обеспечивается малым количеством измеряемых признаков (5 углов достаточно для описания осанки) и высокой мобильностью инструментов, их легкой сборкой и разборкой.

Целью данной работы стало изучение состояния осанки в трех группах населения России методом гониометрии. В исследовании, проведенном в 2008–2009 гг. приняли участие 109 студенток Калмыцкого Государственного Университета, г. Элиста (средний возраст 18,3 лет), 46 студенток МГУ им. М.В.Ломоносова (средний возраст 19,0 лет) и 104 студентки МГУ им. М.В.Ломоносова (средний возраст 22,9 года). Программа обследования включала стандартную антропометрию (50 показателей), измерение углов наклона позвоночника по методу В.А.Гамбурцева. Наличие деформаций спины выявлялось визуально. Наибольшее количество отклонений было отмечено в обеих группах русских девушек: 34,7% страдают от

сколиоза, 12,1% имеют подозрение на искривление позвоночника, у 17,9% отмечены нарушения осанки, и только у 35,3% русских не выявлено нарушений в ОДА. Тогда как у калмычек сколиоз отмечен только у 7,3% выборки, а 75,2% не имеют проблем с осанкой. У русских прямую спину имеют только 34,3% выборки, у калмычек 62,7%, среди русских девушек сутулых выявлено 21,7% от выборки, а калмычек всего 2,1%. Дисперсионный анализ показал, что 19-летние русские девушки не отличаются от 23-летних девушек по гониометрическим признакам. Калмычки достоверно ( $p<0,05$ ) отличаются от обеих выборок русских девушек по крестцово-тазовому углу и углу шейного лордоза. От своих русских ровесниц калмычки отличаются по углу наклона таза, а по углу поясничного лордоза и показателю статики тела их можно достоверно отличить от старшей группы русских девушек.

Выявленные различия могут быть связаны с принадлежностью обследованных девушек к разным этно-территориальным группам, проживающим в заметно отличающихся экологических условиях. Полученные данные позволяют говорить о дифференцированном подходе при диагностике осанки у разных групп населения.

*Выражаю огромную благодарность моему научному руководителю Ирине Анатольевне Хомяковой за помощь в сборе и обработке материала, а также всей лаборатории ауксологии НИИ и музея антропологии МГУ за поддержку и теплую рабочую атмосферу в коллективе.*

**К вопросу о связях между полиморфизмами генов  
и морфофункциональными характеристиками  
(на примере генов LEP и LEPR у больных остеопорозом и остеоартрозом)**  
**Казеева Анна Юрьевна (Москва, kazeeva.a@gmail.com)**

В последнее время анализ ДНК маркеров используется для конкретизации генетических факторов предрасположенности к различным заболеваниям. Особенно широко в подобных исследованиях применяют однонуклеотидные полиморфизмы. Выбранные нами гены LEP и LEPR участвуют в регуляции кальциевого метаболизма, формировании костного скелета, а также в дифференации функций остеобластов. В настоящем исследовании представлены результаты анализа распределения полиморфизмов генов LEP и LEPR с учетом ряда морфологических (минеральная плотность костной ткани позвонков в поясничной области и различных участках бедренной кости), антропометрических (вес тела, длина тела, индекс массы тела) и биохимических показателей (уровень кальция, фосфора, щелочной фосфатазы). Исследование проводилось в двух группах больных остеопорозом ( $n=248$ ) и остеоартрозом ( $n=237$ ), и в контрольной группе ( $n=125$ ).

По результатам корреляционного анализа в группе больных остеопорозом были найдены статистически значимые корреляции веса и комплекса признаков минеральной плотности костной ткани в поясничном отделе, шейке бедра, большом вертеле, межвертельной области и тотальными показателями минеральной плотности костной ткани и уровнем щелочной фосфатазы. Также обнаружены статистически достоверные корреляции длины тела и минеральной плотности костной ткани в шейке бедра и общей минеральной плотностью костной ткани.

В группе больных остеоартрозом выявлены статистически достоверные корреляции между весом и показателями минеральной плотности костной ткани в поясничной области.

Полученные результаты показали наличие статистически достоверных связей полиморфизма гена LEPR (трех его возможными генотипами) и длиной тела в группе больных остеопорозом ( $p<0,04$ ) и минеральной плотностью костной ткани большого вертела ( $p<0,04$ ). Выявлена достоверная связь между полиморфизмом гена LEP и минеральной плотностью костной ткани поясничного отдела у женщин больных остеоартрозом.

По результатам дискриминантного анализа установлена неслучайность межгрупповых различий средних по полиморфизмам генов LEP и LEPR и показателям длины и веса тела, всего набора признаков минеральной плотности костной ткани и уровнем кальция ( $p<0,00$ ).

Роль генов LEP и LEPR в формировании предрасположенности к остеопорозу и остеоартрозу на настоящий момент малоизучена. Выявленные тенденции позволяют сделать

предварительное заключение о том, что показатель минеральной плотности кости, активно использующийся в дифференциальной диагностике остеопороза и остеоартроза, не является единственной и исчерпывающей характеристикой, отражающей предрасположенность к данным заболеваниям. ДНК-маркеры могут рассматриваться как независимые дополнительные показатели при проведении диагностики.

Полученные результаты представляют интерес в области мединской антропологии, для улучшения диагностики заболеваний и прогнозирования эффективности лекарственной терапии в зависимости от морфологических признаков.

#### **Антропологические типы населения России по произведениям портретной живописи середины 18-го века – начала 19-го века**

*Локк Кристина Эдвиновна (Москва, lokkkris@rambler.ru)*

Одним из наиболее важных источников информации в антропологии являются описательные и измерительные морфологические признаки. В расоведении и этнической антропологии к признакам морфологии относят также признаки пигментации, особенности волосяного покрова и некоторые другие. Большинство расовых классификаций основано в первую очередь на описании головы. Значительное количество данных признаков являются описательными, многие из которых могут определяться не только при непосредственном контакте с обследуемым, но и по специальным фотографиям. Для некоторых признаков последний способ считается более точным.

Фотопортреты существуют только последние 150 лет, все остальное время для передачи лица живого человека служили различные виды изобразительного искусства. Написание реалистичных портретов было обусловлено в значительной степени стремлением человека увековечить свое изображение. Стремясь достичь сходства (основное требование заказчика), живописцы очень точно передавали мельчайшие подробности строения мягких тканей лица. Информация, заложенная в живописных портретах, уникальна и не может быть получена никакими другими способами. Работа с живописными портретами содержит в себе множество трудностей. Основные проблемы заключаются в том что, живописный портрет представляет собой плоское, а не трехмерное изображение. Немаловажно, что между исследователем и исследуемым как посредник стоит художник.

Нами брались в рассмотрение только портреты реально существовавших людей, нарисованных в реалистической манере.

В этом исследовании было применено 2 метода: 1) традиционное описание строения лица каждого индивида и получение таблиц средних величин для характеристики группы; 2) создание обобщенных портретов методом суммирования индивидуальных изображений. Для последнего метода была создана оригинальная компьютерная программа.

Первыми результатами данной работы является сравнение обобщенных портретов «столичного» и «уездного» дворянства России 18–нач.19 вв. При общем сходстве в частотах описательных признаков представленные портреты вполне различимы по пропорциям лица. Обобщенный портрет «уездных» дворян обладает более низкими глазницами и более широким лицом по сравнению с портретом столичного аристократа. Антропологический тип русского купечества заметно отличается от дворянского антропологического типа по ряду признаков: большей складастостью, иными пропорциями лица, а также строением глазной области, однако группа купцов пока еще очень малочисленна.

Наши данные были, по возможности, сопоставлены с данными Русской антропологической экспедиции. Русское дворянство 18–нач.19 вв. обладало средне-европейским антропологическим типом и его отличия от русского населения середины 20 века заключаются в более темной пигментации глаз и волос и меньшем выступлении скул.

*Тезисы доклада основаны на материалах исследований, проведенных в рамках гранта РФФИ № 06-06-80303. Автор выражает признательность д.б.н. Перевозчикову И.В. за помощь в проведении исследования.*

## **Применение метода Баевского для оценки адаптационных возможностей у подростков**

*Лоскутова Юлия Вячеславовна (Москва, ulabox86@mail.ru)*

В настоящее время проблема здоровья населения становится все более актуальной. Это связано с неблагоприятным влиянием на здоровье человека ряда экологических и социально-экономических факторов. Наиболее чувствительными к воздействию факторов окружающей среды и условиям жизнедеятельности являются дети, подростки и молодежь, поэтому представляется очень важным анализ состояния их здоровья и оценка адаптационных возможностей организма в связи с повышенными интеллектуальными и психологическими нагрузками при обучении в старших классах в условиях московского мегаполиса. В связи с этим, целью данной работы было изучение особенностей соматического развития и адаптационных возможностей у юношей и девушек – учащихся г.Москвы.

Материалом для данного исследования послужили результаты комплексного антропометрического обследования старшеклассников двух московских школ в 2009 году. В данной публикации использованы морфологические данные по тотальным соматическим размерам (длина и масса тела, обхваты талии и бедер), а также функциональным показателям сердечно-сосудистой системы (систолическое и диастолическое артериальное давление, частота сердечных сокращений) для 16-17-летних юношей и девушек. Для оценки степени адаптации был применен метод Баевского (Баевский, Берсенева, 1997), согласно которому на основании тотальных размеров тела и функциональных характеристик сердечно-сосудистой системы, по уравнению множественной регрессии при помощи возрастно-половых градаций оценивается индивидуальный вариант адаптации: удовлетворительная адаптация, напряжение адаптационных механизмов, неудовлетворительное состояние адаптации и срыв адаптации, свидетельствующий о состоянии предболезни.

Результаты исследования. Среди обследованных старшеклассников г.Москвы в группе с нарушениями адаптации девушек почти в два раза больше, чем юношей, при этом у юношей отмечена слабая степень нарушения адаптации, при которой происходит напряжение регуляторных механизмов. Из пяти девушек, попавших в группу с пониженными адаптационными возможностями, у трех отмечена неудовлетворительная адаптация и две девушки оказались со срывом адаптации. Следует сказать, что у обеих девушек со срывом адаптации отмечена повышенная жировая масса по показателю индекса массы тела и артериальная гипертензия. Интересно отметить, что в публикациях 1980-1990-х гг. ухудшение физического развития и снижение адаптационных возможностей в большей степени было выражено у юношей. В современный период аналогичную негативную тенденцию снижения адаптационных резервов организма мы наблюдаем у девушек 2009 г. обследования. В связи с этим большое значение имеют антропометрические методы обследования детей, подростков и молодежи (особенно девушек) с целью выявления индивидуумов с функциональными нарушениями, ведущими к срыву адаптации и болезни.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РГНФ-БРФФИ в рамках проекта № 09-06-00879 а/Б.*

## **Население г. Чебоксары XVI–XVII вв. по данным крааниологии**

*Макарова Екатерина Михайловна (Москва, uminoyma@yandex.ru)*

Материалом данной работы явилась антропологическая коллекция, полученная в ходе раскопок одного из ранних кладбищ в центре г.Чебоксары. Оно было заложено во второй половине XVI века и функционировало на протяжении всего XVII века. Погребальный обряд характеризуется как христианский (в могилах встречены нательные медные крестики). Краиниологическая серия представлена 53 черепами, в целом, хорошей сохранности.

Исследование данной коллекции поможет установить степень влияния местного тюркского (татар и чуваши) и финского (мордвы и марийцев) населения на формирование физического облика русского населения данного региона.

В ходе работы были проведены внутригрупповой анализ и межгрупповой сравнительный анализ серии, что позволило сделать следующие выводы.

Распределение по возрастным категориям показало, что средняя продолжительность жизни взрослого населения, без учета детей, составила (это в основном мужская часть популяции) – 37,7 лет. Наибольшая детская смертность падает на интервал от одного года и до 10 лет (ок. 30%), то есть, в этом возрасте умирал каждый третий из родившихся детей. Эти показатели мало чем отличаются от средней продолжительности жизни в других группах древности, где качество жизни не соответствует мировым цивилизованным стандартам. С условной долей вероятности, серию из г. Чебоксары можно рассматривать как палеопопуляцию.

По своим морфологическим характеристикам серия относится к европеоидному кругу. Статистики можно предполагать наличие в серии двух вариантов европеоидных черепов, с разными морфологическими характеристиками. Первый вариант очень близок морфотипу раннеславянских групп, а второй – характерному для русского населения позднесредневекового времени, включившего в свой состав различные местные финские группы при освоении северо-восточных земель.

На индивидуальном и внутригрупповом уровнях анализа прослеживается монголоидная примесь местных поволжско-приуральских истоков. Она проявлялась в некоторой уплощенности лица и ослабленным углом выступления носа. Данный краинотип дополнялся, как правило, небольшой высотой лица.

Межгрупповой анализ серии из г. Чебоксары показал ее морфологическую близость к сериям, характеризующим позднесредневековое христианское население Казани и Вятской земли. В основе этой близости, на наш взгляд, лежат родственно-генетические связи.

По присутствию в городских краинологических выборках Чебоксар и Казани монголоидной примеси местных истоков, можно предположить, что в процессе колонизации Среднего Поволжья русское население могло включать в свой состав отдельные финноязычные и тюркоязычные элементы. Этому могли способствовать христианизация и культурная ассимиляция местного населения.

Антропологическая близость серии из Вятской губернии к сериям из Чебоксар и Казани, может указывать на один из маршрутов колонизации края, почему не противоречат данные переписных книг.

*Автор глубоко благодарен Герасимовой М.М. и Газимзянову И.Р. за ценные советы, помощь и поддержку, оказанные в процессе работы.*

#### **К вопросу о физическом здоровье гимназистов и школьников Малькова Алена Викторовна (Ярославль, olyabotyazhowa@yandex.ru)**

Общепризнано, что состояние здоровья детского населения определяется не только наличием или отсутствием заболеваний, но также гармоничным и соответствующим возрасту развитием. Такое понимание здоровья дает основание считать физическое развитие одним из его важных показателей. С физиологической точки зрения для оценки адаптивных возможностей растущего организма, важно изучение физического здоровья детей в условиях образовательной среды. Исключительно актуальной эта задача становится в современных школах нового типа, когда возрастает интенсивность учебных нагрузок.

Цель нашей работы состояла в сравнительном исследовании антропометрических показателей и оценке физического здоровья пятиклассников (11–12 лет) – гимназистов и обычных школьников. Были обследованы учащиеся гимназии – 58 человек (25 мальчиков и 33 девочки) и учащиеся обычной школы – 47 человек (27 мальчиков и 20 девочек).

Было установлено, что в обследованных группах 11–12-летних подростков параметры длины и массы тела достоверно не отличаются у гимназистов и школьников. Частота сердечных сокращений у мальчиков-школьников достоверно больше, чем у мальчиков-гимназистов, а у девочек-школьниц достоверно ниже, чем у девочек-гимназисток. Величина диастолического артериального давления у девочек-школьниц достоверно отличается от показателей девочек-гимназисток. Данные по динамике морфометрических и физиометрических показателей в течение учебного года свидетельствуют о нормальных, соответствующих возрасту темпах физического развития, как гимназистов, так и школьников. У 11–12-летних подростков, как школьников, так и гимназистов наблюдаются

достоверные половые различия по показателям длины и массы тела, частоты сердечных сокращений, артериального давления и силы руки. Определенный расчетным методом уровень физического здоровья показывает, что в соответствие с региональными стандартами физического развития основная масса гимназистов имеет уровень физического здоровья выше среднего (41%) и высокий (33%), а большая часть школьников характеризуется уровнями здоровья выше среднего – 35% и средним – 41%. В группах обследованных гимназистов и школьников 11–12 лет – одинаковое количество ребят с уровнем физического здоровья ниже среднего (11–12%). В то же время среди пятиклассников обычной школы детей с высоким уровнем здоровья в 5,5 раза меньше, чем среди гимназистов, и 6% составляют учащиеся с низким уровнем физического здоровья. Такие данные, вероятно, объясняются тем, что среди обычных школьников по сравнению с гимназистами, больше подростков с хроническими заболеваниями, меньше доля посещающих обязательные занятия по физической культуре и спортивные секции и больше доля учащихся, проводящих перед компьютером более 2-х часов в день, о чем свидетельствуют результаты анкетирования обследованных подростков.

### **Обобщенный портрет удмуртского населения 17–18 вв.**

*Парамонова Анна Васильевна (Москва, aparamonova@gmail.com)*

На всем историческом периоде отмечается своеобразие антропологического типа удмуртов, присутствие в нем как монголоидного компонента, так и европеоидных черт. На рубеже первого тысячелетия н.э. древнеудмуртская общность была разделена – часть населения попала под влияние Древней Руси, южные территории вошли в состав Волжской Булгарии. Предполагается, что близкое к современному населению носит местный характер происхождения, несмотря на постоянные контакты с аллохтонными группами.

Материалом для нашего исследования послужили две серии черепов удмуртов из могильников XVII–XVIII вв. (Можгинский и Буринский) с территории Удмуртии. Измерения проводились как по стандартной краинометрической методике (Алексеев, Дебец, 1964), так и по специальной программе реконструкции внешности (Балуева, Веселовская, 2004). В основе этой программы лежит метод Герасимова М.М. (1949), она позволяет восстановить прижизненные размерные характеристики и составить словесный портрет человека по его черепу.

В результате мы получили развернутую характеристику внешности жителей средневековых удмуртских поселений. Также было проведено сравнение наших данных и материалов по современному населению, полученному в ряде экспедиций разных лет на территории Удмуртии (Аксянова, Аксянов, 2000; Витов, 1959; Зенкевич, 1941; Марк, 1964). Это позволило проследить судьбу носителей средневековых удмуртских традиций и изменчивость их облика.

Известно, что именно к концу XVII–XVIII вв. произошла окончательная локализация удмуртского этноса на территории его современного проживания. В этой связи интересен тот факт, что материалы авторов, в том числе и наши, были собраны практически с одного локального поселения. Все группы антропологически близки друг к другу, но можно увидеть, что по ряду признаков намечается тенденция к градации в определенном направлении. По некоторым признакам усматривается волнообразное изменение значений, что может свидетельствовать как об эпохальной изменчивости, так и о взаимодействии двух противоборствующих факторов – грацилизации и смешения.

### **Вариации развития подкожного жироотложения у девочек г. Архангельска**

*за последние 20 лет*

*Пермякова Екатерина Юрьевна (Москва, ekaterinapermyakova@gmail.com)*

Изучение вариаций развития подкожного жироотложения во временном аспекте представляет огромный интерес для современной антропологии. Но, несмотря на актуальность подобных исследований, их количество в России все же невелико, особенно в отношении детей и подростков малых городов и окраинных регионов страны.

Настоящая работа посвящена выявлению тенденций вариабельности показателей жироотложения у девочек г. Архангельска за последние 20 лет.

Материалы по физическому развитию архангельских учащихся 7–16 лет были получены в 1988 и 2009 годах экспедициями НИИ и Музея антропологии МГУ. В настоящий анализ вошли данные измерений 723 (первая группа) и 431 (вторая группа) девочки соответственно. Антропометрическая программа включала измерения 30 признаков по стандартной методике НИИМА МГУ. Определялись также характеристики телосложения и конституциональный тип по схеме Штефко-Островского, на основании измеренных вычисляли 5 расчетных признаков, позволяющих оценить состав тела. Статистическая обработка материала проводилась с помощью пакета программ Statistica 6.0.

Результаты проведенного анализа выявляют у архангельских девочек эпохальное увеличение величины кожно-жировых складок на корпусе (различия достоверны) и бицепсе. Толщина жировой складки на трицепсе у девочек, обследованных в 2009 г., больше только в возрасте 8 и 13 лет.

Максимальные значения веса, весо-ростового индекса, а также толщины жировых складок у современных девочек наблюдаются в возрасте 13 лет, а у обследованных в 1988 г. – в 14 лет, что соотносится с разницей в сроках наступления менархе в этих группах. Аналогичная тенденция наблюдается для жировой массы, рассчитанной по методу М.Слотер. Анализ соотношения компонентов массы тела позволяет установить, что незначительное повышение веса тела у современных девочек происходит в основном за счет увеличения общей жировой массы.

Интересно отметить, что современные девочки вплоть до возраста полового созревания по всем признакам развития жироотложения, кроме складки на трицепсе, имеют более высокие показатели, чем их сверстницы, обследованные в 1988 г., после полового созревания мы наблюдаем обратную картину. Особенно показателен в этом отношении весо-ростовой индекс (различия отмечены на уровне тенденции).

Наблюдается изменение во временном аспекте частоты встречаемости конституциональных типов в двух рассматриваемых выборках. Так, с возрастом у современных девочек значительно уменьшается процент встречаемости дигестивного типа и растет процент торакального.

Проведенный анализ показал, что за последние 20 лет у девочек г. Архангельска толщина жировых складок на корпусе достоверно увеличилась. Такие показатели, как индекс массы тела, вес тела, жировая масса у современных девочек, по сравнению с девочками 1988 г., обнаруживают тенденцию к более высоким значениям до возраста полового созревания и более низким после, что, возможно, связано с усилением влияния стереотипов современной массовой культуры.

*Выражая глубокую искреннюю благодарность сотрудникам лаборатории ауксологии НИИ и Музея антропологии МГУ, особенно своему научному руководителю Годиной Елене Зиновьевне и старшему научному сотруднику Задорожной Людмиле Викторовне.*

**Возможности палеоантропологической реконструкции  
по длинным костям верхней и нижней конечности  
Синева Ирина Михайловна (Москва, i-sineva@yandex.ru)**

При исследовании костных останков в местах массовых захоронений, на местах аварий, катастроф, стихийных бедствий, при палеоантропологических исследованиях антропологи и судебно-медицинские эксперты сталкиваются с проблемой установления индивидуальной принадлежности скелетированных останков. Исследование костных останков позволяет получить идентификационную информацию, объем которой зависит как от количества исследуемых костей, так и от числа примененных методов и диагностических методик. И лишь многоплановое исследование большого числа идентификационных признаков костной системы приближает остеолога к идентификации личности человека.

Основной целью настоящего исследования стала разработка критерии определения основных групповых признаков личности (половой принадлежности, длины тела, прижизненного соматотипа) по характеристикам длинных трубчатых костей конечностей, а

также изучение этнотERRиториальных различий в пропорциях тела. Материалом для данной работы послужили длинные трубчатые кости конечностей 330 скелетов (210 мужских и 110 женских) из коллекций институтов Москвы, С.-Петербурга, Костромы, Йошкар-Олы и Вильнюса.

В ходе исследования существенных различий в размерах длинных трубчатых костей между изученными этнотERRиториальными группами (русские различных областей России, ингуши, литовцы) не обнаружено. Разработана методика диагностики половой принадлежности по костям верхней и нижней конечности. Для всех костей по исследованным признакам точность разделения по полу составила 77,5–84,9% (в среднем 81,3%). Наибольшая точность классификации получена для локтевой кости. Для всех костей, кроме плечевой и лучевой, процент правильной диагностики женского пола был больше, чем мужского, что может быть следствием большей стабильности женского пола, размах изменчивости признаков которого меньше. В результате исследования также были получены уравнения множественной регрессии для расчета длины тела и выявлено, что наиболее предпочтительным для анализа длины тела является уравнение, полученное для признаков нижней конечности (точность уравнения составила 2,7 см). Была разработана методика определения прижизненного соматотипа по длинным трубчатым костям конечностей, основанная на многомерном дискриминантном анализе. Показано, что наибольшая точность классификации (68,3%) достигается с помощью уравнений дискриминантных функций, составленных с использованием признаков локтевой кости.

Проведенное исследование позволило оценить прогностическую точность палеоморфологических реконструкций, проведенных по длинным костям конечностей человека, как достаточно высокую и рекомендовать разработанную методику для применения в палеоантропологии и судебной медицине.

*Автор выражает благодарность своему научному руководителю Бахолдиной Варваре Юрьевне за помощь в проведении работы и составлении тезисов.*

## ПОДСЕКЦИЯ «БИОФИЗИКА, БИОИНЖЕНЕРИЯ И НАНОБИОТЕХНОЛОГИИ»

### Роль различных межмолекулярных взаимодействий

в докинге гуанин-содержащих лигандов

**Балицкая Елизавета Дмитриевна** (Москва, [balis.89@mail.ru](mailto:balis.89@mail.ru))

Гуанин-содержащие соединения – важный класс низкомолекулярных биорегуляторов. На основе гуанина создано целое поколение противовирусных препаратов, активных в отношении инфекций, таких как герпес, цитомегаловирусная инфекция, болезнь Эпштейн-Барра («ацикловир», «ганцикловир», «фамивир»). В связи со свойством вирусов развивать резистентность к различным видам антибиотиков появляется необходимость вести поиск новых и модернизировать уже существующие препараты. При этом неизбежно возникает задача докинга лекарственных веществ и их прототипов (лигандов) в активные центры белков-мишеней (рецепторов).

В данной работе на основе программы PLATINUM (<http://model.nmr.ru/platinum>), было проведено исследование структурно-функциональных особенностей молекулярного узнавания гуанин-содержащих лигандов рецепторами. Анализ структур атомного разрешения комплексов таких лигандов с различными белками, взятых из базы данных PDB, позволил выявить, что особо важную роль при этом играют помимо гидрофобных и стэкинг-взаимодействий особые мотивы водородных связей гуанин-белок. Учёт уже одного терма, описывающего образование таких мотивов, позволяет повысить число комплексов, для которых найдена верная ориентация лиганда в активном центре с 63 (по стандартной оценочной функции программы GOLD, Jones et al., 1997) до 66 из 75 рассмотренных структур. Кроме того, был разработан интегральный оценочный критерий, включающий комбинацию термов, описывающих отдельные водородные связи (с атомами N2 и N6 гуанинового основания), стэкинг-контакты и гидрофобные взаимодействия. Его использование позволяет точнее идентифицировать верную ориентацию лиганда в активном центре белка по сравнению с оценочной функцией программы GOLD.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты № 07-04-01514-а, 09-04-13813-офи\_у), программ РАН «Молекулярная и клеточная биология» и «Основы фундаментальных исследований нанотехнологий и наноматериалов» и Федерального агентства по науке и инновациям в поддержку ведущих научных школ (грант НШ-4728.2006.4).*

### Физико-химические характеристики полиплексов на основе полиэтиленимина

**Белецкая Е.А., Уласов А.В., Храмцов Ю.В., Трусов Г.А.** (Москва, [elenabeletkai@mail.ru](mailto:elenabeletkai@mail.ru))

Полиплексы – невирусные синтетические векторы для переноса генетической информации – представляют собой комплексы поликатионов с полианионом ДНК. Ранее в лаборатории были созданы коньюгаты (ПЭИ-ПЭГ-ТАТ) из полиэтиленимина (ПЭИ), полиэтиленгликоля (ПЭГ) и ТАТ-пептида. Положительно заряженный ПЭИ применен для компактизации отрицательно заряженной ДНК. Гидрофильные молекулы ПЭГ введены для экранирования избыточного положительного заряда (результаты см. ниже), что должно приводить к снижению токсичности и к увеличению гидрофильности комплекса. ТАТ-пептид введен для облегчения проникновения полиплекса в клетку.

Гидродинамический диаметр полиплексов из ПЭИ-ПЭГ-ТАТ и суперскрученной плазмидной ДНК (4700 п.н.), измеренный методом динамического светорассеяния (на приборе ZetaPALS, Brookhaven Instruments, США), оказался на порядок меньше, чем у этой ДНК в свободном состоянии и составил 26-61 нм (ср. с 320 нм у плазмидной ДНК), что свидетельствует о компактизации ДНК.

У полиплексов на основе ПЭИ z-потенциал, измеренный на том же приборе ZetaPALS, составил  $+27,3 \pm 0,3$  мВ, а у полиплексов на основе коньюгатов ПЭИ-ПЭГ-ТАТ –  $+21,2 \pm 1,5$  мВ. Благодаря своему высокому положительному заряду все полиплексы, должны быть устойчивы в водной системе. Уменьшение z-потенциала полиплексов на основе коньюгатов ПЭИ-ПЭГ-ТАТ по сравнению с полиплексами на основе ПЭИ указывает на то, что в

полиплексе группы ПЭГ-ТАТ находятся на поверхности полиплексов и ПЭГ эффективно экранируют избыточный положительный заряд, что должно способствовать снижению цитотоксичности полиплексов.

В экспериментах на клеточных культурах показана высокая трансфицирующая активность полиплексов на основе полученных коньюгатов (вплоть до 100% клеток).

Для определения стабильности полиплексов изучали степень их распаковки после добавления полианиона гепарина (от 0,2 до 0,5 МЕ). Оказалось, что полиплексы на основе ПЭИ-ПЭГ-ТАТ более устойчивы к распаковке, чем на основе ПЭИ, т.к. для их распаковки требуется большая концентрация гепарина. Соотношение ПЭГ/ПЭИ, по всей видимости, на устойчивость полиплексов к гепарину не оказывает существенного влияния.

Для определения устойчивости к действию ДНКазы исследовали полиплексы на основе коньюгатов ПЭИ-ПЭГ-ТАТ и на основе ПЭИ с варьированным соотношением азота ПЭИ к фосфатным группам ДНК ( $N/P = 10, 20, 30, 40$ ). Сначала в течение 30 минут полиплексы обрабатывали 3 МЕ ДНКазы, а затем добавляли 2 МЕ гепарина, заведомо распаковывающих полиплекс. Была выявлена большая устойчивость ДНК к расщеплению в составе полиплекса на основе ПЭИ-ПЭГ-ТАТ. Так же было показано, что с увеличением отношения  $N/P$  увеличивается и устойчивость к действию ДНКазы.

Таким образом, в данной работе продемонстрировано, что полиплексы на основе ПЭИ-ПЭГ-ТАТ более стабильны и лучше защищают ДНК, чем полиплексы на основе ПЭИ, обладают пониженным  $z$ -потенциалом за счет ПЭГ, экранирующего избыточный положительный заряд, что снижает агрегацию и цитотоксичность полученных полиплексов.

### **Исследование взаимодействия фуллерена C60 с прокариотической и эукариотической мембранами методом молекулярной динамики**

*Боздагянян Марин Евгеньевна (Москва, marinulka@gmail.com)*

Одним из важнейших этапов развития нанотехнологии стало открытие фуллеренов и нанотрубок во второй половине 80-х годов. Это замкнутые поверхностные структуры углерода, которые проявляют специфические свойства как своеобразные материалы, как физические объекты и как химические системы. Обладая высокой электроотрицательностью, фуллерены выступают как сильные окислители в химических реакциях, а это, в свою очередь, позволяет синтезировать новые вещества на их основе. Так производные фуллерена могут выступать в роли антиоксидантов и противоаллергических веществ; обладают цитопротективной и антибактериальной активностями; могут быть причиной перекисного окисления липидов; взаимодействуют с различными белками. Последние токсикологические исследования показывают, что фуллерены и нанотрубки могут проникать через мембранные клетки и влиять на выполняемые ими функции. Вдыхаемые ультратонкие наночастицы оседают в легких и далее с током крови попадают в мозг (преимущественно в обонятельную луковицу), преодолевая гематоэнцефалический барьер. Токсичность углеродных наночастиц зависит от их растворимости, например, цитотоксичность немодифицированного фуллерена в 7 раз выше, чем у его производных с высокой растворимостью в воде. Однако механизмы, благодаря которым наночастицы с такой легкостью проникают через мембранные клетки до сих пор мало изучены. В данной работе предлагается использовать метод молекулярной динамики для детального изучения механизмов взаимодействия наночастиц между собой в водной фазе и с биомембранными.

В качестве объектов исследования были выбраны: фуллерен C60, две билипидные мембранны: эукариот — из 128 DPPC в воде, и прокариот — смешанная (3:1) из POPE/POPG. Для производства расчетов использовался программный пакет GROMACS. На начальном этапе проводились исследования свойств фуллерена с целью оценки применимости модели. Были рассчитаны потенциалы средней силы для двух фуллеренов в вакууме, воде и толуоле. Полученные графики свидетельствуют о том, что параметры созданной модели сопоставимы с литературными данными. Оценка моделей мембранных проводились с помощью расчета основных параметров: толщины, площади, приходящейся на липидную головку, а также профиля плотности. Все результаты вычислений соответствуют экспериментальным данным. Далее исследовалось проникновение фуллерена

через мембранны. Изучались динамика адсорбции и проникновения наночастицы, построены энергетические профили. Также построены графики зависимости расстояния от центра мембранны до центра массы фуллерена, гидрофобные карты мембранны, произведены расчеты изменения диффузии липидов в мемbrane после проникновения фуллерена.

### **Фотодинамические свойства N-ацилированных циклоимидных производных бактериохлорина**

*Борицдева Алёна Александровна (Москва, vesnyshka12@yandex.ru)*

Метод фотодинамической терапии рака (ФДТ) – один из перспективных подходов к лечению онкологических заболеваний. В основе ФДТ лежит избирательное накопление фотосенсилизаторов (ФС) в раковых клетках с последующим облучением опухоли светом в одном из максимумов поглощения ФС в длинноволновой области. Эффективность ФДТ существенно зависит от параметров используемого ФС.

В данной работе были исследованы фотофизические и фотобиологические свойства новых циклоимидных производных бактериохлорина (ЦИБХЛ), отличающихся длиной N-алкиламидного заместителя в имидном цикле. Метиловый эфир N-пропиониламидоциклоимид бактериохлорина (1), метиловый эфир N-гексиламидоциклоимид бактериохлорина (2) и метиловый эфир N-октиламидоциклоимид бактериохлорина (3) были синтезированы в лаборатории проф. А.Ф.Миронова (МИТХТ, Москва). Данные ФС обладают эффективным поглощением в ИК-области спектра ( $\lambda_Q = 821$  нм, коэффициент молярной экстинкции  $28000\text{--}36000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), что соответствует спектральному окну прозрачности ткани.

Соединения 1-3 нерастворимы в воде, в качестве солубилизаторов для обеспечения их совместимости с биологическими средами были исследованы ДМСО, кремофор EL (CrEL), плюроники L64 и L122. Обнаружено, что соединения 1-3 легко растворяются в ДМСО в концентрации 1 мМ и присутствуют в растворе в мономерной форме. В CrEL и в плюрониках P85 и L122 соединения 1-3 растворяются в концентрации, не превышающей 0,15 мМ, при этом наблюдается образование в растворе агрегатов, поглощающих свет в диапазоне 920-970 нм. Таким образом, оптимальным солубилизатором для 1-3 является ДМСО.

Установлено, что соединения 1-3 способны эффективно генерировать синглетный кислород, но не гидроксильные радикалы в мембраноподобном окружении. Квантовые выходы генерации синглетного кислорода составили  $\phi\Delta(1)=\phi\Delta(2)=0,24$  и  $\phi\Delta(3)=0,39$ .

Было обнаружено, что соединения 1-3 проникают в клетки аденокарциномы легкого человека A549 и накапливаются в цитоплазме в мономерной флуоресцирующей форме: диффузно окрашивают цитоплазму и преимущественно накапливаются в гранулах размером 0,5-2 мкм. Данные гранулы совпадают с липидными каплями – контрастными структурами на изображении клеток в проходящем свете. В ядрах клеток ЦИБХЛ не обнаружены. Показано, что 1-3 проявляют фотоиндуцированную цитотоксичность в отношении клеток A549, однако, без светового воздействия ЦИБХЛ для клеток не токсичны. Наиболее активным ФС является соединение 1. Фотодинамическая активность ЦИБХЛ сильно снижается с увеличением длины N-алкиламидного заместителя, что, возможно, связано с избыточным увеличением гидрофобности соединений. Так, соединение 1 ( $LD50=0,6\pm0,1$  мкМ) в 2 раза превосходит по активности соединение 2 ( $LD50=1,7\pm0,1$  мкМ) и более чем в 30 раз соединение 3 ( $LD50>20$ ).

### **Получение мембранных белков для ЯМР исследований**

*Гончарук С.А., Гончарук М.В. (Москва, goncharuk@ntr.ru)*

Мембранные белки (МБ) играют ключевую роль в жизнедеятельности клетки. Дисфункции МБ нередко лежат в основе различных заболеваний. В настоящее время действие приблизительно 50% лекарств направлено именно на эти белки. Однако создание высокоэффективного и высокоспецифичного препарата возможно только при наличии данных о механизме функционирования МБ. На сегодня спектроскопия ЯМР является одним из основных инструментов, позволяющих получить такую информацию.

Среди огромного разнообразия данных о пространственной структуре водорастворимых белков в Protein Data Bank данные о МБ составляют лишь 1% от общего числа. Главным образом, это связано с отсутствием эффективных технологий получения МБ. Наработка каждого нового функционально-активного МБ в количествах, достаточных для физико-химических методов исследования, является значимым событием для структурных биологов.

Для разработки эффективных методик получения МБ были выбраны белки семейства KCNE (KCNE1, dKCNE1 – укороченный вариант KCNE1, KCNE3), длина которых варьируется от 103 до 123 а.о. Эти белки содержат один трансмембранный сегмент и взаимодействуют с  $\alpha$ -субъединицами потенциал зависимых калиевых каналов. Формирование стабильных комплексов приводит к изменению таких свойств каналов, как проводимость, селективность, потенциалы активации, деактивации и инактивации, чувствительность к лекарственным препаратам и др.

Для достижения высокого уровня экспрессии каждого из генов целевых белков собраны различные конструкции. В случае KCNE1 использована прямая система экспрессии. Для очистки белка на 3'-конце гена KCNE1 предусмотрена нуклеотидная последовательность, кодирующая шесть гистидинов (гистидиновый таг). В случае dKCNE1 и KCNE3 применена гибридная система экспрессии. В качестве белка партнера выбран тиоредоксин *E. coli*. Гибридные конструкции содержат нуклеотидные последовательности, кодирующие: тиоредоксин, гистидиновый таг, сайт расщепления высокоспецифичной протеиназы (энтерокиназы в случае dKCNE1 и тромбина в случае KCNE3) и гибкие линкеры. Собранные гены клонированы в экспрессионный вектор pGEMEX-1 под контроль T7 промотора. Процесс культивирования рекомбинантных штаммов (BL21(DE3)pLysS) оптимизирован для «богатой» и «бедной» сред (TB и M9, соответственно). Процесс очистки dKCNE1 и KCNE3 включает следующие основные стадии: металл-хелатная аффинная хроматография (MXAX), гидролиз гибридного белка, повторная MXAX и дополнительная хроматография (ионообменная – в случае dKCNE1; гидрофобная – в случае KCNE3). Очистка KCNE1 проведена с использованием MXAX и гидрофобной хроматографии. Итоговый выход для всех белков и их  $^{15}\text{N}$ -,  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ - производных составляет не менее 10 мг/л культуры. На данный момент предложенный способ экспрессии генов и очистки МБ уже позволил получить структурную информацию о KCNE3, что свидетельствует в пользу высокого качества полученных по представленной технологии белковых препаратов.

Авторы выражают благодарность к.б.н. А.А. Шульге, к.б.н. Я.С. Ермолюку, к.х.н. Р.В. Тихонову, к.х.н. Э.В. Бочарову, д.х.н. А.С. Арсеньеву и акад. М.П. Киртичникову за консультации, помощь и финансирование при проведении настоящей работы; поддержке грантов РФФИ и Российского Федерального Агентства по Науке и Инновациям.

#### **Бактериальный синтез и очистка трансмембранных фрагментов рецепторных тирозинкиназ для структурно-функциональных исследований**

**Гончарук М.В., Гончарук С.А. (Москва, goncharuki@gmail.com)**

Рецепторные тирозинкиназы занимают центральное место в ключевых процессах жизнедеятельности клетки. Трансмембранные (ТМ) домены участвуют в гомо- и гетеродимеризации этих белков. Значительная часть современных лекарственных препаратов направлена на рецепторные протеин киназные системы, однако детальные механизмы функционирования последних до конца не изучены. Понимание аспектов, связанных с ролью ТМ доменов в активации и функционировании рецепторных тирозинкиназ, расшифровка их пространственной структуры поможет понять на молекулярном уровне процессы, происходящие в живой клетке и заложит основу рационального дизайна лекарственных препаратов нового поколения.

Для исследования выбраны рецепторы эпидермального фактора роста (ErbB2, ErbB4) и рецептор фактора роста фибробластов в норме (FGFR3) и патологии (с точечными мутациями G380R и A391E). Разработана методика препаративного бактериального получения ТМ доменов этих белков (ТМ пептидов), а также их  $^{15}\text{N}$ -,  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ - меченых производных для структурно-функциональных исследований. Синтетические гены ТМ пептидов экспрессированы в составе с тиоредоксином A *Escherichia coli* (TrxA).

Нуклеотидные последовательности каждого пептида собраны из химически синтезированных олигонуклеотидов и подсоединенены к 3'-концу гена *TtxA* при помощи ПЦР. На стыке двух генов введены нуклеотидные последовательности, кодирующие шесть гистидинов, сайт узнавания легкой цепи энтерокиназы человека и гибкие линкеры. На N-конце TtxA размещен H-таг, устраниющий токсичность гибридного белка по отношению к клетке-хозяину. Синтетические гены гибридных белков клонированы в вектор pGEMEX-1 под транскрипционный контроль T7 промотора. Культивирование рекомбинантных штаммов *E.coli* проведено на минимальной солевой среде M9. При необходимости получения  $^{15}\text{N}$ - (или  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ -) меченых белков использовали  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  (или  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  и  $^{13}\text{C}$ -глюкозу). Протокол очистки пептидов включал металло-хелатную аффинную и ионообменную хроматографии. Гибридные белки гидролизованы легкой цепью энтерокиназы человека. Итоговый выход пептидов и их  $^{15}\text{N}$ -,  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ - производных составил не менее 7 мг/л культуры. Высокая степень чистоты (не менее 97%) и идентичность всех полученных белков соответствующим целевым пептидам подтверждена при помощи гель-электрофоретического и масс-спектрометрического анализов. Очищенные белковые препараты готовы для получения структурно-динамической информации о их гомо- и гетеродимерных комплексах методом гетероядерной спектроскопии ЯМР высокого разрешения. Так, разработанная стратегия получения пептидов позволила получить первую в мире структуру высокого разрешения ТМ доменов ErbB2 в димерном состоянии.

Авторы выражают благодарность к.б.н. Шульге А.А., к.б.н. Ермолюку Я.С., Ткач Е.Н., к.х.н. Бочарову Э.В., д.х.н. Арсеньеву А.С. и акад. Киртичникову М.П. за консультации, помощь и финансирование при проведении настоящей работы; поддержке грантов РФФИ и Российского Федерального Агентства по Науке и Инновациям.

#### **Микроинкапсулирование альфа-интерферона на водорастворимом хитозане** *Губайдуллина Альфия Азаматовна (Уфа, alphiya05@rambler.ru)*

Получены образцы микрочастиц хитозана методом осадительной коацервации и ионотропного гелеобразования. Микрочастицы хитозана представляют собой суспензию, состоящую из гранул разного размера (1-3 мкм). Микрочастицы в основном существуют в виде небольших скоплений, ассоциированных участков.

Взаимодействие альфа-интерферона с микрочастицами исследовали в зависимости от концентрации белка, от времени сорбции. Образцы микрочастиц хитозана, полученные методом ионного гелеобразования показали лучшую сорбцию по сравнению с образцами, полученных методом солевого высаждивания. Довольно большую сорбционную способность до 640 мкг белка/мл микрочастиц вероятнее всего можно объяснить образованием надмолекулярных структур, либо небольших ассоциированных участков, которые способны связывать белок в межмолекулярном пространстве. Изучение продолжительного времени взаимодействия белка с микрочастицами хитозана показало незначительное влияние на количество сорбируемого белка. Основная часть загружаемого интерферона сорбируется уже в первые 4 часа, а в последующие часы от 4 до 24 часов сорбируется от 0 до 2,9% основного количества альфа-интерферона.

При изучении десорбции белка во времени в течение 24 часов, было установлено, что основная часть десорбируемого белка высвобождается в первый же час инкубирования образцов при 37°C. Динамику высвобождения интерферона из микрокапсул определяли на модельном опыте на кроликах породы Шиншилла. При инъекции рекомбинантным интерфероном-альфа в концентрации 800 мкг/мл к 8 часам наблюдается почти полное выведение интерферона, а концентрация интерферона, обнаруживаемая в сыворотке крови кролика после иммунизации образцом, полученным методом осадительной коацервации, все еще является лечебной. Хотя образцы, полученные методом ионотропного гелеобразования показывали наилучшую сорбцию белка и наименьшую десорбцию *in vitro*, эффекта пролонгации они не оказывают, вероятнее всего из-за необратимого связывания микрочастиц с интерфероном, который привел к денатурации либо дезактивации. На основании исследований физико-химических свойств и биологической активности можно сказать, что микрочастицы хитозана с М.м. 100 кДа, полученные методом солевого

высаживания являются оптимальными для получения пролонгированной формы альфа-интерферона и, вероятнее всего, для многих других белковых препаратов.

### Исследование клеток нейронов в культуре при патологии и в норме методами биофизики и нанобиотехнологии

*Дзюбенко Егор Вячеславович (Москва, ejeeek@yandex.ru)*

На основные свойства нервной клетки – возбудимость и проведение нервного импульса сильно влияет морфологическое и энергетическое состояние клетки (Klapstein et al., 2001; Costa et al., 2008). Цитоскелет отростков нервных клеток – сложный комплекс нейрофиламентов, микротрубочек, актиновых филаментов и ассоциированных с ними белков, играющий важнейшую роль в процессах направленного роста, стабилизации и регуляции нейритов (Dent, Gertler, 2003). Таким образом, цитоскелет нейритов является мишенью исследования нейродегенерации в целом и аксональной дегенерации в норме и при патологии.

Изменение мембранныго потенциала митохондрий, их распределение и форма, отражает физиологическое состояние клетки (Sureda et al., 1997). Метод атомной силовой микроскопии высокоеффективен при исследовании тонкой морфологии нативной нервной клетки в среде роста, при измерении упругих свойств мембранны и в целях нанохирургии (Xiong et al., 2009; McNally, Ben Borgens, 2004).

В ходе данной работы были получены первичные культуры клеток нейронов эмбрионов курицы E8–E13, диссоциированные и органотипичные. С точки зрения морфологии проведено исследование цитоскелета нервных отростков методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии при использовании цитохимических и иммуноцитохимических подходов. Рассмотрена общая морфология клеток, их отростков и конусов роста с помощью атомной силовой микроскопии и сделана попытка измерения упругих свойств мембранны различных областей клетки. Применен потенциал-чувствительный флуорофор родамин 123 для исследования мембранныго потенциала митохондрий. Кроме того, применена модель глутаматной цитотоксичности при изучении дегенеративных процессов в нервной клетке.

### Влияние дитиотреитола на $H^+$ -транспортирующие системы плазмалеммы клеток *Chara*: связь с нефотохимическим тушением флуоресценции *Додонова С.О., Крупенина Н.А. (Москва, dodonova.sveta@gmail.com)*

В освещенных клетках водоросли *Chara corallina* величина нефотохимического тушения флуоресценции (NPQ), связанная с градиентом pH на тилакоидной мемbrane (TM), четко скоординирована с профилем pH в апопласте ( $pH_o$ ). Неоднородный профиль pH у поверхности клетки обусловлен чередующимися доменами плазмалеммы с активным выведением  $H^+$  и с  $\Delta\mu H$ -зависимым электрогенным поступлением  $H^+$  в клетку по протонным каналам в щелочных зонах. В участках клетки с  $pH_o \sim 10$  уровень NPQ повышен в связи с закислением люмена и высоким градиентом pH на TM. Известно, что NPQ ослабляется при действии дитиотреитола (ДТТ – агент, препятствующий образованию S-S связей в белках, известный как ингибитор виолаксантин-дезоксизады). В работе прослежено влияние ДТТ на NPQ в хлоропластах и встречено направленные трансемембранные потоки  $H^+$  в щелочных и кислых зонах клеток *Chara*. Об активности  $H^+$  помпы и  $H^+$  каналов судили по сдвигам  $pH_o$  в соответствующих примембранных областях после остановки входящего и выходящего потоков  $H^+$ , вызванной генерацией потенциала действия (ПД). Значения коэффициента NPQ получены с использованием метода насыщающих световых импульсов на базе микрофлуорометра Microscopy PAM (Walz); pH у поверхности клетки измеряли с помощью сурьмянного pH-микроэлектрода. Инкубация клеток *Chara* в среде с 2мM ДТТ приводила к сдвигу S-образных световых кривых NPQ в область высоких интенсивностей света как в кислой, так и в щелочной зонах. Такое снижение уровня NPQ можно объяснить уменьшением количества зеаксантина в антенне фотосистемы 2. В контрольных опытах амплитуда ПД-индированных изменений pH в щелочных участках была в несколько раз больше, чем в кислых. При обработке клеток ДТТ амплитуда изменений pH в щелочных зонах заметно уменьшалась, а в кислых, наоборот, увеличивалась. Вероятно, это связано

с тем, что ДТТ снижает проводимость в щелочных областях клетки *Chara* и не влияет на  $\text{H}^+$  насос в кислых зонах. Результаты работы показывают, что снижение тушения в хлоропластах под действием ДТТ сопровождается снижением  $\text{pH}_o$  как в щелочных, так и в кислых зонах клетки. Эти наблюдения подтверждают наличие сложных связей между NPQ и  $\text{H}^+$ -транспортирующей активностью плазмалеммы. Можно предполагать, что ДТТ влияет как на протонные каналы плазмалеммы, так и на взаимодействия хлоропластов с плазмалеммой.

### **Изучение трансфекции клеток в культуре полиплексными нанокомплексами с лигандной специфичностью**

**Дурыманов Михаил Олегович** (Москва, [mdurymanov@gmail.com](mailto:mdurymanov@gmail.com))

В целях генной терапии рака необходимо создание носителей (векторов), которые бы обеспечивали защиту, направленность и специфичность доставки генов в клетки-мишени. В настоящее время все большее внимание уделяется созданию невирусных систем доставки, в том числе полиплексов – нанокомплексов доставляемой ДНК с положительно заряженным полимером, например, полизтиленимином (ПЭИ). ПЭИ и конъюгаты на его основе связываются с отрицательно заряженной ДНК, компактизуют её и предохраняют от действия нуклеаз в условиях *in vivo*. С целью снижения токсичности полиплексов используют конъюгаты ПЭИ с полистиленгликолем (ПЭГ). Кроме того, к комплексу ПЭИ-ПЭГ может быть присоединён дополнительный компонент, придающий специфичность для доставки полиплексов в раковые клетки. Для меланом с повышенной экспрессией меланокортиновых рецепторов первого типа таким компонентом может служить пептид, способный взаимодействовать с ними с высокой аффинностью, подобно  $\alpha$ -меланоцит-стимулирующему гормону ( $\alpha$ -МСГ).

В данной работе была показана высокая трансфицирующая способность полиплексов, полученных в нашей лаборатории, на клетках мышиных меланом двух линий – B16F1 и Клаудмана S91 (клон M3). В качестве репортерного гена был выбран ген зелёного флуоресцентного белка. Анализ результатов трансфекции проводили при помощи конфокального лазерного сканирующего микроскопа Carl Zeiss 510 META NLO. Обнаружено, что эффективность трансфекции зависит от соотношений компонентов в составе полиплекса и её максимальное значение составляет около 80% и 90% для клеток B16F1 и M3 соответственно. Для увеличения трансфицирующей способности и специфичности доставки были синтезированы конъюгаты блок-сополимеров, содержащие МСГ-подобный пептид. Была проведена оценка физико-химических параметров полиплексов, полученных на основе данных конъюгатов: их размеры,  $\zeta$ -потенциал, действие на мембранны. Изучена трансфицирующая способность полиплексов на основе конъюгатов блок-сополимеров ПЭИ-ПЭГ-(МСГ-подобный пептид) и ПЭИ-ПЭГ на линиях клеток меланом *in vitro* при разных количественных соотношениях конъюгата и переносимой ДНК. Проведенные эксперименты показали, что на клетках линии M3 при соотношениях N/P (отношение количества амино- и иминогрупп ПЭИ к числу фосфатных групп ДНК) 20 и 30 эффективность трансфекции полиплексами, содержащими МСГ-подобный пептид, достоверно выше, чем при трансфекции полиплексами без пептида. Для клеток B16F1 подобный эффект наблюдался только при N/P 20. Было доказано, что увеличение эффективности трансфекции определяется присутствием МСГ-подобного пептида. Добавление избытка свободного  $\alpha$ -МСГ уменьшало трансфекцию при помощи полиплексов с МСГ-подобным пептидом за счет конкуренции за receptor на клетках меланом, но не на клетках почки эмбриона человека линии HEK293, у которых отсутствуют меланокортиновые рецепторы.

### **Спектры кругового дихроизма цитохром с - оксидазы и их интерпретация на основе классической теории оптической активности**

**Дюба Артем Владимирович** (Москва, [dyubon@gmail.com](mailto:dyubon@gmail.com))

Цитохром *c*-оксидаза — один из ключевых ферментов аэробного дыхания, служащий генератором протонного потенциала. Предметом многих исследований служит механизм сопряжения электронного и протонного транспорта в этом ферменте. Среди

экспериментальных методов изучения этой проблемы особое место занимает спектроскопия кругового дихроизма (КД). Этот метод позволяет оценить симметричность поглощающей молекулы. Если молекула не имеет ни центра инверсии, ни плоскости симметрии, то она неодинаково поглощает правополяризованные и левополяризованные световые волны и называется оптически активной. Оптическая активность цитохром *c*-оксидазы в ближней УФ и видимой области спектра (400-600 нм) связана с наличием двух гемов, низкоспинового гема *a* и высокоспинового гема *a<sub>3</sub>*, имеющих полосы поглощения в этих областях спектра, а также расположенных вблизи них ароматических аминокислотных остатков. Спектры КД могут оказаться чувствительны к изменению состояния как самих гемов, так и их ближайшего окружения, например, функционально важных аминокислотных остатков.

Несмотря на то, что спектры КД цитохром *c*-оксидазы были экспериментально зарегистрированы, теоретического объяснения наблюдаемой формы спектра и положений максимумов на нем не было предложено.

В настоящей работе приводятся полученные нами спектры КД и поглощения цитохромоксидазы в различных редокс-состояниях и предлагается модель, позволяющая на основе данных 3D-структур (PDB:1V54, 1V55) выяснить факторы, обуславливающие наблюдаемый сигнал КД цитохром *c*-оксидазы. Модель основана на классической теории оптической активности.

При моделировании спектров поглощения и КД восстановленной и окисленной форм цитохром *c*-оксидазы было установлено, что взаимодействие двух гемов не может объяснить наблюдаемую величину и форму сигнала. Основной вклад в оптическую активность, обуславливающий наблюдаемый вид спектра, дает взаимодействие гемов с находящимися вблизи них остатками ароматических аминокислот.

### **Силовая спектроскопия живых клеток** *Ефремов Юрий Михайлович (Москва, ул.efremov@gmail.com)*

В последнее время атомно-силовая микроскопия (АСМ) все чаще применяется для исследования биологических материалов. Это обусловлено ее преимуществами перед другими видами микроскопии, в том числе высоким пространственным разрешением и возможностью проведения измерений в жидкости (что позволяет ставить эксперименты в условиях, близких к нативным).

Изучение живых клеток методом АСМ может быть выделено в отдельное узкое направление, его обособленность связана с тем, что живые клетки являются очень мягким и подвижным объектом. Кроме измерения топографических характеристик, АСМ позволяет определять локальные неоднородности механических свойств, это делается с помощью силовой спектроскопии. В данной работе этот метод был применен для исследования клеток органогенетической культуры DRG (dorsal root ganglion), выделенной из эмбрионов цыплят. Были получены изображения клеток на оптическом и атомно-силовом микроскопах, при этом использовались различные режимы АСМ (контактный, полуконтактный, контактный метод рассогласования, метод фазового контраста). Выяснилось, что при проведении измерений в контактном режиме упругие элементы цитоскелета заметны лучше, чем в полуконтактном. Были проведены эксперименты по оценке модуля Юнга: он составил от 4 до 40 кПа, эти значения примерно совпадали при использовании кантилеверов разной жесткости. Было показано, что экспериментально измеряемые значения модуля Юнга существенно зависят от способа обработки данных и выбранной модели взаимодействия, описывающей взаимодействие между зондом и клеткой.

*Работа выполнена при поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы, ГК № П717. Автор выражает благодарность Е.В. Дзюбенко за предоставленные образцы.*

### **Комплексное исследование везикулярного цикла в нервно-мышечных синапсах** *Захаров Андрей Викторович (Казань, mphiszav@rambler.ru)*

В данной работе проведено исследование экзо-эндоцитоза и рециклирования синаптических везикул в нервных окончаниях кожно-грудинной мышцы лягушки и

диафрагмальной мышцы мыши при длительном раздражении с частотой 20 имп/с. Для регистрации потенциалов концевой пластиинки применяли внутриклеточное микроэлектродное отведение. Динамику эндоцитоза в процессе высокочастотной активности синапса исследовали с помощью флуоресцентной микроскопии с использованием красителя FM1-43 (применили поминутную аппликацию FM1-43). Полученные данные положены в основу математических моделей везикулярных циклов в указанных объектах.

Экспериментальные наблюдения и результаты математического моделирования позволяют заключить, что в двигательных нервных окончаниях лягушки в секреции медиатора участвуют три пула синаптических везикул, которые восполняются посредством двух видов эндоцитоза: быстрого, имеющего ограниченную пропускную способность, и медленного. Быстро рециклирующие везикулы пополняют мобилизационный пул, а резервный пул восстанавливается за счёт медленного эндоцитоза. Модельное исследование также показало, что в нервных окончаниях лягушки везикулы резервного и мобилизационного пулов вовлекаются в секрецию медиатора независимо, т.е. параллельно.

Экспериментальные данные на нервно-мышечных препаратах мыши воспроизводятся с высокой степенью согласования в рамках модели с двумя пулами везикул и одним типом эндоцитоза.

#### **Исследование воздействия теплового шока и экранирования электромагнитного поля на локомоторное поведение личинок *Drosophila melanogaster***

**Захаров Геннадий Александрович** (Санкт-Петербург, [gennadiy.zakharov@gmail.com](mailto:gennadiy.zakharov@gmail.com))

Согласно современным данным, экранирование человека от магнитного поля Земли (что иногда необходимо при эксплуатации промышленного и военного оборудования) приводит к стрессу, агрессии, нарушениям поведения и нейропатологии. Для изучения этого явления требуется привлечение модельных объектов, например дрозофилы, белки нервной системы которой обладают высокой степенью гомологии с человеческими (Fortini et al., 2000). Важную роль в возникновении нейродегенеративных расстройств, играют нарушения механизмов организации цитоскелета (Ramaekers, Bosman, 2004), в частности сигнального каскада ремоделирования актина и его ключевого фермента LIMK1 (Weeber et al., 2002). О развитии нейродегенерации можно судить по локомоторному поведению, поскольку оно вовлечено во все виды поведенческой активности (Martin, 2004).

Целью данной работы являлось исследование влияния экранирования магнитного поля на локомоторное поведение личинок дрозофилы в сравнении с воздействием тепловым шоком (ТШ). Для исследования роли LIMK1 использовалась мутантная линия *agents3*, несущая нарушения гена LIMK1 и отличающаяся существенными нарушениями обучения и памяти (Savvateeva-Popova, 2002).

Показано, что тепловой шок угнетает локомоторную активность личинок дикого типа CS, и стимулирует активность *agents3*. На western-блоте наблюдается существенное увеличение концентрации HSP70 и LIMK1 у CS, и падение уровня LIMK у *agents3*. При нахождении в ослабленном магнитном поле в течение 12 часов наблюдается резкое увеличение всех параметров локомоторной активности у исследованных линий, при этом концентрация HSP70 и LIMK1 заметно падает. У *agents3* происходит восстановление дефектов пространственного ориентирования. Действие ослабленного магнитного поля в течении одного часа у CS приводит к незначительному возрастанию подвижности, в то время как у *agents3* оно приближается по силе к 12-часовому.

Полученные результаты указывают на участие системы ремоделирования актина в развитии ответа на магнитное поле, а также на существенное различие в механизмах ответа на действие ТШ и магнитного поля, возможно связанное с активацией каскада HSP.

*Автор выражает признательность Б.Ф. Щеголеву, Т.В. Паялиной и Е.В. Савватеевой-Поповой за помощь в подготовке и проведении работы, а также за ценные замечания. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 07-04-00655), гранта СПб НЦ (Е.В. Савватеевой-Поповой), Программы Президиума РАН «Биоразнообразие и динамика генофондов».*

## **Система направленной визуализации глиом на основе наночастиц оксида железа**

**Зоркина Яна Александровна (Москва, viverina@gmail.com)**

Наночастицы железа и его оксидов, в частности гамма оксида железа (III) ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), за последние десять лет привлекают всё больше внимания исследователей со всего мира. Такие свойства, как суперпарамагнетизм, низкая токсичность и малый размер и доступность для конъюгации с векторным молекулами для ткань-специфической доставки делают возможным их применение для визуализации методом магнитной резонансной томографии различных типов опухолей, в том числе и глиобластомы головного мозга человека.

Для создания подобной конструкции в нашей лаборатории методом термического разложения пентакарбонила железа (Fe(CO)<sub>5</sub>) были синтезированы суперпарамагнитные наночастицы  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, покрытые защитной оболочкой из олеиновой кислоты и дистеароилфосфатаноламин полиэтиленгликоля (DSPE-PEG). Также наночастицы были помечены флуоресцентным маркёром DILC18. По результатам просвечивающей электронной микроскопии размер металлического ядра составил  $3,5 \pm 0,5$  нм, а гидродинамический радиус, измеренный методом динамического светорассеяния, составил  $140 \pm 40$  нм. Исследования, проведённые с помощью флуоресцентной микроскопии на клетках глиомы человека С6 и фибробластов крысы показали, что наночастицы способны к адгезии на поверхности этих клеток. Таким образом в результате нашей работы были получены наночастицы  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> с известным радиусом, устойчивые к агрегации в водной среде и была обнаружена адгезия полученных частиц на клетках глиомы.

## **Влияние внутрибрюшных инъекций фуллеренов на функциональные способности эритроцитов крыс**

**Камалетдинова Татьяна Рашидовна (Москва, kamaletdinovat@gmail.com)**

Широкое использование наноматериалов в последние годы вызывает интерес с точки зрения их влияния на различные клетки и ткани организма, а так же здоровье в целом.

Проведенные ранее исследования предполагают цитотоксическое и генотоксическое воздействие растворов фуллеренов на различные типы клеток, такие как человеческие фибробlastы кожи, клетки зародышевой почки человека, яйцеклетки китайских хомячков и ряд других, что связано с их способностью генерировать активные формы кислорода и, тем самым, вызывать перекисное окисление липидов. По другим данным фуллерены могут использоваться как противовирусные вещества.

В данном исследовании изучались биологические эффекты, оказываемые фуллеренами, вводимыми в различных концентрациях, на количество оксигемоглобина в крови крыс. Животные так же подвергались физической нагрузке – проводились тесты на изнуряющее плавание, что увеличивало гипоксический эффект, тем самым позволяя более точно оценить влияние фуллеренов на количество оксигемоглобина в крови. Наблюдение велось в течение 4-х дней.

Исследование состояния гемоглобина проводили с помощью метода КР на цельной крови. Гемопорфирин обладает интенсивным сигналом КР, очень чувствителен к появлению дополнительного (шестого) лиганда, что позволяет достаточно точно оценивать количество гемоглобина в окисленной и восстановленной формах. Увеличение/уменьшение оксигемоглобина в крови может свидетельствовать об увеличении способности гемоглобина связывать кислород, либо об уменьшении способности его выделять. Изменения средства гемопорфирина к кислороду вероятно связаны с изменением расстояния между атомом железа и кольцом гемопорфирина, что можно зарегистрировать с помощью данного метода. С использованием КР спектроскопии были выявлены различия в количестве оксигемоглобина в крови контрольных и подверженных действию фуллеренов животных.

## **Изучение функционирования калиевого канала KcsA бактерии *Streptomyces lividans* методами молекулярного моделирования**

**Касимова Марина Анатольевна (Москва, skyfalls@mail.ru)**

Ионные каналы – это биологическиеnanoструктуры, входящие в состав белкового компонента клеточной мембраны. Их основной функцией является селективный контроль

ионной проводимости. В связи с этим ионные каналы оказываются вовлечены в целый спектр важнейших физиологических процессов, таких как генерация электрической активности в нервных и мышечных клетках, контроль возбудимости сердечной мышцы, внутриклеточная передача сигнала, секреция гормонов (инсулин), клеточная пролиферация и регуляция клеточного объема. Неправильная работа ионных каналов может служить причиной различных патологий. Эпилепсия, эпизодическая атаксия (временное расстройство координации движений), длинный QT синдром, синдром Барттера (Bartter), пузырчатый фиброз, сердечная аритмия и один из типов диабетов являются следствием дисфункции этих биологических наноструктур. Последнее указывает на актуальность изучения структуры и функционирования ионных каналов с целью последующего применения полученных знаний для разработки направленных лекарств.

Исследование ионных каналов может основываться на использовании молекулярно-биологических методов, позволяющих определять в основном структуру белка, и электрофизиологических методов, направленных на изучение принципов функционирования данных биологических объектов. Однако детальное представление механизмов работы ионного канала на молекулярном уровне возможно с применением другого подхода – молекулярной динамики биологических объектов.

В качестве объекта исследования был выбран бактериальный калиевый канал KcsA, обладающий целым рядом сходств с потенциал-зависимыми калиевыми каналами возбудимых клеток эукариот. Для произведения расчетов использовался программный пакет AMBER10 (<http://ambermd.org/>). На начальном этапе работы проводили построение структуры канала в открытой конформации: с помощью метода управляемой молекулярной динамики внутренне спирали KcsA раздвигали до заданных координат. Правдоподобность полученной модели оценивали, во-первых, сравнивая диаметр поры канала в области внутриклеточных ворот с размером молекулы тетраэтиламмония (блокатор), во-вторых, рассчитывали значение ионной проводимости по алгоритму программы hole (<http://d2o.bioch.ox.ac.uk:38080/>).

На следующем этапе работы полученную структуру KcsA встраивали в систему, состоящую из октана и воды – компонентов, имитирующих соответственно гидрофобную и гидрофильную фазы. Изучение проводимости бактериального канала проводили методами равновесной и управляемой молекулярной динамики.

**Исследование фаз нефотохимического тушения флуоресценции индуцированных светом высокой интенсивности у зелёной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* и диатомовой водоросли *Thalassiosira weissflogii* с использованием РЕА флуорометра**  
**Колачева Анна Алексеевна (Москва, [kufiya@inbox.ru](mailto:kufiya@inbox.ru))**

В настоящее время экологический мониторинг широко используется для оценки состояния фитопланктона, а также наземных растений. Измерение флуоресценции хлорофилла являются дешевым в эксплуатации, высокочувствительным методом позволяющим оценивать физиологическое состояние растений в режиме реального времени, благодаря чему эти методы получили применения в экологическом мониторинге. Недавно был разработан метод измерения и анализа индукционных кривых флуоресценции (ИКФ) индуцированных высоким по интенсивности светом (ОЛР кривая). В настоящее время исследованы механизмы быстрой фазы ИКФ, связанных с изменением фотохимического тушения флуоресценции (до 1 с), в то время как медленные фазы кинетики (от 1 с до 5 минут), связанные с нефотохимическим тушением флуоресценции исследованы недостаточно, в том числе у водорослей. Как известно нефотохимическое тушение связано в основном с ростом тепловой диссипации энергии в антенне фотосистемы II ( $\Delta\text{pH}$  зависимые механизмы, ксантофилловый цикл), а также с переходом фотосинтетических мембран из состояния 1 (высокая скорость возбуждения реакционного центра фотосистемы II) в состояние 2 (низкая скорость возбуждения реакционного центра фотосистемы II) (Рубин, Кренделева, 2003).

В данной работе мы исследовали различные фазы нефотохимического тушения флуоресценции на ИКФ используя специфические разобщители и ингибиторы: FCCP –

разобщитель трансмембранный протонного градиента; валиномицин – разобщитель электрического градиента; этилмалеимид – ингибитор перехода мембран из состояния 1 в состояние 2; дитиотреитол- ингибитор ксантофиллового цикла. ИКФ возбуждались светом интенсивностью  $3000 \text{ } \mu\text{E} \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$  в течение 5 минут у зелёной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* и диатомовой *Thalassiosira weissflogii* с использованием флуорометра Handy Pea. Кроме того проводили измерения кинетик замедленной флуоресценции с использованием фосфороскопа, созданного на кафедре биофизики МГУ.

По результатам работы были определены механизмы, которые обуславливают развитие тех или иных фаз нефотохимического тушения флуоресценции на кинетиках индукции флуоресценции у *Chlamydomonas reinhardtii* и *Thalassiosira weissflogii*.

### **Исследование участия фосфатидилинозитол 3-киназы, протеинкиназы B/Akt и киназы гликогенсинтазы-3beta в реакции нейронов и глиальных клеток рака на фотодинамическое воздействие**

**Командиров М. А., Князева Е.А.** (Ростов-на-Дону, [tkomandirov@yandex.ru](mailto:tkomandirov@yandex.ru))

Фотодинамическое (ФД) воздействие, применяющееся для лечения рака, основано на развитии окислительного стресса в окрашенных клетках при освещении и в итоге некротической или апоптозной смерти. Эти процессы контролируются внутриклеточной сигнальной системой. Важную роль в выживаемости клеток может играть сигнальный путь с участием фосфатидилинозитол 3-киназы, протеинкиназы B/Akt и киназы гликогенсинтазы-3beta (*PI3K/Akt/GSK-3beta*). Для изучения его участия в ФД повреждении нейронов и окружающих глиальных клеток (ГК) в изолированном рецепторе растяжения рака использовались *LY294002* (10 мкМ) и вортманин (120 нМ), ингибиторы *PI3K*, *Akt inhibitor IV* (*AktI*, 1 мкМ), ингибитор протеинкиназы *B/Akt*, и *TDZD-8* (2 мкМ), ингибитор *GSK-3beta*. Фотосенсибилизатор – алюмофталоцианин Фотосенс, источник света – полупроводниковый или Не-Не лазеры (670 или 633 нм). Нейронную активность отводили внеклеточно присасывающимися электродами и регистрировали с помощью программно-аппаратного комплекса на базе персонального компьютера. Некроз и апоптоз определяли путем двойного флуорометрирования препарата пропидиум-иодидом, выявляющим ядра некротических клеток, и Hoechst-33342, выявляющим фрагментированные ядра апоптозных клеток. В темноте ингибирование *PI3K* или *Akt* не влияло на некроз нейронов и ГК и на апоптоз ГК. *TDZD-8*, ингибитор *GSK-3beta*, втрое усиливал апоптоз и вдвое – некроз ГК, что указывает на защитную роль *GSK-3beta* в нервной системе рака. Фотосенс или лазерное излучение по-отдельности не влияли на нейронную активность, но вместе (это ФД воздействие) вызывали сначала активацию, а затем торможение и необратимое прекращение нейронной активности в среднем за 15-20 мин. После этого развивался некроз нейронов, некроз и апоптоз окружающих ГК. При фотосенсибилизации ингибирование *PI3K* с помощью *LY294002* или вортманина, как и ингибирование *GSK-3beta* с помощью *TDZD-8*, не вызывало достоверного изменения уровня фотоиндуцированных апоптоза и некроза ГК или некроза нейронов. Это свидетельствует о неучастии *PI3K* и *GSK-3beta* в данных процессах. Ингибитор *AktI* не влиял на импульсную реакцию нейрона и апоптоз ГК, но вдвое снижал уровень ФД-индуцированного некроза нейронов и ГК, т.е. протеинкиназа *B/Akt* участвовала в ФД-индуцированном некрозе нейронов и глиальных клеток. Это могло быть связано с *Akt*-опосредованной генерацией активных форм кислорода в этих клетках.

*Работа поддержанна грантами РФФИ (09-04-01322) и Минобрнауки РФ (2.1.1/6185).*

### **Влияние затемнения на уровень экспрессии гена фосфолипазы D в однодольных и двудольных растениях**

**Крывля Ирина Анатольевна** (Белоруссия, Минск, [ira.kryvulia@gmail.com](mailto:ira.kryvulia@gmail.com))

Основным ферментом фосфолипидного катаболизма в растениях является фосфолипаза D (ФлD). В условиях затемнения ФлD участвует в обеспечении энергетических потребностей клетки путем гидролиза фосфолипидов, продукты которого затем вовлекаются в углеводный обмен, способствуя тем самым адаптации растений к недостаточному уровню освещенности.

Известно, что ферментативная активность ФлД зависит от световых условий выращивания растений. Однако до настоящего времени оставалось неясным, каков механизм светового контроля активности фермента ФлД. Для выяснения возможности регуляции на транскрипционном уровне, оценивали влияние световых условий роста растений на содержание в их тканях транскриптов гена ФлД с помощью метода ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Исследования проводились на проростках растений томата и овса, выращенных в различных световых условиях. Были разработаны генспецифические пары праймеров для генов  $\alpha$ - и  $\beta$ -изоформ ФлД томатов (на основании известных последовательностей мРНК ФлД томатов), а также для гена ФлД овса. Следует отметить, что для овса нуклеотидная последовательность гена ФлД до сих пор не установлена, поэтому дизайн праймеров осуществлялся на основе последовательностей генов ФлД других злаковых: риса, кукурузы, ячменя. Секвенирование ДНК-фрагментов, полученного в ходе ОТ-ПЦР с помощью разработанной пары, показало, высокий (97%) уровень сходства нуклеотидной последовательности с генами ФлД других видов злаковых и, в то же время, не выявило сходства с генами других белков. Таким образом, в результате секвенирования ампликонов, полученных с помощью этой пары праймеров, впервые была получена нуклеотидная последовательность фрагмента гена ФлД овса.

При исследованиях на растениях томата, применялись различные варианты режимов выращивания. 1) этиолированные проростки томатов; 2) зеленые проростки; 3) зеленые проростки после 1, 2, 3 и 4 суток затемнения. В них оценивался относительный уровень экспрессии гена ФлД – R. В качестве контроля использовались зеленые растения соответствующего возраста. Эксперименты проводились на растениях разного возраста: проростки через 2–3 дня после всходов, двухнедельные проростки (считая с момента всходов), полуторамесячные растения. Однако проведенные эксперименты не выявили четкой зависимости R генов исследуемых изоформ от режима освещения и затемнения.

Аналогичные эксперименты были проведены на зелёных и этиолированных проростках овса. В результате не было обнаружено существенного изменения R гена ФлД в зависимости от условий освещенности, что дает основание говорить о том, что выявляемая с помощью разработанной нами пары праймеров экспрессия изоформы гена ФлД овса не зависит от световых условий.

Полученные результаты дают основания полагать, что гены исследуемых изоформ ФлД томатов и овса не подвержены фотомодуляции и свидетельствуют в пользу посттранскрипционных механизмов контроля ферментативной активности ФлД.

### **Исследование упорядоченности микроструктуры глаза мухек *Drosophila melanogaster* методом атомно-силовой микроскопии**

**Крючков М.В., Сергеев А.В. (Пущино, Kruichkov\_mih@mail.ru)**

Фасеточный глаз насекомых состоит из высокоупорядоченных омматидиев. Линза омматидия имеет антибликовое покрытие, но молекулярные механизмы его образования неизвестны.

Нами был поставлен метод исследования поверхности глаза методом атомно-силовой микроскопии. Разработанный нами подход отличается простотой приготовления образца и быстротой получения результатов. В результате впервые были получены изображения микроструктуры омматидия дрозофилы, отличающиеся высоким разрешением. Благодаря хорошей детализации поверхности нами был проведен подробный анализ с использованием современного программного обеспечения. Фурье-анализ морфологии поверхности выявил наличие периодичности микроструктуры омматидия.

Нами была выдвинута гипотеза о том, что PCR (planar cell polarity), как путь, обуславливающий высокую упорядоченность структуры глаза, может также влиять и на формирование антибликовой поверхности. Для проверки гипотезы были исследованы различия микроструктуры омматидиев мухек дикого типа и мутантных по Frizzled рецептору (участвующему в PCR пути).

Анализ полученных изображений показал, что зернистые структуры поверхностей омматидиев имеют одинаковую плотность распределения и практически идентичные

периоды как для мух дикого типа, так и для мутантных по Frizzled рецептору. Элементарная ячейка, характерная для кристаллических структур, выявлена не была.

Поставленный нами метод дает мощный инструмент для будущих исследований и может быть использован для решения широкого круга задач.

*Выражая благодарность коллективу группы физики нуклеопротеидов Института белка РАН за межлабораторное сотрудничество, в рамках которого была выполнена работа.*

**Биологический эффект галоид-производных антрацена:  
влияние на биохимические реакции, взаимодействие с белками**

*Кудряшева Галина Александровна (Красноярск, gusya@ptt.ru)*

Исследование биологического эффекта галоидсодержащих веществ является актуальной задачей, поскольку, с одной стороны, галогенированные соединения – это необходимые составляющие живых организмов, а с другой, многие из них – сильнодействующие токсиканты (Williams et al., 2003). Транспорт, активация таких веществ часто осуществляется посредством взаимодействия с белковыми молекулами. Данная работа посвящена выявлению зависимости степени воздействия галогенированных соединений на биохимические процессы от массы галоида в их составе.

Целью работы являлось изучение влияния ряда гомологичных соединений с увеличивающейся массой галоидного заместителя (антрацен, 9-хлороантрацен, 9-бromoантрацен, 9-йодоантрацен) на ферментативные реакции на примере биолюминесцентной реакции бактерий.

Были зарегистрированы характеристики (спектр, кинетика, максимальная интенсивность) биолюминесценции биферментной системы NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза-бактериальная люцифераза в присутствии разных концентраций антраценов. Установлено, что эффективная концентрация воздействия красителей (при которой максимальная интенсивность уменьшается на 50%) увеличивается с ростом массы галоидного заместителя. Для оценки воздействия галогенированных антраценов на ферменты было исследовано их взаимодействие с модельным белком – сывороточным альбумином быка (БСА). Были измерены спектры возбуждения и испускания, а также анизотропия люминесценции антраценов в присутствии и отсутствии БСА. Константу диссоциации комплекса БСА-краситель рассчитывали, используя изменения анизотропии флуоресценции антраценов при связывании с белком (Lakowicz, 2006). Зарегистрировано увеличение квантового выхода антраценов при связывании белком. Получены константы диссоциации комплекса БСА-краситель в диапазоне  $2,3 \cdot 10^{-6}$ – $9 \cdot 10^{-5}$  М, монотонно уменьшающиеся с ростом массы галоида в составе антрацена.

Таким образом, установлено, что с ростом массы галоидного заместителя усиливается ингибирующее действие галогенированных антраценов на биолюминесцентную реакцию, что, возможно, объясняется усилением взаимодействия антраценов с белками, приводящим к инактивации ферментов.

**Влияние N-концевого участка антибактериального пептида Ltc1K  
на гемолитическую активность**

*Кудряшова Ксения Сергеевна (Москва, rekamoskva@mail.ru)*

В последние годы наблюдается рост устойчивости патогенных микроорганизмов к действию известных антибиотиков. Проблема поиска новых антибактериальных агентов становится все более актуальной. Антимикробные пептиды обнаружены у различных по происхождению организмов и, по видимому, являются частью защитной системы. Многие из них обладают высокой антибактериальной и низкой цитотоксической активностью, поэтому могут рассматриваться как перспективные антибактериальные агенты при создании новых лекарств.

Изучение влияния структуры пептидов на характер их взаимодействия с про- и зукариотическими клетками, в том числе с использованием мутантных форм, необходимо для создания синтетических аналогов, обладающих заданным набором свойств.

В данной работе был проведен сравнительный анализ гемолитической активности и характера взаимодействия с мембраной линейного катионного пептида латарцина Ltc1K из яда среднеазиатского паука *Lachesana tarabaevi* (SMWSGMWRRKLKLRNAL-KKKLKGEK) и его укороченного на 3 аминокислоты с N-конца аналога Ltc1.2.

Гемолитическую активность пептидов оценивали по вытеканию гемоглобина при инкубации с эритроцитами человека *in vitro*. Активность укороченного аналога в отношении эритроцитов оказалась снижена по сравнению с исходным пептидом в 8 раз. Это согласуется с опубликованными ранее данными о том, что N-концевой участок Ltc1K погружен в гидрофобную область мембраны. Следовательно, его удаление может снижать сродство пептида к мемbrane эукариотической клетки. Эксперимент на модельных липидных системах показал, что удаление 3 N-концевых остатков снижает в 8 раз аффинность пептида к цвиллерионным мембранам, а на пермеабилизующую способность пептида влияния не оказывает. Было высказано предположение, что уменьшение гемолитической активности Ltc1K при его укорочении обусловлено только снижением сродства пептида к незаряженному фосфолипидному бислою. С помощью метода лазерной сканирующей конфокальной микроскопии мы сравнили механизм действия пептидов на мембрану эритроцитов. Было показано, что лизис сопровождается прохождением эритроцитов через одинаковые морфологические стадии (дискоцит-эхиноцит-сферицит-стоматоцит-«тень») в обоих случаях. Размеры образуемых дефектов оценивали по проникновению флуоресцентно-меченых декстранов разного диаметра внутрь «теней». Оба пептида могут формировать устойчивые во времени поры, средний размер которых сильно зависит от концентрации добавляемого пептида. Выявлено, что при эквивалентных гемолитических концентрациях размер пор одинаковый. Таким образом, полученные данные подтверждают гипотезу о том, что пептиды взаимодействуют с эукариотической мембраной по одинаковому механизму, а все выявленные различия являются лишь следствиями различий в мембранный аффинности.

Проведенное сравнительное исследование существенно проясняет картину взаимодействия антибактериального пептида Ltc1K с клетками эукариот и послужит необходимой теоретической базой для возможных дальнейших исследований в этой области.

#### **Регуляция хинонами редокс-состояния фагоцитов крови и клеток глиомы Кулагова Т.А., Крылова Н.Г. (Белоруссия, Минск, [tatyana\\_kulagova@tut.by](mailto:tatyana_kulagova@tut.by))**

Одной из характеристик клеточного гомеостаза является редокс-состояние или окислительно-восстановительный баланс клетки, который поддерживается благодаря сопряженному функционированию систем образования и утилизации редокс-агентов, а также мембранных систем транспорта различных типов окислителей и восстановителей в клетке. Редокс-состояние клеток может меняться при воздействии на них редокс-активных молекул, в частности, хинонов. При действии хинонов изменение редокс-состояния клеток может произойти как за счет накопления окислителей (взаимодействие семихинонов с молекулярным кислородом с образованием активных форм кислорода (АФК)), так и за счет накопления восстановителей-антиоксидантов (двуэлектронное восстановление хинонов). Следовательно, вмешательство хинонов в редокс-процессы несомненно отразиться на проявлении функциональных свойств клеток. С целью выявления регулирующего действия хинонов на свойства клеток были изучены процессы генерации АФК моноцитами и нейтрофилами крови в присутствие бензо- и нафтохинонов, а также хинониндуцированное образование АФК в клетках опухоли (глиомы) с использованием методов хемилуминесцентного и флуоресцентного анализа.

Установлено, что при добавлении менадиона, лавсона, юглона, коэнзима Q10 в диапазоне концентраций от  $1 \cdot 10^{-6}$  моль/л до  $1 \cdot 10^{-4}$  моль/л к мононуклеарам и нейтрофилам, адгезионным к стеклу, количество генерируемых клетками АФК уменьшается. Следовательно, данные хиноны проявляют антиоксидантные свойства при генерации АФК фагоцитами, стимулированными адгезией к стеклу. Присутствие коэнзима Q10 в диапазоне концентраций от  $1 \cdot 10^{-9}$  моль/л до  $1 \cdot 10^{-4}$  моль/л не влияет на активацию кислорода фагоцитами. Выявлено, что при добавлении менадиона и викасола к клеткам глиомы линии

С6 и линии U251 образуются АФК с преобладающим вкладом супероксидных анион-радикалов и пероксида водорода, то есть индуцируется окислительный стресс. Количество образующихся в клетках глиомы АФК зависит от концентрации хинонов. С использованием ингибиторного анализа выявлено, что в клетках глиомы менадион подвергается одно- и двухэлектронному восстановлению внутриклеточными редуктазами. Образование АФК при действии менадиона на клетки линии С6 осуществляется при участии НО-синтаз, НАДН:убихинон-оксидоредуктазы электротранспортной цепи митохондрий, протеинкиназы С, ERK1/2 и ферментов метаболизма эндогенной арахидоновой кислоты, включающих активацию фосфолипазы А2 и 5-липоксигеназы, но не циклооксигеназ.

Результаты проведенных нами экспериментов позволяют заключить, что хиноны можно рассматривать как регуляторы редокс-состояния клеток. Поскольку при действии на клетки, которые при функционировании в организме генерируют АФК, хиноны выступают в роли антиоксидантов, а при добавлении к клеткам, в которых содержится большое количество антиоксидантов, в частности, к клеткам глиомы, они индуцируют окислительный стресс.

**Нанокомпозит на основе кристаллов кремния и фуллереновой фазы – новый фотосенсибилизатор с выраженным цитостатическим эффектом на опухолевые клетки Курмышикина Ольга Вадимовна (Петрозаводск, VolkovaTO@yandex.ru)**

Проблема формирования наночастиц для прицельного воздействия на биологические мишени решается путем использования нанопористых полупроводников и их нанокомпозитов с молекулами фуллеренов С60 и С70, обеспечивающих высокоеффективную генерацию возбужденных состояний синглетного кислорода. Синглетный кислород и ряд других кислород-содержащих радикальных молекул играют важную роль в регуляции процессов жизнедеятельности организмов. Кроме того, показано, что синглетный кислород может быть использован как мощный оксидант биомолекул для лечения онкологий (метод фотодинамической терапии). При этом нанореакторы являются наиболее эффективным способом формирования синглетного кислорода в локальной области злокачественных новообразований.

Нами было изучено цитостатическое действие нанокомпозита кристаллов кремния с адсорбированными молекулами фуллерена С60 на клетки фиброзаркомы человека НТ-1080. Нанокомпозит создан на кафедре физики твердого тела Петрозаводского государственного университета (зав. кафедрой д.ф.м.н., проф. Гуртов В.А.). Там же получены результаты, касающиеся особенностей переноса энергии в системе наноструктурированный кремний – фуллерены и позволяющие сделать вывод об эффективной генерации синглетного кислорода в данном нанокомпозите. Нами показано, что разработанный нанокомпозит обладает по отношению к клеткам НТ-1080 выраженным цитостатическим действием: к 5-ым суткам экспозиции количество жизнеспособных опухолевых клеток в культуре составляло всего 10–12%, тогда как определяемый показатель клеток, обработанных только нанокристаллами кремния, находился на уровне 32–35%. Культивирование клеток с чистыми фуллеренами снижало их жизнеспособность до 60–63%. Жизнеспособность необработанных клеток в культурах была порядка 95–97%. Все культуры после внесения реагентов в течение часа подвергались воздействию видимого света. Таким образом, создание подобных фотосенсибилизаторов представляется весьма перспективным подходом к разработке препаратов нового поколения для фотодинамической терапии опухолей.

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта НШ-306.2008.4.*

**Изучение внутриклеточной локализации *in vitro* и *in vivo* модульного нанотранспортера для адресной доставки лекарств**  
**Дупанова Т.Н., Сластникова Т.А. (Москва, tatyana.dupanova@yandex.ru)**

Многие противораковые лекарства являются локально-действующими и должны быть доставлены в определенный клеточный компартмент раковой клетки. В нашей лаборатории был разработан ряд модульных нанотранспортеров (МНТ) для направленной доставки локально действующих лекарств в заданный компартмент клетки-мишени. В основу их работы заложены естественные клеточные механизмы транспорта и сортировки

макромолекул. МНТ включают в себя следующие модули:  $\alpha$ -меланоцит-стимулирующий гормон ( $\alpha$ МСГ) или эпидермальный фактор роста (ЭФР) в качестве интерниализуемого лиганда; оптимизированный сигнал ядерной локализации (СЯЛ) большого Т-антитела вируса SV-40, обеспечивающий транспорт в ядро; *HMP* (гемоглобиноподобный белок *E.coli*) как модуль-носитель; транслокационный домен дифтерийного токсина (ДТокс), в качестве эндосомолитического модуля.

Целью данной работы было изучение внутриклеточного распределения модульного нанотранспортера *in vitro* и *in vivo*.

Для достижения данной цели были экспрессированы в клетках *E.coli*, выделены и аффинно очищены полипептиды (*Гис*)<sub>6</sub>-ДТокс-*HMP*-СЯЛ- $\alpha$ МСГ и (*Гис*)<sub>6</sub>-ДТокс-*HMP*-СЯЛ-ЭФР. Для восстановления дисульфидных связей в ЭФР проводился рефолдинг полипептида (*Гис*)<sub>6</sub>-ДТокс-*HMP*-СЯЛ-ЭФР.

Исследование внутриклеточной локализации МНТ *in vitro* было проведено на клетках меланомы мышей линии B16F1, характеризующихся повышенной экспрессией меланокортиновых рецепторов, и клетках эпидермоидной карциномы человека линии A431 с повышенной экспрессией рецепторов эпидермального фактора роста.

Методом конфокальной сканирующей микроскопии и непрямого иммуногистохимического окрашивания показано, что уже через 3 часа после инкубации исследуемые МНТ проникают в клетки и обнаруживаются в ядрах. Были подобраны условия, при которых уровень автофлуоресценции клеток и неспецифического связывания антител был крайне низок.

Ранее в нашей лаборатории на ряде раковых клеток в культуре также была показана ядерная локализация транспортера. Однако ситуация *in vivo* нередко значительно отличается от наблюдаемой *in vitro*, поэтому нами было исследовано распределение МНТ в клетках опухоли *in vivo*. Уже через 3 часа после внутривенного введения ЭФР-содержащего МНТ в дозе 3 мг на мышь Balb/c ByЛсо pu/pu с привитой опухолью A431 методом непрямого иммуногистохимического окрашивания полутонких срезов и конфокальной сканирующей микроскопии МНТ выявлялся не только в цитоплазме, но и в ядрах опухолевых клеток.

Таким образом впервые показано, что уже через 3 часа после системного введения исследуемые МНТ проникают в опухолевые клетки и обнаруживаются в ядрах не только *in vitro*, но и *in vivo*.

#### **Установление термодинамических характеристик взаимодействия метилрезорцина с лизоцимом для целенаправленного регулирования ферментативной активности Мартиросова Елена Игоревна (Москва, ms\_martins@mail.ru)**

Установлено, что один из химических аналогов микробных регуляторных факторов, С7-АОБ (метилрезорцин), относящийся по природе к алкилоксибензолам (АОБ), способен увеличивать каталитическую активность гидролаз, а также влиять на их функциональную стабильность. На примере лизоцима было показано, что его модификация молекулами С7-АОБ в диапазоне концентраций 0,2-2,0 мг/мл влечет за собой повышение активности фермента в отношении специфического субстрата, пептидогликана, до 200% и в отношении неспецифического субстрата, коллоидного хитина, до 470%.

Для понимания физико-химической природы выявленных эффектов было изучено влияние концентрации С7-АОБ на термодинамические параметры взаимодействия фермент-АОБ в растворе на примере модельной системы «лизоцим белка куриного яйца - С7-АОБ» в 0,05М фосфатном буфере (рН 7,4) при 37°C.

Термодинамической функцией, непосредственно отражающей преобладающий характер взаимодействий белок-АОБ в водной среде, является энタルпия взаимодействий ( $\Delta H^\circ$ ), которую определяли методом изотермической микрокалориметрии смешения. Установлено, что  $\Delta H^\circ$  является отрицательной величиной, значение которой уменьшается от 0 до -5 кДж/моль с увеличением концентрации С7-АОБ от 0 до 35 мМ. Отрицательные значения  $\Delta H^\circ$  указывают на преобладание в системе экзотермических взаимодействий, обусловленных, вероятно, образованием водородных связей между гидроксильными группами С7-АОБ и полярными группами молекулы лизоцима. На основании полученной

изотермы определены стандартные термодинамические функции связывания ( $\Delta H_b = -9,6$  кДж/моль;  $\Delta S_b = -3,8$  Дж/(моль·К);  $\Delta G_b = -8,5$  кДж/моль).

Методом статического лазерного светорассеяния в той же системе установлено двукратное повышение значения второго вириального коэффициента взаимодействий белок-белок в результате взаимодействия с С7-АОБ. Это свидетельствует о повышении термодинамического сродства молекул лизоцима к растворителю под действием С7-АОБ. Полученный результат коррелирует с наблюдавшимся ранее методом адиабатной сканирующей микрокалориметрии (ДСК) эффектом двукратного повышения разности теплоемкостей нативной и денатурированной форм молекул модифицированного с использованием С7-АОБ лизоцима в сравнении с интактным белком.

Ранее также методом ДСК нами было установлено, что избыточная свободная энергия денатурации лизоцима в той же системе понижается с увеличением концентрации с С7-АОБ на 10 кДж/моль и этот эффект коррелирует с повышением неспецифической каталитической активности лизоцима.

Совокупность полученных данных позволяет предположить, что эффект метилрезорцина на каталитическую активность лизоцима в отношении неспецифического субстрата (коллоидного хитина) в изученной системе проявляется как в повышении скорости реакции гидролиза, так и в повышении сродства лизоцима к субстрату.

### **Ослабление кислород-независимых реакций нейтрофилов под воздействием квантовых точек**

**Михеева Эльза Раисилеевна** (Нижний Новгород, [biomikheeva@gmail.com](mailto:biomikheeva@gmail.com))

Лизосомально-катионные белки (ЛКБ) полиморфно-ядерных лейкоцитов принимают активное участие в реализации всех эффекторных функций нейтрофильных гранулоцитов. Поэтому лизосомально-катионный тест широко используется в качестве диагностического критерия многих заболеваний инфекционной природы. В представленной работе он впервые используется для оценки влияния на нейтрофильные гранулоциты принципиально нового класса соединений – квантовых точек. Квантовые точки являются перспективным флуорофором, обладающим целым рядом несомненных преимуществ перед традиционными (высокий квантовый выход, устойчивость к фотоблitzингу, хороший спектр эмиссии и т.д.).

Нейтрофильные гранулоциты выделяли из венозной крови здоровых доноров на двойном градиенте фиколл-урографина. Квантовые точки трех типов: CdSe/ZnS-меркаптопропионовая кислота (МПК), (CdSe/CdZnS)ZnS-polyT, CdSeCdSZnS/polyT/SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (НТИЦ «Нанотех-Дубна», г. Дмитров) брали в конечной концентрации 0,1 мг/мл. Клетки инкубировали с квантовыми точками в течение 60 мин при 37°C. Цитохимическое исследование ЛКБ нейтрофилов проводили по методу В.Е. Пигаревского.

В контроле (нейтрофильы без воздействия) показатели среднего цитохимического коэффициента (СЦК) составили 1,37±0,7, после инкубации с квантовыми точками наблюдается изменение активности лизосомально-катионных белков: соответственно средний цитохимический коэффициент для CdSe/ZnS-МПК составил 0,89±0,68 (р<0,05), для (CdSe/CdZnS)ZnS-polyT – 0,88±0,68 (р<0,05) и для CdSeCdSZnS/polyT/SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> – 0,98±0,6 (р<0,05). Таким образом, после инкубации нейтрофилов со всеми типами квантовых точек наблюдается статистически значимое снижение СЦК по сравнению с контролем. Это свидетельствует о снижении кислород-независимых реакций у нейтрофильных гранулоцитов после воздействия на них наночастиц, а, следовательно, показывает один из вариантов реализации токсического эффекта квантовых точек.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 09-04-97068-р\_новолжье\_а.*

### **Использование методов молекулярного моделирования для поиска новых ингибиторов тромбина**

**Озеров Иван Витальевич** (Москва, [varnivey@mail.ru](mailto:varnivey@mail.ru))

В настоящее время методы компьютерного молекулярного моделирования становятся неотъемлемой частью фундаментальных исследований, направленных на изучение молекулярных механизмов функционирования белков, а также и прикладных проектов,

связанных с рациональным дизайном новых лекарственных соединений. В частности метод молекулярного докинга (от англ. docking —стыковка), открывает заманчивые перспективы для исследователей, позволяя предсказывать пространственную структуру комплекса рецептор–лиганд и свободную энергию его образования, исходя из данных о пространственной структуре рецептора и химической структуре лиганда. Тем не менее современные алгоритмы докинга не всегда достаточно точны, чтобы с их помощью можно было сделать статистически достоверное предсказание для произвольной системы рецептор–лиганд. Одним из способов улучшения предсказательной способности метода молекулярного докинга является создание системоспецифичных алгоритмов предсказания энергии связывания, основанных на статистических потенциалах. В основе таких потенциалов лежит параметризация на обучающих наборах данных о структуре комплексов.

В процессе работы была создана настраиваемая под конкретную систему функция оценки энергии связывания лигандов в активном сайте белка-мишени. В полученной оценивающей функции использованы современные подходы, такие как метод молекулярного гидрофобного потенциала для оценки гидрофобных взаимодействий и метод молекулярной динамики для оценки динамических свойств комплексов. В качестве тестового объекта был выбран тромбин, поскольку для него известно достаточно большое количество кристаллических структур с различными лигандами (44), используемых в процессе настройки алгоритма, а разработка специфических ингибиторов этого белка представляется весьма важной с практической точки зрения задачей. Тромбин играет важную роль в процессе свертывания крови, поэтому поиск его ингибиторов поможет в создании новых антикоагулянтов.

**Моделирование структурных свойств цитохрома *c*,  
способствующих снижению его электрон-транспортной активности**  
**Островерхова Т.В., Черткова Р.В. (Москва, tato-tato@list.ru)**

Цитохром *c* – белок из класса цитохромов, содержащих в своей структуре гем типа *c*. Специализированная функция цитохрома *c* состоит в переносе электрона между белковыми комплексами III и IV митохондриальной дыхательной цепи.

Ранее предложена модель функционирования цитохрома *c*, предполагающая выведение атома железа из плоскости гема в процессе электронного транспорта. Была построена информационная структура цитохрома *c* при помощи метода анализа информационной структуры (АНИС-метода). В структуре цитохрома *c* были определены иерархически организованные элементы информационной структуры (ЭЛИС). В районе 73-88 а.о. полипептидной цепи цитохрома *c* обнаружен сайт пониженной плотности ЭЛИС, или ADD-сайт. Названный участок содержит лиганд гема Met-80. Мы предположили, что подвижность атома железа в цитохроме *c* обеспечивается за счёт гибкости ADD-сайта.

С целью проверки данной гипотезы были сконструированы три мутантных варианта цитохрома *c*. Дизайн вариантов цитохрома *c* с различными аминокислотными заменами создавался на основе анализа коротких полипептидов, имеющих высокую степень гомологии с последовательностью цитохрома *c* дикого типа. Мутации сконструированных вариантов цитохрома *c* направлены на усиление структурированности его ADD-сайта и снижение электрон-транспортной функции цитохрома *c*. Гены с аминокислотными заменами были экспрессированы, а соответствующие мутантные белки выделены. В ходе измерений биологической активности полученных белков, выявили сниженные способности мутантного варианта T78S/K79P к взаимодействию с комплексом III и варианта I81Y/A83Y/G84N к взаимодействию с комплексом IV. В результате анализа полученных данных возникла идея избирательного взаимодействия аминокислотных кластеров цитохрома *c*, находящихся по разные стороны от Met-80, с белковыми комплексами дыхательной цепи.

Наряду с АНИС-методом для определения точечных аминокислотных замен, изменяющих структурные характеристики сайтов, окружающих Met-80, был использован молекулярно-динамический подход. Показано, что рассчитанные параметры с помощью метода молекулярной динамики имели слабую корреляцию с аналогичными параметрами, рассчитанными с помощью АНИС-метода. На последующих этапах моделирование

структуры цитохрома *c*, направленное на повышение упорядоченности ADD-сайта, осуществляли при помощи АНИС-метода. Проанализирован ряд аминокислотных последовательностей в сайтах с различной плотностью ЭЛИС негомологичных белков и протеома *E.coli*. Определена частота встречаемости каждой аминокислоты в ЭЛИС разного ранга и выявлены наиболее вероятные аминокислоты, способствующие конструированию ADD+ сайта. Таким образом, обозначены основные направления по включению тех или иных аминокислот в сайт 73-88 а.о. с целью увеличения структурированности этого района.

В данный момент проводится анализ информационных структур цитохрома с с предложенными аминокислотными заменами. Результаты исследования АНИС-методом необходимы для определения конкретных мутаций в гене цитохрома *c* дикого типа.

### **Получение потенциал-зависимого калиевого канала *Heag2***

**для исследования методом электронной микроскопии**

**Пищальникова Анастасия Владимировна (Москва, bionastya@gmail.com)**

Потенциал зависимые калиевые каналы, играют ключевую роль в функционировании возбудимых клеток. Эти каналы также важны в качестве мишени для лекарственных агентов при различных заболеваниях и наследственных расстройствах. Для определения потенциальных сайтов связывания лигандов важно знание структуры канала. Для канала *heag2*, в настоящее время не известна ни его полная структура, и нет никаких прямых структурных данных о строении и расположении его цитоплазматических доменов, которые играют важную роль в функционировании канала.

В данной работе канал *heag2* был экспрессирован в эукариотической клеточной линии *Vero*, выделен и очищен на аффинной колонке с пришитыми к ней поликлональными антителами к 1D4-последовательности, расположенной на С-конце канала. Высокий уровень трансфекции был получен при использовании коммерческого трансфекционного агента Metafecten<sup>TM</sup> PRO (Biontex). Успешность экспрессии и очистки канала была подтверждена методом белкового электрофореза в поликариламидном геле (ПААГ) и вестерн-блотом.

То, что экспрессированные каналы *heag2* имеют правильную структуру было подтверждено с помощью флуоресцентно-меченного аддитоксина AgTx2. Данный токсин обратимо связывается с поровой частью канала, расположенного в мембране клетки. Связывание происходит только с теми молекулами калиевых потенциал-зависимых каналов, которые образуют правильный гомотетramer. Окраска происходит только с внешней стороны клеток и только тех каналов, которые находятся в клеточной мембране. Таким образом данный метод позволил подтвердить успешность трансфекции каналов и правильность их структуры непосредственно на живой клеточной культуре.

Было получено достаточное количество белка канала *heag2* для исследования его структуры методом электронной микроскопии с негативным окрашиванием. В результате исследования были получены электронные микрофотографии с отчетливым изображением отдельных молекул канала.

В дальнейшем, посредством обработки полученных двумерных изображений канала *heag2*, предполагается получить трехмерную структуру данного канала, а также определить локализацию цитоплазматического домена PAS. Для этого планируется получить структуру мутантного канала *heag2ΔPAS*, у которого отсутствует цитоплазматический домен PAS, и сравнить её со структурой полноразмерного канала для определения локализации домена PAS. Полученные структурные данные могут способствовать лучшему пониманию механизмов функционирования калиевых потенциал-зависимых каналов.

### **Молекулярное моделирование структуры серотонинового 5-HT3 рецептора**

**Попинако Анна Владимировна (Москва, popinako@rambler.ru)**

С модификациями в субъединицах серотонинового 5-HT3 рецептора связаны некоторые болезни, в частности: мигрень, неврологические заболевания шизофрения, депрессия, зависимость. Проведенные исследования помогут выяснить причины и механизмы развития болезней и найти путь их лечения в будущем.

Цель работы: определение трехмерной структуры серотонинового рецептора, изучение динамики взаимодействия надмембранный части рецептора с лигандами и миграции ионов в канале серотонинового 5-HT3 рецептора.

Материалы и методы: моделирование структуры по гомологии, управляемая (направленная) молекулярная динамика

Результаты: надмембранный часть рецептора обогащена отрицательно заряженными остатками, что увеличивает селективность взаимодействия с транспортируемыми катионами. Структура поры серотонинового 5-HT3 рецептора гомологична аналогичной структуре никотинового ацетилхолинового рецептора (nAChR). Методами управляемой МД определено положение ворот канала (2,5 нм от надмембранныго фрагмента) и дана оценка энергетического барьера ворот (~5 кДж/моль).

Рассмотрена динамика прохождения через канал катионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cs}^+$ . Динамика движения  $\text{Na}^+$  неравномерна: имеются зоны торможения движения иона. В течение 20 пс положительно заряженный ион  $\text{Na}^+$  локализуется в области остатков GLU 237, ASP 258. На прохождение катионов влияет также незаряженное лейциновое кольцо из остатков LEU 269, которые формируют ван-дер-ваальсовские ворота канала. Аналогичная картина наблюдается при миграции через мембранный часть рецептора  $\text{Cs}^+$  в водном окружении, но для цезия требуется большее время на преодоление зарядовых и стерических препятствий.

Определен потенциал средней силы (энергетический профиль канала), где учитываются особенности взаимодействия иона с молекулярными группами канала. При входе в канал имеется неглубокий энергетический минимум. Далее ион преодолевает энергетический барьер и попадает в потенциальную яму, сформированную взаимодействием с канальным окружением. Затем ион затягивается внутрь канала за счет электростатических эффектов. При выходе из канала имеется также энергетический барьер, который преодолевается за счет трансмембранныго потенциала и, возможно, за счет коллективных эффектов при вхождении в канал следующего иона.

### Методика визуализации внутренней структуры клеток с помощью атомно-силовой микроскопии

*Роскошная Анна Сергеевна (Москва, annarosk@gmail.com)*

Микроскопические методы исследований являются основополагающими в гистологии и цитологии. Важнейшими из них являются оптическая микроскопия и – для получения высокого разрешения – просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ). Атомно-силовая микроскопия применяется для исследования гистологических препаратов чрезвычайно редко: стандартные способы подготовки образцов для АСМ позволяют исследовать поверхность образца, но не его внутреннюю структуру, поскольку игла кантилевера не проникает в объем исследуемого объекта.

Цель данной работы состоит в развитии экспериментальных методик, которые позволили бы проводить сканирование срезов тканей на атомно-силовом микроскопе (АСМ). Предлагаемые новые методики визуализации клеточных препаратов используют иммобилизацию исследуемого материала в твердой среде и приготовление срезов, однако если для ПЭМ требуется приготовление ультратонкого среза, проницаемого для электронного пучка, то для АСМ значение имеет только сохранность поверхности после резки.

В данной работе показано, что на поверхности ультратонких срезов и блоков эпоксидной смолы сохраняется рельеф и неоднородность свойств, соответствующая препаратам, фиксированным в них. Объектами исследования являются изолированные кусочки ткани и клеточные культуры, они фиксируются, проходят процедуру фиксации, обезвоживания и заливаются в блоки эпоксидной смолы. Показано, что при использовании алмазного ножа поверхность для исследования получается более ровной, а рельеф – более информативным, чем при резке стеклянным ножом.

Предлагаемые методики были опробованы на образцах препаратов печени и селезенки крыс, меристемы корешка риса и культуры опухолевых клеток. На полученных

изображениях видны структура клеток, хроматин ядер, цитоплазматические мембранные клеток, митохондрии и другие органеллы.

Исследования срезов на АСМ позволяет получать изображения, сопоставимые с малым увеличением просвечивающего электронного микроскопа. Дальнейшее развитие методик позволит использовать АСМ как дополнительный метод исследования тканей.

### **Определение степени гидролиза липосомальных фосфолипидов Санарова Екатерина Викторовна (Москва, sanarova8686@mail.ru)**

Применение липосомальных лекарственных форм в клинике требует разработки методов оценки их качества. В состав липосом часто входят фосфолипиды из группы фосфотидилхолинов, которые могут подвергаться различным физико-химическим превращениям, в результате чего нарушается целостность липосомальных везикул. Поэтому одним из параметров определения качественного состояния таких липосом является уровень гидролиза фосфотидилхолинов. В водной дисперсии липосом фосфотидилхолины могут быть гидролизованы до свободных жирных кислот, 2-ацил-лизофосфолипидов и 1-ацил-лизофосфолипидов. Лизофосфолипиды гидролизуются дальше до глицеро-фосфо соединений. Степень гидролиза часто определяется как отношение концентрации лизофосфолипидов к первоначальной концентрации фосфотидилхолинов в липосомах. Однако, лизофосфолипиды являются лишь промежуточным продуктом реакции и это выражение не отражает всех стадий гидролиза. К тому же, превращение лизофосфолипидов в глицеро-фосфо соединения происходит быстрее, чем гидролиз фосфотидилхолина до лизофосфолипидов. Для получения точных данных нами разработан метод измерения степени гидролиза, заключающийся в наблюдении за содержанием фосфотидилхолинов и лизофосфолипидов во времени методом ТСХ (или ВЭЖХ) и уровня глицеро-фосфо соединений, определяемого при анализе общего фосфата в супернатанте после экстракции липидов. В этом случае степень гидролиза выражается как отношение суммы концентраций фосфотидилхолинов, лизофосфолипидов и глицеро-фосфо соединений к первоначальной концентрации фосфотидилхолинов, что является более верным отражением степени гидролиза.

### **Влияние азотного голода на эффективность функционирования фотосинтетического аппарата водорослей *Chlamydomonas reinhardtii* Толмачева Александра Викторовна (Москва, aleksandratorlmachova@gmail.com)**

Азот является одним из основных элементов минерального питания фитопланктона. Азотное голодание может привести к прекращению роста и гибели отдельных популяций фитопланктона. Предполагается, что на определенных стадиях роста снижение эффективности функционирования фотосинтетического аппарата водорослей (ФСА) связано именно с лимитированием азоту.

Для доказательства этого утверждения было необходимо проследить динамику потребления азота на примере культуры водорослей *Chlamydomonas reinhardtii* и выяснить, на каком этапе роста водорослей возникает лимитирование по азоту. Определение влияния условий минерального питания на эффективность функционирования ФСА водорослей позволит контролировать и прогнозировать развитие фитопланктона сообщества, что имеет важное прикладное значение для экологического мониторинга природных вод, процессов водоподготовки и водоочистки на производстве.

Эффективность функционирования ФСА с высокой точностью оценивается по флуоресценции хлорофилла. Разница между интенсивностями флуоресценции хлорофилла при переходе ФСА из активного состояния в неактивное называется переменной флуоресценцией Fv хлорофилла в клетках. Величина Fv соответствует той части энергии света, которая используется в фотосинтезе открытыми реакционными центрами фотосистемы 2, то есть может характеризовать активность первичных стадий фотосинтеза. На практике оценивают отношение переменной флуоресценции к максимальной флуоресценции. Эта безразмерная энергетическая характеристика эффективности

фотосинтеза, аналогичная коэффициенту полезного действия, является универсальной и не зависит от видовой специфики организма.

Содержание азота в аммонийной форме определяется индофенольным фотометрическим методом. В щелочной среде аммиак при взаимодействии с фенолом в присутствии окислителя – гипохлорита натрия – образует продукт синего цвета, называемый «индофенольная синь».

Анализ содержания аммонийного азота производился в культуральной среде водорослей *Ch.reinhardtii*. Трудности определения были связаны с влиянием химических свойств компонент питательной среды «Taps» триса на реакцию образования «индофенольной сини», которое в настоящее время не изучено. Исследования показали, что азот, входящий в аминогруппу триса, участвует в реакции образования «индофенольной сини», но его буферные свойства подавляют реакцию, что привело к плохо воспроизводимым результатам анализа. Поэтому для последующего определения содержания азота в среде была использована питательная среда "High-salt", не содержащая триса.

Динамика потребления азота в культуральной среде "High-salt" показала, что культура водорослей *Ch.reinhardtii* по мере роста не испытывает азотного голодаания, что подтверждается высокой эффективностью функционирования ФСА. Следовательно, необходимо многократно снизить исходное количество азота в среде и продолжить исследования, чтобы установить зависимость между обеспеченностью азотом в культуральной среде и эффективностью функционирования ФСА водорослей.

**Исследование конформации примембранного гемоглобина  
с помощью спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния**  
**Хабатова Венера Владимировна (Москва, [venera\\_khabatova@mail.ru](mailto:venera_khabatova@mail.ru))**

Свойства плазматической мембрани и мембранных белков в эритроцитах меняются на ранних стадиях сердечно-сосудистых заболеваний. Данные модификации влияют на конформацию примембранного гемоглобина, связанного с трансмембранным белком. Поэтому примембранный гемоглобин может использоваться в качестве маркера патологий эритроцитов.

В нашем исследовании изучается конформация примембранного гемоглобина с помощью спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) с использованием наночастиц серебра. Данные наночастицы адсорбируются на мембране эритроцита и усиливают КР сигнал от молекул примембранного гемоглобина. На поверхности наночастиц (НЧ) благородных металлов существует локальный поверхностный плазмонный резонанс, благодаря которому происходит усиление комбинационного рассеяния молекул, находящихся на расстоянии не более 15-20 нм от поверхности НЧ. Толщина мембрани клетки составляет около 10 нм. Оставшиеся 10 нм примембранной области содержит фракцию примембранного гемоглобина. Таким образом, ГКР обеспечивает получение информации о конформации примембранного гемоглобина в эритроцитах.

Целью нашего исследования является подбор оптимальных экспериментальных условий для максимального усиления КР сигнала от эритроцитов. Задачами нашего исследования являются: 1) найти экспериментальные условия для усиления КР сигнала от примембранного гемоглобина в эритроцитах, используя коллоиды серебряных наночастиц и две длины волн лазерного излучения (473 и 532 нм), 2) получить коллоиды серебряных наночастиц разного размера, 3) изучить ГКР сигнал эритроцитов, зависящий от размера наночастиц серебра, 4) исследовать влияние серебряных наночастиц разного размера на морфологию эритроцитов.

В результате исследования мы подобрали экспериментальные условия для усиления КР сигнала от примембранного гемоглобина в эритроцитах с использованием серебряных наночастиц и двух длии волн лазерного излучения (473 и 532 нм). Также мы выяснили, что интенсивность ГКР спектров возрастает с уменьшением размеров наночастиц.

Автор выражает искреннюю благодарность научным руководителям Браже Н.А. и Максимову Г.В., а также сотрудникам лаборатории Паршину Е.Ю., Браже А.Р. и Юсиповича А.И. за помощь, советы и поддержку, оказанные в ходе выполнения данной работы.

**Микрохирургия преимплантационных эмбрионов**  
при помощи системы лазерный скальпель – лазерный пинцет  
**Храмова Ю.В., Сергеев С.А., Ракитянский М.М. (Москва, yul.khratova@gmail.com)**

Микрохирургия является важной частью работы с преимплантационными эмбрионами и применяется как в эксперименте, так и в клинической практике. Микрохирургические операции производят на эмбрионах на стадиях от зиготы (0,5сут. развития) до бластоцисты (3,5сут.). В клиниках ВРТ для проведения преимплантационной генетической диагностики производят биопсию редукционного тельца (РТ) или бластомера, разрезают *zona pellucida* (ZP) эмбриона при проведении вспомогательного хэтчинга. В экспериментальной эмбриологии при помощи микрохирургических методов вводят генетические конструкции в пронуклеус зиготы и генномодифицированные клетки в полость бластоцисты для получения трансгенных животных. В клиниках и лабораториях для осуществления всех этих процедур используют микроманипуляторы. Так, например, при биопсии эмбриона двумя стеклянными иглами механически разрушают участок ZP и через полученное отверстие с помощью иглы для биопсии изымают бластомер или РТ. В последние годы разрабатываются методы лазерной микрохирургии эмбрионов.

Нами была разработана методика проведения микрохирургических операций на преимплантационных эмбрионах мыши с помощью лазерного пинцета (ЛП) и лазерного скальпеля (ЛС). Мы использовали установку на основе фемтосекундного хромфорстеритового лазера с длиной волны 620нм, импульсной мощностью 1-15мВт, длительностью импульсов 100фс и инвертированного микроскопа с эпи-положением лазерного луча, разработанную в отделе лазерной плазмы Объединенного института высоких температур РАН. Эмбрионы мыши 1,5-2,5сут. помещали в микрокаплю среды для манипуляций, покрывали минеральным маслом, для получения отверстия в ZP производили серию выстрелов в режиме «ЛС» и с помощью ЛП (длина волны лазерного излучения 1060нм) извлекали РТ. Для осуществления слияния бластомеров на стадии двух клеток также производили одиночные выстрелы в режиме «ЛС». Были подобраны параметры установки, при которых в наибольшем проценте случаев достигали слияния бластомеров. Так, если выстрел производили точно по линии контакта бластомеров при наведенном фокусе, то в не зависимости от энергии удара происходила гибель эмбриона в 90% случаев. В то же время, если выстрелы проводили при не наведенном фокусе, в 45% случаев происходило успешное слияние. Для визуализации процесса слияния мембранны эмбрионы окрашивали флуоресцентным красителем FM4-64 (F34653, Invitrogen) при +4°C и фиксировали 4% р-ром параформальдегида в ФБС, готовили тотальные препараты, которые изучали при помощи конфокального микроскопа (Axiovert 200M 510Meta, Zeiss, Германия). Для получения отверстия в ZP, достаточного для извлечения РТ и/или бластомера в среднем давали 10 импульсов (эффективность – 97%), а затем с помощью ЛП извлекали клетки. Эффективность биопсии при извлечении РТ – 50%.

Таким образом, проведение микроопераций при помощи системы лазерный скальпель – лазерный пинцет, представляется перспективной технологией для микрохирургии эмбрионов.

**Изучение структуры С-терминального домена CAP-комплекса дрожжей**  
по данным электронной микроскопии  
**Шаров Григорий Германович (Москва, sharov.grigory@gmail.com)**

Процессы сборки и разборки актиновых филаментов, а также направление и скорость роста регулируются не только концентрацией мономерного актина в определенных частях клетки, но и большим комплексом актин-связывающих белков (АСБ). В настоящее время известно более 160 АСБ. Большинство из них взаимодействует с фибрillярным F-актином и только некоторые с мономерным G-актином (в том числе CAP).

Белок CAP обнаружен в большинстве эукариотических клеток. Он представляет собой молекулярную машину – высокомолекулярный комплекс с актином, имеющий множество сайтов связывания с другими АСБ. Участвуя в процессе обновления актиновых филаментов, N- и С-фрагменты комплекса работают последовательно, освобождая молекулы актина и

кофилана. Получение пространственной структуры этого комплекса и объяснение механизма его работы является необходимой задачей для понимания функционирования актинового цитоскелета.

Для мономера САР известны кристаллические структуры отдельных доменов: N- (1S0P) и С-концов (1K4Z), но нет данных о пространственной структуре. Результаты аналитического ультрацентрифугирования позволяют предположить, что комплекс является гексамером с молекулярной массой около 600кДа из 12 молекул САР и актина в соотношении 1:1.

Целью данной работы является получение 3D реконструкции С-концевого фрагмента САР. Известно, что именно он ответственен за связывание мономерного актина.

С-САР домен представлен бета-спиральными участками. Известная кристаллическая структура фрагмента представляет собой димер, каждый мономер которого включает 6 правозакрученных бета-спиралей, окруженных антипараллельными бета-слоями.

Для изучения методом электронной микроскопии структуры С-САР (в комплексе с актином), полноразмерный комплекс САР с мономерным актином выделяли из дрожжей и наносили на сетки с углеродной подложкой. Негативно окрашенные сетки исследовали на микроскопе Philips CM12 в условиях низкой дозы (120кВ, увеличение  $\times 60000$ ). Отбор удачных изображений отдельных молекул С-САР для последующего построения 3D структуры проводился вручную с помощью программы Signature. На основе этих изображений после коррекции частотно-контрастной характеристики с помощью программы IMAGIC была получена объемная структура С-концевого домена САР. 3D структура С-САР имеет форму подковы с линейными размерами 12×9нм. Для интерпретации результатов проводили докинг кристаллических структур С-концевого домена САР и мономерного актина в полученную электронную плотность. Было показано, что 3D структура может вместить два мономера С-концевого домена, каждый из которых связан с одной молекулой актина. Молекулярная масса димерного комплекса С-САР с учетом двух молекул актина составляет около 150кДа, что соответствует рассчитанной массе 3D реконструкции. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в полноразмерном комплексе САР с актином С-концевые домены организованы в димеры, стабилизированные N-концевыми двойными спиралами.

Работа поддержанна грантами CRDF (№2918) и РФФИ (№08-04-91125).

### Разработка детоксикационных и антибактериальных препаратов на основе лишайникового сырья

Шеин Алексей Анатольевич (Якутск, bg98saa@yandex.ru)

Разработка и внедрение препаратов на основе уникального природного северного биосырья – слоевищ лишайников из родов цетрарии (*Cetraria*) и кладонии (*Cladonia*) относится к важнейшим фундаментальным и прикладным аспектам медицины. Различные варианты предэкстракционной подготовки лишайникового сырья позволяют получать препараты с различным физиологическим действием на организм человека.

Первое направление – разработка препарата детоксикационного действия “ЯГЕЛЬ”. Исследования связаны с применением технологии экстракции антиоксидантов (флавоноидов, ароматических кислот и пигментов, полиненасыщенных жирных кислот, хинонов), природных антибиотиков из смеси тканей лишайников кладины и цетрарии (ягель) в среде сверхкритического диоксида углерода. В сверхкритическом состоянии диоксид углерода способен активировать воду, проникать вместе с ней в нанопоры амино- $\beta$ -полисахаридов, где происходит гидролиз  $\beta$ -гликозидных связей и образуются амино- $\beta$ -олигосахариды, обладающие детоксикационным действием по отношению к катионам тяжелых металлов и карбонильным соединениям (альдегидам и кетонам).

Второе направление работы связано с разработкой препаратов антибактериального действия. Исследования связаны с применением механохимической стадии в технологическом цикле производства антибактериального препарата из слоевищ лишайников на этапе обработки сухого сырья и последующей водно-спиртовой экстракцией, что позволяет выделять более полную группу природных веществ антибиотического действия (ПВАД). При этом углеводосодержащие метаболиты (амино- $\beta$ -поли- и

олигосахариды) слоевищ лишайников образуют с ПВАД комплексы, представляющие собой типичные наноструктуры. Результаты клинических исследований показали высокую антибиотическую активность данного препарата даже в отношении лекарственно-устойчивых форм микобактерий туберкулёза.

**Молекулярные механизмы цитотоксичности наночастиц на основе  $\text{Au}^+$  и  $\text{Ag}^+$  на первичную культуру клеток карциномы Герена *in vitro***

**Шмараков И.А., Риджак Н.М., Свереда И.В.** (Черновцы, [igor.shmarakov@gmail.com](mailto:igor.shmarakov@gmail.com))

Современные подходы в коррекции онкогенеза основаны на использовании нанобиотехнологических препаратов (НЧ) на основе  $\text{Ag}^+$  и  $\text{Au}^+$ . Способ получения, форма, размеры и компонентный состав наночастиц определяют их метаболическую активность, а также возможные токсические эффекты, молекулярные механизмы которых требуют разноуровневого мониторинга. Цель работы – провести скрининговую оценку цитотоксичности наночастиц на основе  $\text{Ag}^+$  и  $\text{Au}^+$  на первичную культуру клеток карциномы Герена *in vitro*. После культивирования первичной культуры с наночастицами  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Au}^+$ ,  $\text{Ag}^+/\text{Au}^+$  через 6, 24, 48 часов оценивали их цито- и генотоксичность на основе определения жизнеспособности клеток в тесте с трипановым синим, уровня значений ЛДГ-«выготка», МТТ-теста и степени поврежденности ядерной ДНК методом микрогельэлектрофореза единичных клеток. Исследуемые наночастицы проявляли высокую цитотоксичность, снижая количество жизнеспособных клеток до 50% по сравнению с контролем уже через 6 часов после кокульттивирования. Часть жизнеспособных клеток в дальнейшем достигала 5-20% от контроля на 48 час инкубации. В то же время, наивысшей токсичностью владели композитные НЧ  $\text{Ag}^+/\text{Au}^+$  (жизнеспособных клеток 5%). Установленное повреждение мембран и некротическая гибель согласовывалась с возрастанием ЛДГ-«выготка» (4-7 мккат/мг) при низкой жизнеспособности клеток на 48 час инкубации и снижении метаболической активности. По данным проведенного комет-анализа максимальное повреждение ДНК, наблюдалось на 48 час инкубации с наночастицами  $\text{Ag}^+$  (индекс ДНК-комет (Идк) = 3,27) и композита  $\text{Au}^+/\text{Ag}^+$  (Идк = 3,3), в то время как менее генотоксичными были наночастицы  $\text{Au}^+$  (Идк = 2,8). Однако, на ранних этапах эксперимента после проведения микроэлектрофореза визуализировались кометы, соответствующие С0-С3 типам с моментом хвоста 50-100 мкм, свидетельствующим о гибели клеток по механизму апоптоза. На 48 час кокульттивирования резко возрастало количество комет С4 типа, значение момента хвоста которых (до 300 мкм) свидетельствовало о значительной деструкции генома, что, наряду с понижением общей метаболической активности, подтверждало некротический механизм гибели клеток. Таким образом, наивысшим цито- и генотоксическим эффектом по отношению к первичной культуре клеток карциномы Герена владеет нанокомпозит  $\text{Au}^+/\text{Ag}^+$ , что указывает на перспективность его использования, как противоопухолевого средства.

*Работа поддержанна Грантом Президента Украины для молодых учёных.*

## ПОДСЕКЦИЯ «БИОХИМИЯ»

### Состояние про- и антиоксидантного баланса в митохондриях сердца старых крыс при введении комплекса предшественников и модуляторов синтеза убихинона

Андреева А.С., Петухов Д.Н., Кучменко Е.Б. (Украина, Киев, [parpa@list.ru](mailto:parpa@list.ru))

Старение – физиологический процесс, связанный с морфологическими и функциональными изменениями в клеточных структурах, которые приводят в конечном этапе к прогрессивному дисбалансу регуляторных систем организма, в том числе гормональных, нейроэндокринных, и гомеостатических механизмов.

Одной из теорий старения является свободнорадикальная теория старения, которая предполагает, что старение является результатом повреждения тканей и органов вследствие действия свободных радикалов, что в свою очередь приводит к окислению липидов, белков, повреждению ДНК. Изменения баланса между активностью про- и антиоксидантных систем может привести к оксидативному стрессу.

Цель работы – исследовать действие комплекса предшественников и модулятора биосинтеза убихинона (CoQ), а именно витамина Е, пара-оксибензойной кислоты (предшественника синтеза бензохинонового ядра) и метионина (донара метильных групп в бензохиноновом ядре молекулы CoQ) на активность оксидоредуктазных систем и интенсивность свободнорадикальных процессов в митохондриях сердца старых крыс.

Объектом исследования были взрослые крысы-самцы в возрасте 6-7 месяцев и старые крысы-самцы в возрасте 24 месяца, которым в течение 10 дней перорально вводили комплекс предшественников и модулятора биосинтеза CoQ. После чего проводили декапитацию животных и выделяли митохондриальную фракцию сердца.

В митохондриях сердца определяли содержание витамина Е и CoQ, активность сукцинат- и NADH-CoQ-оксидоредуктазных систем. Состояние про- и антиоксидантных систем оценивали по содержанию ТБК-позитивных продуктов, диеновых конъюгатов и продуктов свободнорадикального окисления белков.

При введении комплекса предшественников и модуляторов биосинтеза CoQ наблюдается уменьшение NQR-активности в митохондриях сердца старых животных по сравнению с контрольными старыми животными. Исследование содержания витамина Е в митохондриях сердца старых крыс показало, что при введении исследуемого комплекса его содержание возрастает и значительно превышает этот показатель у взрослых животных. Вместе с тем наблюдается достоверное уменьшение в митохондриях сердца животных, которым вводили комплекс биологически активных веществ, содержания вторичных продуктов окисления липидов – ТБК-позитивных продуктов, по сравнению со старыми и взрослыми контрольными животными, которым не вводили комплекс. Результаты проведенных исследований показали, что введение комплекса предшественников и модуляторов биосинтеза CoQ приводит к достоверному уменьшению содержания продуктов свободнорадикального окисления белков в митохондриях сердца старых животных по сравнению со старыми контрольными животными.

Результаты исследования показывают, что при действии комплекса биологически активных веществ наблюдается коррекция возрастных изменений содержания CoQ, функционирования NADH-CoQ-оксидоредуктазных ферментных систем в митохондриях, интенсивности свободнорадикального окисления липидов и белков в митохондриях сердца.

### Роль матриксного белка фибулина-5 в регуляции функциональных свойств урокиназы

Аниол Наталья Владимировна (Москва, [koptelovaN@gmail.com](mailto:koptelovaN@gmail.com))

Фибулин-5 – это секретируемый внеклеточный матриксный гликопротеин, который связывается с троопластином и необходим для нормальной структурной организации эластина. Фибулин-5 также связывается с интегриновыми рецепторами ( $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha v\beta 5$ ,  $\alpha 9\beta 1$ ) и опосредует интегрин-зависимую клеточную адгезию и миграцию.

Ранее в нашей лаборатории было показано, что фибулин-5 связывается с протеолитическим доменом активатора плазминогена урокиназного типа (урокиназа или uPA) , который является ключевым регулятором системы внеклеточного протеолиза,

деградации и ремоделирования межклеточного матрикса. Известно, что урокиназа регулирует клеточную миграцию не только за счет протеолитического действия, но и путем активации внутриклеточной сигнализации. Рецептор урокиназы (uPAR) играет центральную роль в передаче сигнала от урокиназы внутрь клетки. Однако GPI-рецептор урокиназы лишен трансмембранныго и внутриклеточного доменов и поэтому не может самостоятельно запускать внутриклеточные сигнальные каскады. Считается, что активация сигнальных путей происходит опосредованно через некоторые трансмембранные рецепторы, с которыми взаимодействует uPAR. Особую роль среди таких посредников играют интегрины, рецепторы, ассоциированные с G-белками и тирозинкиназные рецепторы фактора роста EGFR. Однако механизмы внутриклеточной сигнализации урокиназы все еще до конца не ясны и нуждаются в изучении.

Мы предположили, что урокиназный тип активатора плазминогена стимулирует клеточную миграцию опосредованно через матриксовый белок фибулин-5. Для проверки данной гипотезы были исследованы две линии клеток: эмбриональные мышиные фибробласты дикого типа (MEFwt) и нокаутированные по гену фибулина-5 (MEFko). Оказалось, что адгезивные свойства и подвижность клеток MEFwt и MEFko различны. Клетки MEFko быстрее прикрепляются к субстрату, но медленнее движутся по сравнению с клетками дикого типа. Влияние урокиназы на клеточную подвижность было изучено в камере Бойдена и на модели царапины. Оказалось, что урокиназа стимулирует направленную миграцию клеток обоих типов по градиенту урокиназы, однако статистически достоверная разница в движении клеток под действием урокиназы по сравнению с контролем наблюдалась лишь у клеток дикого типа. Таким образом, полученные данные могут свидетельствовать об участии фибулина-5 в регуляции миграции клеток, вызванной урокиназой.

#### **Светособирающий комплекс LH2 из серной фотосинтезирующей бактерии *Ect. haloalkaliphyla* Ашихмин Александр Александрович (Орел, [alex-asch@rambler.ru](mailto:alex-asch@rambler.ru))**

Изучен светособирающий комплекс LH2, выделенный из мембран серной бактерии *Ect. haloalkaliphyla* методом ПАГЭ. Его спектр поглощения в ближней ИК области характеризуется двумя полосами при 800 и 850 нм. Полоса поглощения при 800 нм у данного комплекса была гомогенной, как у комплексов LH2 из несерных бактерий. В LH2 комплексе *Alc. minutissimum* полоса при 800 нм была гетерогенной (два компонента) и с этой характеристикой связывают способность комплексов собираться без каротиноидов. Основные каротиноиды комплексе LH2 из *Ect. haloalkaliphyla* – ангидрородовибрин (34%) и спириллоксантин (37%). Изучена возможность подавления синтеза каротиноидов *Ect. haloalkaliphyla* с помощью ДФА. Были выращены клетки с различным содержанием каротиноидов (60-70%, 35-45% и 25-30% от контроля). Определен состав каротиноидов во всех видах образцов. При концентрации ДФА 12 мг/л в среде выращивания были получены практически бескаротиноидные клетки (3-5% от контроля), которые содержали следы  $\zeta$ -каротина и OH-нейроспорина. Популяции комплексов LH2 из клеток с различным содержанием каротиноидов исследованы на гетерогенность состава. В любой из данных популяций присутствовала часть комплексов LH2 с более высоким содержанием каротиноидов, чем в исходной мемbrane. Они были более термоустойчивы и выделялись, как «выжившие» комплексы после нагревания мембран при 80°C. Полученные результаты согласованы с ранее имеющимися данными по гетерогенности LH2 комплексов у *Alc. minutissimum*.

Проведено встраивание экстрактов каротиноидов из бактерии *Alc. minutissimum* (основной каротиноид – родопин 68%) в бескаротиноидные хроматофоры *Ect. haloalkaliphyla*. Удалось добиться максимального встраивания ( $\approx 95\%$ ) по сравнению с контролем. Изучены спектры поглощения, КД, флуоресценции и возбуждения флуоресценции, а также фотоустойчивость, термостабильность полученных комплексов со встроенными каротиноидами. Данные характеристики соответствуют характеристикам комплекса LH2 из контрольных клеток.

**Активность ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы  
в плазме крови пациентов с мягким когнитивным снижением и болезнью Альцгеймера**  
**Багрова Д.И., Морозова А.Ю. (Санкт-Петербург, darushka87@gmail.com)**

Нарушения функционирования ЦНС, возникающие при когнитивных расстройствах и нейродегенеративных заболеваниях, таких как болезнь Альцгеймера, сопровождаются изменениями биохимических показателей активности ферментов в различных тканях и органах. С целью оценить активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ) и бутирилхолинэстеразы (БуХЭ) при нейродегенеративных и когнитивных расстройствах у человека была исследована плазма крови, как в наиболее доступный экспериментальный материал.

В работе исследована активность АХЭ и БуХЭ в плазме крови пациентов разного пола с диагнозом мягкого когнитивного снижения (МКС) и болезни Альцгеймера, характеризующихся разной степенью нарушений внимания и памяти.

Было показано, что у пациентов мужского пола с диагностированным МКС активность БуХЭ ( $0,256 \pm 0,008$  нмоль БуTX/мин/мг) выше активности БуХЭ пациентов с диагностированной болезнью Альцгеймера ( $0,107 \pm 0,001$  нмоль БуTX/мин/мг) в 2,4 раза. Показатели активности БуХЭ у пациентов мужского пола с диагнозом МКС сопоставимы по значениям активности с пациентами без нарушений внимания и памяти.

Исследование активности АХЭ и БуХЭ в плазме крови пациентов женского пола с диагностированным МКС показали, что активность БуХЭ снижается по сравнению с контрольной группой (с  $0,153 \pm 0,004$  нмоль БуTX/мин/мг белка до  $0,114 \pm 0,002$ ). После применения препарата – глиатилина, активность БуХЭ восстанавливается до контрольных значений ( $0,201 \pm 0,014$  нмоль БуTX/мин/мг белка). Достоверных изменений ( $p < 0,05$ ) в активности АХЭ не выявлено у представителей разного пола.

Полученные нами данные, свидетельствуют о различии в активности холинэстераз у пациентов разного пола с диагнозами МКС и болезни Альцгеймера. Вероятно, при назначении медикаментозного лечения пациентам с диагнозом МКС одним из факторов, который необходимо учитывать, является пол пациента. При своевременной диагностике и применении индивидуально подобранных лекарственных препаратов можно смягчить симптомы когнитивных нарушений и, возможно, развивающейся болезни Альцгеймера. Показатели биохимической активности ферментов получены нами на пациентах прошедших физиологический тест ADAS-cog (шкала оценки МКС и БА – когнитивная часть). Коэффициент ADAS-cog исследованных пациентов с МКС соответствует 2, а у пациентов с болезнью Альцгеймера колеблется от 15 до 49.

Таким образом, исследование ферментов АХЭ и БуХЭ в плазме крови человека позволяет оценить степень когнитивных нарушений, при развитии патологического состояния, такого как МКС и болезнь Альцгеймера. Работа поддержанна грантом РФФИ (№ 06-04-48414), и грантом Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» 2009-2010 и «Стипендия им. Л.А. Орбели» ИЭФБ РАН. Работа выполнена на базе Института Эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова, РАН, в лабораториях «Молекулярной эндокринологии» и «Сравнительной физиологии и патологии ЦНС», Санкт-Петербург.

**Исследование кинетических характеристик цитоплазматической  $\beta$ -глюкозидазы  
растений гороха**

**Баркалова Оксана Николаевна (Воронеж, oks-bar@mail.ru)**

$\beta$ -Глюкозидаза ( $\beta$ -D-глюкозидгидролаза, ЕС 3.2.1.21) избирательно катализирует гидролитическое расщепление  $\beta$ -глюкозидной связи между двумя остатками глюкозы или между глюкозой и арил- или алкил-агликоном. В растениях гороха обнаружена  $\beta$ -глюкозидаза, расщепляющая специфический для этого растения изосукцинимид- $\beta$ -глюкозид (ИС-глюкозид), агликоном которого является циклическое производное гамма-аминомасляной кислоты. Объектом исследования служили 10-дневные проростки гороха (Рамонский 77), из которых был получен электрофоретически гомогенный ферментативный препарат цитоплазматической  $\beta$ -глюкозидазы с удельной активностью  $731,7 \text{ E} \cdot \text{мг}^{-1}$  при высаливании сульфатом аммония и очисткой с помощью гель-хроматографии на G-25 и G-100. При исследовании субстратной специфичности цитоплазматической  $\beta$ -глюкозидазы

использовали раффинозу ( $\alpha 1 \rightarrow 6$  и  $\alpha 1 \rightarrow 2$  связи), целлобиозу ( $\beta 1 \rightarrow 4$ ), мальтозу ( $\alpha 1 \rightarrow 4$ ), лактозу ( $\beta 1 \rightarrow 4$ ), ИС-гликозид и  $\alpha$ -метил- $\beta$ -D-глюкозид в концентрациях  $10^{-10}$  мМ. Было показано, что фермент проявлял наибольшую активность, расщепляя ИС-гликозиды ( $K_m = 0,58$  мМ).  $\beta$ -Глюкозидаза не расщепляла раффинозу, лактозу и мальтозу, но проявляла высокую активность в присутствие  $\alpha$ -метил- $\beta$ -D-глюкозида ( $K_m = 0,76$  мМ). При анализе зависимости активности фермента от величины pH среды,  $V = f(pH)$  определили значения  $pK$  ионогенных групп белка, участвующих в акте катализа. Они соответствуют  $pK_1 = 4,3$  (близко карбоксильной группе) и  $pK_2 = 6,4$  (имидазольная гистидина ( $pK = 5,6-7,0$ )). Расчеты величины  $\Delta H$  оказались равными 5,6 кДж·моль $^{-1}$  и 33,9 кДж·моль $^{-1}$ , что соответствовало теплоте ионизации карбоксильной группы и имидазольной группы. Фотоинактивация фермента в присутствии метиленового синего и ДЭПК ( $10^{-6}$  мМ) доказали наличие имидазольной группы гистидина в активном центре фермента. Полученные результаты по изучению свойств цитоплазматической  $\beta$ -глюкозидазы растений гороха показали, что фермент обладает высокой специфичностью к типу расщепляемой связи субстратов и гидролизует только  $\beta 1 \rightarrow 4$  связи, отщепляя  $\beta$ -глюкопиранозильные остатки. В разрыве гликозидной связи субстратов принимают участие карбоксильная группа глутаминовой либо аспарагиновой кислот и имидазольная группа гистидина.

**Использование моноклональных антител к  $\alpha 1$ -субъединице  $Na,K$ -АТФазы  
в исследованиях механизмов адаптации фермента  
в почках гиберирующих сусликов *Spermophilus undulatus***  
**Басевич Евгений Викторович (Москва, basevichev@mail.ru)**

Состояние гипотермии, наблюдаемое у некоторых мелких млекопитающих в холодное время года, позволяет выживать в условиях недостатка кормов и воды. Зимняя спячка (гибернация) наступает из-за десяти- или даже стократного снижения уровня метаболизма относительно нормотермии, обеспечивающего энергосбережение. Однако и при вялом обмене веществ сохраняется необходимость периодически выводить накапливающиеся метаболиты при кратковременных пробуждениях. Таким образом, выделительная система во время гибернации функционирует в замедленном режиме, а основным потребителем АТФ в почках является  $Na,K$ -АТФаза.

Ранее показано, что при гибернации активность микросомальной  $Na,K$ -АТФазы из почек сусликов при 37°C снижается в 2–3 раза (Charnock, 1978; MacDonald, 1999; Басевич, 2008). В литературе высказывались предположения, что снижение активности  $Na,K$ -АТФазы связано с уменьшением содержания фермента в почках, однако убедительных доказательств приведено не было (Charnock, 1978). Поэтому в настоящей работе мы оценили количество  $Na,K$ -АТФазы в микросомальных препаратах по содержанию каталитической  $\alpha 1$ -субъединицы, единственной присущей почечной ткани. Так, методом иммуноблоттинга с использованием моноклональных антител к  $\alpha 1$ -субъединице  $Na,K$ -АТФазы с широкой межвидовой специфичностью (*Clone C464.6, Millipore 05-369*) показано, что при гибернации интенсивность белковой полосы с массой 102 кДа (мономер  $\alpha$ -субъединицы) снижается на 25% ( $p < 0,005$ ). Кроме того в качестве контроля были выявлены с помощью специфических антител полосы мембраносвязанного актина, количество которого при гибернации достоверно не изменялось ( $p > 0,15$ ). Таким образом, на фоне стабильного содержания клеточного белка актина, количество  $Na,K$ -АТФазы при гибернации уменьшается на четверть, что, однако, не объясняет описанное падение активности фермента в 2–3 раза.

Причиной снижения активности  $Na,K$ -АТФазы в почках сусликов при гибернации может быть агрегация фермента, описанная ранее для  $Ca$ -АТФазы саркоплазматического ретикулума скелетных мышц сусликов, активность которой в условиях гипотермии снижалась более чем в 2 раза (Малышева, 2001). Для оценки олигомерного состояния  $Na,K$ -АТФазы исследуемые препараты были обработаны с разной длительностью инкубации при 37°C сшивющим агентом о-фенантролином в комплексе с ионами меди, катализирующим образование ковалентных S–S-связей между близко расположенными молекулами белков. Наблюдалось прогрессивное уменьшение интенсивности полосы мономерной формы  $\alpha$ -субъединицы  $Na,K$ -АТФазы и появление полос олигомеров,

визуализированных методом иммуноблоттинга. При этом относительное количество спищих за час молекул фермента при гибернации было в 1,68 раза больше относительно нормотермии ( $p<0,001$ ). Таким образом, при гибернации почечная Na,K-АТФаза находится в более агрегированном состоянии, что наряду с показанным снижением тканевого содержания фермента обуславливает, по всей видимости, описанное падение активности Na,K-АТФазы. *Поддержано грантом РФФИ 08-04-00823.*

### **ОБМ-гидролизующая активность антител крови больных системной красной волчанкой** *Безуглова Анна Михайловна (Новосибирск, bezugaf@mail.ru)*

Известно, что у больных системной красной волчанкой (СКВ) на поздних стадиях заболевания в головном мозге томографией обнаружаются бляшки, сходные с таковыми у больных рассеянным склерозом (РС) – аутоиммунном заболевании человека, главным маркером которого является разрушение миелиновой оболочки нейронов. Из этих данных можно сделать предположение, что деструкции клеток головного мозга при этих заболеваниях имеют аналогичный механизм.

Целью работы является изучение и сравнение протеолитической активности абзимов крови больных СКВ и РС.

Из плазмы крови больных РС, СКВ и здоровых доноров получены гомогенные препараты антител (АТ). IgG крови больных аутоиммунными заболеваниями, в отличие от здоровых доноров, эффективно гидролизовали только основной белок миелина (ОБМ) и четыре соответствующих ему олигопептида, но не другие контрольные белки, причем катализитический центр расположен на легких цепях антител. Далее было проведено сравнение катализитических свойств протеолитических абзимов. Обнаружено, что АТ больных СКВ проявляют максимальную активность при pH 8. В то же время, сотрудниками нашей лаборатории было показано, что АТ РС имеют преимущественно два пика активности: при pH 6 и 9,5. Показано, что суммарный пул АТ, полученных из сыворотки крови больных СКВ, представлен в основном протеазами, зависимыми от металлов, в отличие АТ больных РС представленных в большей степени сериновыми протеазами. Ионы различных металлов при концентрации 2 мМ увеличивали глубину реакции гидролиза в следующем порядке:  $\text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$  в случае АТ из крови больных СКВ. Несколько иной порядок:  $\text{Mg}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Fe}^{2+}$  наблюдался для АТ из крови больных РС. Для четырех лучших активаторов:  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  и  $\text{Co}^{2+}$ , были сняты концентрационные зависимости, которые имели колоколообразный характер и заметно отличались для препаратов больных РС и СКВ.

С помощью метода фагового дисплея и библиотеки кДНК легких цепей антител больных СКВ наработан пул клонов, синтезирующих легкие цепи антител. Аффинной хроматографией на ОБМ-сепарозе фаговые частицы, продуцирующие легкие цепи АТ против ОБМ, разделены на фракции, отличающиеся сродством к ОБМ. Получены моноклональные легкие цепи.

### **Влияние солевого стресса на функционирование ферментов метаболизма малата в диффирицированных тканях сорго** *Бессмельцева Юлия Сергеевна (Воронеж, djuta@mail.ru)*

Наличие широкого спектра ферментов, принимающих участие в утилизации малата, позволяет ей играть существенную роль в поддержании внутренних физиологических условий клеток при стрессовом воздействии, что даёт организму дополнительные адаптационные возможности. В связи с этим, целью нашей работы было изучение влияния засоления на работу ферментов малатдегидрогеназной (МДГ) системы в клетках мезофилла и обкладки сорго, относящегося к C4-растениям. Объектом служили 14-дневные проростки сорго зернового (*Sorghum bicolor* L.), выращенные гидропонно. Солевой стресс моделировали 150мМ раствором NaCl, контролем служили образцы, экспонированные в воде. Мезофилл и обкладку разделяли по Клечковскому. Активность малатдегидрогеназ определяли спектрофотометрически при длине волны 340 нм. Содержание малата определяли энзиматически, используя коммерческий препарат МДГ аналитической чистоты.

Полученные данные позволяют говорить о значительных перестройках в работе МДГ-системы в клетках мезофилла и обкладки сорго под действием засоления. Показана активация НАД<sup>+</sup>-зависимых ферментов в клетках мезофилла, очевидно связанная с эффектом “солевого дыхания”. Кроме того, увеличение активности этих ферментов при стрессе необходимо для синтеза малата, способного поддерживать осмотический баланс клетки. Установлено увеличение содержания малата в мезофилле сорго первые 6 часов солевого воздействия с последующим снижением его содержания, что вероятно является результатом усиления декарбоксилирования малата. В обкладке указанные эффекты были менее выражены по сравнению с мезофиллом. Обнаружено усиление работы НАДФ<sup>+</sup>-зависимого малик-энзима в мезофилле сорго и НАДФ<sup>+</sup>-зависимой МДГ в его обкладке, что указывает на негативное влияние стрессора на скорость работы цикла Хэтча-Слейка. Мы предполагаем, что именно НАДФ<sup>+</sup>-МДГ обеспечивает в накопление малата в клетках обкладки опытных растений. Таким образом, индуцированные засолением изменения в работе МДГ системы главным образом направлены на интенсификацию цикла Кребса, необходимую для энергизации клеток, и на дополнительный синтез малата, способного выполнять осмолитические функции. Исследуемая ферментная система в клетках мезофилла сорго более лабильна в стрессовых условиях по сравнению с обкладкой.

**Специфичность мест встраивания каротиноидов в светособирающий комплекс  
B800-850 из *Alc. minutissimum***

**Большаков Максим Александрович** (Пущино, *lfbv22@rambler.ru*)

Цель работы – исследовать избирательность встраивания каротиноидов в комплекс LH2 из серной фотосинтезирующей бактерии *Alc. minutissimum*. Упрощенная схема спириллоксантинового пути биосинтеза каротиноидов представлена следующей цепочкой: – ликопин – родопин – дидегидородопин – ангидрородовибрин – родовибрин – спириллоксантин. В комплексе LH2 *Alc. minutissimum* основным каротиноидом является родопин. В него встраивали каротиноиды из более поздних этапов биосинтеза (спириллоксантин, ангидрородовибрин из *Rps. rubrum*).

Бескаротиноидные мембранные выделяли из клеток *Alc. minutissimum*, выращенных с ДФА (12 мг/л). Каротиноиды из *Rps. rubrum* выделяли методом экстракции ацетон/метанольной смесью с последующим переводом в петролейный эфир и высушивали током аргона. Состав экстракта: спириллоксантин 88%, родопин 8,7% и ангидрородовибрин 3,3%. Встраивание проводили путем дробного добавления экстракта каротиноидов в ацетон/метаноле (A490=0,7) к бескаротиноидным хроматофорам *Alc. minutissimum*, с последующим диализом для удаления растворителей. Анализ каротиноидного состава проводили методом ВЭЖХ на колонке Spherisorb ODS2, используя детектор с диодной матрицей SPD-M20A. Спектры поглощения образцов регистрировали на спектрофотометре Cary 50.

Максимальное увеличение полосы поглощения каротиноидов (~30% от контроля) получено при 3-х кратном добавлении экстракта. В этом случае в LH2 комплекс встраивался преимущественно родопин. Дальнейшее добавление экстракта вызывало быстрое разрушение LH2 комплекса и в его спектре поглощения присутствовало значительное количество мономерного БХЛ (полоса при 780 нм). Реэлектрофорез этой фракции, позволил выделить небольшое количество LH2 комплекса, в котором основным каротиноидом был спириллоксантин (36,5%). Чтобы доказать специфичность встраивания каротиноидов в LH2 комплекс, использовали смесь экстрактов из *Rps. rubrum* и *Alc. minutissimum* (основной каротиноид – родопин) в разном соотношении (1:1 и 1:4). В комплекс LH2 встраивался преимущественно родопин. В LH1 комплекс всегда встраивался спириллоксантин, даже при условии, что его было недостаточно для максимального встраивания. Обсуждаются процессы встраивания каротиноидов в комплексы LH2 *in vivo*.

## Клонирование и экспрессия рекомбинантного N-концевого фрагмента IGFBP-4 в клетках *E. coli*

Бродская О.М., Агаронян К.М. (Москва, olga3511@yandex.ru)

Белок IGFBP-4 является специфичным субстратом для протеазы PAPP-A, присутствующей в нестабильных атеросклеротических бляшках в виде димерной активной формы. PAPP-A расщепляет IGFBP-4 на единственном участке белка между остатками Met135 и Lys136. Предполагается, что наличие в крови расщепленной формы IGFBP-4, как маркера активности PAPP-A, может свидетельствовать о риске возникновения острого коронарного синдрома. Поэтому тест-система антител для детектирования расщепленной формы IGFBP-4 может служить инструментом для диагностики патологических состояний, связанных с сердечной недостаточностью. Для адекватного определения концентрации фрагментов IGFBP-4 в крови пациентов в качестве калибраторов необходимо использовать очищенные фрагменты IGFBP-4. Получение фрагментов IGFBP-4 с помощью протеолиза PAPP-A или в эукариотической экспрессионной системе неэффективно, поскольку выход конечного продукта в обоих случаях достаточно низкий. Более эффективным с этой точки зрения подходом является получение фрагментов IGFBP-4 в бактериальной системе экспрессии *E. coli*. Таким образом, целью нашей работы было получение рекомбинантного N-концевого фрагмента IGFBP-4 в экспрессионной системе *E. coli*.

кДНК N-IGFBP-4 была получена методом ПЦР реакции со специфическими праймерами. Полученные фрагменты были встроены в вектор pET22b+ для экспрессии в клетках *E. coli*. При встраивании фрагмента по сайтам рестрикции NcoI и XbaI рекомбинантный белок содержал сигнальную *pep* последовательность для экспорта в периплазму; при встраивании по сайтам NdeI и XbaI белок не содержал сигнальной последовательности и накапливался в цитоплазме клетки. Рекомбинантный N-IGFBP-4 был экспрессирован в клетках *E. coli* штаммов BL21pLysS, Rosetta и Origami и идентифицирован методами электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия и иммуноблоттинга с использованием специфических антител к N-IGFBP-4. В дальнейшем клетки экспрессионных культур были подвергнуты фракционированию для анализа распределения рекомбинантного белка между растворимой фракцией и фракцией телос включения методами электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия и иммуноблоттинга. Было показано, что рекомбинантный N-IGFBP-4 присутствует в растворимой и нерастворимой формах в клетках всех использованных штаммов *E. coli*. Иммунохимическая активность рекомбинантного N-IGFBP-4 была проанализирована методом иммунного анализа «сэндвич» типа. Таким образом, в результате нашей работы были получены молекулярно-генетические конструкции для экспрессии рекомбинантного N-IGFBP-4 в периплазме и цитоплазме *E. coli*, проведена тестовая экспрессия рекомбинантного N-IGFBP-4 в клетках различных штаммов *E. coli*, и показана иммунохимическая активность рекомбинантного белка. Полученный рекомбинантный N-IGFBP-4 может быть использован в качестве стандарта при измерении концентрации расщепленного IGFBP-4 в крови пациентов. *Авторы выражают признательность к.б.н. Д.В. Серебряной за помощь в работе и подготовке тезисов.*

## Изменчивость цитохромов P450 микобактерий комплекса *Mycobacterium tuberculosis* Василевская Анна Викторовна (Белоруссия, Минск, vasilevskaya@iboch.bas-net.by)

Туберкулэз – инфекционное заболевание, от которого ежегодно умирает около 8 млн. человек. Особое опасение вызывает тот факт, что постоянно увеличивается число штаммов микобактерий, устойчивых к противотуберкулэзным препаратам. Устойчивость к действию лекарственных препаратов обусловлена либо модификацией белка мишени лекарства, либо метаболизмом данного препарата. Цитохромы P450 (P450) выполняют ключевые функции в метаболизме микобактерий и потенциально могут участвовать в деградации большинства противотуберкулэзных препаратов. Изменчивость данных ферментов может рассматриваться как один из возможных путей возникновения новых форм микобактерий, устойчивых к действию лекарственных препаратов.

Сравнение последовательностей *M. tuberculosis* и *M. bovis* позволило определить отличия в генах, кодирующих цитохромы P450: ген *cyp51* – T342C; ген *cyp125* – C1125T; ген *cyp132* –

G404T; ген *cyp135A1* – C298T (АК замена H100Y); ген *cyp136* – C951T; ген *cyp136* – A1334G (АК замена D445G); ген *cyp137* – G406C (АК замена E136Q); ген *cyp139* – C84T; ген *cyp144* – C972G (АК замена H324Q). Результаты исследований показали относительную консервативность структуры и состава P450 микобактерий комплекса *M. tuberculosis*, что, по-видимому, обусловлено участием данных ферментов в росте и развитии патогенных микобактерий.

Кроме того, нами было проведено секвенирование и анализ точечных мутаций генов P450 у различных изолятов *M. tuberculosis* и *M. bovis*, а также форм микобактерий, устойчивых к противотуберкулёзным препаратам. В результате анализа клинических образцов были обнаружены следующие точечные мутации: *cyp139 M. bovis* – G1143A; *cyp144 M. bovis* – A534G; *cyp143A1 M. bovis* – A1160C (АК замена N387T); *cyp141 M. tuberculosis* (клинический изолят устойчивый к амикацину и капреомицину) – A469G (АК замена K157E). Следует отметить, что большинство АК замен расположено в лиганд-связывающей области ферментов (области, прилегающие к регионам SRS1, SRS2, SRS5, SRS6, а также области, ответственной за координацию атома железа – область  $\alpha$ L спирали). Локализация АК замен в области субстрат-связывающего канала и активного центра фермента может говорить о потенциальном участии данных замен в определении специфичности P450 микобактерий по отношению к субстратам или ингибиторам, что обуславливает более благоприятную жизнедеятельность микобактерий в определённом организме, или связано с увеличением степени резистентности к действию определенных групп противотуберкулёзных препаратов.

Таким образом, P450 (исследование структуры, метаболического профиля и поиск изоферментных различных резистентных и нерезистентных микобактерий), может быть перспективным направлением в области диагностики и лечения туберкулёза. Дальнейшее исследование значительно упростит процесс создания новых противотуберкулёзных препаратов, механизм действия которых связан с P450, а также поможет выяснить механизмы участия данных ферментов в жизнедеятельности и патогенезе микобактерий.

### **Изучение экспрессии рекомбинантного PAPP-А в клетках культуры НЕК с использованием сигнального пептида Markov**

**Гладышев Г.В., Кулебякин К.Ю.** (Москва, GG.Nurfed@gmail.com)

Димерная форма белка плазмы крови А, ассоциированного с беременностью (dPAPP-А), является биомаркером дестабилизации атеросклеротических бляшек, что позволяет использовать её для ранней диагностики такого серьезного заболевания, как острый коронарный синдром (Bayes-Genis et al., 2001). Для иммунохимического определения концентрации dPAPP-А в крови пациентов необходим калибратор, в качестве которого может быть использован рекомбинантный dPAPP-А. Таким образом, создание новых и улучшение существующих систем получения рекомбинантного dPAPP-А представляет собой актуальную задачу с прикладной биомедицинской точки зрения.

Одним из возможных способов модификации систем экспрессии рекомбинантного dPAPP-А является использование сигнального пептида секреции, предсказанного *in silico* при помощи hidden Markov model (Markov) (Barash et al., 2002). Этот сигнальный пептид был предсказан на основании анализа 416 сигнальных пептидов и теоретически должен обладать повышенной эффективностью. Таким образом, целью данной работы было исследование экспрессии рекомбинантного dPAPP-А в зукариотических клетках линии НЕК, с использованием сигнального пептида Markov.

Нуклеотидная последовательность ДНК, кодирующая фрагмент PAPP-А вместе с сигнальным пептидом Markov, была вначале встроена в вектор PBC SK+, содержащий недостающий фрагмент гена PAPP-А, по сайтам рестрикции HindIII и EcoRI для получения кДНК полноразмерного PAPP-А. Затем кДНК полноразмерного PAPP-А была встроена в вектор pCEP4 для зукариотической экспрессии в клетках по сайтам рестрикции HindIII и NotI. Полученную плазмиду использовали для трансфекции клеточной линии НЕК с помощью трансфекционных реагентов Fugene, Lipofectamin 2000 и Unifectin 56. В качестве контроля сравнения использовали плазмиду для экспрессии рекомбинантного PAPP-А с

сигнальным пептидом активатора плазминогена. Методом иммуноферментного анализа было показано, что экспрессия и секреция рекомбинантного dPAPP-А с сигнальным пептидом Markov происходит в 10 раз эффективнее, чем с сигнальным пептидом активатора плазминогена. Наиболее высокие уровни экспрессии dPAPP-А, – около 200 нг  $\text{мл}^{-1}$  день $^{-1}$ , наблюдаются в случае использования реагента Unifectin 56.

Таким образом, в результате нашей работы была получена плазмида и подобраны условия для эукариотической экспрессии рекомбинантного PAPP-А. Экспрессия и секреция рекомбинантного dPAPP-А в случае сигнального пептида Markov происходит гораздо эффективнее, чем в случае сигнального пептида активатора плазминогена.

*Авторы выражают признательность к.б.н. Серебряной Д.В. и д.б.н. Катрухе А.Г. за ценные советы и помочь в подготовке тезисов.*

### **Структурные особенности цитопротекторных соединений простаноидной природы**

*Губич Оксана Игоревна (Белоруссия, Минск, Hubich\_Oksana@mail.ru)*

$\text{CCl}_4$  – хорошо известный гепатотоксин, являющийся причиной случайных, суицидальных и профессиональных интоксикаций. Поступление  $\text{CCl}_4$  в организм человека и высших животных вызывает некроз клеток печени, что лежит в основе последующего развития цирроза печени и летального исхода. В исследованиях, выполненных нами ранее, показана способность ряда синтетических аналогов простагландинов (ПГ), синтезированных в Лаборатории химии простагландинов ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларусь», проявлять выраженные гепатопротекторные эффекты *in vitro*.

Целью данной работы явилось изучение связи структура-цитопротекторная функция в ряду синтетических аналогов ПГ групп В, Н и Е на клеточной модели повреждения печени  $\text{CCl}_4$ . В ходе работы выявлено 7 аналогов ПГВ, 3 производных ПГН и 2 11-дезокси-аналога ПГЕ1, снижавших индекс цитотоксичности для  $\text{CCl}_4$  более, чем в 2 раза, и оказавшихся более эффективными, чем такие известные гепатопротекторы, как силимарин, куркумин и ПГ12. Эти простаноиды снижали образование триеновых конъюгатов в клеточных мембранах на 25-95% и предотвращали утечку лактатдегидрогеназы через плазматические мембранны.

Структурно-функциональный анализ данных соединений позволил выявить следующие закономерности: 1) синтетические аналоги ПГВ являются более сильными гепатопротекторами, чем простаноиды Н и Е-группы; 2) присутствие 2-пиридила при C15 в  $\omega$ -цепи простаноида серии Н играет первостепенную роль в проявлении им свойств цитопротектора; 3) среди аналогов 11-дезокси-ПГЕ1 наиболее активные соединения обладают фенильным циклом при C15, соединенным с C13 изоксазолином или C13 изоксазолом; 4) C13- циклогексиламин или C15 фенильная группировка в  $\omega$ -цепи и метоксильная группа в  $\alpha$ -цепи необходимы для проявления простаноидами типа В протекторной активности.

*Работа выполнена в рамках программы ГПОФИ «Физиологически активные вещества» (задание 3.16). Автор выражает глубокую благодарность к.б.н., доценту Шолуху М.В. за помочь в выполнении работы.*

### **Прооксидантно-антиоксидантное равновесие в печени крыс при длительном угнетении желудочной секреции соляной кислоты**

*Дворченко Е.А., Сенин С.А. (Украина, Киев, k21@univ.kiev.ua)*

Длительное использование ингибиторов кислотной секреции желудка при лечении гиперацидных состояний снижает выделение сектретина и холецистокинина, что угнетает желчную секрецию, вызывая нарушения в гепатобилиарной системе. Неспецифическим механизмом структурно-функциональных изменений клеток при патологии является нарушение баланса между образованием активных форм кислорода и их нейтрализацией. Последнее приводит к активации процессов перекисного окисления липидов и, как следствие, к повреждению мембранных структур гепатоцитов.

Целью наших исследований было изучить состояние окислительно-антиоксидантного равновесия в печени крыс в условиях длительного угнетения секреции соляной кислоты.

Эксперименты проведены на белых нелинейных половозрелых крысах-самцах. Гипоацидное состояние моделировали внутрибрюшинным введением 14 мг/кг “Омеза®” (1 раз в сутки) на протяжении 28 дней. В качестве контроля использовали крыс, которым на протяжении 28 суток вводили внутрибрюшинно 0,2 мл воды для инъекций. Изучение показателей окислительно-антиоксидантного баланса в гомогенате печени проводили через сутки после последнего введения “Омеза®”. Липиды экстрагировали по методу Фолча хлороформ-метанольной смесью (2:1, по объему). Спектры функциональных групп липидов снимали на инфракрасном Фурье-спектрометре “Nexus” (“Thermo Nicolet”, США), оборудованным датчиком DTGS. Измерение площадей пиков на инфракрасных спектрах проводили с использованием программного обеспечения прибора OMNIC (версия 5.1). Содержание диеновых конъюгатов (ДК) определяли в гептан-изопропанольном экстракте спектрофотометрическим методом, шиффовых оснований (ШО) – флуориметрическим методом, ТБК-активных соединений (ТБК-АС) – по реакции с тиобарбитуровой кислотой. Оценку активности супероксидисмутазы (СОД) проводили с использованием нитросинего тетразолия, каталазы – по уменьшению количества  $H_2O_2$  в растворе после инкубации в оптимальных условиях.

После длительного угнетения секреции соляной кислоты омепразолом, в печени крыс установлены изменения в структурной организации липидов: возрастало содержание гидроксильных групп – 2,4 раза; альдегидных групп – в 1,7 раза, фосфатных групп – в 1,4 раза и транс-изомеров – в 1,2 раза, при этом снижалось количество карбонильных групп – в 1,3 раза и цис-изомеров – в 1,5 раза относительно контроля. Показано, что после 28-суточного введения животным “Омеза®”, содержание продуктов пероксидации липидов увеличивалось: ДК – в 2,2 раза, ТБК-АС – в 1,7 раза и ШО – в 1,6 раза относительно контроля, при одновременном снижении активности ферментов антиоксидантной защиты: СОД и КАТ – в 1,2 раза по сравнению с контролем.

Результаты проведенных исследований показали, что длительное гипоацидное состояние приводит к сдвигу окислительно-антиоксидантного равновесия в гепатоцитах в сторону интенсификации процессов свободнорадикального окисления липидов, что свидетельствует о развитии оксидантного стресса в клетках печени.

*Выражаем благодарность Остапченко Людмиле Ивановне и Береговой Татьяне Владимировне за предоставленную возможность проведения наших исследований.*

#### **Антиоксидантные и прооксидантные свойства некоторых флавоноидов** *Долгодилина Елена Викторовна (Белоруссия, Минск, leka.dol@mail.ru)*

Окисление чужеродных веществ, поступающих в организм, часто сопровождается образованием радикальных продуктов реакции. Наиболее эффективным средством защиты организма от патологического действия активных форм кислорода (АФК) и других радикальных продуктов являются антиоксидантные вещества фенольной природы, к которым относятся и флавоноиды. Биологическая активность флавоноидов обусловлена наличием реактивных гидроксильных и карбонильных групп. Наряду с антиоксидантным действием флавоноиды могут проявлять и прооксидантную активность.

Нами было изучено влияние кверцетина, гесперетина, эпикатехина – структурно близких, но отличающихся степенью окисленности флавоноидов – на интенсивность перекисного окисления лецитина. Установлено, что при индукции ПОЛ системой Фентона флавоноиды в диапазоне концентраций 0,1-100 мкМ проявляют прооксидантные свойства. Наиболее эффективно кверцетин проявляет прооксидантную активность в концентрации 0,5 мкМ, гесперетин – 0,1 мкМ, эпикатехин – 1 мкМ. При индукции перекисного окисления липидов  $Fe^{2+}$  кверцетин ингибирует накопление ТБК-активных продуктов. В тех же условиях гесперетин проявляет антиоксидантные свойства в концентрации 1 мкМ, а в более высоких концентрациях оказывает прооксидантное действие. Эпикатехин обладает прооксидантной активностью в данной системе индукции ПОЛ в концентрациях больших 50 мкМ. При изучении влияния флавоноидов на процесс пероксидазного окисления 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБД) было установлено, что кверцетин и эпикатехин проявляют антиоксидантное действие и приводят к снижению начальной скорости реакции, а гесперетин

не проявляет ни антиоксидантной, ни прооксидантной активностей. При изучении возможности пероксидазного окисления кверцетина, эпикатехина и гесперетина было установлено, что только первые два являются субстратами для пероксидазы. Итак, в описанных выше модельных системах исследованные флавоноиды проявляют как антиоксидантное, так и прооксидантное действие, причём особенности их действия зависят от структуры и концентрации в реакционной смеси.

### **Влияние митохондриально-направленных антиоксидантов на окислительный стресс и гибель клеток животных в культуре**

*Долудин Юрий Валерьевич (Москва, stryider@rambler.ru)*

В настоящее время является общепризнанным мнение о том, что митохондрии в клетке являются основными источниками активных форм кислорода (АФК). В норме в результате функционирования защитных антиоксидантных систем клетки продукция АФК поддерживается на определенном, невысоком уровне. Повышенная продукция АФК приводит к развитию окислительного стресса и гибели клеток. В нашей лаборатории были разработаны митохондриально-направленные антиоксиданты, названные SkQ, состоящие из проникающего катиона (трифенилfosфония), конъюгированного с пластохиноном. Так же был синтезирован флуоресцентный аналог антиоксиданта, названный SkQR1, где в качестве проникающего катиона использовали родамин 19.

Нами были проведены серии опытов по исследованию динамики накопления SkQR1 в культурах опухолевых клеток HeLa, подкожных фибробластов человека и мезенхимальных мультипотентных стромальных клетках (ММСК). По нашим данным, накопление антиоксидантов в митохондриях происходило в течение двух часов. Повышение времени инкубации клеток в присутствии антиоксидантов не вызывало увеличение накопления SkQR1. Отмывка клеток от антиоксидантов приводила к выходу SkQR1 из митохондрий. Добавление разобщителя мембранныго потенциала митохондрий FCCP препятствовало накоплению антиоксидантов и способствовало более быстрому выходу SkQR1 из митохондрий после отмычки. В литературе было описано явление, получившее название множественной лекарственной устойчивости (МЛУ), представляющей собой процесс активного неспецифического откачивания гидрофобных молекул из клетки в результате активности транспортного белка Р-гликопротеина. Нами было обнаружено, что ингибиование МЛУ приводило к незначительному увеличению накопления SkQR1 в клетках фибробластов и ММСК, в то время как в культурах опухолевых клеток наблюдалось почти двукратное увеличение накопления антиоксидантов.

Нами были проведены эксперименты по исследованию защитного действия SkQ в условиях окислительного стресса, вызванного пероксидом водорода, на культурах клеток HeLa и фибробластов. Было обнаружено, что двухчасовая прейнкубация клеток с антиоксидантами в наномолярной концентрации не способствует снижению уровня продукции АФК в митохондриях и защищает клеток от гибели. Для достижения защитного эффекта SkQ требовалось более длительное время прейнкубации, и для фибробластов оно составляло сутки. Для опухолевых клеток HeLa требовалась недельная прейнкубация.

### **Получение 3-гидроксипроизводных ненасыщенных жирных кислот, их действие на биохимические процессы грибов**

*Дородникова Елена Александровна (Москва, lenchik88878@mail.ru)*

Продукты окисления природных полиненасыщенных жирных кислот играют важную биологическую роль в процессах роста и размножения грибов и являются сигнальными соединениями в отношениях хозяин-патоген. Поэтому изучение механизма действия оксипептидов в жизненно важных процессах развития грибов, в частности, процессах адаптации и внешнего стресса, является актуальным. Ранее были опубликованы исследования, показавшие важную роль 3-гидрокси-эйкозатетраеновой кислоты (3-НЕТЕ) в сигнальных ответах грибов. Целью нашей работы было изучение действия 3-НЕТЕ, добавленной к культуре в разных концентрациях, на рост, дифференцировку и жизненные

характеристики аскомицета *Neurospora crassa*, выбранного в качестве наиболее изученной модели.

3(R)-Гидрокси-(5Z,8Z,11Z,14Z)-эйкозатетраеновая кислота была наработана в препартивных количествах с использованием ацетиленовой стратегии синтеза, ключевым моментом которой является реакция кросс-сочетания терминальных ацетиленовых фрагментов и синтонов пропаргильного типа. Были проведены исследования индикативных характеристик стресса у грибов под воздействием разных концентраций 3-НЕТЕ: изменение содержания карбонильных групп в белках мицелия гриба и концентрации каротиноидов при световом инкубировании. Применяемые биохимические методики позволяют рассчитывать количественные характеристики на основе спектрофотометрических данных. Было показано, что микромолярные концентрации 3-НЕТЕ влияют на содержание каротиноидов у *N. crassa* дозозависимым образом, оптимальной для выработки каротиноидов оказалась концентрации 5-10 мкМ. Было определено повышение содержания карбонильных групп в белках под влиянием 3-НЕТЕ в микромолярных концентрациях (1-5 мкМ), что указывает на развитие оксидативного стресса у грибов.

Исследование мицелия гриба на разных стадиях роста при помощи микроскопа позволило установить, что добавление 3-НЕТЕ в питательную среду снижает скорость роста гиф, усиливая при этом их агрегацию, а также ингибирует спорообразование *N. crassa*.

Особую благодарность выражают к.х.н. с.н.с. Грозе Н.В. (МИТХТ им. М.В.Ломоносова) и д.б.н. проф. Белозерской Т.А. (Институт биохимии им. А.Н.Баха) за помощь в проведении исследований и интерпретации результатов.

**NADH:убихинон оксидоредуктаза (комплекс I) из митохондрий мозга**  
**Калашников Денис Сергеевич (Москва, denis.kalashnikov@gmail.com)**

Комплекс I, или митохондриальная протон-транслюцирующая NADH:убихинон оксидоредуктаза (ЕС 1.6.99.3) наиболее сложно устроенный компонент дыхательной цепи. Каталитические свойства и механизмы регуляции фермента полно изучены с использованием препаратов полученных из сердца млекопитающих или на примере прокариотических гомологов фермента, NDH-1. Нескен вопрос о различиях в каталитических свойствах и возможной специфика регуляции комплекса I из различных тканей в норме и патологии. Мы впервые получили препарат сопряженных субмитохондриальных частиц из митохондрий мозга свиньи (М-СМЧ). М-СМЧ катализируют NADH-оксидазную (0,8 мкмоль/мин на мг белка) и NADH:Q<sub>1</sub>-редуктазную реакции (0,6 мкмоль/мин на мг белка) чувствительные к ротенону (30 °C и pH 8,0). Величина дыхательного контроля сопряженных с помощью олигомицина М-СМЧ при окислении NADH составляет 5 в присутствии БСА (2 мг/мл в пробе) и 6-7 в присутствии подобранной концентрации poly-Lys, но в отсутствие БСА. Дыхательный контроль ~3, когда субстратом дыхания является сукцинат. Содержание комплекса I в препарате (0,06 нмоль/мг) оценили с помощью титрования NADH-оксидазной активности М-СМЧ с помощью пиерицидина, ротенона и NADH-OH, специфического ингибитора, прочно связывающегося с активным центром фермента. Содержание цит. а в полученном препарате составляет 0,17-0,19 нмоль/мг белка (для расчетов использовали миллимолярный коэффициент экстинкции  $\Delta A_{605-630}$  равный 24/cm). По стимуляции каналообразующим антибиотиком аламетицином NADH-оксидазной активности в присутствии разобщителя оценивали содержание правильно ориентированных (inside-out) М-СМЧ, составляющее ~70%. Мы обнаружили, что пальмитиновая кислота в присутствии Ca<sup>2+</sup> приводит к необратимому ингибированию NADH:Q<sub>1</sub>-редуктазной активности М-СМЧ при щелочных значениях pH. Ингибирование развивается со временем и приводит к выходу части субъединиц комплекса I в супернатант, на что указывает обнаруженная нами в супернатанте NADH:гексааминорутений-редуктазная активность. С помощью электрофореза по методу Лэммли в супернатанте обнаруживается полоса с кажущейся молекулярной массой порядка 56 кДа. Это указывает на то, что под действием пальмитиновой кислоты происходит солубилизация FP-фрагмента комплекса I, Ca<sup>2+</sup> способствует этому. Эффект специфичен для пальмитиновой кислоты, по сравнению с другими длинноцепочечными жирными кислотами, не связан с действием пальмитиновой

кислоты на переходы между активной и деактивированной формами комплекса I. Накопление длинноцепочечных жирных кислот в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  может способствовать ингибированию активности комплекса I в митохондриях при ишемии. Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ 08-04-00594 и NIH Fogarty 5R03TW007825.

### Окислительное фосфорилирование в мембранах суббактериальных частиц

*Paracoccus denitrificans*

**Кегярикова Карина Александровна** (Москва, Karibok@gmail.com)

Прочно-сопряженные суббактериальные частицы *Paracoccus denitrificans* способны к зависимому от энергизации мембранны и генерирующему протон-движущую силу гидролизу АТР. Стационарный гидролиз АТР протекает через упорядоченный механизм, согласно которому после акта гидролиза АТР в первую очередь из активного центра диссоциирует ADP, после чего протекает необратимая диссоциация  $\text{P}_i$ . Нами было показано, что связывание субстратов (ADP и  $\text{P}_i$ ) в реакции синтеза АТР, катализируемой  $\text{F}_0\text{-F}_1$  АТРазой *P. denitrificans*, протекает неупорядоченно. Сравнение стационарной кинетики гидролиза и синтеза АТР показало, что обратимость  $\text{F}_0\text{-F}_1$  АТРазы не может быть описана функционированием одной и той же молекулы фермента. Для дальнейшего развития данной гипотезы, мы регистрировали параллельно синтез АТР, генерацию мембранныго потенциала и дыхание СБЧ *P. denitrificans*. Добавление СБЧ в среду, содержащую NADH, сопровождалось генерацией мембранныго потенциала. Инициация синтеза АТР добавлением ADP было сопряжено с резким падением мембранныго потенциала, которое увеличивало нагрузку на дыхательную цепь, а это проявлялось в увеличении скорости дыхания. Интересно, что в процессе синтеза АТР мембранный потенциал медленно увеличивался при постоянной скорости реакции, хотя рост мембранныго потенциала можно было ожидать только после завершения реакции. Дыхание частиц переходило в контролируемое состояние в тот момент, когда синтез АТР заканчивался. Считается, что это происходит, после того как весь добавленный ADP фосфорилируется до АТР. Мы определили, сколько ADP превратилось в АТР к моменту перехода дыхания в контролируемое состояние, и обнаружили, что из 100 мкМ внесенного ADP образовалось только  $\sim 85$  мкМ АТР, а  $\sim 10$  мкМ ADP осталось в среде. Учитывая, измеренную нами ранее величину  $K_m$  для ADP (7-8 мкМ), можно предположить, что уменьшение концентрации ADP в реакционной среде не является причиной завершения реакции синтеза АТР. Мы предполагаем, что процессы синтеза и гидролиза АТР катализируются разными формами  $\text{F}_0\text{-F}_1$  АТРазы – синтетазной и гидролазной. Соотношение между ними зависит от протон-движущей силы и стационарного значения АТР/ADP. Сенсором этих параметров может служить  $\varepsilon$ -субъединица  $\text{F}_0\text{-F}_1$  комплекса, связывающая АТР.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 08-04-00594.

### Активность 5-аминолевулинат-сингтазы в митохондриальной фракции печени крыс

с трансплантированной карциномой Герена

**Кеца О.В., Мудрак М.С.** (Украина, Черновцы, ksen808@mail.ru)

Снижение содержания митохондриальных гемопротеинов печени в условиях роста карциномы Герена в организме могут привести к уменьшению энергетического потенциала клеток, снижению пластических процессов в организме и развитию эндотоксемии. Уровень активности ключевого фермента синтеза гема определяет содержание последнего в печени и последующую утилизацию его для синтеза гемопротеинов. Ферментативная активность 5-аминолевулинат-сингтазы (АЛК-сингтазы) митохондрий тесно связана с содержанием и активностью гемопротеинов, в частности, митохондриальных цитохромов.

Цель работы – изучение активности 5-аминолевулинат-сингтазы в митохондриальной фракции печени крыс с трансплантированной карциномой Герена.

Результаты исследования показали увеличение активности АЛК-сингтазы в митохондриальной фракции печени крыс-опухоленосителей на 7-е сутки после трансплантации карциномы Герена. Наблюдаемые изменения могут быть связаны с повышенными потребностями клеток печени в синтезе гема в условиях роста в организме

карциномы Герена. В тоже время, интенсивное расходование сукцината для синтеза гема уменьшает его использование дыхательной цепью митохондрий печени экспериментальных животных. Уменьшение фонда эндогенных субстратов в митохондриях может привести к развитию низкоэнергетического сдвига.

На логарифмической и терминальной стадии онкогенеза (14-е и 21-е сутки после трансплантации карциномы Герена) наблюдается снижение активности АЛК-сингтазы в митохондриальной фракции печени крыс-опухоленосителей. Вероятно, активация окислительных процессов в период активного и терминального роста опухоли приводит к окислительной модификации фермента и, как следствие, к понижению ферментативной активности. С другой стороны, снижением активности АЛК-сингтазы в наших опытах может привести к развитию высокоэнергетического сдвига, вследствии монополизации дыхательной цепи янтарной кислотой, что связано со значительным образованием янтарной кислоты из других соединений и уменьшением оттока сукцината для синтеза гема в условиях онкогенеза.

Таким образом, в условиях роста в организме карциномы Герена в митохондриальной фракции печени наблюдаются значительные изменения активности фермента синтеза гема. Активация фермента АЛК-сингтазы на начальном этапе онкогенеза постепенно снижается в период логарифмической и терминальной стадий онкогенеза, следствием чего может быть уменьшение содержания митохондриальных гемопротеинов.

**Изучение спектров пептидных соединений эритроцитов человека  
при повышении концентрации цАМФ внутри клеток**  
**Кленов Роман Олегович (Самара, rkleonov@yandex.ru)**

Согласно исследованиям ряда учёных различные экстремальные состояния сопровождаются неспецифическим накоплением в крови гетерогенной группы соединений пептидной природы, молекулярная масса которых колеблется от 300 до 5000 Да, являющихся продуктами распада белков. Имеются данные о наличии у эритроцитов человека эндокринной функции, связанной с внутриклеточными процессами расщепления гемоглобина и генерацией биологически активных пептидных фрагментов в плазму. Образующиеся пептидные молекулы обладают широким спектром биологической активности – опиоидной, рилизинговой, эритропоэтиновой. Лизис гемоглобина осуществляется высокоспецифическими протеазами на внутренней стороне мембранны эритроцита, однако механизм их активации изучен недостаточно (Шатаева, 2003). Ранее, нами было установлено увеличение содержания пептидов в клетках при действии адреналина, цАМФ, АТФ и имидазола, что указывает на возможность активации примембранного комплекса протеаз через фосфорилирование специфическими протеинкиназами, которые в свою очередь активируются цАМФ в результате активации аденилатциклазного комплекса (Кленова, Кленов, 2009).

Целью данного исследования стало изучение спектров пептидных соединений во фракции молодых эритроцитов при действии адреналина и блокировании фосфодиэстеразы цАМФ эритроцитов имидазолом и пептидов, полученных деградацией гемоглобина пепсином. Объектом исследования служила чистая фракция молодых эритроцитов человека, полученная по методу Аврамовой Т.В. и соавт. (1975). Результаты гель-хроматографии пептидных соединений эритроцитов показали наличие одного пика в контроле и при блокировании фосфодиэстеразы цАМФ. При действии 43 мкг/мл имидазола высота пика повышалась на 13% по сравнению с контрольной пробой. Действие 10 мкг/мл адреналина характеризовалось появлением второго пика, содержащего соединения меньшей длины. Высота пика, характерного для всех проб, при действии адреналина была выше контрольных на 39%. Гель-хроматография соединений, полученных при инкубации гемоглобина с пепсином в течение 4 часов, показала также наличие двух, аналогичных эритроцитарным, пиков. Сравнение пиков пептидов эритроцитов с пиком окситоцина как маркерного пептида позволяет предположить, что дополнительный пик при действии адреналина характеризуется наличием пептидов менее 1000 Да по молекулярной массе, а пик, характерный для всех проб, содержал соединения более 1000 Да. Электрофорез полученных

соединений в поликариламидном геле с использованием маркерных соединений подтверждает появление более коротких пептидов под действием адреналина на эритроцитарные клетки.

Таким образом, активация эритроцитарных протеаз приводит к увеличению содержания пептидных соединений внутри клеток за счет деградации гемоглобина. При действии адреналина спектр пептидных соединений характеризуется двумя пиками соединений – меньше и больше 1000 Да и большой высотой пиков, что подтверждает сигнальный механизм образования пептидных соединений.

### **Хирургические личинки *Lucilia sericata* как источник новых антимикробных соединений Кругликова Анастасия Анатольевна (Санкт-Петербург, a.a.kruglikova@yandex.ru)**

Сегодня в биохирургии наиболее активно используются личинки зеленых мясных мух *Lucilia sericata*. Личночная терапия успешно применяется при лечении хронических ран, зачастую не поддающихся традиционным методам лечения. Широкое распространение штаммов бактерий, устойчивых ко всем традиционным антибиотикам (например, MRSA – метициллин-устойчивый *Staphylococcus aureus*), серьезная проблема для современной медицины. Личинки *L. sericata* обладают способностью бороться с инфекциями, вызванными *S. aureus*. Несмотря на длительную историю применения, о механизмах биохирургии известно крайне мало.

В состав экзосекрета, как нам удалось установить, входят пептиды аналогичные антимикробным пептидам гемолимфы, высокомолекулярные соединения пептидной природы, отличные от известных компонентов гемолимфы, и низкомолекулярные соединения. Антимикробные соединения, синтезируемые личинками *L. sericata*, выполняют две основные функции – уничтожение патогенов, проникших в гемолимфу (функция иммунологической защиты), и временное блокирование роста сапрофитных микроорганизмов в окружающей среде (функция защиты пищевого субстрата). Антистафилококковая активность была обнаружена как в гемолимфе, так и в экзосекрете личинок *L. sericata*. Качественный состав хроматографической фракции гемолимфы, ингибирующей рост *S. aureus*, представляет собой сочетание дефензинов, Р-пептида и четырех новых полипептидов. Природа низкомолекулярных соединений остается неизвестной, однако можно предположить, что они относятся к вторичным метаболитам, функционально сходным с антибиотиками микробного происхождения. Если это предположение найдет в будущем подтверждение, то экзосекрет личинок *L. sericata* может оказаться ценным источником для поиска новых природных антибиотиков.

Проведенные исследования характеризуют стратегии, используемые хирургическими личинками для защиты от патогенов и подавления микробных конкурентов, и позволяют лучше понять молекулярные механизмы личночной терапии гнойных инфекционных заболеваний. В перспективе эти исследования могут послужить основой для создания принципиально новых препаратов для борьбы с обычными и резистентными к антибиотикам бактериальными инфекциями. Работа поддержана грантом НШ-963.2008.4.

### **Новые инсектиотоксины из яда паука *Lachesana tarabaevi* Кузьменков Алексей Игоревич (Москва, anteka@ya.ru)**

Яд пауков – богатый источник разнообразных биологически активных веществ, от низкомолекулярных соединений до больших многодоменных белков. Многообразие компонентов яда помогает паукам при нападении на жертву или защите от агрессора. Изучение отдельных веществ из состава ядов представляет большой фундаментальный интерес и может иметь практическое значение. В рамках данной работы мы исследовали пять новых пептидов из яда паука *Lachesana tarabaevi*, проявляющих инсектицидные свойства.

Яд *L. tarabaevi* (семейство Zodariidae, пауки-муравьеды) обладает высокой токсичностью в отношении насекомых и может служить источником потенциальных инсектицидов. Цельный яд подвергался нескольким стадиям хроматографического разделения (гель-фильтрации, обращенно-фазовой высокоеффективной жидкостной хроматографии),

полученные фракции тестировались на летальное действие по отношению к личинкам мясной мухи. В результате в индивидуальном виде были получены пять новых пептидных инсектотоксинов, получивших название латартоксинов (LtTx). С использованием масс-спектрометрии были измерены молекулярные массы выделенных веществ, составившие ~6,5-8,5 кДа. Полные аминокислотные последовательности LtTx (60-71 остатков) были установлены с помощью комбинации методов автоматического секвенирования по Эдману, масс-спектрометрии и селективного протеолиза. На основании сходства LtTx объединены в два семейства, представители одного из которых напоминают исследованные ранее токсины CSTX из яда паука *Cupiennius salei* (Ctenidae). Три LtTx содержат восемь остатков полуцистина и четыре внутримолекулярные дисульфидные связи, а два других отличаются наличием еще одного дисульфида. Кроме того, для трех пептидов характерно С-концевое амидирование. Все новые соединения имеют интересную структуру, заключающую в себе N-концевой цистеин-богатый участок, характерный для нейротоксинов, а также С-концевую область, подобную линейным пептидам, обладающим цитолитической активностью. Предполагается, что эта С-концевая область обеспечивает сродство пептидов к мембранам, специфичное взаимодействие токсинов с белковыми рецепторами происходит затем вследствие латеральной диффузии.

#### **Разработка биологически активного комплекса для предупреждения побочных эффектов при использовании адриамицина**

*Кучменко Е.Б., Петухов Д.Н. (Украина, Киев, kuchmeb@yahoo.com)*

Адриамицин является эффективным и широко применяемым противоопухолевым антибиотиком, одним из дозозависимых побочных эффектов которого является токсичность по отношению к сердцу, печени, почкам и т.д., в основе которой вероятно лежит нарушение про- и антиоксидантного баланса и развитие окислительного стресса. Использование адриамицина сопровождается достоверными изменениями содержания убихинона (CoQ), что может приводить к нарушениям биоэнергетического обмена. Недостатком применения экзогенных препаратов CoQ для коррекции таких изменений является угнетение его биосинтеза после окончания курса лечения.

Цель работы – исследование действия комплекса предшественников и модулятора биосинтеза CoQ: а-токоферол ацетата, параоксибензойной кислоты и метионина – на активность ферментов цепи транспорта электронов в митохондриях, интенсивность свободнорадикальных процессов окисления и активность ферментов антиоксидантной защиты в тканях сердца и печени крыс при введении адриамицина.

Адриамицин вводили внутрибрюшинно в дозе 2,2 мг/кг массы тела ежедневно на протяжении 8 суток. Биологически активные соединения животные получали перорально на протяжении 8 суток параллельно с введением адриамицина.

При введении адриамицина отношение массы сердца к массе тела достоверно уменьшается, содержание CoQ в митохондриях сердца и печени возрастает. NADH-CoQ-оксидоредуктазная активность в митохондриях сердца достоверно не изменяется, а в митохондриях печени уменьшается; при этом процент дефицита CoQ для данной ферментной системы возрастает. Сукцинат-CoQ-оксидоредуктазная активность уменьшается в митохондриях сердца и печени; процент дефицита CoQ для данной ферментной системы возрастает. При введении изучаемого комплекса наблюдается нормализация показателей активности CoQ-зависимых ферментных систем; процент дефицита CoQ для этих систем уменьшается и показатели приближаются к контрольным величинам. Цитохромомоксидазная активность в митохондриях сердца и печени уменьшалась при введении адриамицина; введение исследуемого комплекса приводит к нормализации цитохромомоксидазной активности.

При введении адриамицина наблюдается аккумуляция диеновых конъюгатов, ТБК-позитивных продуктов и карбонильных продуктов окисления белков в тканях сердца и печени, а также изменения каталазной и супероксиддисмутазной активностей. При введении комплекса биологически активных веществ происходит нормализация показателей

свободнорадикального окисления липидов и белков и активностей ферментов антиоксидантной защиты.

Полученные результаты свидетельствуют о протективном эффекте изучаемого комплекса по отношению к митохондриям сердца и печени и могут служить основой для экспериментального обоснования новых подходов коррекции токсических эффектов адриамицина путем введения комплекса предшественников и модулятора биосинтеза CoQ.

#### **Механизм тепловой денатурации и агрегации субфрагмента 1 миозина**

*Марков Денис Игоревич (Москва, marik230185@mail.ru)*

Проведен подробный анализ механизма тепловой денатурации и вызываемой ею агрегации изолированных головок молекул скелетномышечного миозина (субфрагмент 1 миозина, S1). В тяжелой цепи молекулы S1 выделяют два главных структурных домена: моторный и регуляторный; с последним ассоциирована щелочная легкая цепь. Известно, что препарат S1 представляет собой смесь двух изоформ, различающихся своими щелочными легкими цепями (A1 и A2). Для выяснения роли этих легких цепей в процессах тепловой денатурации и агрегации S1 мы провели сравнительный анализ этих процессов для двух изоформ S1. Анализ тепловой денатурации изоформ S1 проводили методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), применяя ранее разработанные специальные подходы. Использование этих подходов позволило выявить в молекуле S1 наличие двух калориметрических доменов (т.е. участков молекулы, денатурирующих кооперативно и независимо друг от друга), причем оказалось, что более термостабильный домен денатурирует в две стадии. Для идентификации этих калориметрических доменов мы сравнивали данные, полученные методом ДСК, с температурными зависимостями параметров собственной триптофановой флуоресценции S1 и инактивации его АТРазы. Оказалось, что основные изменения параметров флуоресценции и АТРазной активности S1 происходят при тепловой денатурации более термостабильного калориметрического домена. Поскольку как активный центр АТРазы, так и все остатки триптофана содержатся в моторном домене S1, мы идентифицировали этот калориметрический домен как моторный, а менее термостабильный – как регуляторный домен S1. Заметные различия в характере тепловой денатурации между двумя изоформами S1 были обнаружены лишь в параметрах денатурации их регуляторных доменов, с которыми ассоциированы разные легкие цепи. Необратимая тепловая денатурация S1 сопровождается его агрегацией. Мы провели детальное исследование кинетики тепловой агрегации S1 методом динамического светорассеяния и установили, что при физиологических значениях ионной силы (100 мМ KCl) в исследованном диапазоне температур этот процесс не зависит от концентрации белка и полностью лимитируется денатурацией моторного домена S1. В этих условиях мы не обнаружили никаких различий в характере агрегации между изоформами S1. Однако при низкой ионной силе (20 мМ Herpes) были обнаружены значительные различия между изоформами S1: агрегация S1(A1) сильно зависела от концентрации белка и при высоких концентрациях белка сильно опережала его тепловую денатурацию, тогда как снижение ионной силы не оказывало существенного влияния на характер тепловой агрегации S1(A2). Мы полагаем, что эти различия в характере тепловой агрегации между изоформами S1 обусловлены межмолекулярными взаимодействиями дополнительного N-концевого сегмента легкой цепи A1, отсутствующего у A2, причем такие взаимодействия имеют место только при низкой ионной силе, но подавляются при повышении ионной силы.

#### **Цитотоксические свойства новых производных 2-оксазолидона**

*Маслова Ирина Игоревна (Нижний Новгород, maslev4@mail.ru)*

Производные 2-оксазолидона нашли широкое применение в области создания биологически активных химических соединений. В настоящее время производные 2-оксазолидона широко известны как антибиотики нового поколения. Для производных 2-оксазолидона показана противовирусная активность, некоторые производные могут применяться в медицинской диагностике в качестве контрастирующих агентов при томографии головного мозга.

Настоящая работа посвящена исследованию влияния новых химических соединений – производных 2-оксазолидона на жизнеспособность опухолевых клеток. Химиотерапевтические препараты, применяемые в настоящее время для терапии опухолевых заболеваний, имеют ряд существенных недостатков, связанных с высокой токсичностью и устойчивостью многих опухолей к терапии. В связи с этим весьма актуальна задача поиска новых соединений с противоопухолевой активностью.

В ходе данного исследования исследовались цитотоксические свойства ряда производных 2-оксазолидона. Исследуемые соединения включали 4,4-дигидроксиметил-2-оксазолидон и его производные, содержащие морфолин или пиперидин. Все соединения были синтезированы в лаборатории органического синтеза ИПХФ РАН (А.Г. Корепин, Н.М. Глушакова).

Влияние производных триазола на клетки HeLa (аденокарцинома шейки матки человека) исследовали с помощью МТТ-теста и проточной цитофлуориметрии после окрашивания йодистым пропидием. Клетки обрабатывали исследуемыми соединениями, и через 24 ч окрашивали красителем МТТ. Из данных «доза-эффект» получали значения IC50. Обнаружено, что соединения, содержащие морфолин или пиперидин, проявляют цитотоксическую активность в концентрации 100-150 мкМ. Сам 4,4-дигидроксиметил-2-оксазолидон не проявляет цитотоксичности в концентрациях до 500 мкМ. Морфолин в концентрации 150 мкМ также не влияет на клетки. Таким образом, цитотоксичность соединений не обусловлена их структурными составляющими, а проявляется только при условии присутствия в соединении как 4,4-дигидроксиметил-2-оксазолидона, так и второго циклического компонента. Для исследования влияния на клеточный цикл клетки обрабатывали цитотоксическими производными 2-оксазолидона в дозах IC50 в течение 24 ч, а затем клетки фиксировали и ДНК в них окрашивали йодистым пропидием. Интенсивность окрашивания клеток измеряли с помощью проточной цитофлуориметрии. Обнаружено, что производные 2-оксазолидона в дозе IC50 проявляют цитостатическую активность, снижая количество клеток в фазе G2/M и увеличивая количество клеток, находящихся в фазе G1/G0 клеточного цикла. Соединение, содержащее пиперидин, проявляет также слабый цитоцидный эффект, вызывая накопление клеток в sub-G1 области.

Мы благодарим с.н.с. лаборатории молекулярной биологии ИПХФ РАН Г.В. Костюк за помощь в проведении экспериментов по изучению цитотоксичности, доцента кафедры биохимии биологического факультета ННГУ А.А. Брикину и зав. лаб. клеточных технологий кафедры биофизики биологического факультета ННГУ И.В. Балалаеву за помощь в проведении проточной цитофлуориметрии и научного руководителя – зав. лаб. молекулярной биологии ИПХФ РАН А.А. Терентьева.

#### **Анализ сигнальных каскадов, зависимых от NADPH-оксидазы и стимулирующих миграцию и пролиферацию клеток под действием факторов роста Морозов Я.И., Тюрин-Кузьмин П.А. (Москва, [mogozov.ji@mail.ru](mailto:morozov.ji@mail.ru))**

Активация тирозинкиназных рецепторов (RTK) под действием факторов роста стимулирует миграцию и пролиферацию клеток за счет внутриклеточных сигнальных путей, основными из которых являются MAP-киназные и PI<sub>3</sub>-киназный каскады. Однако роль других сигнальных молекул остается во многом неясной. Мы обнаружили, что НАДФН-оксидазный комплекс (NOX) вносит важный вклад в пролиферативный ответ клеток HeLa на эпидермальный фактор роста (EGF), который блокируется при нарушении сборки NOX под действием апоцинина. Аналогично, апоцинин подавлял миграционный ответ ЗТЗ фибробластов на тромбоцитарный фактор роста (PDGF). Используя внутриклеточный биосенсор к перекиси водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), мы установили, что стимуляция клеток ростовыми факторами приводит к активации NOX и повышению уровня H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в цитоплазме. Апоцинин блокировал как EGF-, так и PDGF-зависимое накопление H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в клетках, указывая на то, что NOX и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> вносят важный вклад в стимуляцию миграции и деления клеток.

Мы исследовали участие Erk-MAP-киназного и PI<sub>3</sub>-киназного каскадов в PDGF-зависимой миграции ЗТЗ фибробластов в зону повреждения клеточного монослоя путем прижизненной микроскопии и ингибиторного анализа. Ингибитор PI<sub>3</sub>-киназы существенно

тормозил миграцию, тогда как ингибитор Erk-MAP-киназ не влиял на скорость миграции клеток в рану. Эти результаты свидетельствуют о ведущем вкладе PI<sub>3</sub>-киназного, но не MAP-киназного, каскада в миграционный ответ клеток к факторам роста.

Далее мы исследовали взаимосвязь между активацией NOX и образованием H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в клетках, с одной стороны, и профилем активации сигнальных каскадов под действием факторов роста, с другой. Мы обнаружили двуфазный характер активации Erk-MAP-киназ в клетках HeLa при их стимуляции EGF, и в ЗТЗ фибробластах при воздействии PDGF. За первой фазой быстрой активации MAP-киназ в течение 5-10 мин следовала стадия уменьшения активности с появлением последующей фазы повторного увеличения активности через 30-40 мин после стимуляции клеток. Ингибирование NOX апоцинином не приводило к изменению профиля активации Erk-MAP-киназ в фибробластах, что хорошо согласуется с отсутствием эффекта ингибирования Erk-MAP-киназ на миграцию этих клеток. Ингибирование NOX в клетках HeLa вызывало увеличение первой фазы, но не изменяло второй фазы активации Erk-MAP-киназ. Эти результаты означают, что подавление активности NOX практически не отражается на длительности проведения сигнала через Erk-MAP-киназный каскад. В настоящее время мы исследуем влияние ингибиторов NOX на профиль активации PI<sub>3</sub>-киназного каскада.

В совокупности, мы показали, что NOX играет важную роль в стимуляции миграции и пролиферации клеток в ответ на активацию РТК факторами роста. Эффекты NOX не связаны с нарушением проведения сигнала через Erk-MAP-киназный каскад, но опосредованы активацией PI<sub>3</sub>-киназного каскада в случае миграционного ответа.

### **Мономеры участвуют в образовании гетероолигомеров малых белков теплового шока человека**

**Мыльриков Евгений Викторович** (Москва, *evgenem@mail.ru*)

Малые белки теплового шока (sHsp) – семейство АТР-независимых шаперонов. Геном человека кодирует 10 sHsp, некоторые из них тканеспецифичны ( $\alpha$ B-кристаллин, cvHsp, ODFP), а другие ( $\alpha$ B-кристаллин, Hsp27, Hsp20, Hsp22) экспрессируются повсеместно. Эти белки способны предотвращать агрегацию денатурированных белков, образующихся при неблагоприятных воздействиях, повышая выживаемость клеток при стрессе. sHsp формируют крупные гомоолигомеры, а также взаимодействуют между собой с образованием гетероолигомеров. Методы коиммунопрепиципации, двойной гибридизации и FRET, применяющиеся ранее для исследования взаимодействия sHsp человека, не позволяют определить прочность, стехиометрию и молекулярный механизм образования гетероолигомеров. В данной работе мы применили новые подходы, позволяющие более подробно исследовать взаимодействие разных малых белков теплового шока.

Для решения поставленной задачи мы использовали рекомбинантные  $\alpha$ B-кристаллин, Hsp27, Hsp20 и Hsp22 дикого типа, а также их точечные («цистеиновые») мутанты, содержащие единственный остаток цистеина в участке ( $\beta$ 7-складка  $\alpha$ -кристаллинового домена), ответственным за образование гомодимеров sHsp. Ранее мы установили, что внесение точечных мутаций (замена остатков цистеина на серин и введение одного остатка цистеина в  $\beta$ 7-складку) не влияет на структуру и шаперонную активность исследуемых белков. «Цистеиновые» мутанты  $\alpha$ B-кристаллина, Hsp20 и Hsp22, так же как Hsp27 дикого типа, при мягком окислении образуют гомодимеры, связанные дисульфидным мостиком. Для анализа способности этих белков образовывать гетеродимеры образцы, содержащие два разных белка, инкубировали 1 час при 42°C для обмена субъединицами и проводили окисление. При этом наблюдалось образование «сшитых» дисульфидной связью гомо- и гетеродимеров, однако, если одним из партнеров был Hsp22, доля гетеродимеров была незначительной. Данные, полученные с использованием «цистеиновых» мутантов, согласуются с результатами гель-фильтрации смесей различных sHsp дикого типа. Установлено, что  $\alpha$ B-кристаллин, Hsp27 и Hsp20 дикого типа эффективно взаимодействуют между собой с образованием гетероолигомеров. В то же время, Hsp22 дикого типа не образует гетероолигомеры с исследуемыми sHsp. Используя «цистеиновые» мутанты sHsp, мы попытались ответить на вопрос, каким образом происходит формирование

гетероолигомерных комплексов. В первой серии опытов происходил обмен свободными мономерами sHsp, и мы наблюдали образование гетероолигомеров, а во второй, когда смешивали «сшитые» дисульфидной связью димеры различных sHsp, образование гетероолигомеров не происходило. Таким образом, обмен субъединицами Hsp27,  $\alpha$ -кристаллина и Hsp20 осуществляется преимущественно на уровне мономеров, а обмен более крупными блоками (димерами) затруднен. Стабилизация как гомо-, так и гетероолигомеров малых белков теплового шока осуществляется с участием  $\beta$ -складки  $\alpha$ -кристаллического домена. Работа поддержанна грантом РФФИ № 04-10-00026-а.

#### **Октарфин как инструмент исследования неопиоидного рецептора бета-эндорфина Некрасова Ю.Н., Садовников В.Б., Наволоцкая Е.В. (Пущино, nekr-jul@mail.ru)**

Известно, что действие  $\beta$ -эндорфина осуществляется через мю и дельта опиоидные рецепторы. В 1979 году Хейзум с соавт. впервые описал неопиоидные (нечувствительные к опиоидному антагонисту налоксону) рецепторы  $\beta$ -эндорфина. До настоящего времени структура и функции последних остаются малоизученными. В 1980 г. Джулиард и соавт. обнаружили в составе тяжелой цепи IgG человека  $\beta$ -эндорфинподобную последовательность. Затем Хоук и соавт. синтезировали тетрапептид SLTCLVKGFYPSDI, соответствующий  $\beta$ -эндорфинподобной последовательности IgG (фрагмент 364–377 СН3 домена тяжелой цепи) и показали, что он конкурирует с меченым  $\beta$ -эндорфином за связывание с мембранными головного мозга крысы. Позднее нами был синтезирован и исследован  $\beta$ -эндорфинподобный декапептид SLTCLVKGFY (авторское название – иммунорфин), соответствующий последовательности 364–373 тяжелой цепи IgG человека. Эксперименты показали, что меченный тритием иммунорфин с высоким сродством и специфичностью связывается с неопиоидным рецептором  $\beta$ -эндорфина Т-лимфоцитов человека, перитонеальных макрофагов мыши, синаптических мембран головного мозга крысы, а также клеток человеческой Т-лимфобластной линии Jurkat. Недавно нами был определен фрагмент  $\beta$ -эндорфина наименьшей длины, способного с высоким сродством связываться с неопиоидным рецептором. Им является фрагмент молекулы гормона 12-19. Был синтезирован пептид TPLVTLFK, соответствующий последовательности 12-19  $\beta$ -эндорфина (авторское название октарфин).

Цель настоящей работы – изучение влияния октарфина на активность иммунокомпетентных клеток мыши *in vitro* и *in vivo*.

Получен меченный тритием октарфин (удельная активность 28 Ки/моль) и изучено его связывание с перитонеальными макрофагами мыши. Установлено, что меченный тритием октарфин связывается с макрофагами с высокой аффинностью ( $K_d$  2,3±0,2 нМ) и специфичностью. Специфическое связывание меченного тритием октарфина с макрофагами ингибировали немеченные  $\beta$ -эндорфин и селективный агонист неопиоидного рецептора  $\beta$ -эндорфина синтетический пептид иммунорфин (SLTCLVKGFY) ( $K_i$  2,7±0,2 и 2,4±0,2 нМ соответственно) и не ингибировали немеченные налоксон,  $\alpha$ -эндорфин,  $\gamma$ -эндорфин и [Met5]энкефалин ( $K_i$ >10 мкМ). Показано, что октарфин стимулирует активность иммунокомпетентных клеток мыши *in vitro* и *in vivo*: при концентрации 1–10 нМ он увеличивал адгезию и распластывание перитонеальных макрофагов, а также их способность переваривать бактерии вирулентного штамма *Salmonella typhimurium* 415 *in vitro*; внутрибрюшинное введение пептида (20 мкг/животное за 7, 3 и 1 сутки до выделения клеток) приводило к возрастанию активности перитонеальных макрофагов, а также Т- и В-лимфоцитов селезенки.

#### **Новый белок-ингибитор сериновых протеиназ из клубней картофеля Парфенов Игорь Александрович (Москва, triptofan99@gmail.com)**

В процессе эволюции растения выработали ряд защитных механизмов от действия фитофагов и фитопатогенов. Важной составляющей защитной системы являются вещества полипептидной природы. В их число входят белковые ингибиторы протеиназ типа Кунитца, подавляющие активность протеолитических ферментов патогенных бактерий и грибов, а также пищеварительных ферментов насекомых. Представители семейства пасленовых

(Solanaceae) относятся к видам, обладающим значительным содержанием ингибиторов протеиназ и, особенно, в клубнях картофеля, где на их долю приходится до 20% всех водорастворимых белков. Среди этих ингибиторов обнаружены белки с молекулярными массами от 20 до 24 кДа. На основании особенностей первичной структуры эти белки были выделены в подсемейство, обозначенное как PKPIs (potato Kunitz-type proteinase inhibitors), входящее в состав суперсемейства соевого ингибитора трипсина типа Кунитца. Изучение их строения и особенностей функционирования является важным для понимания механизмов устойчивости растений к вредителям.

В рамках данной работы из клубней картофеля (*Solanum tuberosum* L., сорт Юбилей Жукова), возделываемого в Московской области и являющегося устойчивым к вирусным заболеваниям, был выделен белок-ингибитор сериновых протеиназ с молекулярной массой 23 кДа. Выделение и очистку белка проводили осаждением сульфатом аммония, гель-хроматографией на сепадекс G-75 и ионообменной хроматографией на КМ-сепарозе CL-6B. Выделенный и очищенный белок массой 23 кДа эффективно подавлял активность трипсина и химотрипсина, образуя комплексы ингибитор: фермент, в соотношении 1:1, но слабее действовал на бактериальную протеиназу, субтилизин Карлсберг.

Изучено влияние данного гомогенного белка-ингибитора 23 кДа на рост и развитие фитопатогенных микроорганизмов *Fusarium cultorum* и *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. При возрастающих концентрациях ингибитора наблюдали угнетение прорастания гиф и увеличение количества непроросших макроконидий гриба *F. cultorum*. Белок также подавлял рост мицелия *Ph. infestans* и вызывал лизис его зооспор.

Автор выражает признательность профессору, д.б.н. Т.А. Валуевой, и к.б.н. Т.А. Ревиной за помощь в работе и подготовке тезисов.

### **Исследование новых модуляторов потенциал-зависимых натриевых каналов β/δ-агатоксинов из яда паука *Agelena orientalis***

**Прокудин Алексей Александрович** (Москва, [trashforyou@mail.ru](mailto:trashforyou@mail.ru))

Потенциал-зависимые натриевые каналы - интегральные мембранные белки, характерные для электровозбудимых клеток. Главная функция этих белков состоит в обеспечении проведения нервных импульсов, поэтому неудивительно, что они являются одной из мишеней биологически активных веществ, используемых человечеством. Так, прогресс в создании новых анальгетиков и пестицидов во многом определяется поиском веществ, селективно воздействующих на натриевые каналы. При этом наиболее эффективными инструментами исследования этих белков являются природные токсины.

Нами было выделено и охарактеризовано новое семейство токсинов из яда среднеазиатского паука *Agelena orientalis* - β/δ-агатоксинов, обладающих уникальным специфичным и комбинированным действием на натриевые каналы насекомых. Тестирование активности токсинов проводили с помощью метода двухэлектродной фиксации потенциала на ооцитах *Xenopus laevis*, экспрессирующих гены субъединиц натриевого канала дрозофили. В результате показано, что для β/δ-агатоксинов характерна активность двух типов классических токсинов скорпионов: альфа-, препятствующих инактивации каналов, и бета-, облегчающих процесс их активации. β/δ-Агатоксины состоят из 36-38 аминокислотных остатков, имеют четыре дисульфидные связи и С-концевое амидирование. Высокое сходство с Δ-палутоксином IT2, для которого известна пространственная структура, позволило построить модель пространственной организации β/δ-агатоксинов с помощью гомологичного моделирования и предположить возможные остатки, ответственные за связывание токсинов с каналом. Для дальнейших структурных и функциональных исследований был получен рекомбинантный β/δ-агатоксин-1 – основной компонент яда *A. orientalis*. Наработку рекомбинантного токсина проводили в составе гибридного белка с тиоредоксином в клетках *Escherichia coli*. В результате селективного гидролиза гибридного белка и очистки целевой продукт был получен в индивидуальном виде, выход составил 2 мг токсина с 1 л бактериальной культуры.

**Выявление антикоагулянтной активности у соединений  
на основе сульфатированной целлюлозы и исследование её связи  
с подвижностью их комплексов с сульфатом протамина в электрическом поле**  
**Савчик Елена Юрьевна (Москва, elena-savchik3@yandex.ru)**

Проблема тромбообразования – одна из важнейших терапевтических проблем в развитых странах. Тромбозы возникают в следствие действия нескольких патогенетических факторов, основной механизм образования артериального и венозного тромба связан с повышением свертываемости крови и стазом. Одними из лекарственных средств, используемых для борьбы с тромбозами, являются антикоагулянты: нефракционированный гепарин (НФГ), низкомолекулярный гепарин (НМГ), антагонисты витамина К. Однако эти вещества обладают рядом побочных эффектов, такими как: кровотечения, развитие тромбоцитопении, остеопороза и др. В связи с этим значимым и перспективным является поиск фармакологических средств для профилактики и лечения тромбозов на основе антикоагулянтов из ряда новых сульфатированных полисахаридов (ПС).

Получение, сульфатирование и анализ структуры образцов целлюлозы, выделенной из древесины осины, осуществляли в лаборатории каталитической химии угля и биомассы Института химии и химической технологии СО РАН (Красноярск). Были исследованы 6 образцов сульфатированной целлюлозы с различной молекулярной массой (М<sub>r</sub>, 12-19 kDa) и содержанием серы (S, 8,0-8,7%) на наличие антикоагулянтной активности (АК) и связи АК с подвижностью комплексов полисахаридов с поликатионом – сульфатом протамина в электрическом поле. Определяли антитромбиновую (aIIa) и анти-фактор Xa (aXa) активности, что означает способность ингибировать фибриногенсвертывающую или амидолитическую активности сериновых протеаз свертывающей системы крови – тромбина (фактор IIa) и фактора Xa, выраженную в единицах Международного стандарта НФГ. Проводили биоспецифичный электрофорез комплексов полисахаридов с поликатионом протамина сульфатом (ПС) в слое агарозы. В результате электрофореза наблюдали пики преципитации комплексов полианион-поликатион.

Образцы полисахаридов показали практически одинаковую антитромбиновую (45,6±1,0 - 53,8±6,8 Е/мг) и анти-фактор Xa (8,6±1,8-10,5±2,0 Е/мг) активности, кроме одного образца с молекулярной массой 14 kDa и содержанием серы 8,1%. Данный полисахарид проявил наименее низкую АК активность (aIIa=12,5±1,5 Е/мг, aXa=2,1±0,2 Е/мг). Размеры пики преципитации (высота *h* и площадь *S*) значительно положительно коррелируют с aIIa и aXa активностями полисахаридов (raIIa-h=0,90-0,99; raXa-S=0,76-0,88). Значения aIIa и aXa умеренно положительно коррелируют с молекулярной массой полисахаридов (raIIa =0,37; raXa =0,43) и содержанием серы в них (raIIa =0,44; raXa=0,25).

Таким образом, показано наличие связи между антикоагулянтной активностью соединений на основе сульфатированной целлюлозы и подвижностью их комплексов с сульфатом протамина в электрическом поле: чем выше АК активности образца, тем больше размеры его пики преципитации, что может быть использовано для выявления наименее активных полисахаридов. Выражая особую благодарность моему научному руководителю Дрозд Наталье Николаевне, а также научным сотрудникам Института химии и химической технологии СО РАН (Красноярск) за предоставление образцов.

**Глифосат-оксидоредуктаза — новый фермент первичной атаки органофосфонатов**  
**Свиридов Алексей Владимирович (Пущино, alhuniten@rambler.ru)**

Органофосфонаты (ОФ) – класс соединений, имеющих в своей структуре прямую углерод-фосфорную (С-Р) связь – широко применяются в качестве пестицидов и являются опасными загрязнителями окружающей среды. С-Р связь устойчива к химическим и физическим факторам воздействия, однако расщепляется ферментами некоторых микроорганизмов (Кононова, Несмиянова, 2002; Rank et al., 1992; Ternan et al., 1998; Torstensson, 1985; Veiga et al., 2001). Изучение таких ферментных систем имеет большое значение для разработки методов биоремедиации загрязненных почв и воды, а также промышленных стоков (Carson et al., 1997). Однако обнаружены лишь единичные ферменты деструкции ОФ, причем механизм их действия, физико-химические и кинетические

характеристики, за редким исключением, не изучены (Кононова, Несмеянова, 2002; Barry, Kishore, 1998; Obojska et al., 2002).

Нами впервые был выделен и охарактеризован новый ключевой фермент деструкции органофосфонатов у бактерий – глифосат-оксидоредуктаза, превращающий гербицид глифосат (N-фосфонометилглицин) и некоторые другие ОФ в нетоксичные соединения (Barry, Kishore, 1998; Carson et al., 1997; Obojska et al., 2002). Разработана схема очистки фермента до электрофоретически гомогенного состояния, обеспечивающая выход не менее 65%. У глифосат-оксидоредуктазы были определены основные физико-химические (ММ, изоэлектрическая точка, температурный и pH-оптимумы, термостабильность) и кинетические ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ) характеристики, исследованы субъединичный состав и влияние ионов металлов на активность фермента, обнаружены кофакторы, необходимые для катализа, найдены способы сохранения активности фермента при длительном хранении. Проведенный MALDI-TOF анализ глифосат-оксидоредуктазы показал высокую гомологию с семейством FAD-содержащих монооксигеназ (саркозиноксидаза, D-лизиноксидаза и др.).

#### **Механизм полиспецифичности иммуноглобулинов молока человека**

*Седых Сергей Евгеньевич (Новосибирск, sirozha@gmail.com)*

Гипотеза конформационной пластичности антиген-связывающих участков антител является одним из общепринятых путей объяснения феномена полиспецифичности у иммуноглобулинов. Активные центры молекул моноклональных антител под действием некоторых из связываемых лигандов, могут эффективно изменять конформацию антиген-связывающего домена, подстраиваясь под структуру связываемого лиганда. Описанный механизм полиспецифичности иммуноглобулинов, несомненно, существует и может объяснить неспецифическое связывание моноклональных и природных антител с самыми разными близкородственными лигандами.

В данной работе была впервые исследована полиспецифичность *катализически активных* антител (абзимов). Электрофоретически гомогенные IgG и sIgA молока человека были разделены аффинной хроматографией по сродству к ДНК. Все полученные фракции IgG и sIgA обладали каталитическими активностями в реакциях гидролиза ДНК, АТР, олигосахарида, а также фосфорилирования липидов и олигосахаридов, прочно связанных с антителами. Аналогичная ситуация наблюдалась при последующей хроматографии sIgA и IgG, имеющих сродство к ДНК, на АТР-сепарозе. При этом наблюдалось полное или частичное перекрывание пиков, соответствующих различным исследованным активностям.

Высокое сродство некоторых субфракций IgG и sIgA к аффинным сорбентам, обладающим несколькими каталитическими активностями может указывать на то, что молекулы sIgA и IgG могут содержать антигенсвязывающие центры к различным антигенам.

Таким образом, возможным механизмом происхождения *катализической полиспецифичности* абзимов молока человека, может быть обмен “плечами” их Fab, доказанный ранее для IgG четвертого подкласса крови человека, легкими цепями или, в случае sIgA, образования химерных молекул из мономеров IgA с различными активными центрами. Работа поддержана грантами РФФИ № 07-04-00387, 09-04-00804, Программой фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» № 21.16, Аналитической ведомственной целевой программой «Развитие научного потенциала высшей школы» 2.1.1/5580.

#### **Фосфорилирование тау белка человека по трём остаткам серина**

**влияет на его взаимодействие с белком 14-3-3**

*Случанко Николай Николаевич (Москва, nns@live.ru)*

Тау белок, специфичный для нервной ткани, принадлежит к группе белков, ассоциированных с микротрубочками, и регулирует формирование, динамику и функционирование системы микротрубочек нейронов. По данным литературы точечные мутации, ограниченный протеолиз, окисление SH-групп, а также гиперфосфорилирование тау белка могут приводить к накоплению парно-скрученных филаментов – характерного признака целого ряда нейродегенеративных заболеваний, так называемых таупатий, в

частности, болезни Альцгеймера. Было показано, что универсальный адапторный белок 14-3-3 совместно локализуется с агрегатами тау, и было высказано предположение о том, что 14-3-3 может каким-то образом влиять на образование таких агрегатов. В данной работе было решено исследовать эффект фосфорилирования тау белка на его взаимодействие с 14-3-3.

Методами нативного электрофореза, гель-фильтрации и химического сшивания мы показали, что фосфорилирование короткой изоформы тау белка человека под действием протеинкиназы А (ПКА) значительно усиливает взаимодействие тау с рекомбинантным 14-3-3. Было предположено, что за этот эффект отвечает остаток Ser156 короткой изоформы (или Ser214 длинной изоформы) тау белка человека, расположенный в консенсусной последовательности, узнаваемой 14-3-3. Однако мутация S156A, блокирующая фосфорилирование тау по данному остатку серина, уменьшала, но не полностью отменяла взаимодействие фосфорилированного тау с 14-3-3. Таким образом, мы предположили наличие в молекуле тау других остатков серина, фосфорилируемых ПКА и ответственных за прочное связывание тау с 14-3-3. С помощью метода точечного мутагенеза мы показали, что, по крайней мере, три остатка серина (Ser156, Ser235 и Ser267) короткой изоформы тау играют важную роль во взаимодействии тау с 14-3-3. Таким образом, участки связывания 14-3-3, фосфорилируемые ПКА, находятся в Рго-богатом (Ser156) и тубулин-связывающем (Ser235 и Ser267) доменах тау белка человека. Работа была поддержана грантом РФФИ.

#### **Цитотоксическое действие производных секоизоларицирезинола диглюкозида из семян льна масличного**

**Стасевич Ольга Викторовна** (Белоруссия, Минск, *ostas83@mail.ru*)

Секоизоларицирезинола диглюкозид (СДГ) – фенилпропаноид, относящийся к классу лигнанов. Содержание СДГ в семенах льна масличного достигает 3% в расчёте на обезжиренное сырьё (Johnsson et al., 2000). Это соединение обладает широким спектром биологической активности. Цель данной работы – выделение СДГ из семян льна масличного, получение его производных и исследование цитотоксических свойств полученных соединений. Лигнан СДГ был выделен из семян льна масличного с чистотой 95,3%. Далее было получено его производное, в котором отсутствовала глюкозидная часть (секоизоларицирезинол), а также диацетильное производное по фенольным гидроксилам (секоизоларицирезинол-4',4"-диацетат). Структуры полученных веществ были подтверждены на основании данных ИК-, ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии.

Цитотоксичность изучаемых соединений в концентрациях 11,6, 23,3, 58, 145, 290, 580 мкМ оценивали с помощью МТТ теста (Mosmann, 1983) относительно В-лимфобластоидной клеточной линии Raji. В качестве стандартного цитотоксического средства использовали противоопухолевый препарат этопозид. Лигнан СДГ не проявлял цитотоксического действия по отношению к клеточной линии Raji при концентрации менее 580 мкМ, в то время как его производные обладали антипролиферативным действием. При этом цитотоксический эффект секоизоларицирезинол-4',4"-диацетата ( $IC_{50} = 135 \pm 2,4$  мкМ) был выше секоизоларицирезинола ( $IC_{50} = 143 \pm 3,5$  мкМ). Этопозид проявлял себя как наиболее сильный цитостатик ( $IC_{50} < 11,6$  мкМ).

Цитотоксическую активность по индукции апоптоза для производных СДГ и этопозида относительно той же клеточной линии также оценивали методом проточной цитофлуориметрии. Уровень индукции апоптоза определяли по снижению трансмембранных потенциала митохондрий (детектировался по уровню флуоресценции зонда CMXros) и морфологическим изменениям клеток – уменьшением их в размере, повышением их грануляции. Регистрацию количества апоптотических клеток производили после инкубации с соединениями в концентрациях 58; 145; 290; 580 мкМ в течение 24ч и 48ч. Производные секоизоларицирезинол и секоизоларицирезинол-4',4"-диацетат обуславливали индукцию апоптоза в данном диапазоне концентраций, сопоставимую с действием этопозида. Повышение цитотоксической активности у лигнанов в связи с удалением глюкозидной части и ацетилированием фенольных гидроксилов можно объяснить снижением гидрофильности молекулы, что способствует её большему проникновению через мембрану клетки. Выражаю благодарность к.б.н. Т.В. Шман.

## **Оценка влияния брацциостероидов на индукцию монооксигеназ в опухолевых клетках**

**Сыса Алексей Григорьевич** (Белоруссия, Минск, [aliaksei.sysa@gmail.com](mailto:aliaksei.sysa@gmail.com))

Одним из широко распространенных путей метаболических превращений в организме человека и животных различных по структуре веществ являются окислительные процессы, катализируемые монооксигеназной системой. Ключевыми компонентами монооксигеназных систем являются ферменты суперсемейства цитохромов P450 (CYP450), обладающие широкой субстратной специфичностью. В настоящее время не вызывает сомнений, что уровень экспрессии и спектр каталитической активности некоторых изоэнзимов CYP450 в значительной степени определяет возможность возникновения и развития канцерогенеза. В частности, показана повышенная экспрессия CYP1A1 и CYP1B1 в опухолях. Потенциальная роль CYP1A1 и CYP1B1 в мутагенезе делает перспективным поиск специфических ингибиторов CYP1A1 и CYP1B1 как возможных антиопухолевых агентов.

В связи с вышеуказанным интересным является использование в качестве таких веществ брацциостероидов – стероидных гормонов растений. В последнее время появились сведения об антипролиферативных и потенциально антиканцерогенных свойствах этой группы соединений на фоне низкой токсичности в отношении нормальных клеток.

Целью настоящей работы являлась оценка влияния брацциостероидов на индукцию ферментов CYP450 (в основном CYP1A1 и CYP1B1) в опухолевых клетках (на примере аденокарциномы молочной железы (линия MCF-7)). В качестве индуктора применяли 2,3,7,8-тетрахлородибензо-*p*-диоксин. В работе исследован ряд природных фитогормонов, различающихся строением стероидного скелета и боковой цепи (24-эпифрацисинолид и 28-гомокастастерон) и синтетический стереоизомер 24-эпифрацисинолида, особенность которого заключалась в S-конфигурации 22 и 23 атомов углерода, содержащих гидроксильные группы. Для количественной оценки степени индукции микросомальных ферментов при культивировании опухолевых клеток с брацциостероидами был рассчитан коэффициент эффективности, равный отношению максимальной скорости реакции к константе Михаэлиса. В качестве модельной использовали реакцию ферментативного окисления 7-этоксирезоруфина. Показано значительное влияние на индукцию (22S,23S)-изомера природного 24-эпифрацисинолида в то время действие естественных фитогормонов 24-эпифрацисинолида и 28-гомокастастерона не выходит за пределы статистической ошибки.

В настоящей работе впервые установлено, что брацциостероиды снижают эффективность индукции ферментов CYP450 в опухолевых клетках, причем важное значение имеет структура как стероидного скелета, так и боковой цепи.

## **Рекомбинантная ДНК-метилтрансфераза M1.BspAC1 из *Bacillus psychrodurans* AC: получение и биохимические свойства**

**Тарасова М.В., Кузнецов В.В.** (Новосибирск, [tarasovamv@gmail.com](mailto:tarasovamv@gmail.com))

Сайт-специфичные ДНК-метилтрансферазы (метилазы) – это ферменты, катализирующие перенос метильной группы от донора, S-аденозил-L-метионина (SAM), на адениновое (N6mA-метилазы) или цитозиновое (C5mC- и N4mC-метилазы) основание в определенной последовательности ДНК. Как правило, метилазы вместе с эндонуклеазами рестрикции образуют системы рестрикции-модификации (RM-системы). RM-системы, ферменты которых узнают несимметричные последовательности ДНК (тип II S) включают как минимум две метилазы, каждая из которых модифицирует лишь одну из цепей ДНК. Ранее было показано, что константы Михаэлиса для ДНК, установленные для такого типа N6mA-метилаз, как правило, существенно отличаются от КМ ДНК для N6mA-метилтрансфераз, узнающих симметричные нуклеотидные последовательности.

Ранее нами был обнаружен штамм *Bacillus psychrodurans* AC, содержащий RM-систему, рестриктаза которой узнаёт последовательность 5'-CCGC-3'. Целью работы было клонирование генов одной из метилаз данной RM-системы, получение рекомбинантного белка и сравнительный анализ его каталитических параметров относительно метилаз, узнающих палиндромные последовательности нуклеотидов. Для этого был клонирован фрагмент хромосомной ДНК *B. psychrodurans* AC, включающий, по данным анализа его

нуклеотидной последовательности, гены двух C5mC-метилаз: M1.BspACI и M2.BspACI. Ген *bspAC1M1* был клонирован в составе вектора pJW2 и экспрессирован в клетках *E.coli*. Препарат фермента M1.BspACI был получен путем очистки в пять хроматографических стадий. Были определены оптимальные условия работы рекомбинантного фермента: максимальная его активность проявлялась при температуре 30°C и pH 8. Было установлено, что M1.BspACI модифицирует первый остаток цитозина в последовательности узнавания 5'-CCGC-3'. Определены кинетические параметры реакции метилирования ДНК ферментом M1.BspACI. Каталитическая константа оказалась равной 0,095±0,002 мин<sup>-1</sup>, K<sub>M</sub> ДНК = 0,053±0,007 мкМ, K<sub>M</sub> SAM = 5,1±0,3 мкМ.

Ранее в нашей лаборатории для N6mA-метилтрансфераз IIIS типа было показано, что установленные для них K<sub>M</sub> ДНК существенно выше K<sub>M</sub> ДНК для N6mA-метилтрансфераз, узнающих симметричные нуклеотидные последовательности. По-видимому, это связано с различными механизмами реакции метилирования, катализируемой ферментами этих двух типов. Полученное нами значение K<sub>M</sub> ДНК M1.BspACI согласуется с этой закономерностью. Кроме того, мы показали, что каталитическая константа для метилаз IIIS типа ниже, чем для метилаз с симметричными узнаваемыми последовательностями. Таким образом, в случае как N6mA-, так и C5mC-метилтрансфераз, ферменты, узнающие палиндромные сайты узнавания, проявляют большую активность и эффективнее связываются с ДНК, чем метилтрансферазы, модифицирующие непалиндромные последовательности ДНК.

#### **Количественное определение протеолитических фрагментов белка IGFBP-4 — способ диагностики острого коронарного синдрома**

*Трушина Юлия Александровна (Москва, yulijatryshina@gmail.com)*

Связывающий инсулиноподобный фактор роста белок 4 (IGFBP-4) является одним из представителей семейства IGF-связывающих белков. Согласно литературным данным, его функция состоит в регуляции взаимодействия инсулиноподобного фактора роста IGF с его рецептором. Для IGFBP-4 описана специфическая протеаза PAPP-A, которая расщепляет его в единственном месте — между аминокислотными остатками Met135 и Lys136, что приводит к диссоциации комплекса IGF-IGFBP-4 и взаимодействию первого с рецептором. На данный момент известны две изоформы PAPP-A, присутствующих в организме человека — гомодимерная активная форма PAPP-A и гетеротетрамерный комплекс PAPP-A и proMBP в соотношении 2:2, являющийся неактивной формой протеазы. Согласно литературным данным, присутствие димерной формы PAPP-A в атеросклеротических бляшках связано с процессом их дестабилизации. В связи с этим сделано предположение, что PAPP-A является маркером нестабильной атеросклеротической бляшки и что его клиническая оценка может играть чрезвычайно важную роль в идентификации не только нестабильных бляшек, но и в прогнозировании инфаркта миокарда. На сегодняшний день в литературе отсутствуют данные об исследовании ферментативной активности PAPP-A. Целью данной работы являлось создание системы, позволяющей судить об активности протеазы по продуктам ее реакции, а именно, высокочувствительной иммunoлогической системы, пригодной для количественного определения протеолитических фрагментов IGFBP-4 в биологических жидкостях с целью дальнейшего изучения ферментативной активности протеазы PAPP-A.

Для решения поставленной задачи идеально подходит широко распространенная иммунохимическая система «сэндвич»-типа. В такой системе используют пару антител, эпитопы которых являются пространственно удаленными участками молекулы. В результате инкубации антител с антигеном образуется тройной иммунный комплекс с детекторной меткой, что позволяет количественно определить содержание антигена в образце. Преимуществом этого метода является то, что он позволяет проводить количественные исследования непосредственно в биологических жидкостях с низким содержанием исследуемого белка.

В процессе работы получены 13 клонов гибридом, производящие антитела, специфически узнающие протеолитические фрагменты белка IGFBP-4. Все они оказались специфичны на очень близкие участки молекулы, что делает практически невозможным их

использование в иммуноферментной системе «сэндвич»-типа. Но используя коммерческие антитела в качестве антител подложки, специфичные к другим эпитопам, нам удалось создать флуороиммунную систему «сэндвич»-типа, которая была специфична в отношении протеолитических фрагментов белка IGFBP-4. Используя полученную пару, мы планируем детально изучить ферментативную активность PAPP-A. С помощью данных антител нами была показана потенциальная возможность создания флуороиммунной системы (пары антител), пригодной для количественного определения протеолитических фрагментов IGFBP-4 в биологических жидкостях.

### **Регуляция активности $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы скелетной мускулатуры крыс в норме и в условиях экспериментальной острой высокой гипертермии**

*Тумилович Александра Владимировна (Белоруссия, Минск, nimphaizozera@mail.ru)*

Высокая температура окружающей среды является неблагоприятным фактором, который часто действует на организм человека и животных, приводя к возникновению состояния гипертермии и нарушению функционирования различных органов и систем. Гипертермия сопровождается повышением и качественными нарушениями обмена веществ, потерей воды и солей, нарушением кровообращения и доставки кислорода к мозгу, вызывающими возбуждение, иногда судороги и обмороки. В то же время, искусственная гипертермия применяется при лечении некоторых нервных и вялотекущих хронических заболеваний, а также в комплексной радиотерапии опухолей.

Целью данной работы явилось изучение влияния куркумина и силимарина на активность  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы скелетной мускулатуры крыс в норме и в условиях экспериментальной острой гипертермии. Постановка модели острой высокой гипертермии у крыс проводилась в соответствии с требованиями описанными Л.И Усай, 1990. Активность  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы измерялась на изолированном препарате легкой фракции саркоплазматического ретикулума скелетной мускулатуры крыс по количеству неорганического фосфата, накопленному в среде инкубации и измеренному по методу Ратбуна и Бетлах. Содержание белка в мембранистом препарате измерялось по методу Петерсона. Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ Stadia 6.0.

Установлено, что острая высокая гипертермия (42 °C, 1 час) *in vivo* вызывает некоторое повышение активности  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы скелетной мускулатуры крыс (9,4 % к контролю). В это же время наблюдается уменьшение величины Км с  $8,5 \cdot 10^{-4}$  моль/л, характерной для  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы интактных крыс, до  $3,5 \cdot 10^{-4}$  моль/л у крыс, подвергшихся гипертермии. Это свидетельствует о том, что гипертермия увеличивает сродство  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы к субстрату.

Установлено также, что острая высокая гипертермия не оказывает влияния на время полужизни фермента, которое соответствовало 17 минутам как в норме, так и в условиях гипертермии. Интересно, что силимарин не оказывает достоверного влияния на интактный фермент, но модифицирует активность  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы крыс, подвергнутых гипертермии, достоверно активируя ее в концентрациях  $10^{-10}$ - $10^{-8}$  моль/л и проявляя ингибирующий эффект в концентрациях  $10^{-7}$ - $10^{-6}$  моль/л. В то же время куркумин не оказывает действия на  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазу как в норме, так и в условиях экспериментальной гипертермии во всем исследованном диапазоне концентраций ( $10^{-10}$ - $10^{-6}$  моль/л).

Таким образом, нами был изучено влияние острой высокой гипертермии на активность  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы крыс, а также исследована возможность модифицирующего действия куркумина и силимарина.

### **Изменение экспрессии изоформ трансгелина при развитии рака простаты**

*Уласова Наталья Юрьевна (Москва, ulasova\_n@mail.ru)*

Клеточная подвижность – основная черта нормальных и патологических процессов. Одним из важных признаков опухолевой трансформации клеток считают изменение цитоскелета. Именно изменения актиновых микрофиламентов непосредственно связывают со способностями раковых клеток к повышенной подвижности и метастазированию.

Рак простаты (РП) занимает первое место в структуре онкологической заболеваемости в мире и второе место в структуре онкологической смертности у мужчин в промышленно-

развитых странах, но и характеризуется бессимптомным течением болезни на ранних стадиях, а также отсутствием достоверного диагностического метода выявления этой патологии. Наиболее распространенным методом диагностики РП является определение уровня простат-специфичного антигена (ПСА) в сыворотке крови. Этот метод не является травматичным для пациента, однако его использование не дает 100% достоверных результатов, т.к. повышенный уровень ПСА в крови наблюдается также при доброкачественной гиперплазии, простатите, ишемии или инфаркте предстательной железы.

В связи с этим, актуальным является поиск новых молекулярных маркеров, которые способны не только различать разные виды опухолей простаты на ранних стадиях, но и применение которых будет как можно менее травматичным для пациента.

Многочисленные результаты, полученные другими авторами, подтверждают существенную роль актин-связывающих белков (АСБ) при развитии РП. Таким образом, существуют веские основания считать, что целый ряд АСБ может быть использован в качестве молекулярных маркеров РП на ранних стадиях, когда тканевые симптомы этого заболевания еще не сформировались.

В данной работе для выделения АСБ из гомогената ткани простаты был использован метод, предложенный Goode (2002). Исследуемые образцы ткани простаты последовательно центрифугировали при 17 тыс и 30 тыс оборотов, инициировали полимеризацию актина, а затем осаждали F-актин с ассоциированными актин-связывающими белками. 50 мкг полученного белка наносили на 11 см стрипы и проводили двумерный электрофорез. Методом MALDI-TOF было идентифицировано 26 белков, из них 3 приходится на изоформы актина, 7 – на актин-связывающие белки, оставшееся количество – это белки, характерные для сыворотки и гликопротеиновые ферменты. Сопоставление АСБ, выделенных из гомогенатов ткани простаты с раком IV стадии и из ткани без патологий простаты, выявило различия в количестве такого АСБ, как трансгелин. Количество 3-х его изоформ (трансгелин, трансгелин 2, трансгелин 3) существенно увеличивается в гомогенате ткани простаты с IV степенью рака.

Изменение количества трансгелина при развитии онкологических процессов было показано для многих тканей организма. Увеличение выборки онкологических образцов позволит подтвердить возможность использования полученных данных в диагностике.

### **Фосфорилирование малого белка теплового шока человека HspB8 влияет на его структуру и шапероноподобную активность**

*Шеметов Антон Александрович (Москва, antonbiochem@gmail.com)*

Малые белки теплового шока (sHsp) – широко распространенная группа белков, имеющих небольшую молекулярную массу мономера (от 12 до 43 кДа) и характеризующихся наличием в своем составе высококонсервативной последовательности, называемой  $\alpha$ -кристаллиновым доменом. Установлено участие членов этого семейства в защите клетки от частично денатурированных белков, образующихся при неблагоприятных условиях, таких как тепловой шок, окислительный стресс. Считается, что малые белки теплового шока могут участвовать в регуляции апоптоза, сократительной активности, а также регулировать процессы синтеза и деградации белков. Активность sHsp может регулироваться разными способами, одним из которых является фосфорилирование. Данные литературы свидетельствуют о том, что в условиях *in vitro* малый белок теплового шока с молекулярной массой 22 кДа (Hsp22, HspB8, E21G1), подвергается фосфорилированию протеинкиназой ERK1 по аминокислотным остаткам Ser27 и Thr87, при этом Thr87 может находиться в фосфорилированном состоянии в условиях *in vivo*. К сожалению, влияние фосфорилирования на структуру и свойства HspB8 до сих пор остаются не исследованными. В данной работе, используя различные физико-химические методы, мы исследовали влияние фосфорилирования, катализируемого ERK1, на структуру и шапероноподобную активность HspB8.

Исследуя процесс фосфорилирования HspB8, мы обнаружили, что помимо двух ранее описанных участков, ERK1 может фосфорилировать третий участок, Ser24, который также может находиться в фосфорилированном состоянии *in vivo*. Для того чтобы более детально изучить влияние фосфорилирования на структуру и свойства HspB8, методом направленного

мутагенеза нами были получены белки с точечными заменами, имитирующими фосфорилирование – S24D, S27D и T87D. По данным гель-фильтрации и аналитического ультрацентрифугирования фосфорилирование и мутации, имитирующие его, оказывают влияние на олигомерное состояние HspB8, сдвигая равновесие между димерной и мономерной формами HspB8. Используя метод химического «сшивания» мы обнаружили, что фосфорилирование уменьшает вероятность образования крупных олигомеров. Уменьшение концентрации HspB8 сопровождается значительным увеличением амплитуды отрицательного максимума при 202-205 нм спектра кругового дихроизма, что может свидетельствовать о диссоциации олигомеров HspB8, сопровождающихся изменением вторичной структуры мономера белка. Изменения структуры HspB8, вызываемые мутациями, имитирующими фосфорилирование, сопровождаются повышением шапероноподобной активности в случае мутанта T87D и ее понижением в случае мутантов S24D и S27D. Таким образом, фосфорилирование может оказывать эффект на структуру и свойства HspB8. *Работа поддержанна грантом РФФИ № 04-10-00026-а.*

#### **Фактор некроза опухолей — индуктор сигнальных систем оксида азота и сфингомиелинового цикла в условиях ишемии/реперфузии печени**

*Шупик Мария Александровна (Москва, maria.shupik@gmail.com)*

Экспрессия фактора некроза опухолей (TNF) и активация сигнальных систем оксида азота и сфингомиелинового цикла характеризуют многие патологические состояния. Однако при ишемии/реперфузии эти три сигнальные системы совместно не были изучены. В связи с этим, задачей нашего исследования явилось изучение триады: TNF– оксид азота – сфингомиелиновый цикл, что позволит более полно описать механизм индукции апоптоза в клетках ишемизированной/реперфузированной печени.

Известно, что провоспалительный цитокин TNF способен активировать ферменты, продуцирующие оксид азота (NO-синтазы) и сфингомиелиновый цикл. Основной фермент сфингомиелинового цикла – сфингомиелиназа (КФ 3.1.4.12) – расщепляет сфингомиелин на церамид и фосфохолин. Оксид азота в зависимости от концентрации и типа исследуемых клеток способен как вызывать апоптоз, генерацию церамида и активировать сфингомиелиназы, так и ингибировать процесс апоптоза и блокировать накопление церамида. В свою очередь, церамид и сфингомиелиназы могут повышать уровень экспрессии NO-синтаз, активировать их, приводить к накоплению нитритов и нитратов во внутриклеточной среде, или, наоборот, ингибировать NO-синтазы.

Мы показали, что при ишемии первым значимым событием является экспрессия TNF уже через 15 мин после прекращения кровотока, в то время как изменение содержания оксида азота в печени происходит только через 30 мин после начала ишемии, что подтверждает то, что TNF может вызывать повышение концентрации оксида азота. Анализируя состояние низкомолекулярной ДНК, изолированной из доли печени, подвергнутой длительной ишемии (60 мин) и последующей реперфузии в течение 15, 30 и 60 мин, мы обнаружили, что в ишемизированном органе после 60 мин ишемии ДНК все еще стабильна, однако ее разрушение начинается сравнительно быстро после реперфузии. Спустя 60 мин реперфузии фрагменты ДНК представляют собой типичную апоптотическую “лестницу”. Накопление TNF происходит как в ишемизированном органе, так и после реперфузии, однако апоптотическая деградация ДНК наблюдается лишь тогда, когда активируется нейтральная сфингомиелиназа, приводящая к накоплению проапоптотических агентов сфингомиелинового цикла, и происходит резкое повышение содержания оксида азота. Установленная ранее зависимость активности сфингомиелиназы от концентрации оксида азота может указывать на то, что активация фермента вызывается высокими концентрациями оксида азота, содержание которого резко повышается при реперфузии. Предложенный нами механизм апоптоза в ишемизированной/реперфузированной печени, заключающийся в аккумуляции TNF и последующем накоплении продуктов сфингомиелинового цикла и оксида азота, которые совместно индуцируют апоптоз в клетках печени, позволяет предложить новые стратегии предупреждения ишемических повреждений как при пересадке донорской печени, так и при хирургических вмешательствах на печени.

## ПОДСЕКЦИЯ «БОТАНИКА (ВЫСШИЕ РАСТЕНИЯ)»

### Некоторые биологические особенности пыльцевых зёрен

*Eupatorium cannabinum* L. и *Eupatorium purpureum* L.

*Бабичева Наталья Валерьевна* (Томск, [babichevaNV@yandex.ru](mailto:babichevaNV@yandex.ru))

Показатели морфологии и качества пыльцевых зёрен растений представляют значительный интерес для многих научных и практических направлений – систематики, филогении, палинологии, интродукции, селекционных исследований. Объектами исследования являются два представителя семейства астровых (Asteraceae) – посконник коноплевидный (*Eupatorium cannabinum* L.) и посконник пурпурный (*Eupatorium purpureum* L.). Эти виды представляют научный и практический интерес, являясь ценными лекарственными, медоносными и декоративными растениями. Надземная часть их используется в качестве противовирусного, ранозаживляющего, потогонного, желчегонного, антигельминтного средств. Для создания сырьевой базы лекарственных растений в Западной Сибири, проводятся интродукционные исследования данных видов. Успешность интродукции во многом зависит от качества пыльцевых зёрен, определяющее эффективность опыления и нормальное протекание процесса оплодотворения, особенно для тех видов, которые ранее не произрастали в исследуемом регионе.

Исследование зрелых пыльцевых зёрен изучаемых видов, проводили в 2008–2009 гг., выращиваемых на экспериментальном участке Сибирского ботанического сада. Окраску пыльцевых зёрен осуществляли с помощью красителя ацетоорсина. При этом фертильные пыльцевые зёдрина окрашивались в красный цвет, а стерильные в бледно-розовый. Объём просмотренного материала составил 10 тысяч пыльцевых зёрен по каждой выборке растений. Пыльцевые зёдрина *E. cannabinum* L. и *E. purpureum* L. с полюса округло-треугольные, с экватора округлые, трехбороздные. Борозды длинные, сужающиеся к концам. Экзина толстая, характеризующаяся наличием шипиков. Диаметр пыльцевых зёрен у *E. cannabinum* L. варьировал в среднем от 9,3 мкм до 9,6 мкм в зависимости от года наблюдений. У *E. purpureum* L. наблюдали увеличение диаметра пыльцевых зёрен до 11,5 мкм. Отмечено, что размеры пыльцевых зёрен у *E. cannabinum* L. характеризовались различными уровнями варьирования. Коэффициент вариации данного показателя составлял в 2008 г. – 10,5 %, в 2009 г. – 5,2 %. У *E. purpureum* L. отмечали более выровненные показатели коэффициента вариации диаметра пыльцевых зёрен, которые составляли в 2008 г. – 5,4 %, в 2009 г. – 4,9 %. Показано, что в 2008 г. у *E. cannabinum* L. фертильность пыльцевых зёрен составляла 64 %. В 2009 г. фертильность была значительно выше и составляла 94 %. Вероятно снижение фертильности в 2008 г. было связано с засушливым периодом в момент созревания пыльцевых зёрен. У *E. purpureum* L. данный показатель более выровнен и составлял 91–93 % в зависимости от года наблюдений.

Таким образом, строение, величина и форма пыльцевых зёрен изучаемых видов полностью отвечает характерным особенностям пыльцы энтомофильных растений. Изучаемые виды различаются по размерам пыльцевых зёрен. Отмечено пониженное содержание фертильных пыльцевых зёрен, что ставит вопрос о необходимости дальнейшего изучения механизмов репродуктивной биологии видов.

*Автор выражает признательность Т.Г. Хариной за помощь в подготовке тезисов.*

### Морфогенез цветка у раздельнолепестных и спайнолепестных

представителей семейства Ericaceae

*Вислобоков Николай Александрович* (Москва, [number22@yandex.ru](mailto:number22@yandex.ru))

Одна из ключевых особенностей двудольных растений из группы астерида – наличие спайнолепестного венчика. Поскольку среди астерида есть и раздельнолепестные формы, причем не образующие компактной таксономической группы, эволюция данного признака, очевидно, изобиловала гомоплазиями, которые могут быть представлены как параллелизмами, так и реверсиями. В этом отношении привлекает внимание семейство Ericaceae (вересковые). В целом для вересковых характерна спайнолепестность, однако она наблюдается не у всех представителей. В трибе Empetreae венчик раздельнолепестный, а у

представителя Rhodoreae *Ledum palustre* венчик в раскрытом цветке выглядит разделнопестным. Этот вид близок к видам *Rhododendron* (которые имеют развитую трубку венчика) и в современной литературе рассматривается как *Rh. tomentosum*. Изучение морфогенеза цветка этого растения на сериях поперечных срезов выявило наличие на ранних стадиях развития венчика короткой трубки, что говорит о вторичной разделнопестности у этого растения (Leins, 1964).

Мы изучили морфогенез цветка у двух разделнопестных (*Rhododendron tomentosum*, *Empetrum hermafroditum*) и двух спайнолепестных (*Phyllodoce caerulea*, *Loiseleuria procumbens*) представителей Ericaceae с помощью сканирующего электронного микроскопа.

Околоцветник и андроцей тримерные у *Empetrum* и пентамерные у остальных изученных видов. У *Empetrum* и *Loiseleuria* один круг андроцей, а у *Phyllodoce* и *Rhododendron* – два. Гинецей из 6-9 плодолистиков у *Empetrum*, из 5 плодолистиков у *Rhododendron* и *Phyllodoce* и из 2-3 плодолистиков у *Loiseleuria*. По нашим данным, ранние стадии развития цветков с пентамерным околоцветником сходны. Чашечка закладывается в виде меристематического кольца, на котором различимы вершины пяти чашелистиков. Венчик закладывается в виде пяти бугорков, чередующихся с вершинами чашелистиков. На ранних стадиях развития гинеца между лепестками появляются перемычки. У *Phyllodoce* и *Loiseleuria* они дают начало трубке венчика, наблюдаемой в дефинитивном цветке, а у *Rh. tomentosum* не получают дальнейшего развития. Таким образом, наши наблюдения подтверждают данные P. Leins (1964) о наличии у *Rh. tomentosum*rudимента трубы венчика, что говорит в пользу утраты спайнолепестности в этой линии эволюции. У *Empetrum*, по нашим данным, какие-либо следы трубы венчика отсутствуют на всех стадиях морфогенеза цветка. Таким образом, не исключено, что разделнопестность носит здесь первичный характер. Однако возможно, что у предков *Empetrum* имела место утрата всех следов спайнолепестности в связи с глубокой перестройкой общего плана строения цветка.

Автор выражает благодарность Д.Д. Соколову за помощь в подготовке тезисов. Работа выполнена при поддержке грантов Президента РФ (проект № МД-2644.2009.4) и РФФИ (09-04-01155).

### Полиморфизм пыльцы в роде *Lythrum* L.

Волкова Ольга Александровна (Москва, centaurea57@yandex.ru)

Семейство Lythraceae крайне интересно с точки зрения палиноморфологии и биологии опыления. Целью настоящей работы было изучение полиморфизма палиноморфологических признаков тристильного вида *Lythrum salicaria*. Для тристильных видов дербенника характерно наличие трех типов цветков, различающихся по высоте столбика и длине тычиночных нитей. Длинные тычинки коротко- и среднестолбиковых морф имеют зеленые пыльники, тогда как короткие тычинки – желтые. В пределах длинностолбиковой морфы тычинки обоих кругов имеют пыльники желтого цвета. Цвет пыльников не зависит от степени освещенности цветка в процессе развития. Разный цвет пыльников обусловлен наличием в экзине пыльцевых зёрен (п.з.) из длинных тычинок проочно связанных пигментов, которые возбуждаются в зелёной области, флуоресцируют в красной. Тогда как в пыльцевых зёдрах из коротких тычинок пигмент отсутствует.

Для всех типов цветков дербенника характерны 6-бороздно-3-оровые п.з., значительно варьирующие по размерам. Пыльца из длинных тычинок средне- и короткостолбиковых морф достоверно крупнее, чем пыльца из коротких и средних тычинок всех трех морф (One-way, ANOVA;  $p = 0,00002$ ). Пыльцевые зерна коротких и средних тычинок достоверно по размерам не различаются ( $p = 0,62$ ). Сложные и простые борозды всех исследованных п.з. достоверно различаются по длине: длина простых борозд значительно меньше, чем длина сложных апертур. По-видимому, простые («псевдоборозды») и сложные борозды по своим функциям не идентичны и играют разную роль в жизни п.з. Наши исследования показали, что функцию гармономегата выполняют борозды обоих типов, в то время как прорастание и образование пыльцевых трубок происходит только через сложные апертуры. Процент проросших п.з. варьирует от 9 до 20% для длинных тычинок и от 18 до 38% для коротких тычинок, причем скорость прорастания п.з. из коротких тычинок существенно ниже.

Изучение жизнеспособности пыльцы *Lythrum salicaria* в разных популяциях не выявило связи между количеством стерильных п.з. и положением тычинок в цветке. Повторное исследование фертильности п.з. в тех же популяциях показало, что этот показатель значительно варьирует в разные сезоны. Возможно, разница в уровне стерильности п.з. обусловлена внешними факторами, а не отражает особенности биологии растения.

Пыльцевые зёрна всех исследованных морфологических типов обладают струйчатой поверхностью, однако длина струй, степень их выраженности и ориентация в разных морфах различна. Как правило, п.з. из длинных и средних тычинок обладают отчетливыми, длинными струями. У пыльцевых зерен из коротких тычинок поверхность морщинистая, струи короткие, слаженные, часто беспорядочно ориентированные. Хуже всего струйчатая скульптура поверхности выражена у п.з. из коротких тычинок длинностолбиковых растений.

Таким образом, тристилия у *Lythrum salicaria* проявляется в целом комплексе палиноморфологических признаков, к которым относятся цвет пыльников, размеры и скульптура поверхности п.з.

**Особенности формирования гинецея у *Trachomitum sarmatiense***  
*Геворгян Маргарита Мартиновна (Санкт-Петербург, m\_13@list.ru)*

Гинеций преимущественно апокарпный и состоит из 2 плодолистиков. Однако, плодолистики в проксимальной зоне гинецея срастаются как между собой, так и с окружающими элементами цветоложа. Завязь полунижняя, что является апоморфным признаком, так же как у *Arosaetum androsaemifolium* из того же подсемейства *Arosunoideae*.

На ранних стадиях развития в основании цветка наблюдается срастание всех его элементов, видны контуры двух плодолистиков и их будущих гнезд – стерильная часть синкарпной зоны гинецея. Над ней формируется 2-гнездная синкарпная зона, которая переходит в паракарпную одногнездную зону, образованную за счёт срастания вентральных краев смежных плодолистиков, что также является апоморфным признаком, сближающим изученный нами вид с *A. androsaemifolium*. Паракарпная зона постепенно переходит в апокарпную. В основании завязи четко выявляется стерильная синкарпная 2-гнездная зона, переходящая в фертильную синкарпную зону. В центре этой зоны хорошо выражена колумелла, наличие которой свидетельствует о продвинутости вида, по сравнению с другими представителями семейства. К моменту опыления увеличивается протяженность фертильной синкарпной зоны, а также появляется промежуточная синкарпно-паракарпная зона, в которой выявляется постгенитальное несовершенное срастание вентральных краев плодолистиков. В верхней части апокарпной зоны совершенное срастание вентральных краев плодолистиков сменяется несовершенным, а края плацент отходят друг от друга. Плодолистики при этом объединяются, образуя канал, выстланный густоплазменными клетками. С переходом в гиностегий канал застает проводниковой тканью. Таким образом, формируется столбик полузакрытого типа, подобно *Vinca minor* из подсем. *Plumerioideae*, что является промежуточным признаком. Дистальные концы плодолистиков представляют собой лопасти рыльца.

Из плезиоморфных признаков следует отметить наличие массивного кольца проводящих пучков, от которого отходят сначала дорсальные, а затем плацентарные пучки, ответвляющиеся в каждый семязачаток. Затем, от этого же кольца отходят вентральные пучки, заканчивающиеся в верхней части завязи. Следовательно, иннервация семязачатков у *T. sarmatiense* является трансверсальной, при этом колумелла лишена проводящей системы. Следует подчеркнуть, что в стенке завязи, кроме дорсального и вентральных пучков, подобно *A. androsaemifolium* и *V. minor*, формируется большое число самостоятельных пучков, ответвляющихся от кольца, что также является плезиоморфным признаком.

Таким образом, структура гинецея *Trachomitum sarmatiense* сочетает в себе как прогрессивные, так и примитивные признаки, с преобладанием апоморфных, в отличие от изученных нами *A. androsaemifolium* и *V. minor*.

Благодарю за помощь в исследованиях научного руководителя Шамрова Ивана Ивановича.

**Молекулярные маркёры в решении некоторых спорных вопросов  
системы рода Горох (*Pisum* L.)**

**Демиденко Наталья Владленовна (Москва, kapitowka3000@mail.ru)**

Выделение гороха красивого (*Pisum formosum* (Stev.) Alef.) в отдельный род вавиловия красивая (*Vavilovia formosa* (Stev.) Fed.) остается дискуссионным с момента описания данного таксона. Ещё в 1970-х гг был проведён ряд скрещиваний вавиловии красивой с культурными формами гороха, которые, однако, были безуспешными, но в 1980-х годах опыты были повторены; семена, полученные от скрещивания гороха и вавиловии оказались жизнеспособными и дали начало стерильным гибридам (Голубев, 1990). Наряду с рядом общих морфологических черт, это обстоятельство может рассматриваться как аргумент в пользу близости *Pisum* s.str. и *Vavilovia*.

Эти опыты заставляют внимательнее отнестись к ревизии вида *Pisum formosum* и выделению монотипного рода *Vavilovia*, сделанному А.А. Федоровым в 1939 и 1952 гг. (Федоров, 1939; Федоров, 1952).

Целью данного исследования являлось уточнение положения многолетнего гороха красивого (*P. formosum* (Stev.) Alef.) в системе трибы Fabeae. В анализ были включены собственно горох (сорта различных селекционных центров и дикие подвиды *P. sativum*, *P. fulvum*), вавиловия из различных частей ареала на территории бывшего СССР, а также несколько видов чин (*Lathyrus* L.), с которыми вавиловия имеет ряд общих морфологических черт и рядом авторов сближается (Макашева, 1971). По результатам изучения полиморфизма ДНК-маркеров (RAPD, CAPS) и статистической обработки полученных данных построено филогенетическое древо. Его топология отражает внутривидовую дифференциацию *Vavilovia*, соответствующую географической приуроченности сборов. Полученные данные не дают оснований однозначно судить о таксономическом положении *V. formosa* в трибе, т.к. изученные образцы этого вида образуют самостоятельную кладу, обнаруживающую в целом несколько большую близость к *Pisum*, чем к *Lathyrus*. Внутриродовой полиморфизм чин значительно больше, чем у вавиловии и гороха. Для более детального определения статуса *Vavilovia* в системе трибы требуется проведение дополнительных исследований.

**Морфология цветков и соцветий *Acer platanoides* L.  
в связи с эволюционным переходом к двудомности в роде *Acer***

**Капцова Марина Сергеевна (Москва, mar-kap@yandex.ru)**

У представителей *Acer platanoides* L. наблюдается большое и, на первый взгляд, неупорядоченное разнообразие структуры цветков и соцветий, связанное с разной взаимной степенью развития андроцоя и гинецея.

Мы изучили строение цветка *A. platanoides* на разных стадиях развития с помощью сканирующей электронной микроскопии. Также зарисовали схемы строения соцветий, отражающие структуру и распределение цветков разных половых типов.

По нашим наблюдениям, все цветки *Acer platanoides* развиваются как потенциальнов обоеполые. Флоральные примордии в генеративных почках формируются в июле. В августе–сентябре околоцветник в цветках развит ещё слабо и присутствует в виде небольших бугорков, тычинки в числе 6–8 располагаются в один круг. Зачаток гинецея представлен двумя развивающимися пликатными плодолистиками. В марте–апреле цветки имеют ещё сравнительно слабо сформированный околоцветник. Пыльники крупные, до 0,5 мм длиной, сидящие на коротких тычиночных нитях, плодолистики, иногда ещё незамкнутые, до 200 мкм шириной.

В только что раскрывшихся генеративных почках большинство цветков ещё выглядят одинаково и их пол неясен. Достоверно определить пол цветка удаётся лишь у полностью сформированных цветков начиная с 7–8 дня после распускания генеративных почек. У раскрывшихся цветков никогда не встречается обоеполых цветков. Если пыльники вскрываются, гинеций всегда остается недоразвитым. Он может быть разных размеров: от достаточно крупного с хорошо заметными стилодиями, до едва заметного. В том случае, если плодолистики фертильны, пыльники тычинок никогда не вскрываются, несмотря на то, что они по размерам сходны с пыльниками фертильных тычинок.

Таким образом, у клёна остролистного развиваются всего два типа цветков – функционально мужские и функционально женские. Оба типа цветков могут располагаться как в отдельных однополых, так и в смешанных обоеполых соцветиях.

Соцветия *Acer platanoides* устроены по типу метёлки: это закрытое монотелическое соцветие, в котором боковые оси усложняются в базипетальной последовательности. Степень ветвления осей достигает 3–4 порядков. В верхней части соцветия наблюдается зона, представленная 1–4 метамерами, в которой боковые оси – одиночные цветки.

Нами установлено, что по половому составу цветков соцветия *A. platanoides* бывают четырёх типов: мужские, женские, обоеполые с женским доминированием и обоеполые с мужским доминированием. В обоеполых соцветиях с женским доминированием терминальные цветки на главной оси и на нижних паракладиях женские, при этом пазушные цветки, расположенные под ними, всегда мужские.

В обоеполых соцветиях с мужским доминированием терминальные цветки на главной оси и на нижних паракладиях мужские, а расположенные под ними пазушные цветки – женские. По нашим данным, у *A. platanoides* наиболее распространены обоеполые соцветия с женским доминированием. Реже всего обнаружены растения с женскими соцветиями.

### О двойственной природе столона *Tulipa biebersteiniana* и его развитии

**Кобозева Екатерина Александровна** (Москва, *E\_Kobozeva@mail.ru*)

Исследование столона тюльпана интересно, так как он принципиально отличается по анатомическому и морфологическому строению от столонов других растений, представляющих собой видоизмененные побеги.

Изучены луковицы и столоны *Tulipa biebersteiniana*, собранные в 2006, 2008 и 2009 г.г. в Пензенской, Саратовской и Волгоградской областях. Препарирование луковиц проводили под бинокуляром МБС 10. Анатомические срезы выполняли на замораживающем столике ОМТ 28-02Е с помощью микротома.

У большинства тюльпанов образующиеся ежегодно столоны выполняют функцию углубления почки возобновления, и лишь у немногих, таких как *T. biebersteiniana*, – участвует в размножении. Внутрилуковичное развитие обоих столонов сходно. Они имеют двойственную природу, и образуются в результате разрастания узла на донце молодой луковицы и основания влагалища ассилирующего листа. В образующийся единый вырост – будущий столон – смещается пазушная почка, происходит так называемый эпифильный сдвиг. Внелуковичное развитие подробно изучено нами у столона размножения. Его можно условно разделить на 3 этапа. 1. Активный рост столона. В начале весенней вегетации тюльпана столоны в поперечном сечении округлый, полый. В средней и базальной части столона хорошо выражены наружная и внутренняя эпидермы, паренхима. Клетки паренхимы разного размера, содержат много крахмальных зерен. Проводящая система столона – 6–10 закрытых коллатеральных пучков, расположенных в один круг; почки – 5–8 таких же пучков, собранных в плотный «венец». На верхушке столона клетки паренхимы более мелкие, одинакового размера. Полосы столона отсутствуют, здесь расположена почка – зачаточная дочерняя луковичка, представляющая собой на этом этапе меристематический бугорок. Она обращена своим апексом к материнской луковице. Удлинение столона происходит за счет деления мелких клеток на верхушке и роста растяжением клеток основной части столона. 2. Перераспределение запасных веществ в системе столон – дочерняя луковица. Ко времени отмирания надземной части растения, связь дочерней луковицы с материнской еще существует. Запасные вещества столона транспортируются в дочернюю луковицу. Рост столона прекращается, он достигает максимальной длины (до 20–25 см). Его верхушка загибается вниз, и дочерняя почка принимает вертикальное положение. Стенки столона преобразуются в первую покровную чешую дочерней луковицы. 3. Отмирание столона. Отделение дочерней луковицы. После того, как все запасные вещества из столона транспортированы в дочернюю луковицу, он отмирает, дочерняя луковица начинает существовать самостоятельно. Вегетативно размножаются преимущественно прегенеративные особи. Они формируют один, редко два столона размножения. Внелуковичное развитие столона длится около 15 дней. Таким образом, способность

тюльпана с ранних онтогенетических стадий формировать ежегодно в короткие сроки длинный столон размножения с дочерней луковицей на конце делает вид вегетативно подвижным.

Автор выражает благодарность научному руководителю д.б.н., проф. Н.И. Шориной.

### **Ядовитый «зелёный пожар» и новые решения ряда эколого-народнохозяйственных проблем**

**Кудрявцева Екатерина Николаевна (Тверь, [backy@pisem.net](mailto:backy@pisem.net))**

Уже несколько десятков лет в Тверской области и в других регионах России значительно проявляется растение, которое может вызвать «биологическую катастрофу», – гигантский борщевик. Тверской Государственный Университет совместно с ГНУ ВНИИ льна проводят исследования по уничтожению борщевика Сосновского с помощью гербицидов в Тверской области. Для этой цели используются гербициды Ленок и Анкор-85.

Результаты проведенных полевых испытаний 2006–2009 гг. показали высокую эффективность данных гербицидов по остановке роста и снижению массы растений борщевика Сосновского для всех трёх сроков обработки, которая при учётах через 45 суток составляла 92–98%. При учёте в конце периода вегетации борщевика полученный эффект сохранился и даже усилился.

При применении баковых смесей Ленка (10 г/га) и Анкора-85 (50 г/га) с глифосатсодержащим препаратом Раундап (3 л/га) были также получены высокие показатели эффективности угнетения борщевика через 45~суток и в конце периода вегетации (97–99%).

При учёте эффективности гербицидов раздельно для борщевика семенного и корневого произрастания установлено, что их чувствительность по отношению к гербицидам разная. Более чувствителен по отношению к гербицидам борщевик семенного произрастания. По отношению к борщевику корневого произрастания большая эффективность (более 98 %) была отмечена для более высоких доз Анкора-85 (200 г/га) и Ленка (20–40~г/га).

Биологические, токсикологические и физико-химические исследования актуальны также в отношении нежелательных растений конопли и мака, сегетальной флоры на территориях железных дорог, электростанций и других промышленных объектов (иногда вызывающей настоящие пожары), на сельскохозяйственных угодьях.

### **Биохимическая специализация подтрибы *Hordeinae* Dum. (*Triticeae*) Мишанова Екатерина Викторовна (Москва, [gvozdevka@yandex.ru](mailto:gvozdevka@yandex.ru))**

На основе использования гипотезы аминокислотного состава семян (АС) гипотетического предка злаков был предложен оригинальный подход (Семихов, 1988) для решения проблем специализации и эволюции таксонов в трибе *Triticeae*, и в частности в подтрибе *Hordeinae*. Гипотеза дает возможность сравнивать степень специализации таксона в трибах, подтрибах и выявлять эволюционные тренды накопления в семени разных аминокислот, применяя критерий – индекс удаленности от гипотетического предка (Иу) (Семихов и др., 2000). Для этой цели были использованы данные АС подтрибы *Hordeinae*, выступающего как критерий рода. Таксоны ранжированы как на основе Иу, так и по степени различия (Ср) (Соколов и др., 2007). Показано, что в подтрибе *Hordeinae* минимальный Иу обнаружен для *Pascopyrum* – 23,4, а максимальный – для *Leymus* – 38,7. Значения Иу намного превышают те, что установлены для заведомо древних таксонов (у бамбуковых Иу составляет от 5,8 до 11,8, у рисовых – 5,5–6,7), что указывает на высокую специализированность представителей данной подтрибы (Семихов и др., 2009). Также выявлена несбалансированность АС. Аминокислотный состав отличается высоким содержанием глутаминовой кислоты и пролина и низким содержанием лизина и аргинина. Было показано, что Ср между таксонами достигает высоких значений. Так, наиболее резко различаются пары родов *Pascopyrum* – *Leymus* (Ср 22,1), *Pascopyrum* – *Hordelymus* (Ср 19,5) и *Pascopyrum* – *Pseudoroegneria* (Ср 17,7). При сравнении АС таксонов относящихся к разным подтрибам обнаружено, что ряд родов не различаются по этому признаку (например, *Leymus* (*Hordeinae*) и *Sitopsis* (*Triticinae*)), хотя эти таксоны в подтрибах характеризуются как самые специализированные.

В связи с этим, можно предположить, что в процессе эволюции трибы *Triticeae* шли процессы параллельной эволюции, при которой таксоны из подтрибы *Hordeinae*, *Triticinae*, *Agropyrinae* по биохимическим признакам эволюционировали в одном направлении.

Исследования поддержаны грантом РФФИ, проект 08-04-00335а.

#### **Аэропалинологическое изучение атмосферы г. Перми**

**Новожилова Е.Н., Ременникова М.В. (Пермь, Lena\_Novozhilova@mail.ru)**

В Перми впервые проведены палинологические исследования атмосферы в 2008 и 2009 годах с 20 марта по 30 сентября при помощи гравиметрического пыльцеуловителя Дюрама. Пыльцевые зерна, циркулирующие в воздухе, осаждались пассивно на предметные стекла, которые менялись и анализировались каждый день. Подсчет, идентификацию пыльцевых зерен (п.з.) проводили с помощью светового микроскопа OLYMPUS BX51 с системой визуализации изображения DP71 и программой CELLB. Результаты проб сопоставлялись с метеорологическими данными, взятыми из архива погоды в городе Перми ([www.infospace.ru](http://www.infospace.ru)).

В 2008 году в пыльцевом спектре воздушного бассейна г. Перми зарегистрировано 3537 п.з./см<sup>2</sup> поверхности препарата, в 2009 году – 3085. Определены п.з., принадлежащие к 18 пыльцевым типам (*Acer*, *Alnus*, *Betula*, *Corylus*, *Fraxinus*, *Juniperus*, *Picea*, *Pinus*, *Populus*, *Quercus*, *Salix*, *Tilia*, *Ambrosia*, *Artemisia*, *Chenopodiaceae*, *Plantago*, *Poaceae*, *Rumex*, *Urtica*, *Asteraceae*). В спектрах двух лет доминировали п.з. древесных растений (11 типов из 18), в 2008 г. они составляли 79% и 80% (в точках наблюдения по ул. Островского, 113, ул. Ленина, 13 соответственно), в 2009 – 84%. Это связано с особенностями флоры города. Это объясняет пик обращений пациентов к аллергологам в период цветения древесных растений в конце мая – начале июня. Сезон пыления в Перми с с первой или второй декады апреля до конца сентября. По результатам исследований выделены характерные периоды пыления регионального спектра. Первый период (первая – вторая декады апреля – вторая декада июня) – пыление древесных таксонов. Концентрация п.з. в атмосфере в этот период максимальна. Второй период (третья декада июня – август) пыление травянистых растений. В спектре этого периода фиксируются единичные пыльцевые зерна древесных растений. Массовое цветение растений завершается к концу августа, единичные п.з. регистрируются до конца сентября. На начала сезона пыления растений, количественное содержание п.з. в атмосфере влияют метеофакторы. Начало сезона пыления наступает через 5–7 дней после установления постоянных положительных среднесуточных температур. Определен основной период пыления, соответствующий 95% суммарного годового содержания пыльцы этого таксона. Наблюдается четкая зависимость концентрации пыльцевых зерен в атмосфере и температуры.

На основании результатов, был составлен и опубликован календарь пыления аллергенных растений Пермского края. Проведенные исследования, выявляющие региональные особенности территории, позволяют улучшить прогнозирование пыления растений в весенне-летний период с целью совершенствования диагностики поллинозов и оптимизации выбора сроков и объема необходимой терапии.

Мы выражаем благодарность за консультации научному руководителю профессору кафедры ботаники и генетики растений Пермского государственного университета д.б.н. Новоселовой Л.В., доцу кафедры ФПКИПС Пермской государственной медицинской академии им. ак. Е.А.Вагнера д.б.н. Минеевой Н.В. и аспиранту этой же кафедры Малыгиной К.В., и сотрудникам биологического факультета Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова к.б.н. Полевовой С.В. и к.б.н. Северовой Е.Э.

#### **Интродукция и подбор сортов *Zizyphus jujuba* для многоцелевого использования в Волгоградской области**

**Семенютина Виктория Алексеевна (Волгоград, VSem89@mail.ru)**

Унаби (*Zizyphus jujuba* Mill.) является ценной лесомелиоративной, декоративной, плодовой и лекарственной культурой из семейства крушиновых. Её родина Китай, где площади промышленных насаждений достигают 200 тыс. га. Морозостойкие сорта *Zizyphus*

*jujuba* представляют научно практический интерес для возделывания в Волгоградской области, которая отличается частым повторением морозных зим, засух, суховеев, недостаточным количеством осадков. Эти факторы лимитируют рост и развитие насаждений.

В регионе интродуцированы шесть сортов *Zizyphus jujuba*, произрастающих в ОНО «Волгоградское» РАСХН: крупноплодные (Та-Ян-Цзао, Южанин), среднеплодные (Дружба, Финик) и мелкоплодные (Темрюкский, Сочинский). Экспериментальные исследования выполнялись по общепринятым в интродукции растений методикам.

При изучении унаби важно знать ритм их сезонного развития, поскольку он дает основные представления об отношении растений к новым условиям. Как показали наши наблюдения мелко- и среднеплодные сорта заканчивают вегетацию на 10 дней раньше. Сроки прохождения фенофаз всех сортов сближены, особенно в начальный период вегетации, что связано с быстрым нарастанием положительных температур.

Оценку унаби с точки зрения зимостойкости позволили дать зимы, которые характеризовались резкими температурными перепадами. В 2005/2006 гг. по сравнению с предыдущими годами зафиксировано длительное снижение температуры во второй половине января. Ответная реакция на эти климатические факторы визуально определялась весной по наличию поврежденных побегов. Если в молодом возрасте повреждение стволиков над уровнем снегового покрова проявлялось в виде трещин и морозобоин, то во взрослом состоянии эти повреждения нами не были замечены. Начало отрастания побегов зафиксировано в мае, а в конце сезона растения восстановили свой габитус, что указывает на хорошую регенерационную способность спящих почек.

Изученные сорта обладали высокой засухоустойчивостью и способностью регулировать свой водный обмен в засушливое время года. В период интенсивного роста растения имели стабильную оводненность листьев, несмотря на высокие летние температуры (30°-38°) и падения влажности воздуха (до 25%).

В условиях интродукции унаби – листопадный кустарник, до 2,5-3,0 м, крона широко раскидистая или пирамидальная, отличается скороплодностью. Листья унаби продолговатые, ланцетные, цветки мелкие, обоеполые, зеленовато-белого цвета, душистые, с нежным ароматом. Плоды имеют различную форму и величину. Масса плодов крупноплодных сортов превышает 30 г, а мелкоплодных 1-2 г.

В отдельные годы есть опасность повреждения плодов осенними заморозками. Наиболее уязвимы в этом отношении крупноплодные сорта. На высокие адаптивные способности мелкоплодных форм указывает наличие самосева. Наиболее устойчивыми в условиях интродукции являются мелкоплодные сорта, которые перспективны для многофункциональных насаждений деградированных ландшафтов засушливого региона.

#### **Особенности жизненных форм ольхи серой (*Alnus incana* (L.) Moench)**

**Ситников Константин Сергеевич** (Кострома, [snipe301@rambler.ru](mailto:snipe301@rambler.ru))

Жизненная форма *Alnus incana* исследована недостаточно. Цель настоящей работы – анализ жизненной формы ольхи серой в разных эколого-ценотических условиях. Исследования проводились в поймах и на склонах надпойменных террас пяти малых рек. Анализировалась жизненная форма генеративных особей. Параллельно с этим производилось геоботаническое описание сообществ. Было заложено 20 пробных площадей размером 100 м<sup>2</sup>.

Выявлено, что обычным типом жизненной формы во всех исследованных экотопах является куртинообразующее (корнеотпрысковое) дерево. В состав куртины входят корневые отпрыски, представленные как одностольными, так и порослеобразующими деревьями. Одностольные деревья в составе куртины – наиболее часто встречающийся тип жизненной формы во всех экотопах.

Порослеобразующие деревья, приурочены преимущественно к поймам и увлажненным склонам долин рек (31% от общего количества площадок). Альфа-разнообразие высших растений в данных сообществах составило 24 вида. Количество видов антропогенной (An) эколого-ценотической группы (ЭЦГ) составило 11,5%, а болотной (Wt) 6,2%. На 69%

площадок порослеобразования не обнаружено. Разнообразие составило 29,8 видов на площадку. Доля Ап ЭЦГ в составе растительности составляет 5,4%, а Вт ЭЦГ 2,8%. Жизненная форма дерево-«куст», формирующаяся в имматурном онтогенетическом состоянии, отмечена на 56% пробных площадей во всех типах экотопов. Чаще она встречается в условиях несомкнутого древостоя, в сообществах, где альфа-разнообразие составляет 22,6 вида. В составе растительности доля Ап ЭЦГ составляет 13%. Различные нарушения почвенного покрова, например оползневые явления, вымывание и вытаптывание скотом приводят к увеличению порослеобразующей и корнеотприсковой способности особей *Altis incana*. Таким образом, поливариантность жизненной формы *A. incana* является важным адаптивным признаком к различным эколого-ценотическим условиям.

### **Особенности цветения и плодоношения сортов *Corylus pontica* в условиях интродукции**

**Хужахметова Алия Шамильевна (Волгоград, aliyaSHam@mail.ru)**

Сорта *Corylus pontica* C. Koch (фундук) имеют важное хозяйственное значение. Ценность представляют их плоды, которые содержат до 68–71% жиров, около 17–18% белка, витамины, минеральные соли. При выявлении адаптивных сортов фундука проводилось изучение экологии цветения и плодоношения в жестких агроклиматических условиях.

В Волгоградской области с целью создания насаждений для многоцелевого использования (декоративные, лесомелиоративные, плодовые) проходят испытание морозостойкие сорта *Corylus pontica* – Черкесский-2, Футкурами, Президент. Растения были получены из Всероссийского НИИ цветоводства и субтропических культур и высажены на сортогучасток ОНО «Волгоградское» РАСХН, почвы светло-каштановые, содержание гумуса до 1%.

В условиях эксперимента у сортов начало вегетации приходилось на III декаду марта, что на месяц позже, чем в условиях Черноморского побережья. Цветение тычиночных и пестичных цветков предшествовало распусканью почек. Более ранний срок цветения отмечен у сортов Футкурами и Президент (16–18 марта), затем с разницей в 5 дней следует Черкесский-2. Типичное цветение фундука – протандрическое с более ранним цветением мужских соцветий. В засушливые годы наблюдался сдвиг в сторону протогиничного типа цветения. По годам разница в сроках цветения фундука колеблется от 10 до 20 дней, что обусловлено ходом температур. Критическими температурами для мужских соцветий являются понижения температур в зимний период до  $-37^{\circ}\text{C}$ .

Вступление в генеративную фазу указывает на приспособление растений к условиям района возделывания. Сорта фундука вступают в генеративную фазу с 4-5-летнего возраста. В Волгоградской области от периода цветения до полной физиологической спелости плодов требуется 150–180 дней и это укладывается в границы вегетационного периода. Более раннее созревание орехов нами отмечено у Футкурами (I декада августа), далее следует Президент (II декада августа) и, наконец, в III декаде августа созревают плоды у сорта Черкесский-2.

Формирование урожая находилось в прямой зависимости от водо- и теплообеспеченности растений. Сильная жара (температура воздуха –  $35,8^{\circ}\text{C}$ , относительная влажность воздуха – 28%) при дефиците влаги в почве ведет к задержке в формировании плодов. Масса 100 плодов у одних и тех же сортов варьирует по годам, снижаясь в засушливые. Наибольшая масса плодов у Президента (286–274 г), а наименьшая – у Черкесского-2 (157–221 г). Количество плодов в соплодии варьирует в условиях интродукции: у Черкесского – 2–10, Футкурами – 2–7, Президента – 1–5, также как и масса орехов, оно снижается в засушливые годы. Установлено, что плоды изученных сортов сохраняют свои сортовые признаки в новых условиях культуры и характеризуются: неплохой выполненнойностью ядра (48–54%), легкой его извлекаемостью, хорошими вкусовыми достоинствами.

Выявленные особенности цветения и плодоношения, позволяют сделать заключение о возможностях практического применения изученных сортов для насаждений многоцелевого назначения.

## Изменения в строении перикарпия в ходе созревания плодов *Nonea rossica* Stev. (Boraginaceae)

Чернышова Светлана Анатольевна (Ульяновск, svecha\_79@mail.ru)

Большинство работ, посвященных развитию околоплодника бурачниковых, описывает формирование перикарпия у видов триб *Eritricheae* и *Cynoglosseae*. Такой интерес объясняется сложностью и разнообразием скульптуры поверхности плодов их представителей. Данных о развитии перикарпия у видов трибы *Anchuseae* в литературе практически не встречается, мало изучен и род *Nonea* (в т.ч. *N. rossica* Stev.).

Материал для исследования (эрэмы, находящиеся на разных стадиях развития) собирался в природных популяциях г. Ульяновска в июле 2009 г.

Зрелые эрэмы небольшие ( $2,85 \times 2,10 \times 2,10$  мм), коричневые, согнутые. Основание эрэма преобразовано в утолщенное кольцо, окружающее вырост карпобазиса – элайосому. Дорсальная сторона эрэма выпуклая, центральная формирует киль, бока округлые. Поверхность каменистая, мелкобугорчатая, покрыта короткими волосками. От кольца отходят 16–18 крупных морщин. Некоторые из них тянутся по боковым граням эрэма и сливаются на его дорсальной стороне.

Средняя толщина перикарпия молодого эрэма – 190 мкм. Клетки экзокарпия крупные, сильно вытянутые; несут трихомы. Мезокарпий представлен 8–10 слоями паренхимных клеток. На срезе видны коллатеральные проводящие пучки и группы склереид. Эндокарпий выражен слабо.

По мере созревания в основании эрэма клетки карпобазиса сильно увеличиваются – начинается формирование элайосомы. Эти клетки оказываются погруженными в ткань эрэма; окружающие их клетки мезокарпия делятся, за счёт чего происходит увеличение толщины перикарпия в этом месте и постепенное формирование кольца. Наиболее активное деление клеток наблюдается в нижней части дорсальной стороны эрэма, что ведёт к изменению его формы – он начинает приобретать характерную для зрелого эрэма «сгрублённость». Эндокарпий представлен слоем таблитчатых клеток.

У более зрелого эрэма 1/3 толщины перикарпия приходится на экзокарпий. С внутренней стороны его выстилают мелкие, плотно сомкнутые клетки наружного слоя мезокарпия. Весь мезокарпий состоит из 6–8 (в основании 15–16) слоёв паренхимных клеток. Клетки внутреннего слоя мелкие, плотно примыкающие к клеткам эндокарпия.

Дальнейшее развитие перикарпия связано с отмиранием протопласта клеток всех слоёв и утолщением клеточных стенок. Зрелый эрэм имеет околоплодник толщиной 275 мкм, ½ которой приходится на экзокарпий. Мезокарпий представлен слоями сильно сдавленных клеток. Клетки эндокарпия таблитчатые.

В целом формирование перикарпия у нонеи русской сходно с аналогичным процессом у описанных ранее видов. Главные отличия связаны с приспособлением к разным способам диссеминации: у представителей триб *Eritricheae* и *Cynoglosseae*, для которых характерны эпизоо- и анемохория, происходит дифференциация клеток экзокарпия (а у некоторых видов и мезокарпия), ведущая к образованию шипов или окрыления; у *N. rossica* происходит разрастание клеток карпобазиса, ведущее к образованию элайосомы (приспособление к мирмекохории).

## ПОДСЕКЦИЯ «ГЕНЕТИКА»

### Роль последовательности ДНК длиной 246 пар оснований из района 3С6/С7

*D. melanogaster* в формировании междиска

**Бильданова Евгения Ринатовна** (Новосибирск, Skoro\_leto@ngs.ru)

Благодаря своим гигантским размерам и характерному диск-междисковому рисунку политетные хромосомы *D. melanogaster* служат удобной моделью для изучения взаимосвязи между структурной и функциональной организацией интерфазных хромосом эукариот. Структурная и функциональная дифференцированность интерфазного хроматина эукариот проявляется в политетных хромосомах как воспроизведимый рисунок плотно упакованных хромомеров (дисков) и менее плотных пупфов и междисков. До сих пор неизвестно, какие последовательности необходимы и достаточны для формирования декомпактной структуры междисков политетных хромосом дрозофилы. Изучение молекулярной организации междисков осложнено их незначительными размерами, что не позволяет использовать рутинные молекулярно-генетические методы.

В настоящей работе на примере междисковой ДНК из района 3С6/С7 был использован новый подход для изучения способности различных последовательностей ДНК автономно формировать междиск в заданном генетическом окружении. Тестируемые последовательности ДНК из этого района, flankированные FRT сайтами, в составе донорного транспозона pFRTV встраивали в геном дрозофилы. После сведения таких конструкций с акцепторным транспозоном pICon(dV) и источником FLP рекомбиназы в едином геноме происходит вырезание тестируемой последовательности из донорного транспозона по FRT сайтам и ее последующая интеграция в акцепторный транспозон. pICon(dV) расположен в хорошо охарактеризованном цитологически районе 84F хромосомы 3 и состоит из образующих дисковые структуры последовательностей, разделенных сайтом FRT, по которому происходит встройка. Электронно-микроскопический (ЭМ) анализ препаратов политетных хромосом слюнных желез трансформированных мух позволяет выявлять в составе транспозона новые структуры, образуемые тестируемыми последовательностями.

Ранее был клонирован фрагмент длиной 1,5 т.п.н. из района 3С6/С7, включающий 900 пар, удаляемые делецией faswb. Оба фрагмента ДНК – 1,5 т.п.н. и 900 п.н. образуют междиск в составе транспозона pICon(dV). Известно, что делеция faswb длиной около 900 п.н. из района 3С6/С7 приводит к изчезновению междиска. Таким образом, последовательность, удаляемая делецией faswb необходима и достаточна для формирования междиска.

В составе изучаемой последовательности в районе 3С6/С7 выявлен участок около 250 п.н., проявляющий гиперчувствительность к ДНКазе I. Из исходного 1,5 т.п.н. фрагмента этот участок был удален, полученная последовательность ДНК длиной 1,25 т.п.н. не образует нового междиска в транспозоне pICon(dV).

Таким образом, небольшой фрагмент из района 3С6/С7, содержащий ДНКаза I - гиперчувствительный сайт, является необходимым для формирования междиска. Выявление последовательности ДНК такой малой длины, ответственной за формирование междиска, позволяет начать поиск возможных консенсусов и белковых факторов, связывающихся с данной последовательностью и ответственных за формирование декомпактного состояния.

### Влияние этнического фактора на изменение активности рибосомальных генов в присутствии экстремальных вариантов С-гетерохроматина: пилотное исследование

**Бражников Е.А., Ярунова Е.Н.** (Кемерово, bra-maksim@yandex.ru)

Одним из факторов полиморфизма в человеческой популяции является этнический фактор, так как большинство малых народностей проживают в относительной изоляции, что способствует накоплению в их генофонде определенных морфофункциональных вариантов и генетических маркёров. Известен этнический полиморфизм таких цитогенетических показателей, как размер блоков С-гетерохроматина 1, 9, 16 пар аутосом и Y-хромосомы, а также количество ядрышек и площадь аргентофильтной зоны ядра. Последние два показателя

дают информацию об активности в интерфазном ядре рибосомных генов, расположенных в районе ядрышковых организаторов акроцентрических хромосом.

Поскольку в литературе есть данные об ассоциации 1, 9 и 16 пар хромосом с акроцентрическими хромосомами за счёт эктопической конъюгации гетерохроматина, то было решено проверить: а) существует ли связь между наличием экстремальных вариантов С-гетерохроматина (ЭВ) в указанных парах хромосом с показателями белоксинтезирующего аппарата клетки, б) имеет ли при этом значение этническая принадлежность человека.

Для выполнения поставленных задач цитогенетически была исследована группа, в состав которой вошло 73 человека (подростки) в возрасте от 10 до 19 лет, мужского и женского пола двух национальностей: шорцы (30 человек) и русские (26 человек), проживающие в Таштагольском районе Кемеровской области. В качестве ЭВ гетерохроматиновых блоков хромосом принимали 1, 4 и 5 баллов по пятибалльной системе оценок, а также учитывали перицентрические инверсии хромосом 1, 9 и 16. Площадь аргентофильной зоны (ПАЗ) вычислялась как процент от общей площади ядра лимфоцита.

Корреляционный анализ показал, что достоверные отличия наблюдаются только в шорской выборке: у лиц, не имеющих ЭВ гетерохроматина в геноме, ПАЗ больше ( $20,15 \pm 1,02\%$ ), чем у лиц-носителей ЭВ. При этом, чем больше ЭВ в кариотипе человека, тем ниже синтетическая активность ядра: при одном ЭВ ПАЗ составляет  $16,92 \pm 1,02\%$  ( $p < 0,05$ ), при большем количестве  $15,78 \pm 0,68\%$  ( $p < 0,01$ ). В русской выборке достоверных отличий не обнаружено: при отсутствии ЭВ ПАЗ составила  $16,5 \pm 0,87\%$ , с одним ЭВ –  $16,96 \pm 0,9\%$ , с  $2\text{-}3\text{-}4\text{-}5$  ЭВ ПАЗ равен  $15,4 \pm 1,04\%$ . Возможно, присутствие в геноме ЭВ, приводящее к изменению соотношения гетеро- и эухроматина, и, как следствие, изменению пространственной организации интерфазного ядра, подавляет активность части рибосомных генов (согласно гипотезе «эффекта положения гена»), но в данном случае это предположение касается только шорцев. Объяснить полученные результаты можно и фактором этнических особенностей шорской популяции, накопившей в генофонде уникальное сочетание разных генетических вариантов. Также мы допускаем, что представленные данные могут быть следствием малой выборки. Планируется увеличить объём исследуемой группы и перепроверить полученные результаты.

#### **Молекулярно-генетическое исследование генов системы биотрансформации ксенобиотиков у жителей республики Башкортостан**

**Галикеева Гузель Фанилевна (Уфа, galikeevagf@yandex.ru)**

Состояние здоровья человека обусловлено генетическими и средовыми факторами. В настоящее время, в связи с увеличением объемов промышленных производств с каждым годом усиливается нагрузка на окружающую среду и увеличивается число лиц, контактирующих с вредными веществами. В этой связи особо актуальным является изучение генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков. Данную группу генов называют генами «внешней среды», т.к. они играют основную роль в метаболизме химических соединений, поступающих в организм человека из внешней среды.

В работе рассмотрены полиморфные варианты генов ферментов II фазы биотрансформации ксенобиотиков и относящихся к мультигенному семейству глутатион S-трансфераз: GSTM1, GSTP1. У человека ген GSTM1 локализован на хромосоме 1 в области 1p13.3. В работе рассмотрен полиморфный вариант гена, характеризующийся протяжкой делецией гена (10 т.п.н.), которая проявляется отсутствием белка, вследствие чего возникает повышенная чувствительность индивида с делецией гена GSTM1 к воздействию ксенобиотиков. Ген GSTP1 локализован на хромосоме 11 (11q13). В работе рассмотрен полиморфный вариант гена GSTP1, связанный с заменой аденина на гуанин в 313 положении, проявляющейся заменой изолецина на валин в 105 положении (Ile105Val) в 5 экзоне. При мутации 105Val в 7 раз увеличивается каталитическая активность фермента по отношению к полициклическим ароматическим соединениям, но в 3 раза снижена активность по отношению к 1-хлор-2,4-динитробензену.

Материалом исследования служили образцы ДНК, полученные из цельной венозной крови 497 людей. Вся изученная выборка была разделена на 2 группы, различающихся по

экологическим условиям проживания: жители районов с неблагоприятными экологическими условиями (184 человек) и группа сравнения (жители районов РБ, в которых отсутствуют крупные промышленные предприятия) – 313 человек. Анализ распределения частот генотипов и аллелей полиморфного локуса Ile105Val (A313G) гена GSTP1 не выявил статистически значимых различий в группах ( $p>0.05$ ). При типировании по делеционному локусу гена GSTM1 выявлено два генотипа, характеризующиеся наличием или отсутствием нормального аллеля: «+» и «-».

Таким образом, анализ распределения частот генотипов исследованного локуса выявил тенденцию к увеличению генотипа «+» ( $p=0.0598$ ,  $OR= 0.670$ ) и достоверное увеличение сочетания генотипов +// Ile105Val ( $p=0.004$ ;  $OR=2.205$ ) в группе с низкой экологической нагрузкой. *Работа выполнена при частичном финансировании грантом РФФИ №08-04-97050 и грантом Министерства образования РФ тематическое планирование на 2009-2010 годы. Выражаю благодарность за помочь при выполнении данной работы своему научному руководителю д.б.н., проф. Валентине Юрьевне Горбуновой.*

**Мейотический мутант *sy11* ржи *Secale cereale* L.  
с гетерологичным синапсисом хромосом**

*Голубцов Сергей Валерьевич (Москва, sergolubtsov@gmail.com)*

Уникальной особенностью мейоза является синапсис хромосом, который обеспечивает обратимое спаривание гомологов и создаёт условия для процессов рекомбинации. Среди десятков специфических генов мейоза у растений, грибов и животных большую часть составляют гены, которые проявляются в профазе первого деления и прямо или косвенно влияют на синапсис гомологичных хромосом.

Настоящее исследование посвящено совершенствованию Петергофской коллекции мейотических мутантов ржи *Secale cereale* L., созданной С.П. Соснихиной и коллегами. В работе методами световой и электронной микроскопии изучалось наследование и цитологическое проявление мейотической мутации *sy11*. Работа начата в 2008 г., в 2009 г. существенно увеличена выборка изученных растений и исследованных клеток.

Анализ синаптонемных комплексов (СК) выявил сочетание гомологичного и негомологичного синапсиса. Негомологичный синапсис проявлялся в явлениях смены партнёров спаривания и синапсиса хромосом “на себя”, был проведён подробный учёт таких нарушений по субстадиям профазы I. На стадии средней зиготены наблюдались единичные нарушения. В поздней зиготене, по мере увеличения общей длины СК, число нарушений достоверно увеличивалось не менее чем в 5 раз. Однако на протяжении длительной стадии пахитены происходило постепенное снижение среднего числа нарушений на клетку и к ранней диплотене снижение становилось достоверным. Несмотря на коррекцию синапсиса, частота хиазм в диакинезе у мутантов была достоверно снижена. Более того, к началу метафазы I происходила потеря ещё трети хиазм, что дало основание предположить о нарушении одного из этапов сложного процесса рекомбинации. В метафазе I выявлялись открытые биваленты, униваленты и мультиваленты. Наличие мультивалентных ассоциаций, несомненно, являлось цитологическим проявлением выявленного в профазе I негомологичного синапсиса. Генетический анализ показал, что аномальный цитологический фенотип определяется рецессивным аллелем одного гена, т.е. мутация моногена и рецессивна. Гомозиготы по мутантному аллелю были полустерильны.

Таким образом, в ходе данного исследования было установлено, что мейотическая мутация *sy11* ржи является мутацией гетерологичного синапсиса. В эту группу входит большое число мутаций ржи, лука, кукурузы и дрожжей. Такое большое число генов, действующих на процесс синапсиса, говорит о сложности и многогранности механизмов узнавания гомологов в мейозе, которые призваны защищать целостность генома.

*Работа выполнена при поддержке п/программы Президиума РАН “Генофонды и генетическое разнообразие” и РФФИ (проект № 08-04-01725) в Институте общей генетики имени Н.И. Вавилова под руководством профессора Ю.Ф. Богданова.*

**Генотипирование костных образцов Денисовой пещеры:  
филогенетические взаимоотношения с современными видами  
Дружкова Анна Сергеевна (Новосибирск, anna-druzhkova@mail.ru)**

Денисова пещера расположена в северо-западной части Горного Алтая и является уникальным объектом комплексного изучения палеолита. Пол пещеры состоит из мощной толщи отложений с четко выраженным литологическим слоями, датировка 11 слоя, залегающего на глубине около 2 м – 50 12 тыс. лет. Микроклимат пещеры позволил сохраниться костным останкам 27 видов крупных млекопитающих, принадлежавшим как ныне живущим (косуля, архар, лошадь), так и вымершим (пещерный медведь, пещерная гиена, бизон) животным. Молекулярно-генетические исследования ДНК этих животных, представляют огромный интерес с точки зрения филогенетических взаимоотношений с ныне живущими видами.

Изменение условий выделения древней ДНК, применение полигеномной амплификации (WGA) и стратегии вложенных праймеров позволили нам выделить и генотипировать 14 образцов древней ДНК *Capreolus pygargus* из 2-11 слоев раскопа и 2 образца представителей семейства Ursidae (*Ursus arctos*, U. (*Spelaeocetus*) *rossicus* – 4, 11 слои соответственно). Для получения гаплотипов современной косули сибирской, мы также выделили ДНК и генотипировали 33 современные косули Алтая, Новосибирской области, Тянь-Шаня и Якутии.

Филогенетический анализ последовательности нуклеотидов контрольного района (КР) мтДНК длиной 629 п.н. древних и современных сибирских косуль показывает, что на территории Алтая произошла смена популяций, по времени соотносящаяся с последним оледенением. Гаплотипы образцов, принадлежащих к плеистоцену наиболее близки к современным дальневосточным и якутским, к голоцену – курганским и новосибирским. В современной алтайской популяции *C. pygargus* следует отметить высокую гетерогенность гаплотипов. Для древних представителей семейства Ursidae Денисовой пещеры и современных видов получено филогенетическое древо по последовательности КР мтДНК длиной 403 п.н. Малый пещерный медведь имеет общего предка с бурым, гималайским, белым медведями и значительно отличается от пещерного медведя, изучаемого в Европе.

В настоящее время генотипирование древних медведей продолжается.

Автор выражает глубокую признательность научному руководителю к.б.н. Н.В. Воробьевой

**Миграция носителей андроновской культуры в лесостепную зону Западной Сибири  
по данным анализа мтДНК (вторая половина II тысячелетия до н.э.)  
Журавлёв А.А., Пилипенко А.С., Трапезов Р.О. (Новосибирск, tos3550@mail.ru)**

Согласно археологическим данным одним из основных факторов, определявших характер этнокультурных процессов на территории степной и лесостепной зон Евразии от Урала до Енисея в середине – второй половине II тыс. до н.э. было расселение носителей андроновской культурной общности. Различные группы андроновского населения оказали влияние на формирование этнокультурных групп эпохи развитой и поздней бронзы Средней Азии, Западной Сибири, Переднего Востока.

Проникновение носителей федоровского варианта андроновской культуры в лесостепной пояс западной Сибири датируется археологами не позднее XIII в. до н.э. На территории Барабинской лесостепи (в междуречье Оби и Иртыша) федоровское население существует с представителями позднего этапа аборигенной кротовской культуры. На уровне материальной культуры происходит постепенное смешение позднекротовских черт с федоровскими. В эпоху поздней бронзы в Западной Сибири под влиянием андроновцев формируется круг андронидных культур.

В настоящей работе мы попытались оценить характер генетических взаимоотношений между пришлым федоровским и аборигенным позднекротовским населением Барабы, а также их влияние на последующие этнокультурные процессы в регионе. С этой целью мы исследовали гаплотипическое разнообразие в серии образцов митохондриальной ДНК (мтДНК) от представителей федоровской и позднекротовской групп из могильников Барабы

(численностью по 20 образцов) и сопоставили полученные результаты с сериями от предшествовавших групп населения Барабы (эпохи неолита, энеолита и ранней бронзы) и андронойдного населения региона эпохи поздней бронзы. Структуру образцов мтДНК оценивали по последовательности I гипервариабельного сегмента контрольного района мтДНК.

В генофонде федоровского населения выявлены гаплогруппы как западно-евразийского (Т, U5), так и восточно-евразийского (А, С) кластеров мтДНК. Показано сходство состава серий мтДНК федоровского с позднекротовским населением и присутствие в федоровской серии вариантов мтДНК, характерных для автохтонного населения Барабы. Следовательно, нами зафиксированы признаки генетического влияния аборигенов на мигрантное население.

Новый компонент мтДНК, отличающий федоровцев и позднекротовцев от более ранних групп населения Барабы представлен линиями гаплогруппы Т. По-видимому, они были привнесены в регион федоровцами и могут рассматриваться как маркер этой миграционной волны. Данное предположение подтверждается присутствием линий гаплогруппы Т с высокой частотой в андроновских сериях в сопредельных с Барабой территориях. Кроме того, линии гаплогруппы Т выявлены среди носителей культур андронойдного круга из памятников Барабы. Таким образом, миграция федоровского населения на территорию Барабы, с большой вероятностью, сопровождалась взаимными генетическими контактами по женской линии с аборигенным населением.

*Работа поддержанна грантом РФФИ № 09-06-00357-а.*

### **Влияние ретроэлементов семейства SVA на экспрессию генов человека**

**Клебанов Фёдор Алексеевич** (Москва, [fkleb@mail.ru](mailto:fkleb@mail.ru))

Ретроэлементы (RE) – мобильные элементы генома, увеличивающие число своих копий при помощи процесса обратной транскрипции, который осуществляется белком обратная транскриптаза. В настоящее время полагают, что мобильные элементы оказывали значительное влияние на эволюцию эукариотических геномов.

Геном человека на ~40% состоит из RE. Семейство мобильных элементов SVA – самое молодое из RE приматов, возникшее около 25 млн. лет назад в геноме общего предка человека и шимпанзе. В процессе видеообразования человека в результате транспозиций появились человек-специфичные вставки SVA (hs-SVA), многие из которых полиморфны. Большинство hs-SVA являются дефектными, однако некоторые копии до сих пор сохранили свою транспозиционную активность.

Консенсусная последовательность SVA несёт сигнал полиаденилирования (AATAAA), участвующий в терминации транскрипции генов. По этой причине при встраивании SVA в инtron гена в прямой ориентации можно ожидать преждевременной терминации генных транскриптов. Экспериментальному анализу таких случаев посвящена настоящая работа.

При помощи сервера UCSC Genome Browser были проанализированы все 864 hs-SVA. Для каждого элемента было установлено генное окружение, ориентация относительно направления транскрипции близлежащих генов, а также наличие/отсутствие сигнала полиаденилирования. В 45-ти случаях вставки hs-SVA расположены в относительной близости к точкам начала транскрипции (до 5 т.п.н.), что может оказывать влияние на экспрессию соответствующих генов. Из 351 hs-SVA, локализованных в инtronах генов, 83 оказались расположены в прямой (26 из которых лишены сигнала AATAAA) и 268 в обратной ориентациях. Полученные данные подтверждают гипотезу, согласно которой с большей вероятностью в геноме фиксируются обратноориентированные RE.

В настоящее время, используя метод ОТ-ПЦР, проверяется возможность терминации транскрипции по сигналу полиаденилирования прямоориентированных SVA на примере обнаруженного прямоориентированного hs-SVA, несущего максимальное число таких сигналов (6 шт.).

## **Функциональный анализ промоторной области гена *Xist* мыши (*Mus musculus*)**

**Короткова Анна Михайловна** (Новосибирск, [korotkovaanna@yahoo.com](mailto:korotkovaanna@yahoo.com))

Дозовая компенсация генов, расположенных на половых хромосомах, осуществляется у высших млекопитающих за счет инактивации одной из двух X хромосом у самок. Этот процесс контролируется особым локусом на X хромосоме, называемым центром инактивации (Xic). Данный локус содержит ряд элементов, ответственных за подсчет, выбор будущей неактивной хромосомы и инициацию процесса инактивации. Ключевым фактором среди этих элементов является ген *Xist*, который экспрессируется со случайно выбранной X хромосомы. Его продукт, длинная белок не кодирующая РНК, распространяется вдоль всей хромосомы, что приводит к гетерохроматизацию и к транскрипционному молчанию расположенных на ней генов. В данной работе мы пытаемся выявить механизмы регуляции гена *Xist* мыши в процессе инактивации.

Регуляция гена исследовалась с помощью репортерных конструкций, основанных на векторе, содержащем ген люциферазы под контролем различных участков промоторной области *Xist* мыши. Активность конструкций была измерена в разных типах клеток самок мыши, как дифференцированных, так и недифференцированных. Результаты измерения активности репортерных конструкций выявили сходный профиль экспрессии для клеток разного типа и привели к обнаружению шести районов вероятного расположения энхансеров либо сайленсеров транскрипции.

Компьютерный анализ последовательности ДНК промотора *Xist* выявил большое количество потенциальных сайтов связывания транскрипционных факторов (ER, RAR, SRY и другие). Сопоставление результатов измерений активности конструкций и компьютерного анализа последовательностей показало возможное расположение участков, усиливающих либо ослабляющих экспрессию.

В высоко-консервативном (среди всех млекопитающих) районе промотора был обнаружен потенциальный транскрипционный фактор ER (estrogen receptor), который является ядерным рецептором связывания стероидного гормона эстрогена. Выдвинуто предположение, что эстроген может принимать участие в процессе инактивации X хромосомы за счет влияния на транскрипционную активность гена *Xist*. Для проверки этого предположения провели измерение активности репортерных конструкций, содержащих ER сайты, в клетках, предварительно подвергенных индукции эстрадиолом. Активность экспрессии оказалась почти в два раза выше на одной из конструкций. Проведенные эксперименты свидетельствуют в пользу модели влияния гормона на процесс инактивации в период развития эмбриона.

## **Молекулярно-цитогенетическая характеристика промежуточных пшенично-пырейных гибридов, полученных с участием пырея среднего**

**Крупин Павел Юрьевич** (Москва, [pavelkroupin1985@gmail.com](mailto:pavelkroupin1985@gmail.com))

Пырей средний широко используется в селекции мягкой пшеницы в качестве донора устойчивости к биотическим и абиотическим стрессорам. Эффективный метод получения пырейных интрагибридий в геном мягкой пшеницы – использование промежуточных пшенично-пырейных гибридов (ПППГ) в качестве селекционного мостика. Необходимым условием для успешной хромосомной инженерии мягкой пшеницы является молекулярно-цитогенетическая характеристика ПППГ.

Целью нашей работы было установить геномную конституцию четырех ПППГ ( $2n=56$ ), отличающихся комплексной устойчивостью – Истра-1, Отрастающая 38, Останкинская, Зернокормовая 169 (НЭХ Снегири, ГБС им. Цицина РАН). Для анализа применяли геномную гибридизацию *in situ* (GISh) с ДНК мягкой пшеницы в качестве блока и меченой ДНК пырея среднего.

Применение GISh на ПППГ показало, что геном каждого образца включает 21 пару хромосом пшеницы и 7 пар хромосом пырея. При этом было установлено три типа гибридизации меченой ДНК пырея на дополненных хромосомах пырея: 1) равномерная гибридизация вдоль всей хромосомы; 2) гибридизация на теломерных и прителомерных участках; 3) преимущественная гибридизация в прицентромерной и прителомерной области

хромосом пырея. Дополненные хромосомы пырея у изучаемых форм отличались по типу гибридизации и центромерному индексу. Следовательно, различия в пырейном компоненте могут объяснять различия между ПППГ по хозяйственно-полезным признакам.

Все типы гибридизации сохранялись при различных соотношениях блок-метка, а также при использовании меченої ДНК различных образцов пырея среднего. При постановке GISH на пыре среднем ( $2n=42$ ) кроме первого (14 пар хромосом) наблюдался второй (7 пар хромосом) тип гибридизации, что указывает на то, что наличие второго типа хромосом в геноме ПППГ не является следствием пшенично-пырейных транслокаций. Из литературы известно, что схожая картина наблюдается при гибридизации с ДНК *Pseudoroegneria* sp.

Среди изучаемых ПППГ встречались образцы с телосомиками и транслокациями. Поскольку данные ПППГ отличаются комплексной устойчивостью и несут различные дополненные хромосомы пырея, эти перестройки могут способствовать интродукции полезных наследственных признаков в хромосомы пшеницы.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» ГК № 02.740.11.0286. Автор выражает благодарность к.б.н. Дивашуку М.Г. и к.б.н. Карлову Г.И. за научное руководство, к.б.н. Белову В.И. и к.б.н. Глуховой Л.И. за предоставленные материалы.

#### Исследование экспрессии гомологов генов эррантивирусов у *Drosophila melanogaster*

Кузьмин И.В., Бурмистрова Д.А. (Москва, [kuzmin.ilya@gmail.com](mailto:kuzmin.ilya@gmail.com))

Ретровирусы проявляют значительное сходство с ДКП-ретротранспозонами, что указывает на их эволюционное родство. Так, мобильный элемент *gypsy* (МДГ4) *Drosophila melanogaster* относится к классу ДКП-ретротранспозонов. В то же время, способность *gypsy* к горизонтальному переносу позволяет считать его первым ретровирусом, обнаруженным у беспозвоночных. Важным этапом в репликативном цикле ретровирусов является интеграция их генома в геном хозяина. Ретровирусы могут заражать половые клетки хозяев, что приводит к устойчивому интегрированному состоянию провируса, который может передаваться последующим поколениям. Некоторые гены ретровирусов могут претерпевать доместикацию, в результате которой они начинают выполнять новую, полезную для хозяина, функцию. Известны доместицированные гены принимающие участие, например в развитии плаценты и защите от вирусной инфекции. Вопрос о доместицированных генах *D.melanogaster* мало изучен. Недавно в геноме *D.melanogaster* был обнаружен гены *Iris* и *Grp* (*gag related protein*), проявляющие гомологию с генами *env* и *gag* ретровирусов и ДКП-ретротранспозонов. Предполагается, что гены *Iris* и *Grp* произошли от гомологичных им генов ретровирусов или ретротранспозонов.

Транспозиционная активность *gypsy* находится под контролем хозяйственного гена *flamenco*. Для проверки гипотезы об участии генов *Grp* и *Iris* в защите от ретровирусной инфекции были исследованы четыре линии *D.melanogaster*: 413, 7K (SS), OregonR и 145 (MS), различающиеся по фенотипу *flamenco* и активности *gypsy*. На эмбриональной и личиночной стадиях развития экспрессия генов *Grp* и *Iris* протекает на очень низком уровне, но значительно повышается на стадии имаго. У взрослых мух ген *Grp* экспрессируется главным образом в кишке и незначительно в гонадах, для *Iris* характерна экспрессия в каркасе. Такой характер экспрессии может быть потенциально связан с участием этих генов в защите организма от вирусной инфекции. Однако различий в экспрессии между линиями, отличающимися инфекционными свойствами *gypsy*, не обнаружено.

Мы клонировали гены *Grp* и *Iris* в экспрессионных векторах *E.coli*. В прокариотической системе эти рекомбинантные белки экспрессируются в составе телец включения, что делает затруднительным получение этих белков нативными в растворимой форме. Получить белковый продукт гена *Iris* в растворимой форме нам пока не удалось. Однако нам удалось подобрать условия для выделения белка *Grp* в растворимой форме, что позволило использовать его для ИФА.

Предварительные результаты анализа экспрессии гена *Grp* на уровне трансляции свидетельствуют об активности продукта этого гена в тканях взрослых мух.

## **Изучение роли гена *Arabidopsis thaliana ICE2* в развитии холодового ответа**

**Курбидиева Амина Султановна (Москва, amina.kur@gmail.com)**

В процессе развития растения испытывают стрессовые воздействия как биотической, так и абиотической природы. Изучение генетической регуляции адаптивных ответов растений на стрессовые воздействия является важнейшим направлением генетики, экологии и биотехнологии. Одной из наиболее актуальных проблем является изучение генетических механизмов устойчивости к холоду. Открытия в этой области имеют потенциальное практическое значение для повышения холдоустойчивости сельскохозяйственных культур. В генетическом контроле ответа на стрессы участвует множество генов – как кодирующих специфические защитные белки, так и транскрипционные факторы, обеспечивающие передачу сигнала и активацию защиты. Существуют два основных механизма активации холодового ответа. Зависимый от абсцисовой кислоты требует синтеза АБК, активирующей каскад генов защиты. Ключевым регулятором АБК-независимого ответа является регуляторный ген *ICE1*. Недавно был идентифицирован новый ген *Arabidopsis thaliana ICE2*, участвующий в активации холодового ответа и повышении холдоустойчивости. На основании данных о высокой степени гомологии 2-5 экзонов данного гена гену *A. thaliana (ICE1)*, возникло предположение об участии гена в холодовом ответе. В то же время оставалось неясно, является ли 1-ый экзон, экспрессия которого не была обнаружена, отдельным геном либо функциональной частью *ICE2*. В ИОГен им. Н.И. Вавилова были получены трансгенные растения *Arabidopsis thaliana* двух групп линий: несущие полноразмерную копию гена и несущие 2-5 экзоны гена под 35S промотором CAMV. Мы показали, что суперэкспрессия полноразмерной копии гена вызывает повышение экспрессии гена *NCED3*, кодирующего ключевой фермент биосинтеза АБК, а также конечных генов в пути АБК-зависимого холодового ответа – *RAB18, RD29A, RD29B*, кодирующих высокогидрофильные белки (дегидрины); в то же время суперэкспрессия только второй части гена вызывает незначительное повышение экспрессии этих генов. Также было показана роль гена *ICE2* в регуляции АБК-независимого холодового ответа путем активации транскрипционного фактора *CBF1*, причем 1-ый экзон *ICE2*, содержащий F-бокс, также играет значительную роль. Обнаружены изменения морфологии устьиц у трансгенных растений: суперэкспрессия второй части гена вызвала появление кластеров недоразвитых устьиц, остановленных в развитии на стадии меристемоидов. В то же время при суперэкспрессии полноразмерной копии гена аномалий не наблюдалось. Эти результаты указывают на роль гена *ICE2* и особенно его первого экзона в регуляции АБК-зависимого и АБК-независимого путей ответа на холод, а также на формирование устьиц. Участие этого транскрипционного активатора одновременно в холодовом ответе и в дифференцировке устьиц может быть отражением стратегии растений объединить внешние сигналы и программы развития, наиболее точно подстраиваясь таким образом к условиям окружающей среды. *Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю Новокрещёновой Марии Габриэловне. Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 09-04-12216-офи\_м и 09-04-01639-а.*

## **Функциональный анализ доменов интегразы ретротранспозона *gypsy***

***Drosophila melanogaster***

**Маннанова Мария Маратовна (Москва, tannanova\_m@mail.ru)**

У ретровирусов и ретротранспозонов одним из ключевых ферментов, участвующих в транспозиции, является интеграза. Этот фермент имеет в своей структуре три функциональных домена: N-концевой, каталитический и C-концевой. Роль каждого из доменов в интеграции в ходякую хромосому изучена на примере ретровирусов позвоночных, однако неизвестно, аналогично ли функционирование интегразных доменов при транспозиции мобильных элементов.

Для изучения эндонуклеазной активности доменов интегразы ретротранспозона *gypsy D. melanogaster* были использованы три фрагмента гена *pol*: фрагмент, кодирующий полноценную интегразу, и два фрагмента, кодирующих интегразу без N- или C-концевого домена. Каждый фрагмент был клонирован в экспрессионном векторе pET-30. Полученные

конструкции, названные pETint, pETint  $\Delta N$  и pETint  $\Delta C$ , были трансформированы в штамм *E. coli* Rosetta. В результате были получены рекомбинантная интеграза, размером около 45 кДа, и две формы усеченного белка ( $\Delta N$  и  $\Delta C$ ), каждая размером около 30 кДа. Субстратом для изучения *in vitro* эндонуклеазной активности  $\Delta N$ - и  $\Delta C$ -форм интегразы служила конструкция на основе вектора pBlueScript KS (+) - pBSLTR, несущая длинный концевой повтор ретротранспозона *gypsy*. В качестве контроля использовалась полная форма интегразы.

Показано, что в результате реакций как с полноценной формой интегразы, так и с  $\Delta N$ -формой происходит однонитевое расщепление матрицы.  $\Delta C$ -форма фермента не расщепляет субстрат. По-видимому, без С-домена белок не способен связаться с субстратом. Это соответствует данным о ретровирусных интегразах, у которых каталитический домен обладает эндонуклеазной активностью, а роль в узнавании и связывании хромосомы хозяина принадлежит С-дому. N-домен не участвует в расщеплении ДНК хозяина, поэтому его отсутствие не влияет на эндонуклеазную активность интегразы.

### Хромосомная «хореография» в профазе I мейоза

**Матвеевский Сергей Николаевич** (Москва, [sergey8585@mail.ru](mailto:sergey8585@mail.ru))

Термин «хромосомная хореография» предложен Page & Hawley (2003) и, как нельзя точно, отражает специфику сложнейших генетически предопределенных и строго выверенных движений хромосом в профазе I мейоза. Наиболее точные представления о деталях спаривания, синаптиса и десинаптиса гомологичных хромосом на этой стадии мейоза стали доступны, благодаря открытию Мозесом осевых структур мейотических хромосом: осевого элемента (ОЭ), объединяющего сестринские хроматиды, и синаптонемального комплекса (СК), объединяющего гомологичные хромосомы в период их синаптиса, рекомбинации и десинаптиса.

Настоящее сообщение посвящено анализу поведения СК в профазе I мейоза у видов-двойников *Ellobius talpinus* (2n=54, NF=54) и *Ellobius tancrei* (2n=54, NF=56) и гибридов F1 между ними. Эти виды характеризуются изоморфностью половых (XX) хромосом у самцов и самок. У *Ellobius tancrei* описан полный робертсоновский веер с 2 п от 34 до 54 при NF=56 у всех хромосомных форм (Ляпунова, Воронцов, 1978). Также исследованы СК у внутривидовых гибридов F1 *Ellobius tancrei*, гетерозиготных по Rb-транслокациям. Иммуноокрашивание с помощью антител против белка латеральных элементов СК – SYCP3 и центромерного белка CENPA позволили выявить динамику движения хромосом на стадиях лептотены-диплотены. На стадиях лептотены-зиготены прослежен переход от кластирирования центромерных районов хромосом в области одного полюса ядра (фигуры Рабля) к формированию фигуры букета, и выпрямления хромосом на стадии пахитены, и далее детали десинаптиса хромосом. Установлено, что у гомозиготных самцов *Ellobius talpinus* и *Ellobius tancrei* половые хромосомы на стадии зиготены формируют закрытый половой бивалент с двумя прителомерными участками СК, на всех стадиях профазы I располагающийся на периферии ядра. У стерильных гибридов половые хромосомы формируют открытый половой бивалент, который перемещается в центральную область ядра. У гибридов, гетерозиготных по множественным Rb-транслокациям, «хромосомная хореография», обусловленная поиском гомологии, определяет формирование сложных конфигураций хромосом, включающих как закрытые Rb-триваленты, так и цепочки, образованные Rb-метацентриками, гомологичными друг другу по одному из плеч, и акроцентриками. Количество элементов в цепочке может увеличиться за счет синаптиса между короткими С-гетерохроматиновыми плечами негомологичных акроцентриков. Сочетание методов электронной микроскопии и иммуноокрашивания позволяет идентифицировать элементы движения и синаптиса хромосом на всех стадиях профазы мейоза, оценить степень их гомологии по структуре СК и расширить представления о природе эволюции хромосом в разных популяциях животных одного вида и видов-двойников. Все животные картионированы и предоставлены для исследования д.б.н И.Ю. Баклушинской и д.б.н. Е.А. Ляпуновой (ИБР РАН). Работа выполнена на средства гранта РФФИ № 08-04-01725.

## Поиск и разработка молекулярных маркёров генов устойчивости к килю у капусты пекинской

Нгуен Мин Ли (Москва, minhlyvn\_21@yahoo.com)

В современное время традиционные методы селекции дополняются новым молекулярным маркированием. Созданные за последние годы различные методы молекулярного маркирования генов и признаков позволили в значительной мере сократить продолжительность селекционного процесса у сельскохозяйственных культур.

Целью работы является изучение эффективности различных маркеров для дифференциации устойчивых и восприимчивых к килю генотипов в расщепляющейся по устойчивости популяции пекинской капусты из коллекции Селекционной станции им. Н.Н.Тимофеева (РГАУ-МСХА имени К.А.Тимирязева) и разработка маркеров гена устойчивости к килю.

На первом этапе исследований была проведена оценка и дифференциация растений по устойчивости/восприимчивости к килю на искусственном инфекционном фоне. В анализе использовали инбредные родительские линии различного происхождения, F1 гибридные и расщепляющиеся потомства F2 и BC1S (беккросс от скрещивания с восприимчивым родителем).

На втором этапе работы оценена эффективность пяти специфических молекулярных маркеров, разработанных российскими и японскими учеными: SCARp91F- SCARp61R (Монахос, Игнатов, 2007), BRMS-088 и BRMS-096 (Hirai, 2004), OPC11-1S и OPC11-2S (Suwabe, 2003) в трех комбинациях устойчивых и восприимчивых родительских форм капусты и их расщепляющихся потомствах. В результате оценки только два маркера SCARp91F - SCARp61R и BRMS-088 показали полиморфизм во всех исследуемых комбинациях линий, но при анализе популяций BC1S их эффективность не была выявлена.

На третьем этапе был проведен молекулярный анализ с 287 RAPD -праймерами в комбинации 20-2cc1 x ES1 и их популяции BC1S и выявлен 394RAPD-маркер, локализующийся на расстоянии 2,8 см от гена устойчивости.

394RAPD-маркер является пригодным для селекции пекинской капусты на устойчивость к килю. В дальнейшем на основе данного маркера будет разработан высокоспецифичный SCAR-маркер. Выражая благодарность своим научным руководителям Монахосу С.Г. и Готовцевой И.П. за оказанную большую помощь при подготовке тезисов и доклада.

## Геномный скрининг для выявления гена-детерминанта прионоподобного фактора $[NS1^+]$ дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Нижников А.А., Магомедова З.М. (Санкт-Петербург, Ant.nizhnikov@gmail.com)

Прионами называют амилоидогенные белки, обладающие инфекционными свойствами. Наиболее изученным прионом дрожжей *S. cerevisiae* является  $[PS1^+]$ , представляющий собой амилоидную изоформу фактора терминации трансляции Sup35. Прионоподобная агрегация Sup35 вызывает супрессию ряда нонсенс-мутаций (например, *adel-14<sub>UGA</sub>*), что приводит к прототрофности штамма на селективной среде без аденина. Нами был выявлен новый нехромосомный фактор *S. cerevisiae*, который аналогичен  $[PS1^+]$  по фенотипическому проявлению, однако не связан с прионизацией Sup35. Этот фактор был назван  $[NS1^+]$ . Ранее нами было показано, что фактор  $[NS1^+]$  обладает свойствами дрожжевого приона: демонстрирует доминантный неменделевский тип наследования в мейозе и обратимую элиминацию, способен к спонтанному возникновению *de novo* и обладает цитоплазматической инфекционностью.

Нашей приоритетной задачей является идентификация гена-детерминанта  $[NS1^+]$ , а также выявление взаимодействующих с ним белков. Все известные прионы с повышенной частотой индуцируются при сверхэкспрессии соответствующих генов-детерминантов. Для выявления кандидатов на роль гена-детерминанта  $[NS1^+]$  мы провели скрининг с использованием адресной дрожжевой геномной библиотеки YSC4613. Библиотека включает 1588 клонов *Escherichia coli*, каждый из которых несет плазмиду на основе членочного многокопийного вектора с уникальным фрагментом генома *S. cerevisiae* с известной нуклеотидной последовательностью. Трансформация дрожжей этими плазмидами приводит

к сверхэкспрессии соответствующих генов. Полный скрининг библиотеки (1588 индивидуальных трансформаций) позволил выявить тридцать последовательностей, сверхэкспрессия которых приводила к индукции прототрофности по аденину в штамме [ $nsf^+$ ]. Таким образом, целый ряд белков прямо или опосредовано взаимодействует с прионным детерминантом [ $NSf^+$ ]. Среди выявленных последовательностей пять содержали гены, кодирующие аспарагин-глутамин обогащенные белки (*DEF1*, *HAA1*, *NAB2*, *PUF4*, *YAK1*). Поскольку наличие аспарагин-глутамин обогащенных трактов является отличительной особенностью дрожжевых прионов, перечисленные белки являются приоритетными кандидатами на роль детерминанта [ $NSf^+$ ]. Дальнейшая работа с использованием комплекса генетических и биохимических методов позволит идентифицировать ген-детерминант прионоподобного фактора [ $NSf^+$ ] среди выявленных в скрининге кандидатов.

*Научно-исследовательская работа выполняется в рамках реализации ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009-2013 годы. Также проект поддержан грантом правительства Санкт-Петербурга 2.6/04-05/122.*

### **Экспрессия рецепторов серотонина в эмбриогенезе шпорцевой лягушки *Xenopus laevis***

*Никишин Д.А., Кремнёв С.В. (Москва, embryo@list.ru)*

Вещества, идентичные медиаторам нервной системы, являются универсальными регуляторами онтогенеза, включая наиболее ранние стадии зародышевого развития. В частности, была продемонстрирована способность лигандов холино-, адрено- и, предположительно, серотонинорецепторов влиять на процесс делений дробления у шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*. В последние годы показана и экспрессия  $\beta_1$ -адренорецептора на всех стадиях эмбриогенеза. В ранних эмбрионах *X. laevis* также выявлено присутствие серотонина, паттерн локализации которого изменяется в ходе раннего развития, и его функциональная активность. При инкубации эмбрионов с момента оплодотворения и до конца гастроуляции антагонисты 5-HT<sub>3</sub>- и 5-HT<sub>4</sub>-рецепторов вызывают нарушения формирования лево-правой асимметрии. При этом молекулярно-биологические данные о рецепторном звене донерной серотонинергической системы малочисленны – экспрессия серотониновых рецепторов продемонстрирована лишь в раннем эмбриогенезе *Caenorhabditis elegans*, дрозофилы и мыши. Данная работа посвящена изучению экспрессии рецепторов серотонина (5-HT<sub>3A</sub> и 5-HT<sub>1A</sub>) в эмбриогенезе шпорцевой лягушки.

Тотальную РНК для ОТ-ПЦР выделяли из неоплодотворенных яйцеклеток и эмбрионов (стадии 2-х бластомеров, поздней бластулы, гастроулы, нейрулы и вылупления) шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*. В качестве контроля экспрессии серотониновых рецепторов использовали головастиков и мозг взрослых лягушек. Показано, что экспрессия рецепторов 5-HT<sub>3A</sub> и 5-HT<sub>1A</sub> отсутствует на ранних стадиях эмбриогенеза и появляется с началом гастроуляции. При этом экспрессия генов орнитиндекарбоксилазы и  $\beta_1$ -адренорецептора, являющихся положительным контролем, была выявлена на всех исследованных стадиях развития. Таким образом, исследуемые рецепторы серотонина начинают экспрессироваться задолго до формирования нервной системы и могут участвовать в постгастроуляционных процессах эмбриогенеза. Предыдущими исследованиями показано, что фармакологические характеристики медиаторных рецепторов на ранних стадиях эмбриогенеза существенно отличаются от таковых на поздних стадиях развития и у взрослых организмов, что дает основания предполагать и отличия их структуры. Отсутствие экспрессии исследованных нами рецепторов на дагастроуляционных стадиях говорит о том, что функции серотонина в раннем развитии могут опосредоваться другими рецепторами, возможно являющимися особыми эмбриональными формами. Дальнейшая работа будет посвящена изучению экспрессии серотониновых рецепторов в онтогенезе, в частности поиску их эмбриональных вариантов. *Авторы выражают благодарность д.б.н. Ю.Б. Шмуклеру за помощь в подготовке тезисов. Работа поддержана грантом РФФИ № 08-04-00144.*

## Определение компонентов комплексов белка SUUR *Drosophila melanogaster*

Посух Ольга Витальевна (Новосибирск, olga.posukh@gmail.com)

Ген *Suppressor of UnderReplication* (*SuUR*) контролирует время завершения репликации и недорепликацию ДНК в гетерохроматиновых районах политенных хромосом *D. melanogaster*. Мутация в гене *SuUR* приводит к тому, что районы интеркалярного гетерохроматина и часть прицентромерного гетерохроматина заканчивают репликацию существенно раньше, чем в норме, и становятся полностью политенизированными. Несмотря на большой объем данных об эффектах белка SUUR, механизм его участия в контроле репликации до сих пор остается невыясненным. Наша работа направлена на поиск белков-партнеров и изучение функциональных комплексов белка SUUR.

Нами был выбран метод двойной аффинной очистки (TAP – Tandem Affinity Purification), который позволяет выделять белковые комплексы в условиях наиболее близких к *in vivo*. Работа по созданию такой системы для SUUR включала следующие этапы: (i) получение генетических конструкций, обеспечивающих экспрессию в организме дрозофилы белка SUUR и полипептида TAP в одной рамке считывания; (ii) получение линии культуры клеток дрозофилы S2, стабильно экспрессирующей белок SUUR-TAP; (iii) получение линий мух, экспрессирующих белок SUUR-TAP. Для проверки функциональности системы был проведен ряд тестов. Была продемонстрирована способность химерного белка SUUR-TAP восстанавливать фенотип дикого типа в мутантной линии мух и оказывать специфические эффекты на хромосомы в системе экспрессии GAL4-UAS. Полученный результат свидетельствует в пользу того, что химерный белок SUUR-TAP способен взаимодействовать с теми же белками-партнерами, что и эндогенный SUUR.

В результате фракционирования по размеру (FPLC) белковых комплексов из полученной линии культуры клеток и последующей детекции белка SUUR-TAP было показано, что SUUR-TAP находится в составе крупных белковых комплексов (>440 кДа). Нами была проведена двойная аффинная очистка комплексов SUUR-TAP из белковых экстрактов полученной линии культуры клеток. Компоненты комплекса проанализировали при помощи масс-спектрометрии и выявили ряд белков – кандидатов в партнеры SUUR.

На следующем этапе работы предстоит проверка полученных взаимодействий генетическими методами. А также будет проведена двойная аффинная очистка комплексов белка SUUR-TAP из эмбриональных экстрактов дрозофилы, так как наибольшее количество SUUR обнаружено именно в эмбрионах.

## Оценка генетического полиморфизма генов биотрансформации алкоголя *ADH1B*, *ALDH2* и *CYP2E1* в популяциях коренного и пришлого населения Сибири

Солопекин Николай Валерьевич (Кемерово, nikolai\_solopeki@mail.ru)

Полиморфизмы *ADH1B*\*2 возникают вследствие мутации G-A в 3 экзоне, приводящей к замене Arg47His; *ALDH2*\*2 – G-A в 12 экзоне, которая приводит к замене Glu504Lys; *CYP2E1* – G-C в 5'-фланкирующем регионе. Целью исследования было изучение полиморфизмов данных генов в трех группах. У коренного малочисленного сибирского народа – шорцев, у пришлого русского населения Сибири и у потомков смешанных шорско-русских браков. Всего было обследовано 246 человек, проживающих в Таштагольском районе Кемеровской области. Генотипирование проводили методом ПЦР. Результаты оценивали при помощи электрофореза в агарозном геле. Для детекции использовали окраску гелей бромистым этидием с визуализацией на УФ-свете. На основе результатов генотипирования анализировали полиморфизм генов *ADH1B*\*2, *ALDH2*\*2 и *CYP2E1*, оценивали уровень генетического разнообразия в группах по методу М.Нея, рассчитывали генетические расстояния (d) между коренным, пришлым населением Сибири и потомками от смешанных браков. По результатам исследования показано, что генные локусы *ADH1B* и *ALDH2* в группе шорцев ( $H_o=0.481$  и  $H_o=0.518$  соответственно) и потомков от смешанных браков ( $H_o=0.513$  и  $H_o=0.566$  соответственно) характеризуется высоким уровнем полиморфизма, *CYP2E1* – средним уровнем ( $H_o=0.166$  и  $H_o=0.231$  соответственно). В группе исследованных пришлых русских Сибири полиморфизм генных локусов *ADH1B* и *ALDH2* оказался высоким ( $H_o=0.520$  и  $H_o=0.640$  соответственно) и относительно низким у *CYP2E1*.

( $\text{Ho}=0.200$ ). Значение показателя  $\chi^2\text{H-W}$  свидетельствует о достоверном отклонении популяционных частот у шорцев от состояния равновесия по локусам *ALDH2* и *CYP2E1* ( $\chi^2\text{H-W}=9.563$  и 5.785), однако направленность этого отклонения различна. В случае *ALDH2* зарегистрирован избыток гетерозигот, а *CYP2E1*, наоборот, недостаток. Сравнение аллельных частот *ADH1B*, *ALDH2* и *CYP2E1* в трёх группах при помощи критерия  $\chi^2$  выявило статистически значимые различия ( $p<0.001$ ) при попарном сопоставлении русских с шорцами и с метисами. Полученная частота мутантных аллелей генов *ADH1B*, *ALDH2* и *CYP2E1* у шорцев ( $q=0.395$ ;  $q=0.362$ ;  $q=0.137$  соответственно) значимо превышает частоту свойственную пришлым русским ( $q=0.042$ ;  $q=0.015$ ;  $q=0.017$ ) и близка к частоте, отмеченной по данным литературы у азиатских народов. Генетические расстояния шорцами, русскими и метисами рассчитанные на основе аллельных частот генов *ADH1B*, *ALDH2* и *CYP2E1* свидетельствует о значительной дистанции пришлых русских от шорцев ( $d=0.111$ ). Сравнение значений средней удаленности от всех изученных групп показывает наименьшую удаленность от русских и шорцев группы метисов ( $d=0.034$ ), которые, тем не менее, оказываются более близки шорцам ( $d=0.010$ ). Работа поддержанна государственным грантом РФФИ № 10-04-98082-р\_сибирь\_а «Оценка полиморфизма генетических систем биотрансформации алкоголя в популяции шорцев Кемеровской области».

#### Особенности генетического ответа клетки на суммарное действие

экологических факторов – УФ-излучения и NO

Стрельцова Дарья Александровна (Москва, [dastr1@yandex.ru](mailto:dastr1@yandex.ru))

Каждый организм в течение жизни подвергается воздействию многочисленных ДНК-повреждающих агентов, представленных различными физическими и химическими факторами окружающей среды. В настоящее время все больший интерес приобретает проблема координации клеточного ответа на подобные повреждения. Кислород, оксид азота, ионизирующая и не ионизирующая радиация – являясь важнейшими элементами окружающей среды, также оказывают взаимное влияние на структуру и биологическую активность друг друга. Однако механизмы их комплексного воздействия на живую клетку до сих пор исследованы лишь фрагментарно. В наших предыдущих исследованиях впервые удалось показать, что адаптивный ответ или ранее развившийся *SOS*-процесс ингибируют в *E.coli* развитие >основного< *SOS*-репарационного ответа, если его индукторами являются химические мутагены.

В настоящей работе впервые проведено изучение модулирующего действия донора NO в отношении токсической и генотоксической активности УФ-излучения в условиях гипоксии. Использован *UVC*-спектр УФ-излучения ( $\lambda=254$  нм), генетическая активность которого не связана с формированием реактивных форм кислорода (*ROS*).

Нами было исследовано развитие *SOS*-репарационного ответа в штамме *E.coli* *PQ37* [*sfIA::lacZ*] в условиях гипоксии – как реакции клетки на УФ-излучение (*UVC*), железо-серные кристаллические доноры *NO* и комплексное воздействие двух *SOS*-индукторов при последовательной обработке культуры [*UVC*→*NO*].

В работе впервые установлено разнонаправленное действие *NO* на токсическое действие УФ на клетку *E.coli*: 4–5-кратная сенсибилизация при гипоксии и 4,5–10-кратное протекторное действие в присутствии  $\text{O}_2$ . При этом эффект сенсибилизации не проявлялся в штамме *uvr*<sup>+</sup> с активной системой эксцизионной репарации УФ-повреждений *UvrABC*.

При изучении генотоксической активности нами выявлены значительные сенсибилизирующие свойства *NO*: показатели экспрессии гена *sfIA* в аэробных условиях, при последовательной обработке культуры [*UVC*→*NO*] превышали уровни экспрессии, индуцированной *UVC*, в 3 раза; и уровни экспрессии, индуцированной *NO* – в 2,1 раза. Те же тенденции наблюдались в условиях гипоксии: экспрессия при последовательной обработке увеличивалась по отношению к *UVC*-индуцированной в 3,4 раза, а к индуцированной *NO* – в 1,6 раза.

Таким образом, нами впервые найдены сенсибилизирующие свойства *NO* в отношении токсического (в условиях гипоксии) и генотоксического (независимо от условий аэрации) действий УФ-излучения на живую клетку.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Программы РФФИ (грант №08-04-00228). Автор считает приятным долгом поблагодарить за оказанное содействие, критическую оценку и обсуждение при выполнении работы Васильеву Светлану Васильевну.*

**Применение мультиплексной ПЦР для детекции *Lr*-генов пшеницы**  
**Суховеева Ольга Эдуардовна (Москва, olgasukhoveeva@gmail.com)**

Листовая (бурая) ржавчина – одно из опаснейших заболеваний мягкой пшеницы. Ускорить создание устойчивых сортов помогает применение молекулярного маркирования в селекции (MAS). В нашем исследовании использовались STS-маркеры на гены устойчивости пшеницы к листовой ржавчине *Lr19*, *Lr24* и *Lr34*.

При использовании STS-маркирования отсутствие у изучаемого образца на электрофоретическом геле бэнда может привести к ложным результатам из-за дилеммы между его неустойчивостью и отсутствием прохождения ПЦР. Целью нашей работы было ликвидировать этот недостаток, применив мультиплексную ПЦР с совместным использованием двух пар праймеров: на ген резистентности и на контрольный ген, бэнд которого при качественном прохождении реакции должен обязательно присутствовать на электрофоретическом геле.

В качестве контроля нами было предложено использовать ген тионина 1 типа. В работе применялась новая комбинация праймеров на этот ген. Варьирование температуры отжига от 54° до 64° и его временной продолжительности не оказывали влияния на высокий уровень совместной амплификации. Для получения равных количеств продуктов амплификации и бэндов одинаковой интенсивности в ПЦР смесь праймеры на гены резистентности (монокопии в геноме) и на контрольный ген (имеет три копии) добавляли в соотношении 3:1. При совместной амплификации генов показана эффективность тест-системы при снижении концентрации ДНК до 3 нг/мкл.

Разработанная методика была апробирована на селекционном материале, предоставленном Краснодарским НИИСХ им. П.П. Лукьяненко. Результаты указывают на универсальность предлагаемой методики и возможность ее применения на других STS-маркерах. *Работа выполнена при финансовой поддержке Федерального агентства по науке и инновациям РФ (государственный контракт 02.740.11.0286). Выражая благодарность научному руководителю проекта к.б.н., руководителю Центра молекулярной биотехнологии Карлову Геннадию Ильичу.*

**Анализ экспрессии мобильных элементов группы *gypsy* у *Drosophila melanogaster***  
**Урсов Феликс Анатольевич (Москва, flanger\_fx@mail.ru)**

Мобильные генетические элементы (МГЭ) составляют значительную часть генома эукариот, играют важную роль в эволюции организмов. Однако неконтролируемые перемещения МГЭ могут быть причиной геномной нестабильности, которая выражается в повышении частоты мутаций, хромосомных перестроек и связанных с ними негативными последствиями для организма. В процессе эволюции в геноме организмов-хозяев (строго говоря, мГЭ – это часть генома) появились механизмы, контролирующие перемещения МГЭ. Так, у дрозофилы описан гетерохроматиновый локус *flamenco*, локализованный на X-хромосоме, который ограничивает перемещения ретротранспозона *gypsy* предположительно путем РНК интерференции. В линиях, мутантных по *flamenco*, происходит активное перемещение *gypsy*. Кроме *gypsy* эффект *flamenco* распространяется на ретротранспозоны *ZAM* и *Idefix*. В геноме *D. melanogaster*, помимо ретротранспозонов *gypsy*, *ZAM* и *Idefix*, обнаружено еще 8 МГЭ, имеющих значительную гомологию с *gypsy* и потому отнесенных к группе *gypsy*. Не исключено, что *flamenco* может контролировать перемещения других МГЭ, входящих в группу *gypsy*. Нами была исследована экспрессия на уровне транскрипции 11 рэтроэлементов дрозофилы, входящих в состав группы *gypsy*: *ZAM*, 17.6, 297, *Qasimodo*, *Idefix*, *Springer*, *Rover*, *Transpac*, *Tirant*, *Opus* и *gypsy*. В настоящей работе использовались следующие линии *D. melanogaster*: 7K и 145 – изогенные линии, мутантные по *flamenco* (*flam*–), и линия 413 с нормальным аллелем *flamenco* (*flam*+). Экспрессия МГЭ исследовалась на разных стадиях развития: эмбриональной, личиночной и имаго. При этом

на стадии имаго анализ проводился у самцов и самок отдельно. Существенных различий между двумя изогенными линиями 7К и 145 не было выявлено. Уровень транскрипции большинства анализируемых МГЭ в линиях с фенотипом *flat-* оказался повышенным по сравнению с уровнем транскрипции тех же МГЭ в 413 линии (*flat+*). По-видимому, транскрипция МГЭ группы *gypsy* подавляется нормальным аллелем *flamenco*. Кроме того, обнаружено, что эффект снижения количества транскриптов МГЭ сильнее выражен у самок 413 линии. На личиночной стадии транскрипция большинства ретротранспозонов не обнаруживается ни в одной из исследуемых линий. Это может быть связано с особенностями функционирования генома в целом на этой стадии развития. На эмбриональной стадии профиль экспрессии МГЭ существенно не отличается от стадии имаго.

Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что в линиях 7К и 145 повышенный уровень транскрипции рэтроэлементов группы *gypsy* может быть обусловлен мутацией в локусе *flamenco* и/или дефектами в других генах, продукты которых задействованы в генетическом контроле транспозиции МГЭ. Снижение уровня транскриптов МГЭ в линии 413 (с нормальным аллелем *flamenco*) может свидетельствовать в пользу того, что данный локус принимает участие в контроле перемещений изучаемых элементов.

## ПОДСЕКЦИЯ «ГИДРОБИОЛОГИЯ И ОБЩАЯ ЭКОЛОГИЯ»

### Оценка структуры зоопланктона озера Свитязь Базар Светлана Николаевна (Белоруссия, Минск, sweta\_08@mail.ru)

В настоящее время, озеро Свитязь, как и любая сложная биологическая система, претерпевает изменения в силу естественных причин, однако наиболее существенное влияние оказывает антропогенное воздействие. Зоопланктонное сообщество является одним из динамичных компонентов биоты водоема, чуто реагирующее на изменение условий среды, поэтому использование его структурных характеристик в целях диагностики трофического типа озер на сегодняшний день не вызывает возражений. Основной массив данных получен на озере Свитязь в 2008 году. С периодичностью в две недели пробы отбирались в зоне контроля, антропогенной нагрузки (пляж) и в зоне макрофитов. За период исследования выявлены виды, относящиеся к: подотряду Cladocera: *Diaphanosoma brachiyurum* (Lievin), *Sida crystallina* (Muller), *Daphnia longispina* (Muller), *Daphnia cucullata* (Sars), *Daphnia cristata* (Sars), *Scapholeberis mucronata* (O.F. Muller), *Ceriodaphnia quadrangula* (Muller), *Ceriodaphnia pulchella* (Sars), *Bosmina coregoni coregoni* (Baird), *Bosmina longirostris* (Muller), *Holopedium gibberum* (Zaddack), *Chydorus sphaericus* (Muller), *Alonella nana* (Baird), *Alona quittata quittata* (Sars), *Disparalona falcata* (Koch), *Polyphemus pediculus* (Linnaeus); подклассу Copepoda: *Eudiaptomus graciloides* (Lilljeborg), *Mesacyclops leuckarti* (Claus), *Eucyclops serrulatus* (Fischer); типу Rotifera: *Asplanchna priodonta* (Gosse), *Asplanchna herricki* (Guerne), *Brahionus angularis angularis* (Gosse), *Brahionus diversicornis* (Dayay), *Keratella cochlearis* (Gosse), *Keratella quadrata* (Muller), *Keratella quadrata* (Muller), *Lecane luna* (Muller), *Polyarthra vulgaris* (Carlin), *Polyarthra major* (Burckhardt), *Filinia longiseta* (Ehrenberg), *Trichocerca pussilla* (Lauterborn), *Conochilus hippocrepis* (Schrank), *Conochilus unicornis* (Rousselet). Численность зоопланктона в среднем составила: зона антропогенной нагрузки – 135,25 экз./л, контроль – 139,25 экз./л, зона макрофитов – 143,25 экз./л. Биомасса: 1,24 мг/л – зона антропогенной нагрузки, 1,29 мг/л – контроль, 1,34 мг/л – зона макрофитов. Количественные и структурные показатели зоопланктона характеризуют озеро Свитязь как мезотрофное.

### Структура сообществ макрообентоса р. Ануй (Северный Алтай) Батурина Наталья Сергеевна (Новосибирск, ns\_baturina5@mail.ru)

Цель работы – выявить структурные особенности распределения видов макрообентоса в условиях изменения совокупности абиотических факторов при смене высотной поясности для отдельно взятой реки.

Исследование проводилась на р. Ануй (территория Алтайского края и Республики Алтай) в августе 2009 года. При описании структуры сообщества исследуемый водоток условно разбивался на участки, располагающиеся на различной высоте относительно уровня моря. Для каждого участка определялись показатели основных абиотических характеристик.

В ходе исследования обнаружено 36 видов макрообентоса, принадлежащих к различным классам. В реке Ануй наиболее богато представлены отряды Ephemeroptera и Trichoptera: 44,4% и 27,8% от общего числа видов соответственно. Среди видов, не приводившихся для территории Алтайского края и Республики Алтай, обнаружены два вида из отряда Ephemeroptera: *Ephemerella setigera* (Bajkova, 1967), *Ameletus inopinatus* (Eaton, 1887) и один вид из отряда Trichoptera: *Hydropsyche pellucidula* (Curtis, 1834).

При обработке данных с учётных площадок были выявлены доминантные виды для каждой высотной зоны. Так, для участка №1 (h 1123 м) по численности преобладали представители рода *Phagocata* sp. (планарии). На втором участке (h 960 м) было обнаружено господство представителей отряда Ephemeroptera, в частности рода *Baetis* (4 вида). По численности преобладает *Afghanurus joernensis* (Bengtsson, 1909): 43,5 %. Третий участок (h 749 м) значительно отличается от второго по показателям абиотических факторов, что отражается и на структуре сообщества макрообентоса. Увеличивается доля отряда Trichoptera в видовом составе макрообентоса: 46,0 %, доминантный вид *Hydropsyche pellucidula* (Curtis, 1934). На двух ниже лежащих участках (200 м < h < 550 м) соотношение

количества видов, представляющих отряды Trichoptera и Ephemeroptera, равно единице. Однако при переходе реки в её равнинную часть доля отряда подёнок увеличивается, а ручейников уменьшлась.

Анализ видового состава макрообентоса на различных участках реки показал увеличение коэффициента Жаккара от 0,24 до 0,41 при сравнении биоразнообразия на участках лежащих последовательно друг за другом вниз по течению. Это обусловлено присутствием «транзитных» видов (*Afghanurus joernensis* (Bengtsson, 1909), *Rhyacophila sibirica* (MacLachlan, 1879), *Diura tajuscula* (Klapalek, 1912) и др.) и одновременно замещением групп макрообентоса друг другом на чередующихся участках.

Исследование выполнено благодаря финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 08-04-92228) и программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (проект 02.740.11.0277). Научный руководитель: д-р биол. наук, проф. М. Г. Сергеев. Выражаю благодарность В.В. Заике за профессиональную помощь в определении таксонов.

**Оценка экологического состояния водоёмов Юнтоловского заказника по гидробиологическим показателям**

**Васильева Екатерина Сергеевна** (Санкт-Петербург, *polychaetka@mail.ru*)

Юнтоловский заказник (основан в 1999г.) находится в границах г.Санкт-Петербурга. В настоящее время достаточно хорошо изучены растительный и животный миры Юнтоловского заказника, однако сведения о гидробиологии водотоков Юнтоловского заказника нами не найдены. Поэтому изучение сообществ макрообентоса на данной территории является весьма интересным.

Задачи: 1. Дать общую характеристику состояния Юнтоловского заказника в целом и водных объектов в частности по данным литературы; 2. Провести рекогносцировочное обследование макрообентоса водоемов Юнтоловского заказника. Оценить: видовой состав макрообентоса; показатели обилия (численность и биомасса) макрообентоса; экологическое состояние водоемов Юнтоловского заказника по составу макрообентоса.

В составе макрообентоса водоемов «Юнтоловского заказника» было обнаружено 12 таксонов рангом вида и выше. Наибольшим разнообразием отличались *Insecta* – 4 таксона. Так же отмечено *Gastropoda* – 3 таксона, *Oligochaeta* – 2, *Hirudinea*, *Crustacea* и *Bivalvia* по 1. На станции №3 макрообентос не обнаружили. Вероятно, это обусловлено глинистым характером грунта.

Выводы: 1. Нагрузка биогенными элементами велика (для фосфора в 4 раза превышает фоновую), так как значительная часть водосбора занята пахотными землями. 2. Водотоки Юнтоловского заказника характеризуются низким видовым разнообразием по сравнению с реками Ленинградской области. 3. Численность и биомасса тесно связаны с развитием вида доминанта *Tubifex tubifex*. 4. По составу макрообентоса можно говорить о значительной антропогенной нагрузке. Класс качества вод: р.Каменка – III-IV, р.Глухарка – IV-V.

*Хочу поблагодарить Полякову Наталью Владимировну за помощь и поддержку.*

**Общая продолжительность жизни раков *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg в лабораторной культуре в связи с действием потенциально токсичных веществ**

**Гершкович Дарья Михайловна** (Москва, *papirus451@yandex.ru*)

Методы биотестирования с использованием водных организмов широко применяются в контроле загрязнения окружающей среды и потенциальной токсичности химических веществ. Целью работы стало исследование изменения продолжительности жизни стандартного лабораторного тест-объекта *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg в связи с сезонностью и воздействием некоторых химических факторов. Опыты проводили в соответствии со стандартными токсикологическими методиками.

Продолжительность жизни раков *C. affinis* в культуре характеризуется значительной сезонной вариабельностью. На основе анализа продолжительности жизни в контрольных выборках у раков в лабораторной культуре можно выделить период осенне-зимней (октябрь-декабрь) и период летней депрессии (июнь – июль). В периоды депрессии средняя

продолжительность жизни раков снижается до 14-18 суток, тогда как в другие сезоны она может достигать 28-33 суток.

При действии на раков веществ различной химической природы выявляется диапазон концентраций, оказывающих стимулирующий эффект на показатели продолжительности жизни. В частности, отмечено увеличение средней продолжительности жизни на 8% при воздействии бихромата калия в концентрации 0,0001 мгCr/л, на 22% при воздействии этилового спирта в концентрации 0,002 мг/л, а также при воздействии препарата SkQ1 в широком диапазоне концентраций.

Испытанные концентрации антиоксидативного препарата SkQ1 (0,003 мг/л, 0,0003 мг/л и 0,00003 мг/л) достоверно увеличивают среднюю продолжительность жизни раков *C. affinis* на 60-90%, продлевают сроки наступления фиксированных величин гибели до двух раз, а также снижают вероятность смерти для старших возрастов. Кроме того, исследованные концентрации препарата не оказывают негативного влияния на репродуктивную функцию раков, стимулируя и сохраняя способность к размножению на всем протяжении жизни.

Антиоксидативный препарат SkQ1 в концентрации 0,0003 мг/л при внесении на разных сроках жизни оказывает наибольшее стимулирующее воздействие на младшие возрастные группы раков *C. affinis*. При кратковременном внесении (в течение 10 суток) препарата SkQ1 в концентрации 0,0003 мг/л достоверное увеличение средней продолжительности жизни отмечено в младших возрастных группах – при введении препарата с первых суток.

Выявлено сезонное изменение восприимчивости раков к воздействию препарата SkQ1. Максимальный эффект увеличения продолжительности жизни наблюдается при минимальной продолжительности жизни в контрольных испытаниях.

### **Проблема адаптации птиц-дуплогнёздников к урбанизированным ландшафтам** *Дорошин Роман Евгеньевич (Москва, roman-rd@yandex.ru)*

С развитием хозяйственной деятельности человека всё большие территории занимаются городами. Современные процессы урбанизации – это не просто рост городов и увеличение численности городского населения, но и всесторонняя трансформация природных территориальных комплексов, одним из компонентов которых являются живые организмы, в том числе и птицы. Изменение экологических условий приводит к созданию для птиц новой природно-антропогенной среды обитания.

Цель работы это изучение комплекса адаптивных приспособлений птиц к новым экологическим условиям города. Исследование проводится на протяжении пяти лет в Московском регионе, включающем в себя столицу и территории в геоэкологическом отношении тесно связанные с ядром региона. В качестве модельного объекта исследования выбраны птицы-дуплогнёздники, обладающие достаточной эврибионтностью и присутствующие в наших урбанизированных ландшафтах. В ходе работы отмечались сроки прилета птиц, время гнездования и откладки яиц, периоды выведения птенцов, изучался гнездостроительный материал, брались пробы питания, измерялись яйца и птенцы, проводились замеры температуры и влажности в гнездовых ящиках. Наблюдались особенности размещения гнёзд, предпочтения выбора гнездовых в ландшафтах различной степени урбанизированности.

По сравнению с естественными стациями, в антропогенных ландшафтах меняется поведение птиц. Раньше начинается строительство гнёзд (уже через 7-12 дней после прилёта), оказываются новые предпочтения в выборе гнездовой (не только снижаются требования к факторам шума и беспокойства, но и в связи с изменениями динамических характеристик климата в городе, меняется зависимость выбора направления лётков). Хотя давно подмечено, что сами взрослые особи проявляют интерес к пищевым отбросам, по моим данным птенцы продолжают получать преимущественно насекомых (более 80%) и других беспозвоночных. Антропогенные же корма у них составляют менее одного процента. Так, продолжая участие в регуляции численности насекомых в период выведения птенцов, дуплогнёздники сохраняют своё биоценотическое значение. Многие учёные неоднократно отмечали использование материалов антропогенного происхождения в строительстве гнёзд, и сейчас птицы собирают в гнездо вату, верёвки, тряпки. Но в последние годы отмечается не

только увеличение количества гнёзд, построенных с применением антропогенного материала, но и изменение состава естественных материалов. В городских районах, где ежегодно уничтожается лиственно-травяная подстилка, птицы вынуждены использовать не сухую прошлогоднюю траву, а выдраные травяные корешки, зелёный мох и т.п. Это увеличивает влажность в гнезде, способствует развитию плесени и всяческих гнездовых паразитов, что сказывается на успешности гнездования. Итак, при расширении и углублении урбанизации, птицы-дуплогнёздники продолжают поддерживать свою численность в городских ландшафтах, используя широкий спектр адаптивных механизмов, но страдают от нехватки гнездовий и нерациональной хозяйственной деятельности человека.

### **Развитие зообентоса озера Караколь (Казахстан)**

*Карапун Михаил Юрьевич (Астрахань, aktay\_misha@yahoo.com)*

Озеро Караколь – искусственный мелководный водоём с многочисленными островками, расположенный в районе восточного побережья Среднего Каспия. В 1986 г. озеро Караколь является частью ООПТ «Карагие-Каракольский государственный зоологический заказник республиканского значения». С 2007 года Караколь включен в список Ключевых Орнитологических Территорий, в связи с этим встал вопрос о комплексной изученности данного водоема (Ключевые орнитологические..., 2008). Площадь озера составляет 5270 га, глубина варьируется от 0,5 до 2,0 м. Солёность в озере Караколь составляет 13,28-13,69‰, по сравнению с морской водой в районе г. Актау 12,81‰. Температура воды в зимний период года варьирует от 0 до +7°C, в весенний период от +18 до 21°, а в летом поднимается до +27°C.

В результате наших исследований установлено, что водная растительность представлена: морской травой *Zostera marina*, тростником обыкновенным (южным) *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud и камышом *Scirpus tabernaemontani* (C. C. Gmel.). При этом тростник является доминирующим видом в растительных сообществах по северному, северо-восточному и западному побережьям. Остальные макрофиты распределены равномерно по водоему. Согласно проведенным исследованиям выяснено 5 азово-черноморских видов: *N. diversicolor*, *A. ovata*, *M. lineatus*, *C. lamarcki*, *B. improvisus*.

В результате наших исследований было установлено, что общая численность зообентосных организмов составляла 76 экз./м<sup>2</sup> в феврале, в мае – 181 экз./м<sup>2</sup>, в августе 188 экз./м<sup>2</sup>. Биомасса составляла февраль – 5,2, май – 14,6 и 40,689 г/м<sup>2</sup> соответственно для августа. При этом, в феврале и мае был доминантам двухстворчатый моллюск *Abra ovata*, составляя 65,7 и 62,4% от общей численности и 94,2 и 92,3% от биомассы всех выделенных бентосных организмов. В летний период было отмечено значительное изменение качественного показателя бентофауны. На смену *Abra ovata* приходит моллюск *Cerastoderma lamarcki* составляя 21,8% от общей численности и 77,8% от биомассы. При этом установлено, что данный представитель двухстворчатых моллюсков вытесняет абуру на тех участках дна, где аэрация сравнительно хорошая. Следует отметить, что в весенне-летний период резко возросла численность полихет *Hediste diversicolor* (Muller), в общем от 11 до 50 экз./м<sup>2</sup>. Весной появились личинки хирономид – 12 экз./м<sup>2</sup>, а также моллюски *Mytilaster lineatus* (Gmel.) на 10 станции – 3 экз./м<sup>2</sup>, которые в августе были зарегистрированы на все станциях отбора проб, составляя 17,0% и 14,3% от численности и биомассы. Кроме этого, в августе месяце возросла численность *Niphargoides (Pontogammarus) weidmanni* и составила 38,3% от общей численности зообентоса.

### **Оценка экологического состояния реки Цны в среднем течении**

*Коломейцева Нина Николаевна (Тамбов, kolomeytseva-n@yandex.ru)*

Важнейшими экологическими проблемами современности являются загрязнение и эвтрофирование поверхностных вод, служащих основным, а иногда и единственным источником водоснабжения населения и промышленности. Поэтому вопрос об оценке экологического состояния и рациональном использовании ресурсов реки является актуальным.

Летом 2009 года нами были проведены экологические исследования реки Цны в районе г. Котовска. Целью исследований была оценка экологического состояния реки в среднем течении. Для достижения поставленной цели мы составили географическое описание и провели гидрометрическое обследование трех участков реки Цны, расположенных по течению таким образом, что между первым и вторым створами находилось устье реки Лесной Тамбов, правого притока Цны, а между вторым и третьим – город Котовск. На тех же створах нами была проведена оценка устойчивости донного грунта к поступающим загрязнениям и определено качество речных вод.

Проведенные исследования в совокупности с данными химического мониторинга, проводимого специальными службами, позволяют более полно оценить качество воды в реке. Сведения могут быть полезны предприятиям и городским службам, которые используют воду реки, жителям города, для которых река является местом отдыха. Выбранное нами расположение створов может позволить оценить влияние на экологическое состояние реки Цны ее правого притока и города Котовска. Географическое описание мы составляли методом натурных наблюдений, гигрометрическое обследование проводили согласно методикам из «Практикума по общему землеведению» К.В. Пашканга. Устойчивость донного грунта к загрязнениям оценивали методами, предложенными Л.Ф. Тарариной, Е.Н. Мищустиной и И.С. Востровым. Качество речных вод мы определяли по составу макрообентоса, используя систему сапробности Панте-Букка в модификации М.В. Чертопруды.

По результатам проведенных исследований мы сделали следующие выводы. Русло реки на исследуемых участках относительно чистое, однако повсеместно отмечены нарушения прибрежной водоохранной зоны: грунтовая дорога, вытаптывание травяного покрова, костища, бытовой мусор. При проведении гидрометрических исследований мы выяснили, что расход воды на втором створе увеличился практически вдвое по сравнению с первым. Разница в расходах между вторым и третьим створами незначительная – 5%. Результаты, полученные методом автографии на фотобумаге, позволяют судить о том, что донные отложения реки Цны на первом створе имеют большую самоочищающую способность, по отношению к самоочищающей способности отложений на втором и третьем створах. Исходя из результатов изучения активности протеолитических ферментов в донном грунте, можно сделать вывод о снижении способности самоочищения донного грунта от белкового загрязнения на третьем створе по сравнению с двумя вышеперечисленными. На всем протяжении исследуемого участка значения индекса сапробности вод реки остаются одинаковыми – 2,5. Воды всех трех створов можно отнести к  $\beta$ -мезосапробным. Однако, следует отметить, что полученные значения индекса сапробности являются пограничными между  $\alpha$ - и  $\beta$ -мезосапробными водами. В целом, экологическое состояние реки Цны на исследуемых участках можно оценить как удовлетворительное. Выражая благодарность моему научному руководителю Олегу Ивановичу Дубровину за помощь в организации и проведении исследований и помочь в подготовке данного материала.

**Моделирование распространения видов флоры и фауны  
на территории Восточной Европы в условиях изменения климата**  
**Коломыцев Григорий Александрович (Украина, Киев, g.kolomytsev@gmail.com)**

В целях апробации оценки потенциального влияния изменения климата на ключевой состав флоры и фауны в пределах Восточной Европы построены модели распространения видов, в числе которых 20 видов растений, насекомых – 1 вид, амфибий – 4 вида, птиц – 10 видов и млекопитающих – 18 видов.

Входящий картографический материал представлен историческими и современными данными о распространении видов, климатический пакет – современными и прогностическими картами на 2050 год. В исследование включены 6 климатических параметров, такие как средняя температура вегетационного периода, индекс влажности грунта и др.

Для оценки трендов распространения видов использован подход обобщенных линейных моделей (Generalized Linear Model, GLM). Алгоритм построения видовых моделей включал:

подготовку материалов, составление так называемых ‘климатических паспортов’ видов, их экстраполяцию на карты ожидаемого климата. Математические расчеты проведены в программной среде «R» в сочетании с базами данных MS Access, обработка производных карт, а также финальная визуализация осуществлялись с помощью ARCINFO. Достоверность результатов запусков моделей проверялись по информационному критерию Акайке.

Результаты исследования указывают на потенциальное смещение ареалов видов на территории Восточной Европы не только линейно на север (например, берёза опушённая – *Betula pubescens* Ehrh.), хотя этот тренд наиболее характерен, а по принципу веера: северо-восток (например, дуб обыкновенный – *Quercus robur* L.), северо-запад (например, степной хорь – *Mustela eversmannii* Lesson) и т.д. Однако, благоприятные для обитания исследуемых видов территории, которые по прогнозам появятся в результате изменения климата, могут не привести к расселению из-за отсутствия подходящих ниш в экосистемах, либо по ряду других специфических причин. Анализ прогностических карт также показал, что в масштабах Украины к 2050 году ожидаются потери около 13% исследуемых видов, что очень близко к оценкам риска исчезновения видов в условиях изменения климата, полученным в ходе проведения аналогичных исследований.

Проведение экологического моделирования является очень желанным переходом к современной стратегии принятия решений, когда им предшествуют именно расчёты, а не только экспертные оценки и обобщения. Такой подход уже давно используется в мире, в т.ч. в странах ЕС, что способствует формированию эффективной и последовательной политики в вопросах охраны биоразнообразия.

*Исследование является результатом совместной работы, осуществленной в УЦМЗР (Киев, Украина) и НЕАА (Венинген, Нидерланды) – в рамках 2-го проекта GLOBIO (EEBIO) – «Разработка видо-ориентированной модели по поддержке изучения биоразнообразия на территории “русскоязычных стран” Европы» (№ Е/555050/05/МО). Авторами видовых моделей являются также к.б.н. В.И. Придатко и В. Макаренко (УЦМЗР), которым автор выражает благодарность за предоставление материалов для публикации.*

### **Интегральная оценка экологического состояния урбанизированных территорий на основе биотестирования**

**Крапивина Надежда Сергеевна** (Белоруссия, Минск, *nadya\_krapivina@mail.ru*)

Цель настоящей работы – оценка уровня антропогенного давления на урбанизированных территориях (на примере Минска) с помощью комплекса биониндикаторов. Объект – почвы города из зон с различным уровнем антропогенной нагрузки. Растения-тестеры – берёза повислая, лук-севок, водоросль *Chlorella fucsa*. Цель достигалась путем решения следующих задач: 1. Оценка элементного состава почв и биомассы растений; 2. Изучение реакции тест-объектов (*Betula pendula*, *Chlorella fucsa*) на исследуемые почвы, а также их токсичности и генотоксичности (*Allium cepa*); 3. Оценка уровню антропогенной нагрузки в различных зонах Минска.

Материалы и методы исследований. Сбор биологического материала и почв проводился по стандартной методике (ГОСТ 17.4.3.01). Морфометрический анализ листовой пластиинки *Betula pendula* осуществляли с использованием оригинальной компьютерной программы. Элементный состав почв и зелёной биомассы *Betula pendula* оценивали на рентгенофлуоресцентном анализаторе ElvaX. Изучение влияния состава почвенных экстрактов на низшие растения проводилось на *Chlorella fucsa*. Общую токсичность и генотоксичность почв определяли с помощью *Allium*-теста. Учитывали также энергию прорастания, длину корешков, уровень цитогенетических нарушений в клетках меристемы.

Основные результаты. В неблагоприятных условиях основную угрозу для объекта представляют биологически подвижные соединения свинца, хрома и др., даже если их содержание в среде невелико. Таким образом, определяющим показателем эффекта может служить коэффициент перехода (КП), отражающий их доступную фракцию. Анализ данных свидетельствует о том, что числу наиболее доступных можно отнести соединения кальция (КП=0,95), серы (КП=0,98) и селена (КП=0,77); по ряду элементов берёза является

растением-накопителем (бром КП=2,04; цинк КП=1,19). В то же время, КП для опасных антропогенных загрязнителей минимален: кобальт (0,27), хром (0,01), железо (0,01), никель (0,05), свинец (0,08). Также отмечено, что кадмий, ванадий, олово и серебро, соединения которых обнаруживаются в почвах в следовых количествах, регистрируются в достаточно значимых концентрациях в образцах зелёной биомассы. Практически на всех исследуемых территориях отмечалось повышение коэффициента флюктуирующей асимметрии листовой пластиинки *Betula pendula*.

На культуре *Chlorella fucosa* установлено, что почвенные вытяжки из разных зон обладали разнонаправленным влиянием на её рост. Экстракти почв с высоким уровнем загрязнения по соединениям цинка и кадмия снижали величину энергии прорастания семян и МИ меристемы *Allium cepa*. Цитогенетические нарушения были представлены различными формами нарушений митозов: отставанием или опережением хромосом при расхождении, наличием мостов, а также появлением микроядер.

Таким образом, установлено, что уровень антропогенной нагрузки на урбосреду Минска варьирует в широких пределах. Наиболее неблагополучная ситуация наблюдается в юго-восточной части города.

Выражаем благодарность научному руководителю д.б.н., профессору Мельнову С.Б.

**Экологическая характеристика Жестылёвского водохранилища**  
**Кузнецов Сергей Александрович** (Дмитров, [kenuusk@mail.ru](mailto:kenuusk@mail.ru))

Русловое Жестылёвское водохранилище на р. Якоть площадью 166 га и объёмом водной массы 9,5 млн. м<sup>3</sup> создано для обеспечения водой экспериментально-производственного прудового хозяйства ВНИИПРХ.

Если в период открытой воды благоприятный газовый режим в пределах 5-метровой толщи воды в водохранилище обеспечивается речными водами и ветровой аэрацией, то зимой при ледоставе анаэробная зона поднимается в верхние слои воды и уже к концу зимы (март) содержание растворённого в воде кислорода подо льдом составляет 0,2-0,6 мгО<sub>2</sub>/л.

Минерализация воды колеблется в пределах 250-506 мг/л, максимальные значения характерны для зимы. Максимальная концентрация нитратного азота воде отмечается в начале зимы – до 1,5 г/л, к середине лета количество нитратов в верхних слоях воды составляло 0,2-0,3 мг/л. Содержание хлоридов и сульфатов в воде водохранилища колебалось соответственно от 7,2 до 9,3 мг/л и от 6,0 до 20,0 мг/л.

Анализы воды и донных отложений водохранилища на содержание ионов тяжёлых металлов (Cu, Ni, Pb, Zn) показали превышение ПДКр/х для отдельных металлов (Cu – до 10 ПДК, Ni – 3 ПДК и Pb – 13-16 ПДК). В донных отложениях концентрация ионов тяжёлых металлов на порядки выше, чем в воде.

Биологический режим Жестылёвского водохранилища характерен для малых водохранилища средней полосы России. Высшая водная растительность, преимущественно *Patomogeton pectinatus* L. и *Ceratophyllum demersum* L., распределена узкими полосами вдоль восточных пологих берегов. Фитопланктон представлен свыше 200 видами из разных отделов, но основу (30-35 видов) составляют протококковые, диатомовые, эвгленовые и сине-зелёные водоросли. Численность фитопланктона в течение года колеблется от 450 тыс. кл/л до 22,5 млн. кл/л, максимальные величины приходятся на первую половину июня – первый пик его количественного развития преимущественно за счёт протококковых водорослей. Осенью возможен и второй пик.

Зоопланктон водохранилища отличается небольшим видовым разнообразием – не более 40 видов, основу его составляют *Asplanchna priodonta* (Gosse), *Kelicottia longispina* (Kell), *Filinia longiseta* (Ehrbg), *Brachionus calyciflorus* (Ehrbg), *Ceriodaphnia pulchella* (Sars), *Bosmina longirostris* (Muller), *Diaphanosoma brachirum* (Muller). Среднесезонная биомасса зоопланктона за вегетационный период составляет 2,2 г/м<sup>3</sup>.

В водохранилище до 5-метровых глубин развит пелофильный биоценоз, представленный преимущественно личинками хирономид.

Ихтиофауна водохранилища представлена 10 видами: *Rutilus rutilus* L., *Abramis brama* L., *Carassius auratus* B., *Perca fluviatilis* L., *Esox lucius* L., *Acerina cernua* L., *Alburnus*

*alburnus* L., *Misgurnus fossilis* L. и *Cobitis taenia* L. В зимнее время основу уловов составляли окунь, плотва и ерш. В летних уловах преобладали плотва, окунь, иногда встречалась щука.

### **Оценка реакций низших гидробионтов в условиях пестицидной интоксикации** *Кулагина Кристина Владимировна* (Ульяновск, *ruankare1@yandex.ru*)

Вещества, поступающие в водные экосистемы антропогенным путём, могут оказывать регулирующее, трофическое и токсическое воздействие на различные виды гидробионтов, оценить которые можно степенью отклонения от стандартных поведенческих реакций, что служит первым сигналом на визуальном уровне об изменении качества природной среды.

На современном уровне развития сельскохозяйственной промышленности на смену традиционным химическим препаратам, обладающим с одной стороны высокой токсичностью и возникшей резистентностью вредителей, приходят биологические средства, содержащими целые микроорганизмы, продукты их жизнедеятельности, примесь спор, вегетативные клетки и токсины.

Нами было изучено воздействие пестицидной интоксикации на низших гидробионтов и разработаны практические рекомендации в рамках экологического мониторинга по предупреждению токсического эффекта.

В работе были исследованы биологические пестициды «Лепидоцид» на основе *B. thuringiensis* и «Фитоверм», представляющий собой концентрат аверсектина, который является природной смесью авермектинов (продуцируемых микроорганизмами *Streptomyces avermectinis*). Биопрепараты испытывали в опытах острой летальной токсичности с *Daphnia magna* по общепринятой методике водной токсикологии биотестирования. Для экспериментов использовали молодь раков, непосредственно вышедших от материнской особи как наиболее чувствительную стадию развития. Опыты проводились на культуральной воде, жесткость  $5,57\pm0,02$  мг экв/дм<sup>3</sup>, pH  $7,49\pm0,01$ , содержание кислорода  $9,2\pm0,02$  мг/дм<sup>3</sup>, температура  $20\pm2$  °C. Критерием чувствительности к препаратам является эффективная концентрация, приводящая к гибели 50% особей, которую определяли модифицированным методом пробит-анализа.

Установлено, что при воздействии исследуемых биологических пестицидов у молоди *Daphnia magna* наблюдаются все фазы патологического процесса: гипервозбуждение, нарушение координаций движения и т.д. При концентрации «Лепидоцида» 3 г/л в течение 3 часов ракчи опускались на дно сосудов, наблюдалась 100%-ная иммобилизация; при концентрации 2 г/л иммобилизация наступала в течение 36–48 часов. ЛК50 биопрепарата «Лепидоцид» соответствует значению 0,5–1 г/л, понижение её до 0,1 г/л не вызывает у *Daphnia magna* обнаруженных отличий от нормы и, следовательно, может быть отнесена к бездействующей. По показателям выживаемости большую токсичность для молоди проявил препарат «Фитоверм»: ЛК50 составила  $10^{-5}$ – $10^{-6}$  2%-ного раствора мл/л. При рабочей концентрации 1–2 мл/л сразу наступало глубокое угнетение всех процессов жизнедеятельности, иммобилизация наступала через несколько секунд.

В рамках экологического мониторинга в качестве меры по предупреждению токсического эффекта и изменения химического фона среды обитания гидробионтов следует понижать концентрации исследуемых инсектицидов в районах расположения водных экосистем до 1–0,1 г/л «Лепидоцида» и  $10^{-6}$ – $10^{-8}$  2%-ного раствора мл/л «Фитоверма».

*Выражаю искреннюю благодарность научному руководителю д.б.н., проф. Каменек Валерию Михайловичу за помощь в написании тезисов и д.ф.-м.н., проф. Учайкину Владимиру Васильевичу за методическую помощь.*

### **Сущность понятия «экологическая безопасность»** *Кутепова Екатерина Александровна* (Москва, *eKut24@yandex.ru*)

Взаимодействие общества с окружающей средой составляет единый технологический цикл, на основе которого необходима разработка взаимосвязанных технологический, экономических и экологических требований. Этот цикл состоит из трёх блоков (Кириллов, 1992): первый – процесс извлечения и преобразования ресурсов в формы потребления; второй – преобразование образовавшихся отходов в малоопасные формы с целью

далнейшего обращения (складирование, захоронение, обезвреживание, утилизация); третий – преобразование отходов в удобную для усвоения окружающей средой форму. Каждый блок несёт соответствующие физический смысл, экономические, технические и трудовые затраты.

Многочисленная нормативная и методическая литература содержит основные положения теории экологической безопасности. Но единого толкования понятия «экологической безопасности» на сегодняшний день не существует, наиболее часто встречается такая его интерпретация: состояние защищенности окружающей среды в ходе хозяйственной деятельности.

Экологическая безопасность обладает свойством адаптации к изучаемому объекту – в зависимости от уровня рассматриваемой системы и контекста оно приобретает определенный смысловой оттенок. Одно толкование возникает, когда речь идет в масштабе цивилизации, другое – при рассмотрении этого понятия в системе национальной безопасности государства и третье, когда определение понятия необходимо дать для уровня экосистемы и природно-антропогенного комплекса (Измалков, Измалков, 1998). В общем виде это мера опасного воздействия производственных факторов, в рамках которой сохраняются основные свойства системы и направленность её прогрессивного развития.

Любая деятельность должна базироваться на определенной системе взглядов, практическое осуществление которых должно гарантировать экологическую безопасность при вмешательстве в окружающую среду.

Для достижения поставленной цели необходима смена стереотипов мышления, которое порождает безответственное отношение граждан к окружающей среде; внедрение новых экологически чистых технологий, гарантирующих устойчивое функционирование природных объектов на основе жесткого соблюдения экологических нормативов.

### **Система комплексного фитомониторинга курортного региона как основа его устойчивого развития**

**Мандра Юлия Александровна** (*Ставрополь, унат2007@yandex.ru*)

На сегодняшний день подтверждено, что разумное управление качеством окружающей среды возможно лишь при эффективном функционировании системы экологического мониторинга. Данное обстоятельство особенно важно для курортных регионов, т.к. их основная задача – поддержание здоровья людей, а это невозможно в условиях усиленного антропогенного стресса. Соответственно, если вовремя не отследить изменения в экосистемах рекреационных ландшафтов и не принять решения, последствия могут быть разнообразными. В связи с необходимостью получения интегральной оценки состояния природных сред, биомониторинг является приоритетным направлением в данной области.

Цель исследований: разработка оптимальной для курортно-рекреационных зон системы комплексной фитоиндикационной оценки состояния окружающей среды.

Для этого достижения поставленной цели проводились биоиндикационные наблюдения на 30 базовых площадках города-курорта Кисловодск, выбранных по принципу равномерно-распределенного расположения. В пределах каждой площадки проводили исследования с использованием следующих методов: лихеноиндикация; комплексное обследование признаков сосны обыкновенной; метод флюктуирующей асимметрии; индикация по частотам встречаемости фенов клевера белого. Сроки проведения работ: 2007–2009 г., т.е. каждый метод был применен трехкратно.

В результате проведенных исследований, было выявлено, что территория города-курорта Кисловодск неоднородна по степени антропогенной (в том числе и рекреационной) нагрузки. Согласно бальной оценки, выделяются 3 зоны: I – условно чистая, II – переходная, III – условно загрязненная. По занимаемой площади эти зоны располагаются в следующий ряд (от меньшей к большей): I – III – II. Таким образом, менее трети территории города наиболее подвержено антропогенному воздействию. Однако сравнительный анализ результатов ежегодных исследований указывает на тенденцию уменьшения площадей условно чистых зон.

Кроме того, данные, полученные различными фитоиндикационными методами за один цикл исследований, подтверждают друг друга, что обеспечивает их достоверность. Неоднократное использование этих методов позволяет оценить направление изменения экологических показателей, а это является основанием для прогноза дальнейшего развития курортного региона.

Используемый нами фитоиндикационный подход дает необходимую для сбалансированного развития постоянно обновляемую системную информацию о состоянии всей территории. Это обстоятельство особенно важно для эффективного функционирования всей системы экологического мониторинга отдельного города-курорта и дает основания для разработки стратегии рационального природопользования и устойчивого развития всего региона Кавказских Минеральных Вод.

#### **О методах расчёта фоновой концентрации загрязняющих веществ в морской воде**

*Монахова Галина Анатольевна (Махачкала, gavochka@mail.ru)*

Термины «фон», «фоновая концентрация» широко используются в теоретической и прикладной экологии. Проблема состоит в том, что способы расчета фоновой концентрации, рекомендуемые в литературе, зависят от контекста, в котором используется данный термин.

По нашему мнению, под фоновой концентрацией следует понимать уровень загрязнения данной местности, обусловленный поступлением ЗВ из источников, находящихся за её пределами, и используемый в качестве точки отсчета для оценки загрязнения вносимого местными источниками. Исходя из этого определения, фоновая концентрация представляет собой объективный феномен, способы её расчета должны быть единообразными и не зависеть от контекста. Выбирая метод расчета фоновой концентрации, следует исходить из того, что оптимальным из них является тот, у которого имеется тесная связь уровня загрязнения данной местности с поступлением загрязняющих веществ из внешних источников. Так, при разработке метода оценки фоновой концентрации ЗВ в водах Северного Каспия мы исходили из того, что изменения ФК должны быть тесно связаны с изменением концентрации ЗВ в водах р. Волги (годовой объем волжского стока составляет 1/2 объема вод Северного Каспия).

В ходе исследований, в которых использовались данные многолетних наблюдений за содержанием загрязняющих веществ в воде р. Волги и в водах Северного Каспия, были испытаны различные методы расчета ФК. В частности, в качестве «претендентов» рассматривались значения 10, 20, ..., 80, 90% обеспеченности, верхняя и нижняя границы доверительного интервала среднего значения, а также медиана.

Кроме того, для вычисления ФК исходные ряды наблюдений модифицировались с целью придать им «нормальный» или «независимый» вид. Для этого от ранжированных рядов последовательно отрезались крайние значения до тех пор, пока в первом случае асимметрия ряда не станет нулевой, а во втором случае до тех пор, пока распределение ЗВ утратит зависимость от распределения гидрологических параметров. Среднее значение и медиана модифицированных рядов также испытывались в качестве ФК.

Показано, что параметры модифицированных временных рядов лучше подходят на роль фоновой концентрации. Разработанные способы расчета ФК предполагается использовать не только для Северного Каспия, но и для других морских акваторий. Значение исследований состоит в том, что фоновое загрязнение является одним из основных показателей антропогенной нагрузки на морские водоемы.

*Исследования проводятся в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг., Государственный контракт №П1285.*

#### **Анализ изменения качества водной среды**

**при хроническом воздействии синтетических моющих средств на рыб**  
*Никифорова Юлия Андреевна (Ярославль, Kifirrrchik@mail.ru)*

Наиболее распространенными химическими загрязнителями водоемов являются поверхностно-активные вещества (СПАВ или ПАВ), которые входят в состав синтетических моющих средств (СМС). Неэффективность очистки воды от СМС является причиной

появления их в водоёмах рыбохозяйственного назначения. Актуальной является проблема изучения влияния на гидробионтов токсических веществ, в частности СМС, и продуктов их распада. Целью работы явилось изучение изменения качественных показателей и токсических свойств водных растворов СМС в хроническом эксперименте на карасях. Анализ выживаемости рыб в хроническом эксперименте (15 суток) показал, что концентрации СМС «Миф автомат» и «Миф свежий цвет» 25,0, 50,0 и 75,0 мг/л являются недействующими по данному показателю. Токсичность ПАВ для рыб зависит от ряда факторов: их действие усиливается с повышением температуры воды и понижением содержания в ней растворенного кислорода. Однако анализ качества водной среды за период экспозиции с помощью дафниевого теста (48 часов) показал, что в водоёмах происходили значительные изменения свойств исходных растворов СМС. Так, наблюдение за выживаемостью раков в пробах воды из серий опытов с рыбой и без рыбы выявило наличие дозозависимого эффекта. При этом прослеживалась тенденция к снижению количества выживших цериодифий. В больших концентрациях выживало меньшее количество раков. Анализ содержания растворенного кислорода в растворах исследуемых СМС не выявил значительного отклонения от контроля. Активный кислород, входящий в состав СМС «Миф автомат» не вызывает изменений в концентрации растворенного кислорода. При изменении поверхностного натяжения воды под действием ПАВ уменьшается количество кислорода, растворенного в воде, что определяет скорость трансформации органических веществ. Даже при достаточном насыщении среды кислородом у рыб, помещенных в воду, содержащую дегтергенты, проявляются признаки асфиксии. ПАВ, понижая поверхностное натяжение жидкости, влияют на прохождение кислорода через полупроницаемые мембранны, каковыми являются жабры. При исследовании изменения водородного показателя установлено, что растворы СМС вызывают значительное подщелачивание среды по сравнению с контролем. При этом чем выше концентрация СМС, тем меньше смещение pH в сторону щелочной реакции. Отмечено также, что по сравнению с первыми сутками значение водородного показателя в водоёме с рыбой к 15 суткам возрастает, а в водоёме без рыбы – снижается для обоих СМС. Пятнадцатисуточной экспозиции не достаточно для полной детоксикации СМС «Миф автомат» и «Миф свежий цвет».

#### **Оценка экологического состояния реки Кашмы в нижнем течении Олейников Александр Алексеевич (Тамбов, [alexol-chip@mail.ru](mailto:alexol-chip@mail.ru))**

Вода занимает особое положение среди природных богатств Земли – она незаменима. На больших и средних реках действуют службы мониторинга гидрологического режима и экологического состояния. На реке Кашме экологический мониторинг не ведётся, поэтому исследование экологического состояния реки весьма актуально.

Цель нашей работы – определение экологического состояния реки Кашмы в нижнем течении. При проведении гидрометрических работ, а именно измерений средней скорости течения, площади поперечного сечения и расходов воды на створах мы использовали методики из пособия К.В. Пашканга. Для изучения активности протеолитических ферментов в донных отложениях мы использовали метод аппликаций на рентгеновской пленке, предложенный Е.Н. Мишустиным и И.С. Востровым и модифицированный Л.Ф. Тарапиной. Определение степени восстановленности среды в донном грунте мы проводили с помощью метода автографий на фотобумаге, предложенного Л.Ф. Тарапиной. Качество речных вод мы определяли при помощи индекса сапробности Пантле-Букка в модификации М.В. Чертопруда, а также используя шестиклассную систему оценки качества вод, положенную в основу ГОСТ 17.1.3.07-82. Исследования проводились в течение четырёх месяцев (с августа по декабрь 2009 года). Пробы брались 28 августа. Затем полученные результаты обрабатывались и анализировались.

Река Кашма – правый приток Цны (бассейн Волги). Первый створ мы расположили выше села Марусино. Второй створ мы расположили в 500 метрах от устья реки.

Произведя необходимые замеры и вычисления, мы выяснили, что на створе №1 средняя скорость течения = 0,168 м/с; расход воды = 2150 л/с. На створе №2 средняя скорость течения = 0,171 м/с; расход воды = 4000 л/с.

Определение степени восстановленности среды в донном грунте показало, что на первом и втором створах грунт восстановленный, о чём свидетельствуют чёрные и тёмно-бурые автографы на фотобумаге.

В ходе изучения активности протеолитических ферментов в донных отложениях получены следующие результаты: на обоих створах способность грунта к самоочищению очень низка. На первом створе площадь разрушенного желатинового слоя на полоске рентгеновской пленки в среднем составила 0,89%, На втором створе площадь разрушенного желатинового слоя на полоске рентгеновской пленки в среднем составила 1,55%.

После определения качества речных вод мы выяснили, что воды первого створа соответствуют  $\beta$ -мезосапропным водам, класс качества – III. Воды второго створа соответствуют  $\alpha$ -мезосапропным водам, класс качества – IV.

На основании вышеизложенного можно сделать вывод о том, что экологическое состояние реки Кашмы на первом створе удовлетворительное, от первого ко второму створу ухудшается. На втором створе экологическое состояние реки можно оценить как неудовлетворительное.

*Выражаю благодарность своему руководителю М.Е. Буковскому за помощь в организации и проведения исследований, обработке материала и написания работы.*

**О роли высших водных растений в экологических механизмах очищения воды от тяжёлых металлов: изучение микрокосмов с *Cu* и *Echinodorus quadrifolius***

**Поклонов Владислав Александрович** (Москва, warvir@rambler.ru)

Высшие водные растения активно исследуются в связи с перспективностью их использования для очищения воды и улучшения её качества. Цель данной работы – изучение способности макрофитов влиять на изменение концентрации меди в водной среде. Медь была выбрана в связи с тем, что она входит в число наиболее опасных для окружающей среды тяжёлых металлов. В условиях лабораторных микрокосмов изучали взаимодействие тяжёлых металлов с водными растениями (*Echinodorus quadrifolius* Fassett). Медь была добавлена в микрокосмы в составе смеси четырёх тяжёлых металлов. Для измерения концентраций использовали метод инверсионной вольтамперометрии. После добавления, концентрации меди в воде микрокосмов (А и В) составили: А 1,8 мг/л и В 1,6 (среднее 1,7) мг/л. Спустя 3 дня проявлялись признаки фитотоксичности, вода в микрокосмах стала мутной, имела бледно-зеленоватую окраску. В воде измерена концентрация меди: в микрокосме А 1,43 мг/л; в микрокосме В 1,3 (среднее 1,365) мг/л. Спустя 6 дней растения погибли, в воде микрокосмов измерена концентрация меди: А 0,65 мг/л и В 0,6 (среднее 0,625) мг/л. В контрольных микрокосмах (без макрофитов) концентрация меди составляла: А – в тот же день после добавления металлов 1,9 мг/л, на 3 день 1,9 мг/л, на 6 день 1,67 мг/л; В – в тот же день после добавления металлов 1,9 мг/л, на 3 день 1,6 мг/л, на 6 день 1,8 мг/л. Таким образом, в присутствии макрофитов происходило ускорение снижения концентрации в воде меди. Аналогичные результаты были получены при измерении концентрации и других тяжёлых металлов (*Zn, Cd, Pb*). Сходные данные были получены при изучении микрокосмов с другими видами водных макрофитов. Проведенная работа и полученные результаты вносят вклад в разработку научных основ фиторемедиации (экологических подходов и способов очищения загрязненной среды, восстановления нарушенных экосистем). Автор выражает благодарность за помощь в работе Шестаковой Т.В. и своему научному руководителю.

**Растительные пигменты в донных отложениях как показатели трофического состояния Рыбинского и Горьковского водохранилищ**

**Пяхва Т.А., Лысенко С.А.** (Череповец, ryakhova\_tanya@mail.ru)

Горьковское и Рыбинское водохранилища являются ступенями Волжского каскада и используются для судоходства, рекреации, энерго- и водоснабжения центральной России. Поэтому сохранение в них качества воды на должном уровне – актуальная проблема. Трофический статус водных экосистем – важный экологический параметр, за которым следят альгологи и гидробиологи. Для характеристики продуктивности необходимы

интегративные показатели, отражающие функционирование водоёма как целого. Этому требованию удовлетворяют данные о содержании растительных пигментов. Большинство работ выполнено на фитопланктоне и включает разрозненные сведения о содержании хлорофилла *a* в отдельных биотопах. Данные отложения с этой точки зрения изучены слабо.

Цель работы – использовать пигментные характеристики донных отложений для оценки трофического состояния Горьковского и Рыбинского водохранилищ. Содержание растительных пигментов определяли доступным спектрофотометрическим методом на базе Института биологии внутренних вод им. Папанина РАН в 2008–2009 гг.

Средние за период исследования концентрации суммы хлорофилла *a* и феопигментов в верхнем 5-см слое донных отложений Рыбинского водохранилища находились в пределах от  $4,61 \pm 0,30$  до  $258,42 \pm 8,07$  мкг/г с.о., а в Горьковском – 0,59 до 155,36 мкг/г с.о. Содержание растительных пигментов по территории ложа обоих водоёмов распределено в соответствии с типом грунта: на участках залегания серого песчанистого ила концентрация их больше, чем в зонах распространения илистого песка. Формы хлорофилла *a* в грунтах водохранилищ в основном представлены продуктами его распада – феопигментами. В среднем на исследованных участках в верхнем 5-см слое донных отложений их содержание в Рыбинском водохранилище –  $52,23 \pm 4,38$  –  $92,19 \pm 1,63\%$  от их суммы с “чистым” хлорофиллом, а в Горьковском – 10,71–100%.

Содержание и соотношение растительных пигментов в донных отложениях даёт основание считать, что в настоящее время Рыбинское и Горьковское водохранилища относятся к мезотрофным водоёмам. Характер распределения изучаемых пигментов согласуется с представлениями об экологической зональности водоёмов и продуктивности фитопланктона водохранилищ. Авторы выражают искреннюю благодарность главному научному сотруднику ИБВВ РАН, д.б.н. Л.Е. Сигаревой за помощь в проведении исследований и ценные консультации, а также канд. биол. наук, доценту, зав. каф. Биологии ЧГУ Н.Б.Афанасевой за рекомендации и советы.

**Экологическое состояние озёр Ак-Гель и Большое Туралы (республика Дагестан)  
и их защита в условиях антропогенной нагрузки**  
*Расурова М.М., Гамзаев Д.З. (Махачкала, zhuka-86@mail.ru)*

Практически все водоёмы, расположенные в черте городов, в той или иной степени подвержены антропогенному прессингу, что негативно отражается на качестве воды, жизнедеятельности гидробионтов и водной растительности, состоянии поверхности водоёмов и прибрежной зоны. Целью настоящей работы является изучение состояния озёр Ак-Гель и Большое Туралы, расположенных в городской черте, и выработка рекомендаций по их защите в условиях интенсивного антропогенного воздействия.

Исследования качества воды озёр Ак-Гель и Большое Туралы проводились по методикам в соответствии с Руководящими документами по определению качества поверхностных вод (1995), с целью определения их экологического состояния, а также выявления динамики уровня трофии водоёмов по сравнению с данными 2006–2007 гг. Проведенные исследования позволили, в соответствии с классификацией показателей качества поверхностных вод, отнести данные озёра к числу загрязненных. Экологическое состояние наблюдавшихся водоёмов по сравнению с 2006–2007 гг. заметно ухудшилось. Было выяснено, что состояние оз. Большое Туралы приближается к эвтрофному. Озеро Ак-Гель перенасыщено биогенными веществами из-за поступления богатых органикой бытовых сточных вод даже в зимние месяцы, что свидетельствует об интенсивном антропогенном эвтрофировании. Биологическое потребление кислорода возросло по сравнению со значениями 2006–2007 гг. Данное явление подтверждает всё ускоряющееся повышение трофического уровня наблюдавшихся водоёмов.

Охрана водных ресурсов от загрязнения, засорения и истощения представляет собой очень сложную комплексную проблему. Выбор методов восстановления озёрных экосистем основан на оценке их экологической эффективности. Применительно к разным водоёмам должна разрабатываться своя стратегия защитных мероприятий.

Работа выполняется в рамках Госконтракта № П627 Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 г.г.

### **Морфогенетический гомеостаз *Carassius auratus gibelio* Bloch. как признак биоиндикации**

**Романова Елена Владимировна** (Ульяновск, romanova.al2010@yandex.ru)

Целью работы явилась оценка стабильности развития *C. auratus gibelio* Bloch. Материал для данной работы был собран в течение летних месяцев 2008-2009 гг. Было изучено девять популяций карася серебряного. Шесть из них обитают в водоёмах: пруд р.п. Тереньга, «Гусиное озеро» с. Рыновские Хутора Тереньгурльского района, пруд «Паника» и р. Золотая с. Белозерье Карсунского района, озёра «Озерки», «Татурайкино» Чердаклинского района, испытывающие на себе примерно одинаковое антропогенное воздействие. В качестве экологически чистых водоёмов использовались: пруд с. Молвино Тереньгурльского района, пруд с. Уренбаш Чердаклинского района, «Белое озеро» с. Загвоздкино Ж/Д Майны.

Оценку стабильности развития проводили при помощи показателя флюктуирующей асимметрии. Анализировались признаки: число лучей в грудных и брюшных плавниках; число глоточных зубов; число чешуй в боковой линии. В качестве показателя асимметрии для межпопуляционного сравнения будет использоваться средняя частота асимметричного проявления на признак (ЧАПП).

Оценка стабильности развития в популяциях серебряного карася, обитающих в разных экологических условиях дала следующие результаты: в пруду р.п. Тереньга средняя частота асимметричного проявления на признак составила 0,806; что в пруду «Паника» – 0,771, что соответствует пятому баллу нарушения стабильности развития. В р. Золотая средняя частота асимметричного проявления на признак составила 0,491; в озере «Татурайкино» – 0,460, балльная оценка равна 4. В «Гусином озере» средняя частота асимметричного проявления на признак составила 0,425; в пруду «Озерки» – 0,438, балльная оценка равна 3. В болоте с. Уренбаш средняя частота асимметричного проявления на признак составила 0,400, балльная оценка равна 2. А в «Белом озере» средняя частота асимметричного проявления на признак составила 0,342; в пруду с. Молвино составила 0,225, что соответствует первому баллу нарушения стабильности развития.

Наибольшие нарушения стабильности развития были обнаружены у серебряного карася, отловленных в пруду р.п. Тереньги, «Паника» они характеризуются пятым баллом, что соответствует критическому состоянию. Среди обследованных выборок наиболее благополучными оказалось состояние популяций из условно контрольного района (пруд с. Молвино; «Белое озеро»), они характеризуются первым баллом (условно нормальное состояние). Значения показателя асимметрии, полученные для выборок из условно контрольных точек (пруд с. Молвино; «Белое озеро»), статистически значимо отличаются от значений, полученных в антропогенно-трансформированных водоёмах ( $p<0,05$ ). Использование показателей флюктуирующей асимметрии для оценки стабильности развития серебряного карася и индикации водоема целесообразно.

### **Влияние электромагнитных полей радиочастотного диапазона на рост водорослей *Scenedesmus quadricauda***

**Савченко Галина Александровна** (Челябинск, savchenkoga@yandex.ru)

В настоящее время в результате широкого распространения техногенных источников неионизирующих электромагнитных полей биологические системы, в том числе природные экосистемы, подвергаются воздействию фактора, механизмы биологического действия которого все еще не до конца ясны. Одним из возможных механизмов биологического действия электромагнитных полей, может быть, опосредованное действие через воду. Имеется достаточное количество работ по оценке медицинских эффектов омагнченной воды, однако работ по оценке влияния воды, подвергшейся действию электромагнитных полей радиочастотного диапазона (ЭМП РЧ) с разной поляризацией на гидробионтов, в том числе на рост водорослей в доступной литературе не обнаружено. Целью настоящей работы

явились оценка влияния ЭМП РЧ и воды, подвергшейся воздействию ЭМП РЧ, на рост водорослей *Scenedesmus quadricauda*.

В качестве источника электромагнитных полей радиочастотного диапазона в настоящем исследовании использовали лабораторную исследовательскую СВЧ установку, которая предназначена для изучения влияния модулированного ЭМИ дециметрового диапазона на биологические системы. В качестве излучателя СВЧ-энергии использовали антенну турникетного типа, позволяющую менять направление вращения поляризации. Биологические объекты подвергали воздействию ЭМП РЧ с плотность потока мощности (ППМ) эквивалентной плоской волны (S) равной 1,2 мВт/см<sup>2</sup> (12 Вт/м<sup>2</sup>), экспозицию проводили в течение 60 сек.

В исследованиях применяли 2 схемы воздействия: в первом случае, однократно в начале эксперимента проводили воздействие ЭМП РЧ с разной поляризацией на суспензию водорослей в среде Прата в отдельных колбах с концентрацией клеток в среде 25-35 тыс.кл./мл и объемом суспензии 50 мл; во втором случае, среду Прата подвергали воздействию ЭМП РЧ с разной поляризацией перед инокуляцией культуры водорослей. Далее тестирование проводили в соответствии с методикой и определяли количество клеток через 4 сут. инкубации. После подсчета клеток *Scenedesmus quadricauda* определяли среднее значение анализируемого показателя в экспериментальных группах, ошибку среднего. Сравнение средних проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента.

Проведенные исследования позволяют заключить, что воздействии ЭМП РЧ с линейной поляризацией на суспензию водорослей Sq приводит к повышению роста культуры, а воздействие ЭМП РЧ с левой и правой поляризацией не влияет на этот показатель. Культивирование водорослей в среде, подвергшейся воздействию ЭМП РЧ, приводит к замедлению роста культуры водорослей *Scenedesmus quadricauda*, наиболее выраженное при воздействии ЭМП РЧ с правой поляризацией.

#### **Оценка степени антропогенной нагрузки с помощью *Acer platanoides* L.**

**Садрдинова Гузеля Рафиковна** (Ульяновск, *elspirin@mail.ru*)

Целью работы явились оценка степени антропогенной нагрузки автомобильных дорог на прилегающую территорию с помощью *A. platanoides* L.

Исследования проводились на территории Тереньгульского района Ульяновской области в 2007-2009 гг. В качестве объекта биондикации использовался *A. platanoides* L. Использовали два модельных участка: первый – лес с. Федыкино (контроль), расположенный в 5 км от трассы Ульяновск-Сызрань; второй – лес вдоль трассы Ульяновск-Сызрань (загрязненный). С данных участков брали образцы почв и исследовали. Для определения площади листовой пластинки у деревьев *A. platanoides* L. использовали модификацию весового метода, разработанного Л.В. Дорогань. Определяли длину листа, ширину. Площадь вычисляли по формуле  $S=A \times B \times K$ . Определяли асимметрию вершины листа.

При анализе химических данных почвенных образцов фоновой территории выявлено, что pH почвы проявляет средне- и слабокислую реакцию (pH 4,9-5,4). На загрязненной территории (вдоль трассы Ульяновск-Сызрань) почвы имеют нейтральную или слабощелочную реакцию (pH 6,7 до 7,3). Выявлено, что на участках с загрязненной территорией почвы отличаются высокой степенью насыщенности основаниями, она составила 48,4 мг/экв-100 г. На фоновой территории этот показатель был 21,3 мг/экв-100 г. Значения по остальным показателям носят рассеянный характер. У почвенных образцов с загрязненной территорией отмечен очень высокий уровень содержания подвижной фосфорной кислоты ( $P_2O_5$ ): 29,6 мг/100 г по сравнению с фоновой территорией – 6,9 мг/100 г. Почвы исследуемых районов содержат достаточное количество калия (мг/100 г): фоновый – 18,9; загрязненный – 29,1.

С целью оценки пригодности использования фоновой территории лес с. Федыкино в качестве контроля для сравнения с загрязненной территорией мы провели сравнительный анализ морфологических показателей у листовых пластинок *A. platanoides* L. Значения площадей листовых пластинок *A. platanoides* L. из леса вдоль трассы Ульяновск-Сызрань были достоверно меньше ( $p<0,05$ ), чем из леса с. Федыкино. Угнетение роста листьев

находится в прямой зависимости от степени загрязненности атмосферного воздуха. Площадь листовой пластинки оказалась меньше с контрольными на 10-12%. Результаты наших исследований подтверждают данные о том, что высокий уровень загрязнения атмосферы приводит к уменьшению листовой пластинки.

На территории леса, расположенного вдоль трассы Ульяновск-Сызрань и парковой зоны р.п. Теренъя отмечена одинаковая тенденция в конструкции центральной лопасти – сужение ее граней в направлении от периферии листовой пластинки к центру

Анализ полученных результатов показывает наличие реакции листа *A. platanoïdes* L. на качество атмосферного воздуха. Отмечены различия в морфологии и архитектонике листьев, полученных из разных мест, которые были зафиксированы при изучении вершины листа. Коэффициент асимметрии ниже на контрольной территории (лес с. Федыкино) ( $0,651 \pm 0,004$ ), чем на загрязненной ( $0,661 \pm 0,002$ ).

**Закономерности содержания тяжёлых металлов (Fe, Mn, Co, Cd)  
в *Achillea millefolium* L. в зависимости от почвенно-климатических факторов**  
**Семенова Виктория Валентиновна (Махачкала, semenovav86@mail.ru)**

В последнее время возрастает интерес к нетрадиционным методам лечения, в частности фитотерапии. Усиление антропогенной нагрузки на окружающую среду делает проблему экологической чистоты лекарственного растительного сырья достаточно актуальной. Вопросы загрязнения лекарственных растений тяжёлыми металлами, поступающими во внешнюю среду от промышленных предприятий, автотранспорта, привлекают внимание многих специалистов. Это объясняется главным образом возможными нежелательными последствиями применения лекарственных препаратов, получаемых из этих растений. Об этом свидетельствуют многочисленные исследования, проведенные в России и зарубежных странах.

В задачу данной работы входило изучение зависимости содержания Fe, Mn, Co, Cd в тысячелистнике обыкновенном от эдафических факторов, в частности, от содержания изучаемых элементов в почве, гумуса и pH среды.

Почвенные и растительные пробы были отобраны в различных районах Дагестана: Гунибский, Карабудахкентский, Левашинский, Сергокалинский, Акушинский, Хунзахский, Цунтинский, Казбековский. Растения тысячелистника собирали по вертикальной поясности Дагестана на одинаковых и различных типах почв в период цветения растений. Сбор образцов проводился также вдоль крупных автомагистралей на разных точках от дороги. Определение микроэлементов в растительных образцах проводилось после сухого озоления с получением солянокислой вытяжки, в почвенных образцах – методом экстракции 1M HCl. Измерение проводилось на полярографе ПУ-1, фотоэлектролориметре КФК-2.

Изменчивость и варьирование содержания Fe, Mn, Co, Cd в *Achillea millefolium* L. определяется совокупностью факторов в каждом конкретном случае, отражая специфику геохимической обстановки мест произрастания.

Вегетативные и генеративные органы *Achillea millefolium* L. обладают различной избирательностью накопления тяжелых металлов. Наибольшая концентрация железа, марганца, кобальта отмечалась в листьях, а кадмия – в стеблях. Наиболее низкие концентрации железа и марганца обнаружены в стеблях, кобальта – в соцветиях, кадмия – в листьях.

Отмечена слабая отрицательная корреляционная связь между содержанием гумуса в почве и накоплением марганца, кобальта, кадмия растениями тысячелистника, а для железа – положительная корреляция. Выявлена зависимость накопления тысячелистником тяжелых металлов от величины pH. Максимальное накопление тысячелистником обыкновенным Fe, Mn, Cd, Co происходит на почвах, имеющих слабокислую реакцию среды, и низкое – на почвах, со слабощелочной реакцией почвенного раствора.

Анализ полученных нами данных показал, что содержание элементов в надземной и подземной частях тысячелистника уменьшается в порядке: Fe > Mn > Cd > Co. Максимальная концентрация, как в надземной (554,3 мг/кг), так и в подземной (841,0 мг/кг) частях, отмечена для железа, а минимальная – для кобальта (0,03 мг/кг).

**Мышьяк в древесных растениях  
природной геохимической аномалии Забайкальского края**  
**Солодухина Мария Анатольевна (Чита, tahn@ya.ru)**

Мышьяк относится к группе элементов слабого накопления и среднего захвата (Ивлев, 1996). Его биохимическая роль практически не изучена и еще может быть открыта. Токсичность мышьяка по отношению к растениям одни авторы оценивает как сильную, другие относят мышьяк к группе умеренно-токсичных элементов. Разные растения обладают различной способностью поглощения мышьяка, одни более интенсивно, другие менее. Избыточные уровни содержания элемента в растениях зафиксированы в разных странах мира и составляют значения от 1,2 до 8200 мг/кг, в зависимости от источника мышьяка и вида растения. Растительный кларк мышьяка составляет 0,2 мг/кг.

С целью изучения концентрации мышьяка в древесных растениях и определения интенсивности его биологического поглощения, в течение полевых сезонов 2002–2007 гг. на территории природной геохимической аномалии (олово-вольфрам-висмут-бериллиевое месторождение с наложенной мышьяковой минерализацией), которая находится в Борзинском административном районе Забайкальского края, были отобраны пробы растений. Ими были боярышник кроваво-красный (*Crataegus sanguinea* Pallas), берёза плосколистная (*Betula platyphylla* Sukacz) и тополь душистый (*Populus suaveolens* Fischer). Каждая пробы растений формировалась из 10–30 экземпляров. Растения делили на органы. Корни и наиболее запылённые части промывали сначала струей проточной воды, а после дистиллированной, и высушивали до воздушно-сухого состояния. Анализ растений проведен методом масс-спектрометрии с индуктивно связанный плазмой в Институте тектоники и геофизики им. Ю.А. Косыгина ДВО РАН аналитиками В.Е. Зазулиной, А.Ю. Будкиной, Д.В. Авдеевым и Е.М. Голубевой.

Проведённое исследование показало, что содержание мышьяка в боярышнике кроваво-красном, берёзе плосколистной и тополе душистом составляет (соответственно: число экземпляров, среднее и среднеквадратичное отклонение в мг/кг) 555, 1,92, 3,67; 825, 1,41, 1,68 и 555, 2,73, 3,77. Такие концентрации превышают растительный кларк, но не являются токсичными для растений.

На основании формулы расчета ОСВР (относительного содержания элемента, по сравнению с эталонным) предложенной А.Л. Ковалевским, установлено, что в изучаемом районе деконцентраторами мышьяка являются – плоды и цветы боярышника и серёжки берёзы плосколистной. Тогда как листья, стебли и корни этих же растений концентрируют мышьяк, но умеренно. Кроме этого обнаружено, что интенсивность биологического поглощения мышьяка не зависит от его валового содержания в почве. Коэффициент биологического поглощения мышьяка изученными растениями не превышает 0,01, при среднем его содержании в почве 608 мг/кг.

**Содержание ртути в млекопитающих Вологодской области**  
**Степина Елена Сергеевна (Череповец, StepinElena@yandex.ru)**

Ртуть относится к группе наиболее распространенных и потенциально опасных для живых организмов загрязняющим веществам. Большинство исследований по оценке влияния соединений ртути на живые организмы проведено на природных водных системах, в то время, как о наземных экосистемах известно, гораздо меньше. В то же время ртутное загрязнение суши растёт и в связи с предстоящим введением запрета на «лампочки Ильича» и их заменой энергосберегающими ламп может стать крайне опасным. Поэтому оценка уже имеющегося содержания ртути в организмах наземных экосистем чрезвычайно актуальна. Млекопитающие, находящиеся на вершинах пищевых пирамид большинства наземных экосистем способны накапливать в своих органах и тканях концентрации ртути, превышающие их содержание в окружающей среде. Вместе с тем, межвидовые различия в чувствительности млекопитающих к воздействию соединений ртути в настоящее время не исследованы. Целью представленной работы было оценить содержание ртути в организмах разных видов млекопитающих Вологодской области.

Для характеристики ртутного загрязнения в 2007-2009 гг. нами были проведены исследования животных из разных по удаленности (от 30 до 600 км) от г. Череповца районов Вологодской области: Череповецкого, Кадуйского, Важкинского, Устюженского и Никольского. Общий объем собранного материала составил более 400 проб органов и тканей от разных видов млекопитающих: бурозубки обыкновенной (*Sorex araneus* L.) (n=72), ласки (*Mustela nivalis* L.) (n=6), лесного хоря (*M. putorius* L.) (n=5), лесной куницы (*Martes martes* L.) (n=27), енотовидной собаки (*Nyctereutes procyonoides* Graj) (n=9), лисицы обыкновенной (*Vulpes vulpes* L.) (n=2).

Ртуть в пробах определялась атомно-абсорбционным методом холодного пара на ртутном анализаторе РА-915+.

Анализ накопления ртути в тканях млекопитающих исследуемых видов показал высокое содержание ртути в паренхимных органах – почках и печени, меньше в мышцах, что свидетельствует о внутриклеточной фиксации химическими связями её органических форм. Минимальные уровни содержания металла характерны для мозга. Средние показатели содержания ртути (мг/кг сухого веса) составили у бурозубки в почках  $0,16 \pm 0,03$  > в печени  $0,12 \pm 0,02$  > в мышцах  $0,07 \pm 0,05$ . У хищных млекопитающих среднее содержание ртути было следующим: у хоря – почки  $0,26 \pm 0,05$  > печень  $0,21 \pm 0,02$  > мышцы  $0,23 \pm 0,08$  > селезёнка  $0,12 \pm 0,04$  > мозг  $0,07 \pm 0,01$ ; у куницы – почки  $0,67 \pm 0,05$  > печень  $0,43 \pm 0,02$  > мышцы  $0,35 \pm 0,08$  > селезёнка  $0,25 \pm 0,04$  > мозг  $0,14 \pm 0,01$ ; у лисицы – почки  $0,83 \pm 0,6$  > печень  $0,38 \pm 0,27$  > мышцы  $0,19 \pm 0,14$  > селезёнка  $0,15 \pm 0,13$  > мозг  $0,05 \pm 0,04$ ; у енотовидной собаки: печень  $0,72 \pm 0,08$  > почки  $0,28 \pm 0,06$  > мышцы  $0,07 \pm 0,02$  > селезёнка  $0,06 \pm 0,01$  > мозг  $0,03 \pm 0,004$ ; у ласки – мышцы = мозг  $0,07 \pm 0,09$  > печень = почки  $0,04 \pm 0,03$

Анализ данных по накоплению и распределению ртути в млекопитающих из разных районов Вологодской области показал, что содержание ртути больше у животных из районов, прилегающих к г. Череповцу.

### Комплексная биоиндикация в оценке нефтезагрязненных почв Усачева Ю.Н., Казиахмедова И.А. (Нижневартовск, [Maximus8884@mail.ru](mailto:Maximus8884@mail.ru))

Интенсивно протекающие процессы добычи нефти на территории Среднего Приобья приводят к увеличению масштабов загрязнения почвы. В настоящее время большое значение в оценке состояния почв приобретают методы биоиндикации, которые позволяют достоверно оценить их состояние с точки зрения жизнедеятельности живых организмов. Нами проведена комплексная оценка состояния нефтезагрязненных почв с использованием различных методов биоиндикации болотных и суходольных участков на Ватинском и Самотлорском месторождениях Нижневартовского района Ханты-Мансийского автономного округа – Югра. Для исследования использовали контрольные участки, загрязненные нефтью и рекультивированные. Оценку почв проводили методами биоиндикации: по скорости выделения углекислого газа (интенсивность дыхания) почв, проективному покрытию, видовому разнообразию и встречаемости мхов и лишайников, приросту колониоптейлоров овса, скорости роста одноклеточной водоросли *Chlorella vulgaris*, изменению численности микроорганизмов и грибов в почве, по ферментативной активности почв. Выявлено, что интенсивность дыхания почв выше на контрольных участках. На рекультивированных она снижалась, но была выше, чем на нефтезагрязненных нерекультивированных участках. В условиях сильного загрязнения нефтью снижается видовое разнообразие лишайников и мхов, величина их проективного покрытия, частота встречаемости. Степень токсичности почвы по приросту одноклеточной водоросли *Chlorella vulgaris* была значительно выше на нефтезагрязненных нерекультивированных участках, рекультивация приводила к снижению токсичности, но она не вызывала полного восстановления почв. Такая же закономерность прослеживалась при изучении особенности роста колеоптейлоров овса на водных вытяжках из различных почв. Нефтяное загрязнение снижало численность микроорганизмов и грибов в почве, особенно на нерекультивированных участках, рекультивация приводила к восстановлению их численности, но показатели их восстановления не достигали контрольных вариантов. Наблюдалось значительное снижение целлюлозоразлагающей и протеиназной активности почвы в условиях нефтяного загрязнения, рекультивация

повышала данные процессы, однако, их скорость не достигала контрольных вариантов. Степень выраженности токсичного действия нефти была сильнее выражена на болотных почвогрунтах.

**Additional loading as an approach to reveal the hidden health faults in the urban area  
by the multi-marker response profile**

**Falfushiskaya G.I., Gnatishina L.L., Shimkiv T.V.**

*(Ukraine, Ternopol, halynkaF@ukr.net)*

Organisms that have been chronically exposed to chemical pollutants may develop increased tolerance or resistance. The *Carassius carassius* is widespread freshwater species that has several advantages such as hardiness, unique metabolic and morphological adaptations against disturbance effect. Nevertheless very little is known about crucian carp biochemical reactions after effect of widespread chemicals. Therefore, the goal of the present study was to apply the additional loading to test temporal and spatial responses in the indigenous fish to distinguish clearly whether the effect of the urban surrounding provokes damage or adaptation.

Two-year-old male specimens of *Carassius carassius* were collected from two ponds in the forest (Z) and the urban (B) areas. From each population one group was control and others treated by Cu (0.005 and 0.05 mg/l), Mn (0.17 and 1.7 mg/l) and carbamate pesticide mancozeb (0.005 and 0.05 mg/l) during 14 days. Liver and gills were analyzed. The analysis included the oxidative stress evaluation, metallothionein (MTs), cholinesterase (ChE) activity, level of vitellogenin-like protein (Vtg-LP), activities of ethoxresorufin-O-deethylase and GST determination. For the genotoxins indication, micronucleus test in erythrocytes of peripheral blood was used. For better understanding of the native of MTs responses, their metal-binding capacity was determined by comparison of metal content in the tissue and MTs.

The difference of responses to effects of ecologically relevant concentrations of Cu, Mn and carbamate pesticide mancozeb was shown in crucian carp from two ponds. Various effects provoked similar differences in the responses of the biomarkers of exposure and effect in the fish from two groups, which was confirmed by centroid grouping analysis. While in group Z these effects lead to the satisfactory ability for the adaptation to unfavourable conditions, in group B, the weakness, oppression or absence of response was shown. Indeed, the expression of stress and metal-binding proteins MTs was observed in group Z, whilst the fish from group B demonstrated the loss of the ability of MTs to bind metals, hereupon the concentrations of toxic metals in the tissues were increased. The oxidative stress response was observed in group Z and the oxidative damage (decreased Mn-SOD activity, increased lipids and protein oxidative destruction) – in group B. The redox-state of glutathione in the gills was affected especially. In the fish from site B, the neurotoxicity (depletion of ChE activity) and endocrine disruption (increase of Vtg-LP) were revealed. Genotoxicity determined by micronucleus test and the increase of hepatosomatic index was higher in group B. This approach is expected to provide a sensitive tool for the appreciation of potential environmental danger. *This work has been granted by the Ministry of Education and Science of Ukraine (Projects M/256-2008 and M/567-2009) and West-Ukrainian BioMedical Research Center. Authors are grateful both Ukrainian-Korean R&D project leaders, Prof. Oksana Stoliar and Dr. Yoon Kwon Nam for valuable scientific advices and critically review of abstract.*

**Комплексная оценка экологического состояния малой реки Борзовки**  
**Черноусова Наталья Владимировна (Нижний Новгород, ecology.chernousowa@yandex.ru)**

Городские реки выполняют важнейшие экологические и рекреационные функции, обеспечивают устойчивость и благоприятные характеристики окружающей среды, вопросы их охраны являются очень актуальными. В связи с этим, целью данной работы являлось выявление источников загрязнения и основных загрязняющих веществ малой городской реки, оценка её экологического состояния и разработка плана природоохранных мероприятий.

Объект исследования – р. Борзовка, являющаяся притоком второго порядка р. Оки. В своем верхнем течении р. Борзовка протекает по Автозаводскому району, в среднем и нижнем течении – по промышленной части Ленинского района г. Н. Новгорода.

Установлено, что объем сточных вод, сбрасываемых в реку, варьирует от 3327 тыс.м<sup>3</sup>/год (5 источников загрязнения) в 2004 г. до 829,9 тыс.м<sup>3</sup>/год (3 источника загрязнения) в 2009 г.

В целях комплексной оценки экологического состояния реки были проведены исследования химического состава и фитопланктона речных вод. Анализ фитопланктона, проведенный на кафедре ботаники ННГУ им. Н. И. Лобачевского, показал, что в 2004 г. распространение водорослей характеризовалось пятнистостью, видовой состав был очень беден. В целом в воде р. Борзовка преобладали индикаторы  $\beta$ -а,  $\alpha$ - $\beta$  – мезосапропной зоны органического загрязнения, являющиеся показателями IV класса качества вод. Анализ фитопланктона в 2009 г. позволяет утверждать, что водная экосистема реки имеет тенденцию к восстановлению, что подтверждается сменой класса качества воды с V класса – грязных вод и IV класса – загрязненных вод в 2004 г. на III класс качества, соответствующий умеренно загрязненным водам, в 2009 г.

Установленная тенденция согласуется с результатами анализа химического состава вод. Так, согласно данным Горкомэкологии, в 2004 г. по основным показателям выявлено значительное превышение ПДК: БПК5 в 61 раз, ХПК в 84 раза. В 2009 г., как по данным Горкомэкологии, так и по собственным результатам, химический состав воды соответствовал норме. Исследования, проведенные на кафедре агрохимии и агрозэкологии НГСХА в 2009 г. показали, что в большинстве случаев показатели pH, БПК5, ХПК, а также содержание растворенного кислорода соответствуют требованиям, установленным для водоемов культурно-бытового назначения.

Таким образом, в целом качество воды в 2009 г. существенно выше, чем в 2004 г. Данный факт связан с тем, что по итогам исследований 2004 г. был разработан и реализован комплекс природоохранных мероприятий по улучшению состояния берегов, русла р. Борзовки и агитационно-просветительской деятельности. Их положительный эффект подтверждается результатами исследований 2009 г. Исходя из вышеизложенного правомерно предположить, что дальнейшее развитие подобной природоохранной деятельности с привлечением широкой общественности и местного населения может способствовать преобразованию городской р. Борзовки из водоема с бедным биоразнообразием в рекреационную зону городского масштаба с полноводной рекой и продуктивными ландшафтами.

#### **Мониторинг фенологии и динамики численности колорадского жука на территории Кемеровской области**

*Шишкиарёва Александра Александровна (Новокузнецк, zebrenok08@mail.ru)*

В Кемеровской области появление колорадский жука (*Leptinotarsa decemlineata*) было зафиксировано в 90-х годах в южных районах области, с 2002-2003гг. зафиксировано его распространение. Вид характеризуется высокой экологической пластичностью, что позволяет ему легко приспосабливаться к различным условиям среды обитания и закрепляться в новых ареалах, сохраняя высокую жизнеспособность.

Цель работы – изучить фенологию и динамику численности колорадского жука в области. В работе использовались статистические данные станции защиты растений и результаты полевых опытов общей площадью 1га в пригородной зоне г. Новокузнецка.

Было выявлено, что зимующий запас с 2003 по 2009гг. хаотично варьировал от 1,5 до 30 шт/м<sup>2</sup>, выживало до 80% имаго. Выход на поверхность в среднем по годам зафиксирован 15-22 мая при прогреве почвы +13-14°C. Количество яиц в кладке на контрольных кустах составляло в среднем 35-37 штук (max-60, min-22). В зависимости от температуры, яйца развивались 5-17 дней, температурный порог +11,5°C. В начале первой декады июня (7-10 июня) появились первые личинки, в среднем на одном кусту от 20 до 60 шт. разного возраста разделённые линьками. Наиболее вредоносны личинки 4-го возраста. Их развитие варьировало от 10 до 30 дней, в среднем 16 суток. Оптимальная температура для развития всех фаз +20-32°C. За 2008 и 2009 год успевало развиться 2 поколения. Одна из особенностей потенциальной вредоносности колорадского жука – это умение впадать в многолетнюю диапаузу, которая может длиться 2-3 года. Оценка урожайности дала следующие результаты: на участке, где применялись методы борьбы, пораженность

культуры составляла не более 80%, вес клубней с одного куста 1,2-1,3 кг, общая урожайность составила 240 ц/га, на участке, где обработка отсутствовала и пораженность составляла более 60%, вес с одного куста 0,4-0,3 кг, общая урожайность 80 ц/га.

В настоящее время ареал колорадского жука сформировался лишь в пределах степной и лесостепной зоны Кузнецкой котловины, на остальной территории очаги имеют мозаичный характер. Выражая глубокую искреннюю благодарность своему научному руководителю Кандидату биологических наук, доценту Кузбасской государственной педагогической академии Подурец Ольге Ивановне за оказанную помощь в написании работы.

**Влияние элодеи канадской *Elodea canadensis* на брюхоногих моллюсков (Gastropoda)  
и структуру сообществ макробеспозвоночных  
в бухте Котово Чивыркуйского залива озера Байкал**

**Шмимарёва Ирина Ивановна** (Улан-Удэ, *klarimonda36@mail.ru*)

Целью данного исследования являлось изучить фауну гастропод в зарослях элодеи канадской *Elodea canadensis* бухты Котово Чивыркуйского залива озера Байкал, и выявить значение элодеи в формировании состава и количественных показателей сообществ фитофильных макробеспозвоночных.

Наблюдения проводились на озере Байкал, Чивыркуйский залив, в 2009г. Было установлено, что в бухте Котово Чивыркуйского залива фауна гастропод представлена следующими видами: *Cincinnia sibirica*, *Boreoelona contortrix*, *Lymnea* sp., *Anisus albus*, *Anisus kamtschaticus*, *Physa fontinalis*, *Acroloxus* sp., *Armiger crista*. *E. canadensis* оказывает позитивный эффект на количественные показатели таких видов гастропод, как *Boreoelona contortrix*, *Cincinnia sibirica*, *Lymnea intercisa*. Влияние *E. canadensis* на других видов обнаружено не было. Гастроподы в бухте Котово являются одной из ведущих групп в биоценозах их доля в суммарной биомассе макробеспозвоночных в среднем составляет 35% (в зоне открытых грунтов – 8,3%), в плотности поселения – 14,7% (1,4%). Однофакторный дисперсионный анализ выявил отличия в общей биомассе ( $p=0,012$ ) и плотности поселения ( $p=0,0008$ ) гастропод в зависимости от веса *E. canadensis*. Сравнение контрольного участка (или без растительности) и опытного (с элодеей, те же глубины, что и в контроле) позволило установить: 1) В контроле доминируют хирономиды, амфиподы, двустворки; 2) В биотопе с элодеей наблюдается увеличение численности гастропод (на 20%) и уменьшение численности двустворок, ручейников, хирономид; 3) В биотопе без элодеи из состава сообществ полностью выпали пиявки, водяные клещи, поденки, водяные жуки и р. *Nymphaea*.

Таким образом, элодея в бухте Котово Чивыркуйского залива оз. Байкал оказывает модифицирующее влияние на структуру биотопов, вызывая увеличение таксономического богатства и количественных показателей гастропод, и других макробеспозвоночных.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 08-04-98034-р-Сибирь-а. Благодарю за помощь Матафонова Дмитрия Викторовича и Доржсиеву Оюну Дымбрыловну.*

## ПОДСЕКЦИЯ «ЗООЛОГИЯ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ»

### Основные сообщества жужелиц (Coleoptera, Carabidae) предгорной лесостепи северо-восточного Кавказа

*Айдамирова Милана (Табарик) Адамовна (Москва, AIDMIL@mail.ru)*

Лесотепь как область между степью и лесом характеризующаяся чередованием лесных и степных участков во всех географических областях наименее освоенная часть земной поверхности, а в особенности в горных и предгорных районах, поэтому изучение этой области (зоны) остается актуальным.

Целью настоящей работы стало изучение сообществ жужелиц основных биоценозов лесостепи предгорий северо-восточного Кавказа (лесов, лугов, агроценозов и урбоценозов).

По абсолютным показателям (113 видов 6624 экз) и по альфа-разнообразию (Н-4) наименее богаты и многочисленны лесные сообщества. Показатель выравненности достаточно высок (1,31) относительно других исследованных стаций лесостепи. Индекс доминирования незначителен (0,22), состав доминантов довольно разнообразен (11 видов).

Следующими из наименее разнообразных (Н-2,74) и выровненных (0,64) сообществ лесостепи исследованного района являются луговые сообщества жужелиц (70 видов 5430 экз). Доминантный состав состоит из луговых (9) видов. Динамическая плотность (32 э/100л.с.) сообщества лугов выше плотности сообщества лесных ценозов (29 э/100л.с.).

Наиболее близки по коэффициентам разнообразия и выравненности агроценозы (Н-2,5, еН-0,6) и урбоценозы (Н-2,5, еН-0,6). Однако уловистость жужелиц агроценозов в два раза выше (39 э/100л.с.), нежели в урбоценозах (17 э/100л.с.). Доминантный комплекс в агроценозах состоит из 8 луговых (полевых) видов, индекс доминирования невысок (0,23). Доминантный комплекс урбоценозов состоит из 6 видов с различной биотопической приуроченностью, наряду с этим индексы доминирования довольно высоки (0,35).

Показатели средних численности наименее близки у луговых сообществ ( $76,5 \pm 17,8$ ) и агроценозов ( $72 \pm 24,3$ ) – открытые ландшафты, у лесов ( $58 \pm 16,75$ ) с урбоценозами ( $53,3 \pm 20,34$ ) – закрытые ландшафты. Таким образом, на состав и распределение жуков-жужелиц различных стаций лесостепи предгорий северо-восточного Кавказа имеют влияние такие показатели, как почвенно-растительные условия и степень антропогенного воздействия. Так лесные и луговые сообщества жужелиц наименее разнообразны и выровнены с наименьшими показателями индексов доминирования с высокой численностью и уловистостью. А сообщества антропогенно-трансформированных стаций – антропоценозов (агроценозы и урбоценозы) менее разнообразны, менее обильны и менее выровнены, а индексы доминирования здесь наименее высоки. На долю доминантов (в особенности урбоценозов) приходится около 80–90% численности всего сообщества. Автор выражает признательность профессору, д.б.н. Никитскому Н.Б. за помощь в подготовке тезисов.

### Фауна и население прямокрылых (Orthoptera) урбанизированного ландшафта города Калуги

*Алексанов Виктор Валентинович (Калуга, victor\_alex@list.ru)*

Прямокрылые являются важным компонентом травяных экосистем, потребляя значительный объем фитомассы. Благодаря высокому обилию, относительному удобству учета они используются в качестве удобной индикаторной группы.

Материалом для данной работы послужили сборы 2003–2009 гг. при помощи энтомологического кошения и ловушек Барбера. Всего было обработано около 100 выборок.

На территории г. Калуги обнаружено 24 вида прямокрылых. Среди хортобионтных прямокрылых наибольшей встречаемостью обладают *Phaneroptera falcata* Poda (53%), *Chorthippus «biguttulus»* (55%), *Ch. parallelus* Zett. (63%). В зоне плотной застройки наивысшую встречаемостью имеет *Ch. «biguttulus»*. Добавочными компонентами ортоptерофауны можно считать *Ch. dorsatus* Zett. (33%), *Ch. apricarius* L. (35%), *Conocephalus discolor* Thnb (40%). К редким и локальным видам следует отнести *Metrioptera brachyptera* L., *Bicolorana bicolor* Phil., *Roeseliana roeseli* Hag., *Euthystira brachyptera* Ocsk., *Chrysoschraon dispar* Germ. Единичные, но подтверждаемые анализом биотопов находки

принадлежат *Poecilimon intermedius* Fieb., *Conocephalus dorsalis* Latr., *Stenobothrus lineatus* Panz., *Omomerus viridulus* L., *O. haemorrhoidalis* Ch., *Mecostethus grossus* L. Заносом следует объяснять находки *Psophus stridulus* L., *Locusta migratoria* L.

По видовому составу и спектру жизненных форм прямокрылых биотопы города Калуги дифференцируются на несколько типов. 1) Регулярные газоны скверов. 2) Сухие газоны вдоль автомагистралей 3) Луговые газоны. 4) Высокотравные рудеральные и луговые ценозы вдоль дорог и пустырей. 5) Крупные злаково-разнотравные луга промзоны. 6) Пастбища. Наибольшей видовой насыщенностью (10 видов) отличаются злаково-разнотравные луга, в сумме обеспечивающие существование почти всей хортобионтной ортооптерофауны города. Наиболее бедными (3 вида) являются газоны, при этом газоны скверов могут обеспечивать высокую уловистость прямокрылых, на линейных газонах прямокрылые малочисленны.

В лесных стациях прямокрылые представлены преимущественно *Pholidoptera cinerea* L., который распространён в лесных балках, защитных полосах в застроенной зоне, крупных массивах приусадебных и садово-огородных участков. Среди герпетобионтных прямокрылых наибольшей встречаемостью отличается *Tettix subulata* L., заселяющий сельскохозяйственные участки, луга, леса. *T. tenuicornis* Sahlb. встречается реже, но более многочислен на лугах. *Decticus verrucivorus* L. приурочен к крупным участкам луговой растительности, но вдоль железнодорожных путей проникает к центру города. *Gryllotalpa gryllotalpa* L. встречается крайне редко на садово-огородных участках.

Особое место среди прямокрылых занимает *Tettigonia cantans* Fuess., обитающий практически повсеместно в кронах деревьев.

Как показано при помощи индексов синантропии, реакция абсолютного большинства прямокрылых на урбанизацию отрицательна. Устойчивыми к урбанизации видами следует считать *Ch. «biguttulus»*, *Ch. dorsatus* Zett., *Ch. apricarius*, *Ph. falcata*, *T. cantans*.

### Влияние биотических и абиотических факторов

на концентрацию целомических амёбоцитов *Asterias rubens* L.

*Андрюшин Александр Евгеньевич* (Москва, gradmaxalexander@gmail.com)

Целомические амёбоциты *Asterias rubens* L. – часть клеточного врождённого иммунитета. Их можно сравнить с лейкоцитами позвоночных. Они проявляют фагоцитарную активность и играют важную роль в поддержании гомеостаза у беспозвоночных. Также эти клетки участвуют в пищеварении и выделении, способны к агглютинации. Обладают амёбoidной формой, бесцветны, подвижны и содержат лизосомы.

Мы изучили динамику концентрации амёбоцитов в ответ на введение антигенов: туши, эритроцитов человека (ЭЧ), бычьего сывороточного альбумина (БСА). Также были изучены некоторые абиотические факторы (температура воды, температура и влажность воздуха, уровень воды), которые могут влиять на концентрацию амёбоцитов в перивисцеральной жидкости *Asterias rubens* L. Исследование было проведено в июне 2009 года на Беломорской биологической станции МГУ.

Концентрация амёбоцитов зависит от уровня прилива с максимумом при средней воде и от влажности воздуха, но не от температур воды и воздуха. Возможно, эта корреляция связана с опреснением воды в результате дождя и притока прибрежных вод. Введение антигенов вызывает увеличение концентрации амёбоцитов, после чего концентрация постепенно снижается. Существует зависимость физиологической реакции морских звёзд на введение антигенов от структуры агента: корпскулярные агенты (ЭЧ, тушь) вызывают более значимые изменения концентрации амёбоцитов, чем растворимые (БСА). Динамика концентрации амёбоцитов в ответ на введение ЭЧ отличается наибольшей вариабельностью.

### Динамика населения почвенной мезофауны типичных таёжных и пойменных лесных биоценозов района среднего течения р.Иртыш

*Бастраков Александр Иванович* (Москва, bastrakov85@mail.ru)

Данное исследование проведено в июле – августе 2004-2008 гг., в окрестностях биостанции «Миссия» при Тобольской биологической станции РАН. Работа посвящена,

изучению динамики населения почвенной мезофауны лесных таежных и пойменных биоценозов одного из малоисследованных районов Западной Сибири – среднего течения р.Иртыш. Цель исследований определила следующие задачи: определить основные группы почвенных животных в изучаемых биотопах; провести анализ межгодовой динамики населения почвенной мезофауны.

Для проведения почвенно-зоологических исследований выбраны 4 пробных участка, два – таежных и два – пойменных, типичных для данного района: №1 – плакорный ельник с пихтой чернично-майниково-осоковый; № 2 – пихтово-еловом лес с бересой, чернично-осоковый на склоне возвышенности; №3 – заросли 20-25 летнего ивняка на низкой пойме; №4 – пойменный осиново-березовый лес на высокой пойме. Сбор материала произведен двумя методами – стандартными почвенными раскопками и ловушками Барбера (Гиляров, 1975).

В ходе исследования было выявлено, что почвенное население таёжных лесных биоценозов (Уч. № 1-2) является более стабильным, чем пойменных группировок. Главным образом, оно изменялось за счёт временных массовых групп, таких как личинки мух семейства Bibionidae, молодь пауков. Одной из особенностей коренных таежных сообществ является отсутствие некоторых типичных групп почвенной мезофауны, например, многоножек Diplopoda и Geophilidae, характерных для зоны южной тайги западнее и восточнее этого района (Рыболов, 2007).

Наибольшим разнообразием и численностью всех групп почвенных беспозвоночных отличались биоценозы высокой поймы (Уч. № 4). Это в первую очередь объясняется редким затоплением данных сообществ и высокой продуктивностью сформированных почв.

В зарослях ивняка на низкой пойме (Уч. №3), среди всех изученных сообществ, были отмечены самые низкие показатели численности и активности почвенной мезофауны. Это в первую очередь связано с молодостью несформированных почв и их практически ежегодным затоплением. В итоге здесь наблюдается частая смена большинства видов-доминантов. В аномальном 2007 году, в ивняке на низкой пойме рекой была смыта практически вся почвенная подстилка и большая часть почвенных животных погибла или мигрировала. После спада паводковых вод сюда, в первую очередь, мигрировали быстребегающие и летающие виды, такие как пауки, жужелицы, стафилиниды и клопы. Возможно, что часть фауны было принесено рекой на плавающих бревнах и островках из дёрна. В результате количественные показатели многих групп педобионтов и герпетобионтов снизились в несколько раз.

*Хочу выразить искреннюю благодарность научному руководителю этого исследования, сотруднику ИПЭЭ РАН им. А.Н. Северцова, Л.Б. Рыболову.*

### **Морские звёзды рода *Henricia* (*Echinodermata*, *Asteroidea*) Белого моря: морфологическое и видовое разнообразие**

**Братова Ольга Андреевна** (Санкт-Петербург, *obozerog@gmail.com*)

Морские звёзды рода *Henricia* широко распространены в северном и южном полушарии. Всего описано более 80 видов. Однако, до сих пор нет единого мнения о количестве видов, входящих в состав рода, так как звёзды этого рода обладают широкой внутривидовой изменчивостью: сходные морфологические черты разных видов делают их идентификацию достаточно сложной.

На сегодняшний день общепризнанным определителем северных видов рода *Henricia* является работа Ф. Мадсена 1987 года. Автор сделал подробное описание видов, выделил неотипы, привел биогеографическое распределение хенриций и список синонимов. В его распоряжении не было материала из Белого и Баренцева морей: список видов звёзд, обитающих в этом регионе, Мадсен составлял по литературным данным. В России изучением хенриций занимался А.М. Дьяконов. В Белом море он четко различал 3 вида: *H.eschrichti* (Muller & Troschel) (не равно описанию *H.eschrichti* у Мадсена), *H.scorikovi* Дьяконов, 1950, *H.solida* Дьяконов, 1950.

Цель данной работы – исследование видового состава рода *Henricia* Белого моря с точки зрения современной систематики. Материал был собран летом в 2003-2007 годах в акватории Керетской губы и губы Чупа Белого моря с глубины 10-12 метров. Кроме того, в

работе использовались глубоководные сборы хенриций из других районов Белого моря, хранящиеся в Зоологическом институте РАН. Определение звёзд основывалось на работе Мадсена.

Обработка и анализ собранного материала показали, что в Белом море встречаются 5 видов морских звезд рода *Henricia*: *H.sanguinolenta* (O.F. Muller), *H.pertusa* (O.F. Muller), *H.eschrichti* (Muller & Troschel), *H.perforata* (O.F. Muller), *H.scabrior* (Mihailovskij). Первые 4 вида описаны в работе Мадсена. Последний вид (*H.scabrior*) был отмечен Дьяконовым в Баренцевом море, но Мадсен, ссылаясь на широкое варьирование признаков, и схожесть строения игл, не считал вид *H.scabrior* самостоятельным и относил его к виду *H.perforata*.

Форма игл у вида *H.perforata* и *H.scabrior* схожа (крупные зубчатые иглы без длинных отростков), но для *H.perforata* характерны петли скелета длиной 0,5-1 мм, а для *H.scabrior* – 1-2 мм. В первом случае иглы расположены группами (псевдопаксиллами) по 5-7, во втором – иглы либо располагаются поодиночке, либо небольшими группами по 2-3. Чтобы проверить, является ли вид *H.scabrior* самостоятельным, мы оценили варьирование количества игл в 1 мм<sup>2</sup> у морских звезд, определенных как *H.perforata* и *H.scabrior*. В результате, было показано, что плотность расположения игл носит бимодальный характер. Это может служить косвенным доказательством самостоятельности вида *H.scabrior*.

**Внутривидовая изменчивость полового аппарата самцов шашечниц  
рода *Mellicta* Billberg, 1820 (Lepidoptera: Nymphalidae)**

**Европейской России и сопредельных территорий**

**Буши Маргарита Григорьевна (Москва, bush\_zbs@mail.ru)**

*Mellicta* Billberg, 1820 – небольшой палеарктический род чешуекрылых семейства Nymphalidae, включающий по разным оценкам от 14 до 18 видов и представляющий собой одну из наиболее сложных для изучения групп дневных бабочек. Представители рода имеют настолько изменчивые окраску и рисунок крыла, что особи одного и того же вида часто различаются сильнее, чем представители разных видов. Статус и границы некоторых таксонов видовой группы данного рода до сих пор не ясны. Для надежной идентификации видов рода используется строение копулятивного аппарата самцов. Однако и половой аппарат обладает изменчивостью, изучению которой практически не уделялось внимания. Поэтому иногда сложно определить видовую принадлежность особи и по генитальным структурам. Исходя из этого, на нынешнем этапе изучения группы необходимо уделять особое внимание внутривидовой и внутрипопуляционной изменчивости генитального аппарата. Свои исследования мы начали с представителей *Mellicta*, обитающих в Европейской России и на сопредельных с ней территориях. К ним относятся: *Mellicta athalia* (Rottemburg, 1775), *Mellicta caucasogenita* (Verity, 1930), *Mellicta britomartis* (Assmann, 1847) и *Mellicta aurelia* (Nickerl, 1850). Для оценки изменчивости генитального аппарата рассматривался каудальный отросток вальвы, как структура, несущая основные диагностические признаки. Было показано, что внутривидовая изменчивость полового аппарата самцов видов рода *Mellicta* в Европейской России и на сопредельных территориях довольно велика, наиболее показательным в этом отношении является строение каудального отростка вальвы. Степень изменчивости определяется в основном сложностью строения данной структуры. Так, каудальный отросток вальвы *M. caucasogenita* и *M. athalia*, который несет меньшее количество зубцов, чем у *M. aurelia* и *M. britomartis*, обладает меньшей степенью изменчивости. Несмотря на высокую степень изменчивости, диагностические признаки являются надежными для определения. Диапазон изменчивости гениталий может отличаться в разных популяциях. Изменчивость на внутрипопуляционном уровне может определяться межвидовыми взаимоотношениями. Так, в местообитаниях, где виды встречаются симпатрично, степень изменчивости ниже, чем в аллопатрических популяциях, особенно наглядно это продемонстрировано на *M. athalia*. Вероятно, в таких популяциях отбор шел на сужение диапазона изменчивости во избежание межвидовых скрещиваний. Симметричное строение вальв согласуется с общей степенью изменчивости. По мере увеличения степени изменчивости процентное соотношение асимметричных вальв увеличивается.

## Хромосомное число *Macrosiphum silvaticum* Meier, 1985

(*Rhynchota: Homoptera: Aphididae*)

**Воронова Нина Владимировна** (Белоруссия, Минск, voronoff@list.ru)

В Европе на короставниках (*Knautia* L.) развивается 3 вида тлей рода *Macrosiphum* Pass.: *M. knautiae* Holman, 1972, *M. silvaticum* Meier, 1985 и *M. rosae* (Linnaeus, 1759). R. Rakauskas на основе морфометрии для выборок *Macrosiphum* с *Knautia* из разных регионов предложил рассматривать *M. silvaticum* в качестве младшего синонима *M. knautiae*. Однако эта точка зрения не получила полной поддержки. Тем самым проблема уточнения их таксономического статуса продолжает оставаться актуальной.

Хромосомные данные используются как фундаментальный систематический признак. Высокая скорость хромосомной эволюции у насекомых позволяет решать проблему систематики близких и криптических видов, труднодифференцируемых по морфологическим признакам. Несмотря на обширные цитогенетические исследования тлей, кариотип *M. silvaticum* до сих пор не был описан. В связи с чем, в задачи настоящего исследования входило определить хромосомную формулу *M. silvaticum* и описать особенности кариотипа, используя для анализа белорусские популяции тлей этого вида.

Тли вида *M. silvaticum* были собраны в 2009 г. с *Knautia arvensis* (L.) на территории Беларусь. Хромосомы выделяли из эмбрионов партеногенетических самок. В качестве дифференциального метода окрашивания применяли C-banding.

В хромосомных препаратах исследуемых тлей преобладали метафазные пластинки, содержащие набор из 6 пар хромосом. Хромосомная формула *M. silvaticum*: 12, XX (X0), NF=24. Диплоидный набор представлен 2-мя крупными (вероятно, XX) и 10-ю хромосомами средних размеров. 1-я пара хромосом – метацентрическая, иногда имеет субтелоцентрическую вторичную перетяжку. 4-я и 5-я пары хромосом также метацентрические, 2-я и 3-я – субметацентрические, 6-я – субтелоцентрическая (2V+4sV+4V+2sT). Длина самой крупной пары составляла в среднем  $5,28 \pm 0,94$   $\mu$ m, самой мелкой –  $1,76 \pm 0,21$   $\mu$ m. Суммарная длина хромосом в диплоидном наборе составила  $35,143 \pm 4,68$   $\mu$ m. Относительная (процентная) длина хромосом составила для самой крупной пары –  $15,03 \pm 0,58$  %, для самой мелкой –  $5,01 \pm 0,62$  %.

Методом С-окрашивания выявлялись ярко выраженные гетерохроматиновые участки в промежуточных и теломерных районах хромосом. Содержание С-гетерохроматина в митотических хромосомах исследуемых тлей оказалось довольно велико (от 44,27% в 1 паре, до 66,25% 4-й). Положение участков более плотной спирализации хромосом было константным во всех исследованных метафазных пластинках, однако размеры С-гетерохроматиновых зон варьировали, что не всегда позволяло использовать данный кариологический признак для идентификации отдельных хромосом.

Таким образом, клетки *M. silvaticum* содержат 12 хромосом: 2 половых (1 у самцов) и 5 пар аутосом. Хромосомная формула *M. silvaticum*: 12, XX (X0), NF=24.

## Изучение влияния пестицидов на фауну почвы Ульяновской области

**Воронцов Вадим Валерьевич** (Ульяновск, terehindenis@mail.ru)

В настоящее время использование пестицидов дает возможность перейти на интенсивные технологии возделывания культур. К наиболее распространенным пестицидам, разрешенным к применению на территории Российской Федерации, относится АКТАРА. Данный препарат является инсектицидом кишечно-контактного действия, предназначен для защиты зерновых культур от клопа вредная черепашка, хлебной жужелицы; картофеля от колорадского жука и проволочника; капусты от капустной мухи; смородины от тли; яблони от яблонного цветоеда и яблонной медянницы.

Действующим веществом является тиаметоксам. К свойствам данного препарата относят: широкий спектр активности, системное действие при внесении в почву, трансламинарное действие при опрыскивании растений, быстрое ингибирование питания вредителей, эффективность против скрытокижущих и питающихся на нижней стороне листа вредителей. Препарата начинает действовать уже через 30 минут после обработки, полная гибель наступает через 24 часа.

Работа по выявлению действия препарата на почвенную фауну проводилась на Ульяновской агробиостанции. Мезофауна данного участка представлена в основном 5 классами: Oligochaeta – малощетинковые (дождевые черви), Muyriapoda – многоножки, Insekta – насекомые (муравьи, жужелицы, жук колорадский), Arachnida – паукообразные, Nematode – нематоды. Для изучения влияния инсектицида на дождевых червей был выбран участок занятый сельскохозяйственными культурами. Для начала производился отбор проб на контрольном участке до начала обработки препаратом. Количество дождевых червей на контрольном участке, занятого картофелем, составляет в среднем: на глубине до 5 см – 28,4 шт./м<sup>2</sup>, на глубине от 05-10 см – 33,8 шт./м<sup>2</sup>, на глубине от 10-20 см – 19шт./м<sup>2</sup>. Внесение препарата проводилось через три дня после отбора контрольной пробы. Спустя 22 дня были отобраны пробы на обработанном участке по той же схеме. Количество дождевых червей составило в среднем: на глубине до 0,5 см – 10,8 шт./м<sup>2</sup> от 0,5-10 см – 20,6 шт./м<sup>2</sup>, от 10-20 см – 16,2 шт./м<sup>2</sup>. Таким образом по сравнению с контрольной пробой количество дождевых червей в почвенном горизонте снизилось: на глубине до 5 см – в 2,63 раза, от 05-10 см – в 1,64 раза., от 10-20 см – в 1,12 раза. Полученные результаты указывают на негативное воздействия препарата АКТАРА не только на вредителей, но и на полезную мезофауну, в первую очередь дождевых червей оказывающих положительное влияние на разрыхление почвы и увеличение доступа кислорода к корням растения. Так же прослеживается зависимость способности поражать от глубины, внесения в почву.

*Автор выражает признательность научному руководителю д.б.н., профессору Каменек Л.К. за помощь в подготовке тезисов.*

**Изучение трофической структуры таксоцена жужелиц (Coleoptera, Carabidae)  
Окского заповедника по данным изотопного анализа**  
**Гончаров Антон Александрович (Москва, 8antonio8@inbox.ru)**

Спектры питания жужелиц очень разнообразны соответственно большому видовому богатству семейства и широкому кругу экологических ниш, занимаемых этими жестокрылыми. Существует много классификаций жужелиц, основанных на характере их питания (Соболева-Докучаева, 1975; Hengeveld, 1980; Pedermann, 1983). Анализ данных разных авторов показывает, что четкие различия в питании между разными группами в различных классификациях характерны лишь для типичных представителей групп. Многие виды жужелиц в разных исследованиях отнесены к разным пищевым группам. Соотношение стабильных изотопов можно использовать для оценки направления и интенсивности многих экологических процессов, связанных с фракционированием изотопов. Изотопная подпись объекта исследования отражает интегрированную во времени оценку о его трофической позиции, о трофических связях с другими членами сообщества, о базовых источниках энергии. Сильное фракционирование изотопов азота в пищевой цепи позволяет по его изотопной подписи ( $\delta^{15}\text{N}$ ) определить трофический уровень организма и получить информацию о длине и структуре пищевых цепей в данном биотопе (Тиунов, 2007). Водные членистоногие сильно обеднены  $^{13}\text{C}$  по сравнению с наземными организмами (Paetzold et al., 2005). Поэтому по значению  $\delta^{13}\text{C}$  жужелиц можно судить о доле водных организмов в их рационе.

Изучение трофической структуры сообществ жужелиц производили с помощью метода стабильных изотопов. Всего было проанализировано 134 особи 18 видов жужелиц, собранных в пяти биотопах, расположенных на разном удалении от старицы р. Пры. При анализе изотопных подписей жуков, собранных в близко расположенных к водоемам биотопах, присутствует достоверная обратная корреляция содержания тяжелых изотопов углерода и азота: при увеличении  $\delta^{15}\text{N}$  организма снижается его  $\delta^{13}\text{C}$ . Показано, что изотопная подпись целого жука в достаточной мере отражает изотопный состав метаболически активных тканей (мышц груди). Среди 22 исследованных видов жужелиц можно выделить четыре основных трофических группы: фитофаги, специализированные коллембофаги, наземные зоофаги, прибрежные зоофаги. По трём видам [*Bembidion doris* (Panzer, 1796), *Amara communis* (Panzer, 1797), *Amara brunnea* (Gyll., 1810)] получены новые данные, не описанные в литературе.

**Определение типов донных сообществ и их границ по данным ГЛБО  
на примере сообщества *Arctica islandica* (Bivalvia) в проливе Великая Салма  
(Кандалакшский залив Белого моря)**

**Исаченко А.И., Губанова Я.Е., Шматков А.А. (Москва, isachenko.msu@gmail.com)**

Дистанционные акустические методы успешно применяются при картографировании морских донных осадков. В последнее время локаторы бокового обзора стали применять для поиска и изучения различных биологических объектов – от отдельных отчетливых совокупностей организмов (мидиевых и устричных банок, коралловых рифов и т.п.) вплоть до полного картирования живого покрова дна. Применяются они также и в целях мониторинга изменения ландшафтов и биоты дна в районах с сильной антропогенной нагрузкой.

Целью нашей работы является выявление структур сообществ донной биоты с помощью гидролокации бокового обзора (ГЛБО) – картографирования изолированного сообщества двустворчатых моллюсков *Arctica islandica* (Linnaeus, 1767), обитающих не на поверхности, а в толще осадка. Предполагалось на основе анализа данных ГЛБО выделить и картографировать участки дна, с определенными характеристиками сигнала, который можно интерпретировать как зоны размещения искомого донного сообщества и верифицировать эти данные с помощью традиционных методов пробоотбора, а также подводной фотосъемки. Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи: 1) определение границ сообщества *A. islandica* и нанесение их на карту; 2) определение пространственной структуры сообщества; 3) получение визуальной характеристики сообщества. Материал для этого исследования был собран в июне 2009 года в рамках ежегодной практики, проходящей на базе Беломорской Биологической станции им. Н.А.Перцова.

Выявление заиленных областей было сделано на основании данных ГЛБО. С помощью этого метода была исследована западная часть пролива Великая Салма (площадь от станции Поянкона до ББС МГУ). При проведении работ был использован ГЛБО «Гидра». Количественные пробы биологического материала отбирались дночерпателем «Океан» с площадью захвата 0,1 м<sup>2</sup>. Сбор проб для проведения гранулометрического анализа, а также фотосъемка проводились во время водолазных погружений.

*A. islandica* – двустворчатый моллюск, обитающий в Белом море от верхней границы сублиторали до глубины нескольких десятков метров на заиленных грунтах. В проливе Великая Салма сообщество *A. islandica* встречается в месте заметного понижения рельефа дна около острова Высокий. Этот район был выбран для более детальных исследований. Для исследования биологического материала было отобрано 10 проб с глубин от 10 до 16 метров. Водолазным методом были отобраны пробы для гранулометрического анализа, а также сделаны фотографии подводного ландшафта.

Результат качественного анализа биологического материала сравним с результатом, полученным при анализе распространения *A. islandica* по фотографиям. При сопоставлении данных батиметрии и результатов интерпретации данных гидролокации был выделен контур области возможного обитания *A. islandica* в западной части пролива Великая Салма.

**Население пауков (Aranei) в высотном градиенте Хибин  
Камаев Илья Олегович (Москва, ilyakamatayev@yandex.ru)**

Хибины представляют собой уникальный природный комплекс, слабо исследованный в аранеологическом отношении. Нами проводилось изучение почвообитающих и напочвенных пауков шести биогеоценозов, расположенных в высотном градиенте тундровый лес северо-восточного склона г. Вудъяр Хибин. В верхней части склона располагаются два типа горных тундр (лишайниковая и ериниковая); в средней – березовое криволесье (лесотундра) и березняк с рябиной. Долинные леса – березняк и ельник приручейный – находятся в нижней части склона. Пауков собирали с помощью почвенных раскопок (8 проб площадью 25×25 см) и ловушек Барбера в августе 2009 года.

В исследуемых биогеоценозах обнаружено 68 видов пауков, подавляющее число которых относится к семейству Linyphiidae (47). В зоогеографическом отношении преобладают широко распространенные палеарктические и голарктические виды, значительная часть

которых населяет бореальную зону. В обоих биогеоценозах тундры был обнаружен только один тундрово-гольцовский вид – *Ozyptila arctica* Kulcz., 1908.

Показатели обилия почвообитающих пауков варьировали в зависимости от типа сообществ. Наибольшие показатели численности Aranei свойственны долинным ельнику и березняку, 136 и 166 экз/м<sup>2</sup>, наименьшие – биогеоценозам средней части склона, по 50 экз/м<sup>2</sup>. В тундровых биогеоценозах данный показатель изменялся в пределах 72-102 экз/м<sup>2</sup>. Среди почвенной мезофауны доля пауков относительно невелика (менее 20%), за исключением горных тундр, где Aranei составляли от 32 до 45%. Масса пауков изменялась от 60 до 200 мг/м<sup>2</sup>, достигая наибольших значений в нижней и верхней частях склона. Выделен комплекс видов Aranei, населяющих в основном лесные биогеоценозы Хибин: это виды рода *Tenuiphantes*, *Robertus*, *Tapinocyba pallens* (O.P.-C., 1872), *Cryphoeca silvicola* (C.L.Koch, 1834) и др. Представители рода *Mecynargus* свойственны тундровым биогеоценозам. Эвритопным видом является *Centromerus arcarius* (O.P.-C., 1873), отсутствующий только в лишайниковой тундре.

Показатели уловистости напочвенных пауков изменялись в пределах 40-79 экз/100 лов-сут. Во всех лесных сообществах, кроме лесотундры, доминирует *Leptorhoptrum robustum* (Westr., 1851). *Hilaira herniosa* (Thott., 1875) обильна в биогеоценозах с покровом из зеленых мхов: лесотундре и ерниковой тундре. В ельнике приручейном к доминантам наряду с указанными видами Aranei относятся два вида *Tenuiphantes*. Пауки семейства Lycosidae преимущественно встречаются в верхней части склона, преобладая в лишайниковой тундре (35 экз/100 лов-сут), хотя и относятся к бореальным видам.

Таким образом, основу населения пауков в биогеоценозах высотного градиента Хибин формируют лесные таежные виды с широкими ареалами, большей частью из семейства Linyphiidae. Только в горных тундрах среди пауков герпетобия обильны виды Lycosidae, и здесь же встречен один собственно тундровый вид *Ozyptila arctica*.

#### Сенсорные органы *Halobiotus stenostomus* (Richters, 1908)

(Tardigrada: Eutardigrada, Hypsibiidae)

Кузнецова Ксения Глебовна (Москва, kuznetsova.ks@gmail.com)

Тихоходки (Тип Tardigrada) – это миниатюрные беспозвоночные животные, живущие как в море, так и в пресной воде. Размер взрослой особи обычно не превышает 600 микрометров. Данное исследование посвящено тонкому строению, организации и расположению сенсорных структур *Halobiotus stenostomus* Richters, 1908 – вторично морской тихоходки из класса Eutardigrada. Тип Tardigrada относится к группе Panarthropoda, куда кроме тихоходок входят еще два типа: Onychphora и Arthropoda. Филогенетическое положение тихоходок внутри группы Panarthropoda до сих пор не выяснено и подвергается активной дискуссии. Исследования строения нервной системы, сенсорных органов, а так же иннервации сенсорных органов имеет большое значение для решения этой проблемы. Сенсорные органы *Halobiotus stenostomus* представлены оклоротовым сенсорным полем, головными папиллами, переднелатеральными и заднелатеральными сенсорными полями, суборальным сенсорным регионом и глазами. Были получены данные об иннервации сенсорных органов. Головные папиллы, оклоротовое сенсорное поле и суборальный сенсорный регион образованы рецепторными окончаниями дендритов нейронов, тела которых лежат в передних отделах мозга. Переднелатеральные и заднелатеральные поля иннервируются нервами, идущими от наружных долей мозга, глаза лежат непосредственно в наружных долях. Рецепторное окончание в сенсорных органах устроено следующим образом. В области сенсорного поля дендрит чувствительного нейрона, проходя сквозь гиподермальный слой, подходит близко к кутикуле, где, расширяясь, образует рецепторную бульбу. В области бульбы от дендрита отходит видоизмененная ресничка, закорененная в кутикуле, где она, как правило, ветвится разнообразным образом в зависимости от типа рецепторного окончания. В латеральных сенсорных полях *H. stenostomus* обнаружено три типа рецепторных окончаний, отличающихся электронной плотностью цитоплазмы, наличием «воротничка», окружающего основание реснички и характером ветвлений реснички. В суборальном сенсорном регионе обнаружено два типа рецепторных окончаний,

отличающихся, главным образом, строением «воротничка». В целом отмечено, что в суборальном сенсорном региона стандартная модель расположения микротрубочек гораздо менее нарушена, чем в латеральных сенсорных полях, то есть реснички являются гораздо менее модифицированными. Кутикула и гиподерма в сенсорных регионах сильно отличается от гиподермы и кутикулы остальной поверхности тела. Глаза представляют собой инвертированные пигментные чаши и построены из малого количества клеток трех типов: пигментной клетки, микровиллярной клетки и ресничного рецепторного окончания. Строение сенсорных окончаний *H. stenostomus* достаточно своеобразно, что отличает сенсорные органы данного вида от других исследованных видов эукартигрид. Работа поддержанна грантом РФФИ № 09-04-01056, Роснаука № 02.740.11.0280, программой Рособразование за 2009 г. Автор благодарит руководителя ЦКП ИБВВ РАН С.И. Метелева и старшего инженера Г.В. Быкова, а так же старшего инженера ЦКП ЭМ биологического факультета МГУ Богданова А. Г. за техническое обеспечение проекта.

#### **Репродуктивное поведение имаго реликтового усача (*Callipogon relictus* Sem.)**

**Куприн Александр Витальевич** (Уссурийск, [kyprins@mail.ru](mailto:kyprins@mail.ru))

Реликтовый усач (*Callipogon relictus* Sem.) является эндемичным видом юга Дальнего Востока. Распространен на юге Хабаровского края, в Амурской области, Приморском крае, полуострове Корея, северо-восточном Китае. Населяет первичные смешанные и лиственные леса. Жуки массивные, длина тела от 6 до 12 см. Развиваются преимущественно в древесине ильма долинного (*Ulmus japonica*(Rehd.) Sarg.), личинки, кроме того, встречаются в тополе Максимовича (*Populus maximowiczii* A. Непгу), липе амурской (*Tilia amurensis* Rupr.). Несмотря на то, что имеются некоторые сведения о распространении и морфологии, вопросы биологии и экологии указанного вида остаются слабо изученными.

Работы проводились в июле-августе 2009 года, в Уссурийском заповеднике, который расположен в Уссурийском и Шкотовском районах Приморского края. Охраняемая территория лежит на южных отрогах хребта Пржевальского, охватывая верхнюю часть бассейнов рек Комаровка и Артемовка. Общая площадь заповедника составляет 40 432 га. Состав и многообразие лесных сообществ исследуемой территории типичны для большей части юга Приморского края.

Согласно нашим данным, после выхода из куколочной колыбельки самки реликтового усача в течение нескольких дней проходят дополнительное питание. Самцы появляются позже самок. Процесс копуляции и откладки яиц происходит на стволе ильма долинного диаметром 75 см на высоте 150 см от поверхности почвы.

Для привлечения самца самка выделяет специфический секрет. Она реагирует на появление партнера, принимая предостерегающую позу. При этом она привстает на переднюю пару ног, разводит верхние челюсти, и производит так называемое «движение намерения». Тот, в свою очередь, направляется к партнёрше и останавливается перед ней, при этом происходит контакт антеннами. Предкопуляционное поведение длится 5-7 минут. Затем самец быстро разводит надкрылья и обходит вокруг самки, оказываясь позади нее. Сгибает брюшко вперед, чтобы установить контакт с копулятивными органами партнёрши, в таком положении происходит спаривание. Примерно через 30 минут пара разъединяется.

Почти сразу после спаривания (3-5 минут) самка приступает к откладке яиц, периодически надгрызая кору дерева. В это время самец следует за самкой, положив передние конечности на ее надкрылья. Очевидно, что эти действия самца стимулируют самку к откладке яиц. Спустя сутки после откладки яиц особи спускаются к поверхности почвы и погибают. Продолжительность жизни имаго реликтового усача составляет 14 дней.

#### **Совки (Lepidoptera, Noctuidae) Южного Дагестана**

**Курбанова Наида Сеферуллаевна** (Махачкала, [idda79@mail.ru](mailto:idda79@mail.ru))

Семейство совок (Noctuidae) – одно из наиболее многочисленных, разнообразных и распространенных семейств отряда чешуекрылых. Совки распространены повсеместно, встречаются во всех природных зонах, живут в самых различных биотопах. Представители семейства широко распространены также в Дагестане. Свойственная их гусеницам

фитофагия и трофические связи со многими культурными растениями определяют практическое значение семейства в целом. Хозяйственное значение совок, как вредителей сельскохозяйственных и лесных культур весьма велико – среди них известны как первостепенные и широко распространенные, так и локальные вредители. Гусеницы совок питаются на многих дикорастущих, сорных и культурных растениях. Повреждая различные органы культурных растений (семена, стебли, корневища) гусеницы совок периодически снижают урожай сельскохозяйственных культур. Многие виды совок дают массовые вспышки численности, и сельское хозяйство терпит убытки от этих вредителей. По образу жизни гусеницы и характеру причиняемого ими вреда совок делят на две группы: листогрызущие (надземные) и подгрызающие (почвообитающие).

Известно также, что бабочки совок играют немаловажную роль как опылители цветов, а гусеницы – как потребители сорных растений. Несмотря на важное хозяйственное значение совок, в Дагестане эта группа до последнего времени оставалась слабо изученной, а материалы по экологии и распространению были отрывочны.

Актуальность данной работы заключается не только в том, что совки вредители флоры, но и в том, что вообще все совки Южного Дагестана до настоящего времени изучены фрагментарно и далеко не всесторонне.

Целью нашей работы является сбор материала о фауне, экологии и распространении совок района исследования, а также обобщение их и уже известных данных и дальнейший анализ.

Впервые для Южного Дагестана приводится наиболее полный аннотированный список совок, построенный по современной системе, насчитывающий 321 вид, относящийся к 144 родам, 32 трибам и 29 подсемействам. Выявлено для района исследования 177 новых видов относящихся к 73 родам, из них 5 видов являются новые для фауны Дагестана: *Parascoita fuliginaria*, *Ipimorpha retusa*, *Aedia leucomelas*, *Apamea epomidion* *Chersotis ebortorum*. Из них зарегистрирован 1 новый вид для России – *Chersotis ebortorum*, для фауны Кавказа приводятся новых 2 вида: *Aedia leucomelas*, *Apamea epomidion*.

Сборы проводились при помощи световой ловушки, оснащенной ртутно-кварцевой лампой (ПРК-2, ПРК-4), такой метод лова является основным. Для района исследования изучены сезонная и суточная динамика лёта совок на фоне других групп насекомых. Активность различных видов совок неодинакова, так же как неодинаково и количество активных форм в разные сезоны. Общая сезонная динамика активности всего комплекса совок зависит от состава видов, доминирующих по численности. Формально лёт насекомых на свет зависит от динамики всех факторов внешней среды.

#### **Способы восстановления техногенной пустоши в окрестностях медно-никелевого комбината «Североникель» по состоянию комплексов микроартропод** *Лисковая Алена Анатольевна (Anatolity, alena-anatolevna@bk.ru)*

Цель исследований состояла в оценке эффективности разных способов восстановления техногенной пустоши в окрестностях комбината «Североникель» (г. Мончегорск) по состоянию комплексов микроартропод. Анализировали встречаемость, численность и обилие основных групп – индикаторов разных этапов восстановительных сукцессий в почвах: коллембол (Collembola), мезостигматических (Mesostigmata) и панцирных (Oribatei) клещей.

Исследовали 3 исходные площадки без восстановления и 6 площадок, различавшихся по срокам рекультивации (5-11 лет), типу субстрата (минеральный грунт, осадки сточных вод, торф, отмерший полуразложившийся сфагнум) и способу восстановления (инвестиционный или экологический подход). Рекультивация с применением инвестиционного подхода (ИП) включала предварительное планирование (выравнивание) территории, насыпной грунт, внесение торфа, опилок, песка, удобрений (NPK), известкование ( $\text{CaCO}_3$ ), посев травосмеси, высадку саженцев деревьев. При экологическом подходе (ЭП) в исходную загрязненную почву вносили NPK,  $\text{CaCO}_3$ , высаживали саженцы деревьев и высевали многолетние травы.

По результатам исследований сделан вывод, что ЭП, менее затратный в материальном и физическом плане по сравнению с ИП, является достаточным для восстановления почвенного покрова и его фаунистических комплексов. Более высокие значения

численности, таксономического и экологического разнообразия микроартропод на площадках с ЭП связаны с сохранением исходной структуры почв, сформированных ранее под коренными северотаежными лесами. Несмотря на значительную степень техногенной трансформации и фрагментарность растительного покрова, в этих почвах встречаются микроучастки («микрорефугумы») с «остатками» былого «лесного» облика и разнообразия микроартропод. Так численность оribatид в отдельных образцах достигает значений (10-18 тыс. экз./м<sup>2</sup>), сопоставимых с лесными подзолами Мурманской области. Сохранению подобных микроучастков способствует и сложный холмистый рельеф исследованной местности. Планирование территории техногенной пустоши при ИП сопровождалось механическим нарушением исходного почвенного покрова, а мероприятия по фитомелиорации определили формирование растительного сообщества лугового типа. Это привело к развитию «лугового» варианта комплексов микроартропод с преобладанием коллемболов и мелких обильных сапротрофных клещей.

При любом способе восстановления техногенной пустоши комплексы микроартропод характеризуются низким разнообразием, нестабильностью структуры, значительными пространственными и сезонными флуктуациями основных структурных параметров. Это связано со значительной техногенной трансформацией почвенного покрова и накоплением высоких доз поллютантов в условиях постоянной эмиссии комбината. Состояние комплексов микроартропод свидетельствует о начальных этапах восстановления почвенных зооценозов на площадках с разными способами рекультивации. Низкие темпы восстановления подтверждаются сравнением с данными зоологических исследований, выполненных нами на участках, удаленных от комбината «Североникель» на расстояние 0,5-50 км. На большинстве исследованных площадок средняя численность Oribatei (индикаторов поздних этапов восстановительных сукцессий) соответствует ее уровню не далее чем в 2 км от комбината. Численность Mesostigmata сопоставима с их плотностью на удалении до 9 км, Collembola – до 13 км.

**Анализ изменчивости формы раковины моллюсков комплекса «saxatilis»  
(Caenogastropoda: Littorinidae) методами геометрической морфометрии**  
**Лоскутова Зинаида Игоревна (Санкт-Петербург z.loskutova@gmail.com)**

Для исследования формы разнообразных биологических объектов, диагностика которых затруднена значительной внутривидовой и межвидовой изменчивостью морфологических признаков, необходимо привлечение методов, которые комплексно оценивают особенности всей формы тела и учитывают размах варьирования отдельных ее элементов. Особенно остро эта проблема встает при определении и описании у близких и криптических видов. Одним из перспективных методов с этой точки зрения является метод геометрической морфометрии.

Литоральные моллюски видового комплекса «saxatilis» представлены тремя криптическими видами: *Littorina saxatilis*, *L. arcana* и *L. compressa*. Указанные виды сходны с точки зрения конхологических признаков; видовые различия проявляются только в деталях строения половой системы самок. Размах внутривидовой изменчивости конхологических признаков сильно затрудняет установление видоспецифичной формы раковины у этих криптических видов.

Для оценки межпопуляционной и внутрипопуляционной изменчивости формы раковины моллюсков *L. compressa*, *L. saxatilis* и *L. arcana* использовали методы геометрической морфометрии. На 150 цифровых изображениях раковин половозрелых моллюсков, собранных в симпатричном поселении в губе Ярнышна (Восточный Мурман, Баренцево море) с помощью программы TPSDig было расставлено по 15 стандартных меток. Для выявления межвидовых, внутрипопуляционных и зональных различий в форме и размерах раковины самок моллюсков *L. saxatilis*, *L. arcana*, *L. compressa* был сделан пошаговый канонический дискриминантный анализ со всеми полученными переменными формы и размера (27 относительных деформаций, две линейные компоненты и центроидный размер), вычисленные в программах MODICOS. Усредненные конфигурации раковин были получены в программе TPSRelw.

По результатам анализа усредненных конфигураций раковины моллюсков *L. saxatilis*, обитающих в нижней зоне литорали характеризуются более широким устьем и менее вытянутой верхушкой по сравнению с моллюсками этого же вида, обитающими в верхней части литорали. Обнаружены статистически значимые различия между раковинами моллюсков *L. arcana* и *L. saxatilis* из совместных поселений в верхней части литорали (раковины первого вида обладают более овальным устьем по сравнению с круглым у второго). При этом форма раковины *L. compressa* и *L. saxatilis* из сходных биотопов (нижняя часть литорали) не различается.

Были обнаружены статистически значимые различия в форме раковины у здоровых моллюсков *L. arcana* и *L. saxatilis* и зараженных трематодами группы «*rustaeus*».

Таким образом, геометрическая морфометрия наглядно иллюстрирует и помогает оценить межвидовую изменчивость и внутривидовые различия в форме раковины, связанные с обитанием в разных микробиотопах и зараженностью трематодами.

*Работа поддержана грантом РФФИ 09-04-01728а. Автор выражает благодарность своем научным руководителям доц., к.б.н. Михайловой Н.А. и доц., д.б.н. Грановичу А.И.*

### **Особенности строения и ультраструктуры мозга жуков-перокрылок (Ptiliidae) в связи с миниатюризацией**

*Макарова Анастасия Алексеевна (Москва: amkrva@gmail.com)*

Миниатюризация – одно из основных направлений эволюции насекомых. Предельно малый размер тела – важная характеристика насекомых и животных в целом, которая определяет морфологию, физиологию и биологию вида. При уменьшении размеров тела наблюдается сильная трансформация всех систем органов. Нервная система подвержена олигомеризации и концентрации ганглиев, сокращению размеров и количества нейронов. Происходит существенное увеличение относительного объема мозга, но вместе с тем он полностью сохраняет структуру и ультраструктуру, несмотря на многократное уменьшение размеров тела. В результате изучения строения и ультраструктуры мозга перокрылок были выявлены следующие особенности, связанные с миниатюризацией: смещение надглотового ганглия в заднюю часть головы и переднюю часть переднегруди, смещение подглотового ганглия в переднегрудь и слияние с переднегрудным, существенное увеличение относительного объема мозга. Значительных изменений в структуре не наблюдается, почти все структуры меняются изометрически. Количество нейронов в головном мозге Ptiliidae меньше чем у крупных насекомых на два порядка, а размер нейронов существенно меньше, чем у других насекомых. Полученные данные подтверждают и дополняют гипотезу о факторах, лимитирующих миниатюризацию насекомых. Существенным ограничением является размер нервной системы, ввиду крайней консервативности строения, с одной стороны, и размеров нейронов и диаметра аксонов с другой.

### **Особенности режима увлажненности в гнездах *Formica rufa* L. в условиях Крайнего Севера**

*Обрывкина Вероника Борисовна (Нижневартовск, sunflower89@mail.ru)*

Одним из наиболее широко распространенных и массовых видов на территории ХМАО-Югры является *Formica rufa* L. Данный вид наиболее приспособлен к климатическим особенностям региона и к таким природным особенностям рельефа и почвенного покрова, как равнинность, повышенный гидроморфизм, длительный морозный период, способствующий глубокому промерзанию почв. В основу исследования были положены анализ и сравнение проб почв, отобранных с 10 муравейников *Formica rufa* L., и с прилегающими территориями. Исследования показали, что влажность почвы в муравейниках колеблется от 0,14% до 6,04%. При этом наименьшая степень увлажнения характерна для муравейников в открытых, достаточно сильно инсолированных биотопах на песчаных почвах, наибольшая – в слабо инсолированных биотопах на почвах с сильным или средним увлажнением. Таким образом, на степень увлажнения муравейника большое влияние оказывает степень увлажнения биогеоценоза, в котором он расположен. В среднем влажность проб почв, взятых из муравейников, в 6 раз меньше, чем показатели влажности

проб почв, отобранных с прилегающих территорий (на расстоянии 5 метров от гнезда). Максимальная разница между увлажнением почвы из муравейника и почв, с прилегающей территорией может достигать 26-кратных значений массовой доли влажности пробы почвы из гнезда, минимальное значение – 2-кратное превышение показателя влажности почвы из гнезда. Также на степень увлажненности гнезда оказывает влияние и размер купола. Так, например, в достаточно увлажненных биотопах в больших муравейниках (диаметр купола 260 см, высота – 95 см) значения массовой доли влажности почвы равны 3,32%, что в 2,67 раза ниже аналогичного показателя с прилегающей территорией. В гнездах меньшего размера показатели массовой доли влажности почвы в муравейнике увеличиваются (например, для муравейника диаметром 188 см и высотой 82 см данный показатель равен 4,51%, что всего в 1,5 раза ниже значений проб почвы с прилегающей территорией). Аналогичная закономерность прослеживается и в пробах почвы из гнезд с открытыми биотопами со слабым увлажнением почв (для муравейника диаметром 173 см, высотой 100 см значения массовой доли увлажненности в гнезде равны 0,44%, что в 7,3 раза ниже значений для проб почвы с прилегающей территорией). Таким образом, в условиях повышенной влажности почв Нижневартовского района, *Formica rufa* L., вынуждены осушать внутреннее пространство муравейника, для поддержания комфортных для своей жизнедеятельности условий и чем сильнее степень увлажнения месторасположения, меньше инсоляция и размер купола муравейника, тем активнее выражена деятельность насекомых по созданию микроклимата гнезда.

#### **Архианиелида *Dinophilus gyrosciliatus*: жизненный цикл, формирование нервной и мышечной систем**

**Осипова О.А., Фофанова Е.Г. (Москва, biolizok@gmail.com)**

Использование иммунохимических методов и лазерной конфокальной микроскопии позволило накопить значительный массив данных по развитию нервной системы и описать её формирование на уровне одиночных идентифицированных нейронов у различных представителей Lophotrichozoa. Архианиелиды семейства Dinophilidae представляют особый интерес для сравнительно-морфологического изучения, так как взрослая особь соответствует личинке эунидий политирохе, то есть является неотенической трохофорой.

*Dinophilus gyrosciliatus* с легкостью содержится в лабораторных условиях. Мы вели наблюдения за культурой в течение двух лет. Полный жизненный цикл от зиготы до откладки первых коконов происходит за 11-12 дней. Период эмбрионального развития составляет 5 дней. В течение полутора дней ювенилии плавают, затем оседают, начинают ползать и активно питаться. В среднем каждая особь откладывает по кладке в день. Количество яиц в кладке варьирует от 1 до 9, причем количество больших яиц (будущие самки) и маленьких (карликовые самцы) разное. Продолжительность жизни составляет 1,5-2 месяца.

Мы использовали антитела против тубулина для выявления нейротубул нервных клеток и ресничек, серотонина и FMRFамида для выявления тел и отростков нейронов, и мечение фаллоидином мышечных структур у особей разных стадий жизненного цикла. Ресничные структуры оказались удобными для маркирования ранних стадий эмбрионального развития, мышечные структуры – для маркирования поздних. Антитела к FMRFамиду выявляют тела нейронов в церебральном ганглии, центральную нервную цепочку, окологлоточное и каудальное кольцо. Антитела к серотонину маркируют около десятка тел нейронов в церебральном ганглии и единичные тела нейронов по ходу центральной нервной цепочки. В строении мышечной системы выявляется кольцевая, продольная и диагональная мускулатура, особо мощный глоточный бульбус и каудальная мышца. Сегментация выражена только в распределении ресничных шнурков на поверхности тела и протонефридиев и не отмечается в строении нервной и мышечной систем.

*Авторы Благодарят Воронежскую Елену Евгеньевну за помощь в подготовке тезисов, внимательное руководство на протяжении всей работы. Спасибо Вам, Елена Евгеньевна!*

## Особенности организации фауны беспозвоночных в почвах Хибинских гор

Пожарская Виктория Викторовна (Апатиты, [vika\\_pozharskaja@mail.ru](mailto:vika_pozharskaja@mail.ru))

Исследованы склоны северо-восточной (СВЭ) и южной (ЮЭ) экспозиции Хибинских гор Вудъярчорр ( $67^{\circ}39'$  с.ш.  $33^{\circ}39'$  в.д.) и Ловчорр ( $67^{\circ}35'$  с.ш.  $33^{\circ}47'$  в.д.) на Кольском п-ове. На склоне СВЭ г. Вудъярчорр представлены 3 горно-растительных пояса: лесной (еловый редкоствольный лес), субальпийский (березовый кривоствольный лес) и альпийский (тундровый). В пределах г. Ловчорр березовое криволесье сменяется тундрой кустарничковой, а на высоте 1000 м – арктической пустыней.

Цель исследований – сравнение комплексов почвенных беспозвоночных по численности, биомассе и таксономическому составу между склонами разной экспозиции в пределах одной горы, склонами одной экспозиции на разных горах и между горными и равнинными биоценозами северотаежной подзоны Мурманской области. Для сравнения использовали данные по почвенной фауне 10 зональных сосновок и ельников (Зенкова, 2007). Сходство фаунистических комплексов по составу таксонов и численности беспозвоночных оценивали с помощью индекса общности Съеренсена  $k$  для количественных данных (Лебедева, Криволуцкий, 2002).

В почвах г. Вудъярчорр выявлено 24 таксона беспозвоночных (семейства, отряды), г. Ловчорр – 20 таксонов. Зональные подзолы населяют представители 30 таксонов. Основу фауны и горных, и равнинных почв формируют двукрылые, жуки, пауки, многоножки, но обилие каждой из этих групп в равнинных лесах в 2-3 раза выше. Низкий уровень численности насекомых разных трофических групп в биоценозах Хибин связан со своеобразием природных условий (круги на склонах, короткий сезон положительных температур воздуха).

Экспозиция склона существенно влияет на состав и обилие беспозвоночных: фаунистические комплексы в почвах склона СВЭ были более сходны с равнинными лесами, чем комплексы в почвах склона ЮЭ. На склоне СВЭ г. Вудъярчорр степень фаунистического сходства мало различалась для зональных сосновок ( $k=0,30-0,72$ ) и ельников ( $0,45-0,77$ ; на склоне ЮЭ она была выше с сосновками ( $0,15-0,35$  против  $0,09-0,19$  для ельников). На г. Ловчорр комплексы беспозвоночных были более сходны с равнинными ельниками ( $0,64-0,81$ ), чем с сосновками ( $0,31-0,54$ ).

Сходство между одноименными горно-растительными поясами на склонах разной экспозиции было ниже ( $0,12-0,23$ ), чем между разными поясами одного склона ( $0,35-0,73$  для склона СВЭ и  $0,35$  для склона ЮЭ г. Вудъярчорр,  $0,32-0,80$  для склона ЮЭ г. Ловчорр). В пределах южных склонов двух гор сходство комплексов беспозвоночных между соседними растительными поясами было больше ( $0,32-0,80$ ), чем между одноименными поясами на разных горах ( $0,19-0,22$ ), что отражает фаунистическое своеобразие каждой горы.

В целом, степень сходства возрастала в ряду: одноименные растительные пояса разных склонов одной горы → одноименные пояса южных склонов разных гор → горные леса → зональные леса → соседние пояса в пределах одного склона.

Автор выражает искреннюю благодарность Зенковой И.В. за научное руководство работой.

## Список падальников (Coleoptera, Trogidae) Саратовской области

Сажинев Алексей Сергеевич (Саратов, [sazh@list.ru](mailto:sazh@list.ru))

Семейство Trogidae насчитывает около 300 видов мировой фауны. В фауне России встречаются 9 видов из рода *Trox*. Для территории Южной России И.В. Шохин приводит 7 видов семейства. Данные о фауне падальников Саратовской области с непосредственными точками сбора на ее территории мы находим у Н.Л. Сахарова в его сводке по жестокрылым Саратовской губернии, где он приводит 3 вида троксов. В настоящей статье на основании литературных и коллекционных данных составлен список Trogidae Саратовской области. Виды, приведенные для региона впервые, отмечены звездочкой (\*).

1. *Trox cadaverinus* Illiger, 1802. Литература: Сахаров, 1903: 40 – «лет днем, часто на песчаных дорогах; 15.VI». – Саратовская обл., Татищевский р-н, окр. с. Октябрьский городок (у Сахарова «Николаевский городок»). Материал: Саратовская обл.

Красноармейский р-н, окр. пос. Каменский, 1989 (1 экз.) leg. И.В. Крюков, det. А.С. Сажнев, колл. И.В. Крюкова.

2. \* *Trox eversmanni* Krupnický, 1832. Материал: Саратовская обл., Ртищевский р-н, с. Ключи, Макаровский заказник, на свет, 26–28.VI.2008 (1 экз.) leg. И.В. Крюков, А.С. Сажнев, det. А.С. Сажнев, колл. А.С. Сажнева.

3. *Trox sabulosus* ssp. *sabulosus* (Linnaeus, 1758). Литература: Сахаров, 1903: 40 – «лет днем; на трупах мелких животных: ежей, мышей и др.». Материал: в наших сборах не отмечен.

4. *Trox scaber* (Linnaeus, 1767). Литература: Сахаров, 1903: 40 – «лет по вечерам и на огонь ночью; 25.IV». Материал: «Саратовская обл.» – без более точной этикетки, колл. СГАУ.

5. \* *Trox hispidus* ssp. *niger* Rossi, 1792. Материал: Саратовская обл., Ртищевский р-н, с. Ключи, Макаровский заказник, на свет, 26–28.VI.2008 (1 экз.) leg. И.В. Крюков, А.С. Сажнев, det. А.С. Сажнева, колл. А.С. Сажнева.

Таким образом, фауна области насчитывает 5 видов семейства Trogidae, что на наш взгляд является вероятно окончательной цифрой, хотя мы все же допускаем обнаружение новых для региона видов со стороны Казахстана и других прилегающих территорий.

Хотелось бы выразить благодарности И.В. Крюкову, И.А. Забалуеву (Саратов), А.В. Ковалеву (Ульяновск), А.М. Шаповалову (Оренбург), Я.Н. Коваленко (Белгород) за существенную помощь в работе.

#### Дифференциация трофических ниш в сообществах диплопод лесов умеренной и тропической зоны

Семенюк Ирина Игоревна (Москва, [free-cat@bk.ru](mailto:free-cat@bk.ru))

Работа базируется на изотопном методе определения трофической позиции видов в сообществах. Метод основан на феномене естественного фракционирования стабильных изотопов азота и углерода ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ;  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) в телах животных. Закономерное фракционирование изотопов происходит в результате целого ряда биохимических и физиологических процессов. В частности, содержание тяжелого азота увеличивается в трофической цепи при переходе вверх по уровням. Таким образом, по изотопному составу животного можно приблизительно оценить его позицию в трофической цепи, а также круг его возможных пищевых ресурсов.

Целью работы было рассмотреть и сравнить изотопную дифференциацию диплопод в многовидовых сообществах умеренной и тропической зон. Сбор материала был проведен в летний период 2008 года на территории южного участка Государственного природного заповедника «Калужские Засеки» в различных лесных сообществах – ельнике, широколиственном и нескольких типах смешанного леса, залежном поле, на водоразделе и в долине. Вторая часть материала была собрана в 2009 году на территории национального парка Нам Кат-Тыен (Южный Вьетнам) в разных лесных формациях с доминированием диптерокарпуса, афзелии, фикуса и лагерстремии. Собранный материал был высушен и проанализирован на изотопном масс-спектрометре (IRMS) Finnigan Delta V Plus.

В умеренной зоне было отмечено 9 видов диплопод, в тропической – 23. При этом по изотопному составу сообщество умеренной зоны оказалось весьма компактным, разброс по  $\delta^{15}\text{N}$  составил 2,7‰, по  $\delta^{13}\text{C}$  – 2,5‰. Напротив, диплоподы тропического муссонного леса показали явное разделение на три функциональные группы, разброс по  $\delta^{15}\text{N}$  составил более 15‰. По всей видимости, диплоподы первой группы питаются в основном подстилочными грибами, диплоподы второй группы – растительным опадом, тогда как виды из третьей группы, совпадающие по изотопной подписи с хищными многоножками, могут употреблять в пищу, кроме опада, материалы животного происхождения, или вести частично хищный образ жизни. Интересно отметить, что у пещерных диплопод, основу питания которых составляют экскременты летучих мышей, содержание тяжелого азота оказалось наиболее высоким и четко отражало их трофическую позицию «сверххищника».

Таким образом, в относительно небогатом видами сообществе диплопод широколиственного леса умеренной зоны не обнаружено существенного расхождение трофических ниш отдельных видов. Их существование, очевидно, обеспечивается другими механизмами. Напротив, в тропическом муссонном лесу наблюдается четкая трофическая

дифференциация отдельных видов или многовидовых группировок, что, вероятно, является следствием высокого разнообразия как самих диплопод, так и их потенциальных пищевых ресурсов.

### Строение пигидия и зоны роста у *Nereis virens*

**Старунов Виктор Вячеславович** (Санкт-Петербург, starounov@mail.ru)

Традиционно задний конец тела полихет привлекает внимание исследователей. Его можно разделить на три отдела: пигидий, зону роста и зону формирования сегментов. Однако до сих пор не существует единого мнения относительно трактовки заднего конца тела и его частей у полихет. Поэтому нами была предпринята попытка сделать подробное описание заднего конца тела червя, как единого функционального образования на примере *Nereis virens*. Целью данной работы является изучение строения заднего конца тела *Nereis virens*.

Пигидий у полихет изучен крайне слабо. Специально этот отдел тела практически не изучался. Терминально на пигидии находится анальное отверстие. С центральной стороны на нем находятся две лопасти, от которых отходят пигидиальные нити. Сквозь тело пигидия проходят стволы брюшной нервной цепочки червя, которые заканчиваются в пигидиальных нитях.

На основании сделанных реконструкций было выявлено, что внутри пигидия располагается хорошо выраженная сплошная кольцевидная полость, которая охватывает концевой отдел кишечника. Эта полость имеет собственную выстилку подобную выстилке тулowiщных сегментов. Тем не менее, есть и отличия полости пигидия от целомов тулowiщных сегментов. Она непарная и не имеет протоков (целомодуктов или нефридиев). По всей видимости, она является целомической и, поэтому может быть обозначена как перианальный целом. Полость пигидия отделена от остального тела червя соединительнотканной перегородкой, в которой находится перианальный кровеносный синус, связанный с дорзальным и центральным кровеносными сосудами.

Кпереди от перегородки, отделяющей пигидий от остального тела червя, располагается зона роста. Эта зона является местом начала всех морфогенетических процессов, связанных с формированием сегментов. Устроена она следующим образом. В стенке тела находится кольцо из крупных активно делящихся клеток, расположенных по передней границе перианального кровеносного синуса. С центральной стороны имеются две симметрично расположенные группы клеток, подобные клеткам, образующим кольцо в стенке тела. Они начинаются парой клеток на уровне перегородки, отделяющей пигидиальную полость от зоны роста, между стволами брюшной нервной цепочки. Далее, ближе к головному концу число клеток, входящих в состав этих образований, увеличивается. Они заканчиваются в области объединения брюшных нервных стволов в брюшную нервную цепочку.

Таким образом, пигидий *Nereis virens* является довольно сложным образованием. Факт обнаружения перианального целома позволяет сделать вывод о том, что классические представления о его строении неприменимы, по крайней мере для Nereididae. Можно предположить, что клеточное кольцо является эктодермальной зоной роста, служащей источником покровных и ганглиозных клеток, а парные клеточные скопления представляют собой мезодермальную зону роста, дающую начало целомам, мышцам, метанефридиям.

*Работа поддержанна грантом РФФИ 09-04-01309-а. Автор выражает благодарность своему научному руководителю, проф. д.б.н. Слюсареву Г.С, а также Лавровой О.Б. и Тихомирову И.А. за неоценимую помощь при выполнении данного исследования.*

## ПОДСЕКЦИЯ «ЗООЛОГИЯ ПОЗВОНОЧНЫХ»

**Кратковременная пространственная память взрослых особей  
серой жабы (*Bufo bufo* L., 1758) и травяной лягушки (*Rana temporaria* L.)**  
**Антипов Владислав Анатольевич** (Москва, vladantipov@yandex.ru)

Цель работы – выяснить роль памяти в освоении пространства у 2 экологически сходных видов сухопутных амфибий в эксперименте «открытое поле». Эксперименты проводили в лаборатории со взрослыми особями серых жаб (*Bufo bufo* L., 1758) (длина тела 55-105 мм) и травяных лягушек (*Rana temporaria* L.) (50-90 мм) в июне-июле 2008 и 2009 г. В опытах участвовало 33 жабы (21 самец и 12 самок), 30 лягушек (22 самца и 8 самок). Амфибий помещали в установку «открытое поле» размером 1,6×1 м. В установке имелась центральная комната со зрительными ориентирами и выходами в 4 отсека, в одном из которых располагали жизненно важные ресурсы (вода, еда, убежище). Для лягушек использовали конструкцию того же размера, но внутренние перегородки в ней отсутствовали – отсеки выделяли условно. Земноводным давали 4 ч на обследование незнакомой обстановки. Затем ресурсы из установки убирали и через 15 мин животное сажали туда повторно, чтобы проверить, меняется ли его поведение в измененной обстановке. Регистрировали двигательную активность особей в каждом отсеке, проведенное в них время и частоту заходов в каждый из них, а также общую длину траектории в опыте, длину на периферии установки и в ее центре. Чтобы оценить мотивацию амфибий к освоению пространства, сравнили их поведение в центре и на периферии (предпочтение периферии рассматривается как проявление испуга). Перегородок в установке для лягушек не было, в отличие от эксперимента с жабами, и животные могли сразу заметить ресурсы. Т.е. не было ясно, идут ли лягушки к ресурсам или амфибий они интересуют как привлекательные зрительные ориентиры. Чтобы это выяснить, поставили контрольный опыт. В угол установки на 4 ч помещали зрительные ориентиры – ёмкости, которые в предыдущем эксперименте содержали ресурсы, но в этом были пустые. В данном опыте предпочтение этого угла отсутствовало. Основная гипотеза в работе состояла в том, что в измененной обстановке поведение животных будет отличаться, т.е. они запомнят предшествующую обстановку. При анализе видеосъемки установили, что при знакомстве с обстановкой активность обоих видов была максимальной в начале теста и далее уменьшалась. Это свидетельствует об исследовательской активности. У самцов обоих видов она была выше, чем у самок. При внесении изменений в обстановку общая активность увеличилась и у самцов, и у самок. Оба вида амфибий были активнее в отсеке, где были ресурсы, и проводили в нем больше времени, чем в остальных отсеках, что говорит о его запоминании за предшествующие 4 ч. У самок запоминание проявлялось хуже, и они были в обоих опытах на периферии дольше самцов, что говорит об их большем испуге. Эти данные свидетельствуют о том, что у серых жаб и травяных лягушек проявляется исследовательская активность при помещении их в незнакомую и измененную обстановку. Также они быстро запоминают окружающую зрительную обстановку. У самцов обоих видов такое поведение выражено лучше, чем у самок. Автор признателен С. В. Огурцову, к.б.н., доценту кафедры зоологии позвоночных Биологического факультета МГУ, за руководство данной темой.

**Некоторые морфо-функциональные особенности трофической специализации  
камышевок (*Acrocephalus*)**

**Волкова Наталья Вадимовна** (Москва, n.v.volikova13@mail.ru)

Представители рода *Acrocephalus* приспособлены к поиску и сбору пищи в густых труднодоступных зарослях, что оправдывается обилием кормов, мало используемых другими видами. Выявить некоторые морфологические основы трофической специализации камышевок – цель предлагаемой работы.

При помощи метода морфо-функционального анализа ротового аппарата (Дзержинский, 1972) было исследовано пять видов камышевок (*A.dumetorum*, *A.palustris*, *A.shoenobaenus*, *A.stentoreus*, *A.arundinaceus*).

Для всех изученных видов отмечено уменьшение объема некоторых мышечных порций (например, редуцированна ростральная часть глубокой порции наружного аддуктора), характерна общая относительная ослабленность мускулатуры. Вероятно, это вызвано пространственным конфликтом между относительно крупными глазами, мозговой капсулой и наружными аддукторами. Вместе с этим уменьшена и упрощена система апоневрозов, следствием чего является увеличение длины мускульных волокон. С функциональной точки зрения такой ротовой аппарат проигрывает в силе сжатия пойманного объекта, однако увеличивает скорость движений челюстей при захвате корма. Быстрому синхронному захлопыванию кловов способствует хорошее развитие заглазничной связки, которая работает в данном случае как пружина: натягивается при раскрытии кловов, запасая энергию, а затем с силой захлопывает челюсти. В большей степени описанные механизмы выражены у крупных камышевок (*A.stentoreus*, *A.arundinaceus*). У них наиболее упрощена система апоневрозов (например, в каудальной части глубокой порции наружного аддуктора, в поверхностном ложновисочном мускуле), и, как следствие, длинные мускульные волокна обсуждаемых порций. У *A.stentoreus* и *A.arundinaceus* в связи с относительно большими размерами пространственный конфликт между глазами, мозговой капсулой и мускулатурой выражен слабее, в результате чего не требуется максимальной компактации мышц, как у мелких птиц. Упрощение системы апоневрозов и ослабление мускулатуры компенсируется более мощной заглазничной связкой, которая, вероятно, становится важным элементом, способствующим быстрому и синхронному смыканию челюстей, во время активной охоты на насекомых. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 09-04-01661-а.

### Исследование филогеографии волка (*Canis lupus* L.) Алтая методом микросателлитных маркёров

*Воробьевская Е.А., Балдина С.Н. (Москва, nature13@yandex.ru)*

Значительная неоднородность природных условий территории Алтая во многом определяет высокое разнообразие форм алтайского волка, таксономический статус, происхождение и родственные связи которых остаются дискуссионными. С целью исследования этих сложных вопросов была разработана и протестирована методика микросателлитного анализа, являющаяся одним из основных инструментов в исследованиях филогеографии. Было проанализировано 97 образцов волка *Canis lupus* L., добывших в ходе плановых отстрелов в 2008-2009 гг. из популяций, населяющих равнинные степные, предгорные лесостепные и горно-таежные экотопы Алтайского края и Республики Алтай. ДНК выделялась из фрагментов недубленых шкур и засушенных внутренних органов с помощью наборов Diatom DNAPrep («Лаборатория Изоген», Москва). Анализ генетического полиморфизма проводился с помощью микросателлитных маркеров – кодоминантных ядерных локусов, содержащих короткие tandemные повторяющиеся последовательности. Разделение полученных в ходе полимеразной цепной реакции (ПЦР) аллелей, содержащих разное число повторов, велось с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Среди разработанных ранее для собак микросателлитных локусов нами были отобраны один пента- (2119) и пять тетрануклеотидных локусов (2054, 2062, 2137, 2140 и 2201), которые показали устойчивую ПЦР-амплификацию на образцах алтайского волка. Выбранные праймеры имеют одинаковую температуру отжига (58°C) и близкий диапазон длин ПЦР продукта (от 136 до 187 п.о.), что позволяет использовать их вместе при проведении ПЦР и облегчает электрофоретическое разделение ПЦР-продуктов на среднеформатных гелях. При анализе алтайского волка все локусы показали высокое аллельное разнообразие (5–18 аллелей на локус) и гетерозиготность. Максимальные значения микросателлитной гетерозиготности отмечены для предгорной лесостепной, а минимальные – для равнинной степной популяции. Многомерный анализ генетической дифференциации показал, что при ординации выборок в пространстве двух первых главных координат они кластеризуются в целом в соответствии с географическим происхождением. Таким образом, выбранные в качестве генетических маркеров микросателлитные локусы показали высокую эффективность в исследовании генетического полиморфизма географически близких, но различающихся экологией популяций волка и большой

потенциал подобных исследований с увеличением количества и объема выборок популяций и с расширением охвата ареала вида.

Автор выражает благодарность Д.В. Политову (лаб. популяционной генетики Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН) за предоставленную возможность проведения лабораторных исследований и помочь в подготовке тезисов, А.Я. Бондареву (Центр защиты леса по Алтайскому краю) за предоставленные образцы тканей волка и Ольге Александровне Леонтьевой (Географический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова) за ценные консультации. Работа поддержанна ФЦП «Научно-педагогические кадры инновационной России» (направление 1.1, Госконтракт 02.740.11.0281).

**Гельминты бурых лягушек (Ranidae, Anura) Южного Урала**  
**Давлетбакова Гульназ Мидхатовна** (Уфа, [gulnazdaw@mail.ru](mailto:gulnazdaw@mail.ru))

Амфибии, представляющие существенный компонент наземных и водных экосистем, являются важным звеном в цикле развития многих видов паразитов (Лукьянов и др., 2005). В связи с этим целью нашей работы явилось изучение гельминтов бесхвостых земноводных в южных районах Республики Башкортостан и Кувандыкском, Саракташском районах Оренбургской области. Изучение земноводных проводилось в 2007-2009 г.г. по методике неполного гельминтологического вскрытия (Скрябин, 1928). Всего было исследовано 140 экз. остромордых и 22 экз. травяных лягушек.

Остромордая лягушка оказалась носителем 9 видов паразитических червей из 2 классов: Trematoda – 5 видов (*Pneumonoeces variegatus*, *Opistoglyphe ranae*, *Pleurogenes claviger*, *Diplodiscus subclavatus*, *Gorgodrina vitelliloba*) и Nematoda – 4 видов (*Oswaldocruzia filiformis*, *Rhabdias bufonis*, *Aplectana acuminata*, *Neoxysomatum brevicaudatum*) (Рыжиков и др., 1980). Из них наиболее часто встречаются нематоды *O. filiformis* (70%) и *Rh. bufonis* (52,9%), несколько реже – trematоды *O. ranae* (25,7%) и *P. claviger* (20,7%). У травяной лягушки обнаружено 6 видов гельминтов, в том числе из класса Monogenea – 1 вид (*Polystoma integerrimum*), Trematoda – 2 вида (*P. variegatus*, *O. ranae*) и Nematoda – 3 вида (*O. filiformis*, *Rh. bufonis*, *N. brevicaudatum*) (Рыжиков и др., 1980). Среди паразитов этого вида амфибий доминирующими также оказались нематоды *O. filiformis* (36,3%) и *Rh. bufonis* (22,7%), субдоминантами trematоды *O. ranae* (18,2%) и *P. claviger* (13,7%), хотя показатели эктенсивности инвазии значительно ниже, чем у остромордой лягушки. Остальные виды гельминтов у бурых лягушек встречаются редко (меньше 11%).

Из общего количества видов паразитов 5 являются общими для бурых лягушек (индекс Жаккара ( $I$ ) равен 0,454). Ее основу в обоих случаях составляют нематоды. Из 4 видов нематод 3 являются общими для обоих видов лягушек. В целом фауна нематод бурых лягушек обладают значительным сходством ( $I=0,750$ ). Анализируя особенности trematодной инвазии, отметим, что у *Rana arvalis* более разнообразный видовой состав гельминтов этой группы, чем у *Rana temporaria*, что может быть обусловлено меньшим количеством исследованных особей травяной лягушки. Всего нами обнаружено 5 видов trematод у *R. arvalis* и 2 – у *R. temporaria*, причем последние являются общими для обоих видов. Доля общих видов trematод у бурых лягушек составляет  $I=0,400$ .

Таким образом, состав гельминтофауны остромордой и травяной лягушек сходен ( $I=0,454$ ), при этом по нематодам этот показатель выше (0,750), чем по trematодам (0,400). Причина этого – сходство экологии и биологии обоих видов амфибий.

**Состояние популяции европейской лесной кошки (*Felis silvestris caucasica*) в Северной Осетии**

**Дзуцев Заурбек Владимирович** (Владикавказ, [zaurr-dzucev@rambler.ru](mailto:zaurr-dzucev@rambler.ru))

Ещё недавно, в 50-е годы XX века, на территории нашей республики обитало 4 вида представителей семейства кошачьих. Передне-азиатский леопард (*Panthera pardus cis caucasica Satunin*), кавказский подвид рыси (*Felis lynx*), кошка камышовая или Хаус (*Felis chaus*), кавказский подвид лесной кошки (*Felis silvestris caucasica*). Последний экземпляр передне-азиатского леопарда был добыт на территории нашей республики в 1956 г. около селения Ларс. Численность кавказской рыси в настоящее время составляет

несколько десятков экземпляров. Кошка камышовая или Хаус практически исчезла. Единственный из семейства кошачьих (*Felidae*) кто ещё сохранил достаточную численность, является кавказский подвид Европейской лесной кошки, но и этому виду в настоящее время угрожает исчезновение. В силу резкого изменения экологической обстановки.

В 50-ые годы XX века на территории нашей республики по данным охот-инспекции ежегодно заготавливали до 500 шкурок этого вида кошачьих. В настоящее время этот подвид Лесной кошки внесён в Красную книгу России и Северной Осетии как вид, сокративший свой ареал и численность. По данным полевых исследований провидимых нами в течении 3 лет на территории нашей республики стало нам ясно и понятно что кавказский подвид лесного кота (*Felis silvestris caucasica*) в настоящее время имеет численность не более 150-200 особей. Подсчёт численности проводился нами методом тропления. На 7 постоянных маршрутах протяженностью по 5 км каждый, в осенне-зимние периоды, когда достоверность обнаружения животных по следам очень высока.

Наши наблюдения показали, что в настоящее время расселение лесного кота носит мозаичный характер. Отдельные более или менее стабильные популяции насчитывают не более 25-50 особей. Причём они отделены друг от друга безлесными пространствами, которые данный вид животных при расселении самостоятельно не может преодолевать. Всё это создаёт проблемы связанные с близкородственным скрещиванием. Если такое положение дел будет продолжаться дальше, то виду грозит вымирание.

С точки зрения биологии лесной кот является экологически сильным видом имеющим хорошую кормовую базу в виде многочисленных грызунов и птиц. Единственным лимитирующим фактором, сдерживающим рост численности вида, является сведение зарослей кустарников и деревьев в поймах рек предгорной части нашей республики, а так же фактор беспокойства, вызванный увеличением численности населения. *Хочу выразить слова благодарности своему научному руководителю Варзиеву Артуру Борисовичу.*

#### **Роль молекулярно-генетических методов в исследовании брачных связей животных**

*Доронина Лилия Олеговна (Москва, lilia\_doronina@mail.ru)*

Анализ изменения представлений о системе брачных связей у животных проведен на основании сравнения 45 работ о родственных связях, опубликованных в ведущих научных журналах в 2002-2009 гг., а также – классических обзорных статьях, написанных до внедрения в зоологическую практику молекулярно-генетических методов определения родства (Lack 1968, Kleiman 1977). Использованы журналы: Molecular Ecology, Behavioral Ecology, Journal of Mammalogy, Journal of Zoology, Ethology, Animal Behaviour, Canadian Journal of Zoology, Mammalian Biology, PNAS, Biological Journal of the Linnean Society, Journal of Animal Ecology, The Royal Society, Molecular Ecology and Sociobiology.

Благодаря новым методам исследования содержание понятий моно- и полигамии в биологии стало существенно меняться. Ранее описание системы брачных связей основывалось на визуальных наблюдениях за животными. Поскольку копуляция в естественных условиях обычно кратковременна и скрыта от наблюдателя, как основной признак моногамии использовали совместное выкармливание детенышней парой разнополых взрослых. Считалось, что это достаточно надежно отражает верность партнеров, а значит, и родство взрослых с выращиваемыми ими детенышами. Соответственно, противопоставление моногамии и разных форм полигамии было построено в основном на различиях в организации усилий по выращиванию детенышней.

Введение молекулярно-генетических методов открыло новые возможности для детального исследования родственных связей, в том числе между взрослыми и выращиваемыми ими детьми, и многие ранее принятые допущения оказались необоснованными.

Так, Лэк в 1968г считал, что 93% всех подсемейств воробьиных птиц моногамны, так как пара взрослых совместно выращивает птенцов, а случаи полигандрии неизвестны. Использование молекулярно-генетических методов показало, что моногамами в строгом смысле слова можно назвать лишь около 14% исследованных видов воробьиных, а среди оставшихся 86% широко распространена полигандрия. Таким образом, понятие моногамии

усложнилось. Оно стало включать в себя две составляющих: социальную моногамию – связь между парой взрослых при выращивании детенышней («social monogamy»), и генетическую моногамию – отсутствие внебрачных копуляций.

У млекопитающих моногамия встречается гораздо реже, чем у птиц. Считается, что она характерна примерно для 3% видов. Ревизия данных по брачным связям у млекопитающих показала, что у социальных моногамов скрытые формы политинии, полигандрии и промискуитета широко распространены, а уровень внебрачного отцовства выше, чем у птиц.

Таким образом, использование молекулярно-генетических методов дало в руки исследователя инструмент, позволяющий регистрировать ранее недоступные брачные взаимодействия. Картина организации репродуктивных связей очень усложнилась для эволюционных и экологических интерпретаций, но растущий поток статей показывает, что перед исследователями открылся новый фронт работ по изучению видовой специфики взаимозависимостей связей при спаривании, аффилиативных связей и связей при выращивании потомства.

#### **Данные повторных отловов бледной и береговой ласточек юга Центральной Сибири** *Евтихова Анастасия Николаевна (Красноярск, evtushka87@mail.ru)*

Кольцевание – один из основных методов изучения экологии и биологии птиц. Данные о повторных отловах позволяют получить такую важную информацию как продолжительность жизни, скорость жиронакопления, стадия жизненного цикла, продолжительность остановок на путях миграции, сроки миграции и т.д.

В работе представлены материалы кафедры охотничьего ресурсоведения и заповедного дела СФУ за многолетний период работ (1981-2006 гг.) а также результаты собственных исследований (2007-2009 гг.).

Массовое кольцевание ласточек на юге Центральной Сибири и Казахстане позволило установить, что миграция птиц данной таксономической группы на юге Центральной Сибири проходит совместно. Здесь на пролете встречены как бледные *Riparia diluta* Sharpe et Wyett, 1893, так и береговые *Riparia riparia* L., 1758 ласточки. На озере Сарбулак, Казахстан, повторно отловлены особи, окольцованные в колонии в окрестностях Красноярска (пос. Терентьево, о-в Татышева). Также получен прямой возврат с Чокпакского перевала. Примечательно, что весной 1983 г. на озере Сарбулак 17 и 21 мая (1984 и 1983 гг. соответственно) были окольцованы ласточки, повторно встреченные в июне (28.06.1985 г.) и июле (07.07.1983 г.) недалеко от Красноярска. Однако, уже на протяжении ряда лет прилет первых *R. diluta* в окрестностях города регистрируется нами 8-10 мая. Вероятно, сроки прилета могут быть拉伸ned более чем на две недели. В то же время, в летне-осенний период на ночевке на озере Сарбулак (21.07.1981 г.) окольцована особь, найденная в последующие годы на гнездовании недалеко от пос. Терентьево (28.06.1985 г.). Но, по нашим данным, отлет ласточек из окрестностей города идет во второй декаде августа. Так, в 2009 г. последние ласточки зарегистрированы нами 19 августа. Отмечено, что ласточки довольно долго могут пополнять свои жировые запасы перед продолжением миграции. На озере Хадын, Тыва, окольцованная особь *Riparia* sp. (15.07.1987 г.) была повторно отловлена там же через 23 дня (08.08.1987 г.). Молодая *R. diluta* с о. Татышева (окольцована 17.06.1983 г.) отловлена на Чокпакском перевале 12.09.1983 г. Данными повторного отлова установлено, что ласточки могут менять гнездовую колонию, при этом перемещаясь на значительные расстояния. Например, *R. diluta*, окольцованная в колонии в пос. Усть-Абакане (21.07.1984 г.), повторно отловлена в карьере в окрестностях пос. Терентьево (02.07.1986 г.), расположенного в более чем 250 км по прямой от места кольцевания. Отмечено, что птенцы также могут перемещаться на значительные расстояния. Так, нами окольцована молодая *R. diluta*, которая через несколько дней была отловлена в другой колонии, расположенной на расстоянии 10-15 км. Наибольший возраст ласточек в естественных условиях, зарегистрированный по нашим данным, составил более 4 лет.

*Автор выражает особую благодарность своему научному руководителю А.П. Савченко.*

## Регенерация грудных плавников у сенегальского многопёра

(*Polypterus senegalus* Cuvier)

Жоисикашили А.С., Никифорова А.И. (Москва, [jojichek@gmail.com](mailto:jojichek@gmail.com))

Известно, что некоторые виды рыб способны к регенерации парных и непарных плавников. Однако регенерация плавников рыб долгое время не была предметом систематического изучения, только относительно недавно подобные исследования были начаты на известном модельном объекте – *Danio rerio* Hamilton. В случае с *Danio*, в качестве модельной системы для изучения регенерации был выбран хвостовой плавник. По причине относительной простоты строения хвостового плавника, данная модель представляется ограниченной. В нашей работе в качестве объекта исследования регенерации был выбран – *Polypterus senegalus*, или сенегальский многопёр. Рыбы семейства *Polypteridae*, одни из древнейших представителей *Actinopterygii*, группы, к которой относится подавляющее большинство современных видов рыб. Ряд признаков отличает многопёров от типичных представителей *Actinopterygii*, в частности особое строение грудных плавников, сохранивших хорошо развитую мясистую лопасть. Именно грудные плавники многопёра, характеризующиеся сложной внутренней организацией, показались нам наиболее интересными с точки зрения изучения их возможной регенерации. Мы убедились, что грудные плавники многопёра регенерируют. Регенерация начинается с процесса эпителиализации раневой поверхности. Проследив за её дальнейшим ходом, мы пришли к заключению, что она проходит по типу эпиморфоза, и это согласуется с данными о регенерации плавников у других видов рыб. В этом случае, на раневой поверхности повреждённого органа, происходит формирование, так называемой регенерационной бластемы, которая впоследствии развивается в его утраченную часть. Формирование регенерационной бластемы мы наблюдали на 2–3 неделю регенерации. Последующая дифференцировка бластемы, первоначально имевшей коническую форму, привела к повторному формированию функционирующего грудного плавника, по внешней морфологии схожего с нормальным. Однако внутреннее строение регенераторов отличается от нормы. Грудной плавник многопёра состоит из мясистой и кожной лопасти, скелет последней представлен многочисленными костными лучами – лепидотрихиями. В норме скелет мясистой лопасти состоит из трёх базальных элементов, из которых центральный занимает её значительную часть, и ряда радиалий, являющихся основаниями для лепидотрихий. У регенераторов центральный базальный элемент не получает значительного развития, радиалии же формируются непропорционально вытянутыми, хотя, и в меньшем числе. Кроме того, если в норме радиалии представляют собой неветвящиеся одиночные лучи, то у регенераторов они часто выглядят как ветвящиеся структуры и могут соединяться между собой мостиками. Таким образом, при внешнем сходстве регенерата с нормальным грудным плавником, его внутреннее строение далеко от нормы, при этом, новая структура скелета восстановленного плавника дает возможность формировать в регенерате функционирующую хорошо развитую мясистую лопасть, характерную для грудного плавника многопёра.

## Морфологические гемиплазии и филогенетия птиц

Зеленков Никита Владимирович (Москва, [nikita.zelenkov@gmail.com](mailto:nikita.zelenkov@gmail.com))

Гемиплазия – понятие, введенное недавно для обозначения филогенетических процессов, приводящих к несоответствию деревьев, построенных по разным генам, с реальным организменным деревом. В результате таких процессов истинно гомологичные признаки выглядят как гомоплазии (т.е. трактуются как реверсии, параллелизмы или конвергенции). Несложная филогенетическая модель показывает, что понятие гемиплазий может быть применено и к морфологическим признакам. Для демонстрации возможности проявлений морфологических гемиплазий в кладистическом исследовании нами была создана модельная матрица с априори известными состояниями признаков у «живущих» и «предковых» таксонов. Кладистический анализ модельной матрицы при помощи программы PAUP демонстрирует, что таксоны, обладающие истинно гомологичными апоморфическими состояниями признаков, могут оказаться разнесенными на филогенетическом дереве,

создавая впечатление независимого приобретения апоморфий. Введение понятия гемиплазии объясняет противоречия в филогениях, построенных по различным морфологическим признакам.

Возможные примеры гемиплазий в эволюции птиц помогают объяснить кажущееся независимое проявление апоморфных признаков в достаточно отдаленных группах. Так, меловые и раннепалеогеновые гусеобразные *Presbyornithidae* имели высоко специализированный челюстной аппарат, сходный с таковым современных утиных, но сильно отличались от современных гусеобразных строением посткраниального скелета. Кладистический анализ гусеобразных и пресбиорнитид заставляет считать последних сестринской группой по отношению к современным анатидам; в таком случае примитивно устроенный посткраниальный скелет пресбиорнитид трактуется как вторично измененный. Однако проявление сходного челюстного аппарата у пресбиорнитид легче объяснить гемиплазией: подобная адаптация могла сформироваться у предков гусеобразных еще до формирования отряда в современном понимании, была утрачена при формировании *Anhimidae*, но унаследована современными *Anatinae* и *Anseranatidae*. Другие вероятные примеры гемиплазий в эволюции птиц: формирование специализированного летательного аппарата у колибри и палеогеновых стрижей *Jungornithidae*, а также формирование специфически устроенной зигодактильной лапы у продвинутых дятлообразных и сестринской группы воробьиных – палеогеновых *Zygodactylidae*.

#### **Гибридная популяция восточно-европейской и сибирской форм пеночки-теньковки (*Phylloscopus collybita abietinus*, *Ph.(c.) tristis*) в Архангельской области** **Комарова А.Ф., Шипилина Д.А. (Москва, komras@yandex.ru)**

Пеночку-теньковку (*Phylloscopus collybita*) в настоящее время рассматривают в качестве надвидового комплекса, состоящего не менее чем из 11 форм, обособившихся предположительно в эпоху последнего оледенения. Некоторые из этих форм образуют зоны вторичного контакта и гибридизации. Наличие зоны гибридизации между восточно-европейской *Ph. collybita abietinus* и сибирской теньковками *Ph.(c.)tristis* доказано нами на Южном Урале и до сих пор оставалось неизученным в других частях зоны симпатрии. Так в Пинежском заповеднике (Архангельская область) лишь в 2008 году впервые были получены аудиозаписи «смешанного» (включающего элементы песен одновременно сибирской и европейской форм) пения теньковки. Анализ морфологического и генетического разнообразия популяции ранее не производился.

Работа осуществлялась в период с 5 по 28 июня 2009 года. Мы записывали пение самцов теньковки в течение 5 минут, отлавливали птиц с помощью звуковой ловушки (всего поймано 53 особи), описывали морфологические признаки и брали пробу крови.

По морфологическим данным популяция крайне разнообразна, широко распространены как фенотипически «чистые» сибирские и восточно-европейские теньковки, так и особи с промежуточными признаками. Однако акустическое и генетическое разнообразие популяции напротив почти полностью представлено сибирскими особями. Только 3 птицы несут генотип восточно-европейского подвида, а «чистым» европейским пением не обладает ни одна из птиц.

Для изучения биотопических предпочтений теньковки было сделано 21 геоботаническое описание на пробных площадях размером 10 на 10 м. Теньковка предпочитает еловые леса, чаще всего она была встречена в ельниках черничных. Все встречи оказались приурочены к участкам ельников с выраженной оконной динамикой, групповым расположением подроста ели и другими особенностями, свидетельствующими о длительном существовании на этом участке леса без крупномасштабных нарушений (ветровалов, вырубок, пожаров). Другим подтверждением выявленного предпочтения теньковок является то, что при нанесении точек встреч теньковки на космический снимок Landsat ETM+ все точки оказались в участках, которые дешифруются как ельники. Пеночки нет в смешанных елово-березовых лесах, где береза превосходит по высоте ель; такие участки выглядят на снимке как березняки и, вероятно, являются следствием площадных нарушений. Теньковки располагают свои гнёзда на высоте около одного метра, поэтому наличие подроста свидетельствует об удобстве

участка леса для размножения, а присутствие окон в древостое и отдельно стоящих высоких деревьев подтверждает важность существования на гнездовой территории удобных песчаниковых постов самцов.

Результаты наших исследований доказывают существование в Пинежском заповеднике смешанной гибридной популяции сибирской и восточно-европейской тенековок. Статистически достоверных отличий в биотопических предпочтениях двух форм выявить не удалось. *Работа выполнена при поддержке гранта РFFI: 09-04-10099-к. Мы хотим выразить благодарность дирекции и сотрудникам Пинежского государственного природного заповедника и лично Светлане Юрьевне Рыковой. Мы также признательны Алексею Ионову за помощь в сборе материала и всестороннюю поддержку.*

### **Свойства каротиноидов плазмы крови птиц отряда воробьиных (Passeriformes)**

**Кутузов Н.П., Колганов А.С. (Москва, kutuzovnp@gmail.com)**

Известно, что количество и химическая природа каротиноидов крови птиц определяются значительным количеством физиологических процессов, протекающих в организме. Содержание этих веществ может меняться в зависимости от рациона, уровня стероидов в крови и других метаболических процессов. Существуют данные о том, что количество каротиноидов в крови также может варьировать в связи со сменой перьевого покрова птиц во время линьки. Кроме того, пол и возраст конкретной особи могут быть также определяющими факторами.

В рамках данной работы исследовалась кровь 7 видов птиц, принадлежащих к отряду Passeriformes (числа в скобках соответствуют количеству исследованных особей): зарянка *Erythacus rubecula* (13), певчий дрозд *Turdus philomelos* (3), черный дрозд *Turdus merula* (2), славка-черноголовка *Sylvia atricapilla* (6), большая синица *Parus major* (6), обыкновенная овсянка *Emberiza citrinella* (1), лесная завирушка *Prunella modularis* (2). Отлов проводили в течение двух месяцев (с сентября по октябрь) на территории Звенигородской биостанции МГУ. Для качественного определения содержания каротиноидов в крови, а также их химических свойств применялся метод спектроскопии комбинационного рассеяния. Данный метод позволяет определять относительное содержание каротиноидов в исследуемом образце, химическую структуру, а также свойства молекул, образующих их ближайшее окружение.

Результаты исследования показали, что существует разница в строении каротиноидов (длина углеводородного скелета) между различными видами птиц. Наименьшую длину углеводородной цепи имеют каротиноиды в крови черного дрозда. Наибольшей длиной характеризуются каротиноиды славки-черноголовки по сравнению с черным дроздом и большой синицей. Причиной подобных различий могут быть отличия в составе потребляемого корма. Среди исследованных птиц у лесной завирушки и славки-черноголовки обнаружены различия в параметре, отражающем вязкость окружения молекул каротиноидов, что может указывать на наличие разницы в строении липопротеидных комплексов, обеспечивающих их транспорт. Полученные результаты указывают на существование межвидовых различий в содержании каротиноидов в плазме крови птиц. Вероятно, причиной подобных расхождений могут служить как различия в количестве и составе корма, усвоенного птицей к моменту измерения, так и процессы, связанные с накоплением пигментов во время роста перьевого покрова.

### **О линьке тетерева в предзимний период на территории Центральной Сибири**

**Литвиненко Н.А., Савченко И.А. (Красноярск, finehunter2005@mail.ru)**

Линька – периодическое обновление перьевого покрова, которое имеет важное адаптивное значение в жизни птиц. Не случайно этому вопросу уделялось большое внимание еще в работах Н.А. Северцова, О. Хейрота, А.А. Войткевича и др., опубликованных в середине XIX – начале XX вв. Однако указанные работы в основном носили экспериментальный характер. Линька же у диких птиц по продолжительности, скорости протекания, половозрастным особенностям изучена далеко не полно. Накопление

таких сведений затруднено сложностью сбора материала непосредственно в природе. Не является исключением в этом плане и тетерев.

Материал для данного сообщения собирали в течение 2001–2009 гг. на территории Центральной, Ачинской и Южной групп районов Красноярского края. Общее количество обследованных птиц составило 100 экземпляров. Оценка линьки проведена по методике Британского орнитологического общества.

В сентябре у основной массы птиц (n=41) характерно присутствие начальных стадий линьки. Исключение составили только единичные самцы в возрасте двух-четырех лет. Доля пера, находящегося в заключительной 5-ой стадии даже в конце сентября не превышала 77,6%. В октябре, уже в первой декаде месяца (n=50) отмечено значительное уменьшение начальных стадий роста пера вплоть до их полного отсутствия, но они еще встречались практически на всех отделах тела у единичных молодых птиц и взрослых самок. В целом же наблюдается завершение линьки некоторых отделов тела. Среди части взрослых самцов и самок отмечено полное завершение линьки во второй декаде месяца. Такие ранние сроки смены оперения взрослых самок скорее всего связаны с неучастием этих птиц в размножении.

Окончание линьки у основной массы птиц происходит в третьей декаде октября – начале ноября, но единичные молодые особи (вероятно, из поздних выводков) со следами линьки встречались и в начале декабря. Завершение линьки полетных перьев происходит в первой–второй декадах октября в зависимости от пола и возраста птиц. Отдельные взрослые самцы завершают смену маховых и рулевых в течение сентября. Наиболее поздние сроки свойственны взрослым самкам, участвующим в размножении.

Особую благодарность за помощь в написание данной работы выражаем своему научному руководителю – д.б.н., профессору Александру Петровичу Савченко.

#### **Именчивость формы верхнего зубного ряда у виверровых (Carnivora, Viverridae)**

**Нанова Ольга Геннадьевна (Москва, nanova@mail.ru)**

Форма зубного ряда у хищных млекопитающих может сильно варьировать между близкими видами, между популяциями одного вида. Изучение изменчивости формы морфологических структур в настоящий момент доступно благодаря развитию мощного комплекса методов геометрической морфометрии. Эти методы позволяют исследовать изменчивость формы «в чистом виде», без относительного влияния размерной изменчивости. Задачей работы является исследование изменчивости формы зубного ряда в семействе виверровых (Viverridae). Эта группа представляет интерес, т.к. внутри нее предполагается существование глубоких морфологических параллелизмов, кроме того, систематика рода *Genetta* достаточно запутана.

Исследовано 140 черепов (Муз. Ест. Истории им. Гумбольдта, Берлин), определенных в коллекции как: *Genetta genetta*, *G. felina*, *G. maculata*, *G. servalina*, *G. angolensis*, *G. tigrina*, *Civettictis civetta*, *Viverra tangalunga*, *V. zibetha*, *Viverricula indica*, *Prionodon linsang*, *Poiana richardsoni*. Зубные ряды фотографировали, затем расставляли метки (16 меток на ряд); измеряли кондилобазальную длину (CBL) черепов. На совокупности координат меток расчитывали относительные деформации (RW), которые использовали как признаки. Провели дискриминантный и кластерный анализ. Использовали пакет программ TPS и Statistica 8.0.

Показано, что изменчивость формы зубного ряда в основных чертах соответствует принятой систематике виверровых. Генетты и виверры по форме зубного ряда образуют отдельные группы. *C. civetta*, ранее включаемая в род *Viverra*, хорошо отличается от представителей этого рода по форме зубного ряда. *P. linsang*, ныне выделяемый из виверрид (предполагается их конвергентное сходство), не отличается от генетт по RW1 и RW2 (берущих на себя наибольшую долю изменчивости), но хорошо отличается по RW3. *P. richardsoni*, близкая к роду *Genetta*, хорошо отличается от представителей этого рода по RW1. Среди генетт *G. genetta* из Испании четко отличается по форме зубного ряда от африканских представителей. Генетты Африки не различаются между собой. Этот результат может быть обусловлен как низкой межвидовой изменчивостью рассматриваемого признака

в роде, так и трудностями в определении представителей рода по внешним признакам. Показан высокий уровень корреляции между изменчивостью формы зубного ряда и изменчивостью размеров (CBL) на межвидовом уровне ( $R=0,73$ ,  $p<0,05$ ). На внутривидовом уровне корреляция во всех случаях недостоверна.

Работа выполнена при поддержке грантов ДААД 325, РФФИ № 09-04-00283-а. Я благодарна Павлинову И.Я., Лебедеву В.С., Фридеру Майеру.

### Пространственное размещение Соколообразных (Falconiformes) в Усинской котловине Западного Саяна

Рудовский Владислав Сергеевич (Москва, [pooteen@rambler.ru](mailto:pooteen@rambler.ru))

Усинская котловина длиной 70 км и средней шириной 8 км расположена в среднем течении реки Ус между хребтами Куртушибинский и Мирской на высоте около 650 м над уровнем моря.

Большую часть территории Усинской котловины занимают участки злаковых и разнотравно-злаковых степей, подвергшихся в той или иной степени пастбищной дигрессии. По окраинам котловины расположены лиственнично-берёзовые лесостепи. Склоны южной и юго-западной экспозиции представлены сообществами ксерофитов и петрофитов, а также участками ковыльных горных степей. Склоны северной и северо-восточной экспозиций покрыты лиственничниками, берёзово-лиственничными и берёзовыми лесами. Местами встречаются зарастающие вырубки и гари. Пойма реки Ус – чередование осоковых лугов, сырых березняков, ивняков и ольшаников, а также берёзово-лиственничных и сосновых лесов.

Работы по изучению пространственного распределения Соколообразных в Усинской котловине проводились в июне 2008 и в июне-июле 2009 годов. Было отмечено 15 видов дневных хищных птиц.

Наибольшее количество отмеченных видов хищных птиц приурочено к степным участкам котловины, на которых расположены крупные колонии сусликов и отмечается летом высокая численность насекомых (особенно прямокрылых и чешуекрылых). Здесь регулярно охотились орлы-карлики (*Hieraetus pennatus* Gmelin, 1788), могильники (*Aquila heliaca* Savigny, 1809), канюки (*Buteo buteo* L., 1758), зарегистрированы скопления чёрных коршунов (*Milvus migrans* Boddaert, 1783) (до 27 особей) пустельги (*Falco tinnunculus* L., 1758 и *F. naumanni* Fleischer, 1818) и луны (*Circus cyaneus* L., 1766), *C. pygargus* L., 1758 и *C. aeruginosus* L., 1758). В качестве отдельной охотничьей стации можно назвать село Усинское, где часто встречаются чёрные коршуны, а также наблюдалась охота орла-карлика на краю населённого пункта.

Самая ценная гнездовая стация для хищных птиц в Усинской котловине – пойменные сосновые, берёзово-лиственничные и берёзовые с присутствием лиственницы леса. Здесь отмечено гнездование тетеревятника (*Accipiter gentilis* L., 1758), мохноногого курганника (*Buteo hemilasius* Temminck et Schlegel, 1844), чёрного коршуна, канюка, перепелятника, орла-карлика и полевого луна. Основной гнездовой фонд в котловине формирует чёрный коршун, но он почти весь приурочен к пойме Уса. В горных и предгорных лиственничных и берёзово-лиственничных лесах гнезд обнаружено значительно меньше. Здесь гнездятся чёрный коршун, канюк, могильник, обыкновенная пустельга, чеглок (*Falco subbuteo* L., 1758) и, вероятно, орёл-карлик. На скалах в горном обрамлении Усинской котловины было отмечено гнездование мохноногого курганника, балобана (*Falco cherrug* J.E. Gray, 1834) и степной пустельги, а сапсан (*F. peregrinus* Tunstall, 1771), вероятно, гнездится на скалах в долине Уса и в ущельях его притоков.

Хочу поблагодарить О.А. Леонтьеву за помощь в оформлении работы и И.В. Карякина за предоставление некоторых данных по гнездованию хищных птиц, Н.А. Суранкову и Е.Л. Железную за участие в экспедициях. Также я признателен сотрудникам Саяно-Шушенского заповедника, НП "Шушенский бор" и жителям села Усинск Ольге и Ивану Фёдоровым за обеспечение комфортного проживания во время проведения полевых работ.

**Анализ распространения видового комплекса такырных круглоголовок  
*Phrynocephalus helioscopus* (Reptilia, Agamidae) с использованием ГИС-картирования  
Соловьев Е.Н., Поярков Н.А. (Москва, [anolis@yandex.ru](mailto:anolis@yandex.ru))**

Ареал видового комплекса такырных круглоголовок, включающего собственно такырную круглоголовку (*Phrynocephalus helioscopus*) и персидскую круглоголовку (*Ph. persicus*), довольно обширен: он простирается от Восточной Турции на западе до Монгольского Алтая на востоке и от юга Астраханской области и Южного Урала на севере до центральных областей Ирана на юге.

Недавно было показано, что оба вида имеют сложную генетическую структуру и представлены рядом значительно обособленных филогенетических линий, ряд из которых, возможно, представляют собой отдельные таксоны. Для уточнения ареала видового комплекса такырных круглоголовок в целом и выявленных филогенетических линий, была предпринята попытка ГИС-моделирования ареалов.

Для этого по данным литературы и коллекционным материалам крупнейших музеев было проанализировано более 600 локалитетов представителей комплекса, из них точную географическую привязку имело около 500. С использованием программы DIVA-GIS мы нанесли точки на карту и, применив алгоритм BIOCLIM, использующий климатические данные, построили вероятностные модели распространения такырных круглоголовок на территории Средней и Центральной Азии.

Построенные ареалы отражают фрагментированность и неоднородность структуры ареала видового комплекса, показывают возможность обнаружения круглоголовок в ряде районов, где ранее они не были отмечены, и естественные границы (например, северная и южная границы ареала). Кроме того, совместив на карте информацию о распространении круглоголовок комплекса с полученными ранее молекулярными можно наметить предполагаемые границы между разными филогенетическими линиями круглоголовок, что важно для понимания исторической биогеографии группы.

Таким образом, составление подробного кадастра локалитетов и использование ГИС с алгоритмами экологического моделирования может оказаться полезным не только для экологических исследований, но и в области филогеографии и внутривидовой систематики.

**К вопросу об изменении массы тела *Motacilla flava* L. в период миграций  
Темерова Виктория Леонидовна (Красноярск, [toritem@mail.ru](mailto:toritem@mail.ru))**

Желтая трясогузка (*Motacilla flava* L.) – группировка близкородственных форм и один из основных мигрантов Центральной Сибири. Ее территориальные связи остаются слабоизученными, так как число фактических данных кольцевания ограничено. Недостаточно изучена и экология вида в регионе. Все это объясняет особый интерес к исследованиям ее в составе палеарктической фауны.

Материалы для данного сообщения собирали при изучении миграций птиц Центральной Сибири с 1983 г., в результате чего была сформирована электронная база данных, включающая результаты наблюдений и отлова трясогузок. Птиц отлавливали паутинными сетями и большими переносными ловушками. Всего на территории Тувы окольцовано 4950 особей. В течение сезона масса тела трясогузок изменяется, что позволяет рассмотреть особенности этих изменений по отношению к исходной величине.

Из пойманных повторно 363 особей 70,2% составляли молодые птицы, 19,8% – взрослые самцы, 10% – взрослые самки. Средний интервал от первого до повторного отлова составил в среднем  $96 \pm 8$  часов. Среди взрослых желтых трясогузок низкой упитанности с массой тела менее 16,2 г у 70,1% птиц она возрастила от первого отлова к повторному, и лишь у 29,9% – уменьшалась. У упитанных птиц с массой тела более 16,2 г она уменьшалась у 64,3% птиц и возрастила – у 35,7%.

Сходная картина получена и для молодых особей. Сеголетки со средней массой тела 12,5–15,5 г. между первым и повторным отловами увеличивали массу тела, а те, масса которых при первом отлове была 15,5–19,5 г., уменьшали. У девяти особей, пойманных повторно в тот же день, масса тела снижалась в среднем на 0,2 г.

Ранее считалось, что причиной снижения массы тела служит отлов и связанный с ним стресс, снижающий эффективность питания и скорость жиронакопления птиц. Однако, по мнению Н.С.Чернецова (личное сообщение), основанному на результатах телеметрического слежения за воробьиными, «эффект отлова» обычно сохраняется не более 1–2 часов.

Таким образом, данные, полученные на свободно живущих в условиях континентальной Азии желтых трясогузках, показывают, что в миграционный период после прибытия в район остановки для них типично снижение массы тела, а её рост начинается лишь спустя несколько дней. Автор выражает признательность профессору д.б.н. А.П.Савченко за помощь в подготовке тезисов.

### **Популяции куньих (Mustelidae) Белозерского и Череповецкого районов Вологодской области**

**Цветкова Ю.Н., Хлопотина О.В., Сметкина Е.А. (Череповец, biologiacher@mail.ru)**

Изучение закономерностей изменения популяций животных актуально и имеет практическое значение для управления населением охотничих животных, к которым относятся большинство представителей семейства куньих. Исследование выполнено в 2005–2010гг. на 24 постоянных и 9 временных маршрутах. Общая протяженность маршрутов составила 210 км, всего пройдено 24220км.

Оценку обилия куньих вели с использованием линейного учета следов на снегу. Для изучения биотопического распределения и численности куньих проанализированы данные зимнего маршрутного учета (ЗМУ), выполненного охотниками. Для уточнения определения стадий многолетней динамики популяции хищных, выяснили динамику численности их жертв – мелких млекопитающих, которых учитывали методом ловушки – линий.

В результате исследования выявлены девять видов: обитатель лесов – кунница (*Martes martes* L.), обитатель экотонов – лесной хорь (*Putorius putorius* L.) и барсук (*Meles meles* L.), обитатели околоводных участков – американская (*Lutreola vison* Schreber) и европейская норки (*L. lutreola* L.) и речная выдра (*Lutra lutra* L.), обитатели разных биотопов – ласка (*Mustela nivalis* L.), горностай (*Mustela erminea* L.), росомаха (*Gulo gulo* L.). Фоновым видом является кунница, она доминирует во всех типах леса. В районе исследований её оптимальными биотопами являются смешанные и сосновые леса, где её относительное обилие составляло 3,1 и 1,6 следов/10км.

В Белозерском районе по данным ЗМУ максимальная численность хоря наблюдалась в 1986г., а горностая и кунницы в 1987г. По нашим данным максимальное обилие кунницы имело место в 2007г. (4 след/10км), ему предшествовал максимум численности хоря, норок и ласки в 2006г. (4,4;4,3 след/10км).

В Череповецком районе по данным ЗМУ максимальная численность хоря и горностая наблюдалась в 2002г., а кунницы в 2004г. По нашим данным максимум обилия кунницы и горностая пришелся на 2005 (1 и 0,8 след/10 км), 2007гг. (0,7 и 0,9 след/10км) и 2009г., после пиков численности грызунов в 2004, 2006, 2008гг., максимум численности норок, ласки и хоря в 2006 (0,7; 0,3 и 0,1 след/10км), 2008гг (1,5; 0,5 и 0,6 след/10км).

Таким образом, на исследуемых территориях с определенной отчетливостью подтвердилось правило, установленное в лесах Дальнего Востока Н.Я. Поддубной и Н.П. Коломийцевым: у видов с короткой латентной стадией в беременности год пика численности наступает в год пика численности мышевидных грызунов, а пик численности у видов с длительной паузой – на следующий год.

### **Околоводные виды Куньих Дарвинского биосферного заповедника и юго-востока Вологодской области**

**Шемякина Юлия Александровна (Череповец, julia\_chetaikina@mail.ru)**

Для рационального управления популяциями необходимо проводить их сравнительное изучение на охраняемых и опромышляемых территориях. Наша работа велась в 2007–2010 гг. на территории Дарвинского Биосферного заповедника и в Никольском районе, расположенному на юго-востоке Вологодской области. Обследовалось более 120 км речной сети 2 раза в год, где проводили учёт численности методом регистрации встречаемости

следов в расчёте на 10 км. Одновременно проводили сбор экскрементов, собрано более 360 образцов. Для выявления многолетней динамики популяций и распределения видов по биотопам проводили анкетирование охотников и анализ архивных материалов охотобществ и Дарвинского заповедника. Проанализированы Летописи Природы за 1946–2007 гг., карточки встреч выдры и норок (n=400), карточки специализированного учета околоводных млекопитающих (n=177). В заповеднике норки приурочены к небольшим рекам и ручьям. На крупных реках они держатся главным образом в их приусտевой части. Берег водохранилища неблагоприятен как для норок, так и для выдры, так как уровень водохранилища изменяется независимо от природных колебаний уровня воды. В 2009 г. относительное обилие норок в Центральном лесничестве заповедника было на высоком уровне – 5 следов/ 10 км. Минимальная следовая активность, 1 след/10 км, зарегистрирована на тех водоемах, где количество полыней составило 2/10 км, максимальная – 3/10 км. В большинстве случаев норки регулярно использовали лишь 100-200 м береговой линии. Обитание выдры установлено на более крупных реках и побережье Рыбинского водохранилища. За время существования заповедника с 1945 по 2009 численность выдры изменяется от 3 до 33 особей; относительное обилие – от 3 до 24 следов на маршрутах общей протяженностью 315 км. В Никольском районе население этих видов многочисленнее, так в 2008 г. выдры было учтено 202 особи, норок – 742. Максимальная численность отмечалась на р. Лундонге, где обилие экскрементов составило 120/10 км. На большинстве водоемов района в близком соседстве обитают норки европейская и американская, а также выдра. Р. Нюненга наиболее интересна, так как, несмотря на её относительно малую глубину и ширину, на ней обитает как выдра, так и норки при доминировании американской. Р. Каменка в зимний период из-за отсутствия доступа к воде неблагоприятна для жизни норок, вследствие чего они мигрируют в быстротекущую и незамерзающую зимой р. Нюненгу. Среди других куньих, совместно обитающих или заходящих к местам обитания выдры и норок, следует отметить ласку, горностая, хоря, особенно куницу. К сожалению, в последнее десятилетие реки района испытывают значительную антропогенную нагрузку в виде вырубок лесного массива вдоль берегов рек, что отражается как на всей экосистеме реки, так и на численности куньих. Если на опромыщляемой территории об обитании европейской норки можно судить по черепам и шкуркам добытых охотниками животных, то статус этого вида на территории заповедника в силу охранного режима неясен.

*Автор выражает искреннюю признательность своему научному руководителю к.б.н. Поддубной Надежде Яковлевне, а так же сотрудникам заповедника за предоставленную поддержку и возможность работы на территории заповедника.*

## ПОДСЕКЦИЯ «ИННОВАЦИИ В БИОЛОГИИ»

### Влияние фосфолипидных наночастиц на формирование скелета эмбрионов мышей *Алексеенко К.А., Рябцева М.С. (Волгоград, ksybenka@yandex.ru)*

Достоинства липосомальных наночастиц как носителей лекарств очевидны: полученные из природных фосфолипидов липосомы пригодны для включения в них многих фармакологических агентов, в том числе ферментов, гормонов, витаминов, антибиотиков, иммуномодуляторов и цитостатиков. Уникальной особенностью липосом является возможность доставки лекарственных средств внутрь клеток, с которыми они взаимодействуют путем слияния и эндоцитоза. В связи с этим, изучение вопросов потенциальных рисков их использования представляется первостепенной задачей. Целью данного исследования является изучение действия фосфолипидных наночастиц на формирование скелета мышей в период эмбриогенеза. Опыт проводился на беременных мышах линии СВА массой 19-21 г, которые были разделены на 2 группы: мыши, которым вводился 0,9% NaCl по 0,3 мл, и мыши, которым вводились фосфолипидные наночастицы в дозе 208 мг/мышь, растворённые в 0,9% NaCl, в том же объёме. Введение проводилось с 1 по 17 день беременности. На 17,5 день осуществлялась эвтаназия беременных мышей с последующим исследованием скелета плодов. После наружного осмотра и морфометрических измерений плоды использовали для изучения костного скелета по методике Доусона, модифицированной в отделе эмбриологии НИИЭМ РАМН. В ходе исследования было выявлено, что введение фосфолипидных наночастиц в дозе 208 мг/мышь с 1-го по 17-й день беременности сопровождается увеличенным количеством центров оссификации в экспериментальной группе по сравнению с контрольной ( $p<0,05$  с использованием  $t$ -критерия Стьюдента). Причём преобладания увеличения центров оссификации в отдельных частях скелета по сравнению с другими выявлено не было. Наличие повышенного числа центров оссификации свидетельствует об общей задержке развития скелета эмбрионов, так как центры оссификации в данном случае ещё не слились. Что в свою очередь можно рассматривать как проявление системного токсического действия на эмбриогенез.

### Очистка сточных вод с использованием фильтровальных материалов с переменной пористой структурой

*Кондратьева А.С., Чарочкин А.А. (Городище, liuba.novikova@yandex.ru)*

Очистка сточных вод с использованием фильтровальных материалов с переменной поровой структурой. В настоящее время все чаще возникает проблема очистки сточных вод от углеводородных соединений. Нефтеперерабатывающие заводы, автозаправочные станции, станции нефтепролива и т.д. – это лишь малая часть перечня предприятий загрязняющих воду нефтьми и углеводородными соединениями.

Для решения этой проблемы я предлагаю использование фильтровальных материалов для очистки жидкости в химической, нефтехимической, автомобильной и других отраслях промышленности. Материал состоит из синтетических нитей в виде трубчатого трикотажа с размещенной внутри резиновой крошкой с размером 1,5–3,2 мм, предварительно обработанной озона–воздушной смесью, при этом внутри трубчатого трикотажа дополнительно размещена эбонитовая крошка размером 2,8–4,0 мм, причем объемное соотношение между резиновой и эбонитовой крошкой составляет 5:1. Техническим результатом является повышение качества материала и повышение степени очистки от нефтепродуктов ливневых и промышленных стоков и от частиц тяжелых металлов при использовании данного материала.

По результатам исследований и проведения опытов было выяснено, что удельная производительность процесса фильтрования незначительно возрастает, улучшается качество фильтрования и степень поглощения нефтепродуктов за счет набухания резиновой крошки. Это свидетельствует тому что данный материал может быть использован в химической, нефтехимической, машиностроительной, автомобильной и других отраслях

промышленности, использующих фильтровальные материалы в экологических процессах очистки сточных вод и промышленных газов, а также для сбора нефтепродуктов.

### **Повышение эффективности культивирования ценных видов тихоокеанских лососевых рыб на основе феномена послерестового выживания**

**Маркевич Г.Н., Ивашик Е.Г. (Москва, g-markovich@yandex.ru)**

Снижение запасов морских рыбных ресурсов делает актуальным освоение небольших не использовавшихся ранее внутренних водёмов и создание объектов рыбохозяйственной деятельности на их основе. Особо перспективными для промыслового освоения на Дальнем Востоке являются малоиспользуемые в рыбном хозяйстве озерные формы тихоокеанских лососей рода *Oncorhynchus*. В целом, лососевые рыбы отличаются значительной экологической пластичностью и реализуют самые разнообразные жизненные стратегии. Среди *Oncorhynchus* наиболее распространенной является проходная жизненная стратегия, но в отдельных случаях, может реализоваться и жилая – когда весь цикл от рождения до нереста и смерти проходит в пресных водах. Известно, что как проходные, так и жилые тихоокеанские лососи не выживают после нереста, что связано с реализацией запограммированной гибели. Нами было описано и детально изучено явление послерестового выживания у озёрной формы нерки (*Oncorhynchus nerka* Walb.) в небольших пресноводных озерах Камчатского полуострова. Целью исследования была оценка возможности применения стратегии образования постпроизводителей озёрной формы нерки в рыбном хозяйстве.

Постпроизводители были найдены в озерах с моновидовой ихтиофауной. Морфометрия выявила достоверные отличия постпроизводителей от донерестовых рыб. Постпроизводители были в 2-2,5 раза крупнее, чем донерестовые рыбы. Анализ регистрирующих структур (чешуя, отолиты) показал, что их возраст составляет 5-7 лет. Гистологическое исследование структуры половых желёз показало наличие запустелых фолликулов и семенных ампул, однозначно свидетельствующих о прошедшем нересте, при этом признаки повторного созревания не обнаружены. Расчет темпов роста постпроизводителей выявил, что основной рост приходился на период жизни после нереста. Сравнительный анализ питания показал, что в летний период у донерестовых рыб и постпроизводителей оно было сходно, что связано с наличием общедоступных кормов. Отличие в темпах роста можно объяснить различиями в рационе в осенне-зимний период, когда в условиях моновидовой ихтиофауны единственным имеющимся источником пищи является разновозрастная молодь того же вида. Таким образом, основным фактором, определяющим дальнейший быстрый рост, представляется наличие избытка кормовых объектов, которые по своим линейным размерам являются доступными для поедания более крупными рыбами. Хищный образ жизни подтверждается наличием у рыб постпроизводителей характерных морфологических признаков: крупный размер головы, прогонистая форма тела.

Полученные данные являются основой для разработки эффективной организации моновидовых лососевых рыбных хозяйств. Постпроизводители будут выполнять роль хищника, регулирующего численность, и быстро расти на высококалорийных кормах. Так как они не являются частью нерестового стада, их вылов не будет влиять на воспроизведение. Авторы выражают глубокую признательность д.б.н. Савваишовой Ксении Александровне и д.б.н. Воронежской Елене Евгеньевне за неоцененную помощь в работе и подготовке тезисов. Работа была поддержана грантом Федерального агентства по науке и инновациям МК-3637.2009.4.

### **Применение принципов экологической инженерии для решения проблемы обезвреживания сточных вод малых населенных пунктов**

**Сивкова Елена Евгеньевна (Томск, sivelen@yandex.ru)**

Малые населенные пункты, как правило, не имеют финансовой возможности построить типовые очистные сооружения для обезвреживания собственных сточных вод, к тому же низкая температура и крайне неравномерное поступление стоков не позволяет достичь

высокой эффективности их очистки стандартными методами. В настоящее время существует единственная технология, способная экономически и экологически эффективно решить проблему обезвреживания сточных вод малых поселений. Это одно из практических приложения экологической инженерии – технология «constructed wetlands», метод создания искусственных болот как систем очистки сточных вод. Данная технология работает в полном соответствии с основными принципами экологической инженерии: обезвреживание стоков здесь происходит благодаря естественным процессам самоочищения, протекающим в водных экосистемах; главный источник движущей энергии также естественный (энергия солнца, гравитация). Технология «constructed wetlands» уже выше 40 используется во многих регионах мира, единственным белым пятном остается территория СНГ и в частности Россия. Причин тому несколько, одна из главных – жесткие климатические условия большей части территорий, которые требует особого подхода к конструированию сооружений очистки сточных вод «constructed wetlands». Цель нашей работы – создание методической основы инженерных расчетов для очистных сооружений типа «constructed wetlands» для северных регионов России.

Программа исследований осуществляется на базе очистных сооружений с. Корнилово Томской области, которые были модернизированы с созданием трех фитокарт в биоинженерную систему очистки. Основные направления исследований – разработка энергонезависимых технологических решений, необходимых в работе очистных сооружений, и оптимизация функционирования систем «constructed wetlands», особенно в зимний период. На данном этапе разработки по первому направлению предложено и эффективно опробовано устройство стабилизации потока неравномерно поступающих сточных вод, с применением этого устройства также осуществляется определение расхода стоков без специального оборудования. Так же по данному направлению была разработана гидравлическая схема движения сточных вод по фитокартам, обеспечивающая максимальный контакт загрязненных вод с агентами очистки (фильтрующая загрузка, корневая зона водных растений). По второму направлению исследований осенью 2009 года был составлен, а позже отработан, план перевода фитокарт очистной системы в зимний режим функционирования, при котором стало возможно минимизировать влияния на качество очистки стоков сезонных переменных.

В дальнейшем завершение двухлетних исследовательских, мониторинговых работ и опытно-промышленных испытаний обозначенной энерго- и ресурсосберегающей технологии позволит пройти процедуру ее сертификации, что будет способствовать широкомасштабному внедрению данного метода для решения проблемы обезвреживания сточных вод малодебетных источников.

### **Перспективы использования одорант-связывающих белков комплекса MUP для создания онкочипов нового поколения**

**Федорова Е.М., Ермакова И.И., Пицик Е.В.** (Санкт-Петербург, *ellen\_fedorova@mail.ru*)

Ранняя диагностика онкологических заболеваний и поиск чувствительных молекулярных биомаркеров является одним из наиболее актуальных и быстро развивающихся направлений экспериментальной и клинической медицины. Возможность использования одорант-связывающих белков комплекса MUP (major urinary proteins) в качестве чувствительных маркеров опухолевого роста была впервые показана более 20 лет назад при изучении химического гепатоканцерогенеза у лабораторных мышей. Белки MUPs, кодируемые кластером генов *Mup*, относятся к семейству липокалинов и играют ключевую роль в процессах химической коммуникации у мышей: они переносят гидрофобные биологически активные соединения (гормоны, феромоны, жирорастворимые витамины) в гидрофильных средах, а также сами кодируют индивидуальные характеристики животного. В ходе исследований одорант-связывающих белков комплекса MUP и их роли в формировании обонятельного кода мы впервые показали, что в основе селективной детекции (считывания) комплекса химических соединений могут лежать матричные принципы. Мы предлагаем использовать эти принципы для создания высокочувствительных биосенсоров нового поколения.

Мы предполагаем, что наблюдаемое резкое снижение дифференциальной экспрессии генов кластера *Mirp* при гепатоканцерогенезе может быть непосредственно связано с нарушением коммуникации с помощью MUPs между здоровыми и малигнизированными гепатоцитами. На основании этой системы взаимодействия возможно создание как эффективных детекторов опухолевых маркеров для ранней диагностики рака печени (онкочипов), так и новой группы векторов на основе рекомбинантных белков (гMUPs) для адресной доставки к раковой клетке терапевтических агентов. Наибольшие перспективы в плане создания подобных лекарственных комплексов на полимерной основе в настоящее время могут представлять пиразины. Структурно-функциональная гетерогенность белков комплекса MUP и дифференциальный характер связывания низкомолекулярных лигандов с различными изоформами MUPs создают необходимые предпосылки для разработки высокочувствительных и селективных онкочипов нового поколения на полимерной матрице одорант-связывающих белков комплекса MUP. В докладе подробно представлена схема практической реализации проекта.

*Авторы выражают признательность д.б.н. Новикову С.Н. за помощь в подготовке тезисов.*

**Использование морских беспозвоночных в качестве модельных объектов  
для тестирования биологически активных веществ**

**Фофанова Елизавета Геннадьевна (Москва, lizchenbio@mail.ru)**

Одной из задач современной фармакологии является быстрая оценка физиологических эффектов большого количества синтезируемых и выделяемых биологически активных веществ. В связи с этим становится актуальным поиск адекватных моделей для их быстрого тестирования. Беспозвоночные животные давно и с успехом используются в качестве модельных объектов для изучения базовых механизмов различных физиологических процессов. Они обладают такими преимуществами, как короткий жизненный цикл, легкость содержания в культуре, относительно просто устроенные органы и проявления поведения. В дополнение к этому, морские беспозвоночные, представителем которых является архиannelida *Dinophilus gyroculatus*, не имеют твердых покровов и хорошо проникаемы для любых водорастворимых веществ. Целью нашей работы было определение возможности использования *D. gyroculatus* как модельной системы для оценки действия физиологически активных веществ. Парааминобензойная кислота (ПАБК) и панавир были выбраны как вещества широкого фармакологического профиля, являющиеся регуляторами ферментативной активности, водно-солевого баланса, размножения клеток, антиоксиданты. Оценивались изменения в продолжительности фаз жизненного цикла, репродуктивности и продолжительности жизни *D. gyroculatus*.

Наблюдения за культурой велись в течение двух лет и ежедневные наблюдения за отдельными особями, кладками и группами особей из одной кладки в течение 6 месяцев. Подсчитывалось количество отложенных кладок и число яиц в кладке. В норме жизненный цикл от зиготы до откладки первых коконов происходит за 11–12 дней. Период эмбрионального развития в норме составляет 4–5 дней. При индивидуальном содержании первые кладки появляются на шестой день после вылупления и содержат 1–2 яйца. В среднем каждая особь откладывает по кладке в день. Количество яиц в кладке варьирует от 1 до 9, причем среднее соотношение больших яиц (будущие самки) и маленьких (карликовые самцы) составляет 3:1. Продолжительность жизни червей составляет 1,5–2 месяца. ПАБК или панавир добавлялись в среду обитания в соответствующих фармакологически активных концентрациях. Анализ полученных данных показал, что продолжительность эмбрионального развития и период до полового созревания не изменяются. Максимальная продолжительность жизни не изменяется, однако отмечается увеличение средней продолжительности жизни. Статистически достоверным оказалось увеличение плодовитости (общее число отложенных яиц и частота откладки коконов каждой самкой) в обоих исследованных веществах.

Результаты исследований показали, что оба вещества оказывают влияние на общее физиологическое состояние *D. gyroculatus*. Таким образом, данная модель является

перспективной для использования в качестве тест-системы для оценки физиологических эффектов биологически активных веществ.

*Работа поддержанна грантом РФФИ 09-04-01-326. Автор сердечно благодарит д.б.н. Воронежскую Елену Евгеньевну и коллегу Ивашина Евгения Геннадьевича за неоценимый вклад в подготовке тезисов и чуткое руководство в выполнении работы.*

**Новый способ диагностики онкозаболеваний у животных**  
**Янковский Георгий Маркович (Москва, gyankovskii@mail.ru)**

Разработанный метод позволяет диагностировать развитие онкозаболеваний различных этиологий у животных, в том числе на ранних стадиях, генерализацию опухолевого процесса, развитие процесса метастазирования. Метод является универсальным, простым в исполнении, обладает высокой чувствительностью и специфичностью (более 90%).

С помощью лазерной корреляционной спектроскопии и последующей математической обработки лазерных корреляционных спектров получают данные о размере ингредиентов сыворотки крови животного в интервале от 8 до 10000 нм.

Диагностическим критерием служит наличие в сыворотке крови онкобольных животных молекулярных комплексов размерами порядка 600–8000 нм, устойчивых к воздействию специальной обработки, в то время как в сыворотке крови здоровых животных размер компонентов составляет порядка 8–80 нм.

Кроме диагностики онкозаболеваний, представленный метод может быть эффективно использован для интегральной оценки состояния организма. Например, распределение компонентов сыворотки крови собаки с симптомами пищевой аллергии, по сравнению с эталонным имеет отклонения, наблюдаются молекулярные компоненты сыворотки крови с размерами вплоть до 500 нм.

После подбора и соблюдения гипоаллергенной диеты состав сыворотки крови собаки вернулся практически к эталонному. Таким образом, метод может быть эффективно использован в ветеринарной диагностике как для выявления онкозаболеваний, так и для контроля эффективности лечения, оценки общего состояния организма животного.

## ПОДСЕКЦИЯ «МИКОЛОГИЯ И АЛЬГОЛОГИЯ»

### Сравнительная оценка методов изучения биологического разнообразия миксомицетов Гмошинский Владимир Иванович (Москва, rubisco@list.ru)

За последние 70 лет значительный прогресс в области исследования биоразнообразия миксомицетов был достигнут благодаря повсеместному использованию метода «влажной камеры». Этот метод позволяет получать в лабораторных условиях культуры миксомицетов и выявлять виды, которые практически невозможно обнаружить в ходе полевых сборов вследствие их малого размера, эфемерности спороношений, сезонного развития и ряда других причин. Этот метод продемонстрировал хорошие результаты как при исследованиях, проведенных в экстремальных условиях обитания (пустыни и тундры), так и в регионах с умеренным климатом. Однако у этого метода существует ряд недостатков. Основным из которых является то, что некоторые виды, легко обнаруживаемые в ходе полевых сборов, этим методом не выявляются.

Задачей нашего исследования явилось установление для Москвы и Московской области видов миксомицетов, которые были выявлены а) только при помощи полевых сборов (72); б) только методом «влажной камеры» (24); в) этими методами совместно (51). Таким образом, для территории Москвы и Московской области в настоящий момент отмечено 147 видов миксомицетов. Исследования были проведены на основании изучения около двух тысяч образцов из гербария кафедры Микологии и альгологии МГУ и литературных источников. Полученные данные свидетельствуют о необходимости совместного использования методов «влажной камеры» и полевых сборов.

### Спектр антимикробной активности микромицетов Бурятии Дарханова Татьяна Андреевна (Москва, tadar@yandex.ru)

При скрининге биологически активных соединений в качестве потенциальных продуцентов особый интерес представляют микроорганизмы из мало исследованных, экологически чистых районов. В связи с этим, целью нашей работы стало изучение спектра противомикробной активности микроскопических грибов, выделенных из почв и смежных с ней субстратов (растительные остатки, мох, навоз и др.), собранных на территории Заиграевского и Прибайкальского районов р. Бурятия.

Наличие антибиотической активности определяли в культуральной жидкости и в ацетоновом экстракте из мицелия методом диффузии в агар в отношении следующих микроорганизмов: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA – Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*), *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *B. cereus* var. *mycoides*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Aspergillus niger* 137a, эталонный штамм *Candida albicans* CBS 8836 и клинические изоляты: *C. albicans* 616, *C. krusei* 600M, *C. krusei* 32/1.

Исследовано 56 штаммов почвенных микромицетов, у 34 из них (61%) выявлена умеренная антибиотическая активность. Большинство из изученных грибов проявило активность в отношении грамположительных бактерий. Наибольший интерес из них представляют штаммы, проявившие избирательность в подавлении роста *S. aureus* ATCC 29213 и *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA): *Penicillium chrysogenum* 28a, *P. restrictum* 50, *Gamsyella gephryopaga* 47, *Arthrobotrys superba* 32a, *Humicola grisea* 17, *Ulocladium atrum* 18. Штаммы №17 и №18, проявили также и антигрибную активность. Отобран штамм *Beauveria bassiana* 37, у которого отмечена избирательная активность в отношении грамотрицательной бактерии *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Отобраны штаммы, продуцирующие вещества, подавляющие *A. niger* 137a, также штаммы *Tolypocladium inflatum* 2 и *T. microsporum* 5, ингибирующие рост как *Candida albicans* CBS 8836, так и клинического штамма *C. krusei* 600M. Следует отметить, что ранее нами была показана, способность образовывать циклоспорины штаммом *Tolypocladium inflatum* 2.

Скрининг продуцентов антибиотиков среди микромицетов Бурятии позволил отобрать грибные культуры, обладающие широким спектром антимикробной активности, а также активные в отношении метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus* и клинического

изолята *Candida krusei*. Полученные данные представляют интерес как возможность отбора новых продуцентов антибиотиков и фармакологически активных соединений, а также как характеристика биоразнообразия грибов.

**Выявление механизмов устойчивости вида *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson  
к радионуклидному загрязнению среды**

*Егорова Анна Сергеевна (Москва, AS.Egorova@gmail.com)*

Микроскопические грибы обладают высоким приспособительным потенциалом по отношению к различным экстремальным воздействиям техногенного происхождения. Об этом свидетельствует большоеколичество видов микроскопических грибов, обнаруженных в зоне отчуждения ЧАЭС. Действие ионизирующего излучения обычно приводит к окислительному стрессу и повышению уровня кислородных радикалов внутри клетки. Ферментативные и неферментативные механизмы антиоксидантной (АО) защиты позволяют клеткам выживать в условиях стресса путем обезвреживания активных форм кислорода (АФК) и/или снижения содержания внутриклеточных АФК.

Целью нашей работы было выявление механизмов устойчивости к окислительному стрессу штаммов *P.lilacinus*, наиболее распространенных, наряду с другими видами, в местах высокого радиоактивного загрязнения.

Рассмотренный нами вид является эвритопным (т.е. обладающим широким диапазоном экологической выносливости) представителем несовершенных грибов. Его выделяют как из ненарушенных природных местообитаний, так и из подверженных различным антропогенным нагрузкам (городскому использованию, загрязнениям тяжелыми металлами и нефтью, а также радиоактивному заражению). Для изучения нами были выбран ряд штаммов, выделенных из почв зоны отчуждения ЧАЭС, контролем послужили штаммы из ненарушенных почв.

В ходе работы мы определяли радиальные скорости роста колоний выбранных штаммов, антиоксидантные защитные ферментативные системы (активность супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы) и содержание карбонильных групп в белках, как основного маркёра окислительного стресса. Устойчивость к окислительному стрессу выявляли путём исследования реакций растущих культур на обработку 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в течение одного часа.

У штаммов, выделенных из зоны отчуждения ЧАЭС, было обнаружена тенденция к увеличению радиальной скорости роста при низких (0,1-0,2%) концентрациях глюкозы в среде по сравнению со штаммами из ненарушенных почв. Нами было установлено, что при росте на полноценной среде (2% глюкозы) содержание карбонильных групп в белках мицелия рассмотренных штаммов было ниже, чем при углеродном голодании (0,002% глюкозы). Реакция на окислительный стресс после обработки H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> у рассмотренных штаммов различалась и не зависела от исходного местообитания. По изменению содержания карбонильных групп в белках штаммы из радиоактивных зон проявили большую устойчивость к окислительному стрессу. Было выявлено наличие пигментов этилацетатной фракции, а также остаточных пигментов щелочной фракции (меланинов) как у штаммов *P.lilacinus*, выделенных из чернобыльской зоны, так и из фоновых местообитаний. Исследование разнообразных систем АО-защиты у *P.lilacinus* показало их штаммовую специфичность и отсутствие зависимости от исходного местообитания.

*Исследования поддержаны грантом РФФИ 08-04-01833.*

**Макромицеты осинников Минусинского района Красноярского края  
Заузолкова Наталья Андреевна (Абакан, Nata1132@yandex.ru)**

Исследования видового состава макромицетов проводились нами в различных типах осинников на территории Минусинского района. Эта территория располагается в центре Минусинской котловины. Район исследования находится в зоне лесостепи. Сбор грибов осуществлялся в течение нескольких лет на заложенных учетных площадках, с конца апреля и до середины октября. Промежутки между сборами составляли 2-3 недели. На исследуемой территории было выявлено 257 видов грибов – макромицетов, принадлежащих к 95 родам, 39 семействам, 18 порядкам и 2 классам. Таксономический анализ биоты макромицетов

выявил, что наиболее крупными порядками на исследуемой территории являются *Agaricales* (41вид), *Porales* (25), *Stereales* (20). Ведущими семействами являются *Tricholomataceae* (23 вида), *Coriaceae* (14), *Corticaceae* (11). Наибольшее число видов насчитывают такие рода как *Marasmius*, *Mycena*, *Russula*, *Corticium*. В целом таксономическая структура характеризуется высоким преобладанием базидиальных грибов.

Встречаемость видов в различных типах осинников достаточно разнообразна. Наиболее широко распространенными здесь видами являются *Polyporus badius* (Pers.) Schwein., *Trametes hirsuta* (Wulff) Lloyd, *Bjerkandera adusta* (Wild. ex. Fr.) P. Karst., *Phellinus tremulae* (Bond.) Bond., *Ganoderma applanatum* (Pers. Ex Wallr.) Pat., *Marasmius androsaceus* (Fr.) Fr. и другие. Так же имеются виды найденные в единичном экземпляре, такие как *Eocronartium muscicola* (Fr.) Fitz., *Macrotyphula fistulosa* (Holmsk.) R.H. Petersen. Были найдены виды занесенные в Красную книгу Красноярского края – *Langemannia gigantea* (Pers.) Rostk., *Hericium coralloides* (Scop.: Fr.) Pers.

Трофическая структура макромицетов представлена 10 трофическими группами. Ведущее положение занимает группа сапротрофов на древесине (Le), она составляет 60%, к этой группе принадлежат представители таких родов как *Oxyporus*, *Crepidotus*, *Stereum*, *Daedaleopsis*, *Auriculariopsis* и другие. В таксономической структуре ксилотрофных макромицетов преобладают грибы из семейств *Polyporaceae*, *Corticaceae*, *Poraceae*, *Peniophoraceae*. Микоризообразователи (Mg) составляют 21%, это в основном представители родов *Mycena*, *Russula*, *Geastrum*. Список подстилочных сапротрофов (St) – 7% составляют виды семейства *Tricholomataceae* из родов *Mycena*, *Collybia*. 5% видов составляют сапротрофы на гумусе, герботрофы (He) составляют – 2%. 1% – 1 вид бриотрофы (Br) – *Eocronartium muscicola* (Fr.) Fitz.

Вклад в биоту макромицетов остальных трофических групп, составляющих в сумме 6% невелик и ограничивается 1–5 видами. В ходе исследования были выделены 5 сезонных аспектов появления грибов: весенний, раннелетний, летний, осенний и позднеосенний. На данной территории хозяйственно – ценные являются около 32 видов (съедобные – 15, а условно-съедобные – 17). В осинниках исследуемой территории выявлено 17 видов макромицетов, обладающих фармакологической активностью.

### **Окисление модельных органических соединений культуральной жидкостью гриба *Pleurotus ostreatus***

**Зеленый Ю.М., Морозова Е.Д. (Белоруссия, Минск, zima-vkl@mail.ru)**

Объектом наших исследований стала культуральная жидкость (КЖ) гриба белой гнили *Pleurotus ostreatus*. Этот гриб способен разрушать лигниногеллюлозный комплекс, входящий в состав древесины, благодаря выбросу в окружающую среду 2 классов ферментов – оксидаз и пероксидаз. Эти ферменты обладают широкой субстратной специфичностью и могут разрушать не только высокоустойчивый к биодеградации лигнин, но и стойкие органические загрязнители (СОЗы), представляющие угрозу для окружающей среды. Целью нашей работы явилось изучение природы окислительных свойств культуральной жидкости гриба *Pleurotus ostreatus*.

Мицелий выращивали в глубинной культуре в течение 7 дней при постоянном перемешивании и температуре 26°C. КЖ отделяли фильтрованием через нейлоновую ткань. В качестве модельных органических соединений использовали 0,1% растворы диметоксиленола (ДМФ), ABTS и трипанового синего (ТС) в Na-ацетатном буфере. Определение активности содержащихся в КЖ оксидаз проводили без каких-либо дополнительных условий. Для определения активности содержащихся в КЖ пероксидаз к реакционной смеси дополнительно добавляли 20 мкл 100мМ  $H_2O_2$ .

При исследовании активности оксидаз было отмечено появление красно-оранжевого окрашивания ДМФ при взаимодействии с КЖ, что свидетельствовало о его окислении с образованием димера. Изменение окраски ABTS до бриллиантового зеленого свидетельствовало о его окислении с образованием окрашенного катиона. Обесцвечивание раствора ТС свидетельствовало о расщеплении его молекулы. Доказательством того, что наблюдаемые изменения являются следствием работы оксидаз, стало уменьшение

концентрации кислорода в реакционной смеси: для реакции с ДМФ – на  $3,2 \pm 0,2$  нмоль/мл, для АВТС –  $2,5 \pm 0,3$  нмоль/мл для ТС –  $3,1 \pm 0,2$  нмоль/мл. Среди внеклеточных пероксидаз грибов белой гнили основной является марганец-пероксидаза (МП), поэтому изучение пероксидазной активности проводили в присутствии  $MnSO_4$ . Изменения окраски растворов субстратов шли в том же направлении, что и в случае с оксидазами, но интенсивность приобретаемой окраски и скорость реакции была значительно ниже. Это может объясняться многостадийным механизмом окисления, характерным для пероксидаз в отличие от прямых механизмов, характерных для оксидаз. Для подтверждения присутствия в исследуемой КЖ именно МП мы провели тест на образование  $Mn^{3+}$ -малонатового комплекса: в течение 1 мин оптическая плотность реакционной смеси при 270 нм увеличилась на 1,13 о.е. Это свидетельствовало об образовании  $Mn^{3+}$ -малонатового комплекса. Таким образом, КЖ *Pleurotus ostreatus* способна окислять различные ароматические соединения по структуре напоминающие лигнин и СОЗы.

### Перспективы практического использования микромицетов карстовых пещер Средней Сибири

*Ильинец И.Р., Нестеренко Е.В. (Красноярск, safina-ir@mail.ru)*

В пещерах Средней Сибири присутствуют автохтонные бактерии и грибы, адаптированные к низкой ( $+1..+4^{\circ}C$ ) температуре подземной среды. Наличие подобных микробных сообществ открывает ряд перспективных направлений для практического использования входящих в них микроорганизмов.

Выделенные из пещер психрофильные и психротолерантные микромицеты, сочетающие высокую конкурентоспособность при низких температурах начала вегетационного периода с абсолютною безопасностью для теплокровных, могут быть использованы для биологической борьбы с возбудителями болезней растений, в качестве альтернативы биопрепаратаам на основе мезофильных микроорганизмов. Наши исследования показали, что ряд пещерных микромицетов обладает антибиотической активностью в отношении фитопатогенных грибов р.р. *Bipolaris*, *Alternaria* и *Fusarium*. По результатам лабораторного тестирования и микровегетационных опытов 3 выделенных в пещерах штамма рекомендованы к полевым испытаниям для биологической защиты зерновых от корневой гнили в условиях Сибири.

Другим перспективным направлением является поиск в изолированных пещерных сообществах продуцентов новых антибиотиков, к которым у наземных микроорганизмов нет генетической устойчивости. В частности, нами выделены изоляты, проявляющие сильный антагонизм в отношении условно патогенных грибов р.р. *Aspergillus*. В настоящее время работы в данном направлении продолжаются.

Еще одним направлением использования пещерных микромицетов является разработка препаратов для биологической очистки таких пещер, в которых в силу специфики их геологической истории отсутствуют собственные адаптированные к низким температурам микробные сообщества. В таких пещерах на мусоре антропогенного происхождения в большом количестве развиваются аллохтонные мезофильные грибы, в том числе – патогенные для человека, что, в частности, показали экологические экспедиции МГУ под руководством С.Е. Мазиной в пещеру «Снежная» в 2008 и 2009 г.г. Проведенные нами модельные эксперименты показали, что выделенные в пещерах Сибири микромицеты в условиях, имитирующих антропогенное загрязнение пещер, успешно вытесняют мезофильные виды. В 2010 году планируется испытание разработанных на их основе биопрепаратов в пещерах Абхазии «Снежная» и «Сарма» с целью ускорения процессов биологической очистки и вытеснения опасных для человека мезофильных видов.

Ещё одним перспективным направлением является поиск в пещерах продуцентов биологически ценных веществ. Так, в гифах выделенного в пещере «Ледяная» психрофильного штамма ДЛ3.2 накапливаются липиды в количестве до 50-60% от абсолютно сухого веса, представляющие интерес как источник полиненасыщенных жирных кислот.

*Выражаем свою искреннюю признательность и глубокую благодарность за помощь в написании статьи Хижняку Сергею Витальевичу.*

**Влияние комбинированного фунгицида Амистар Экстра на генофонд вирулентности северокавказской популяции возбудителя буровой ржавчины пшеницы**  
**Кольбин Дмитрий Александрович (Краснодар, kolbin3@mail.ru)**

Среди антропогенных факторов наибольшее давление на популяцию фитопатогена в агробиоценозах, кроме сортового фактора, оказывают химические средства защиты растений. Северный Кавказ является, как известно, зоной их широкого применения. Только на Кубани ежегодно против ржавчинных заболеваний на пшенице обрабатывается порядка 700 тысяч гектар (Санин, 2007). Пестициды, являясь мощным индуктором микроэволюционных процессов в популяциях возбудителей болезней, ведут к изменениям их генетической структуры. Следствием таких изменений является формирование популяций патогена, резистентных к применяемым фунгицидам (Волкова, 2006). Исследования по изучению действия фунгицидов на состояние генетической структуры популяции возбудителя буровой ржавчины, впервые проведенные во Всероссийском НИИ биологической защиты растений (Алексеева и др., 1990) показали, что под влиянием пестицидов в популяции изменяется содержание изолятов гриба с отдельных гена-ми вирулентности в сторону увеличения, снижения частоты или их элиминации.

В связи с актуальностью данного вопроса нами изучено влияние комбинированного фунгицида Амистар Экстра, КС (200 г/л азоксистробина + 80 г/л ципроконазола) на структуру северокавказской популяции буровой ржавчины пшеницы (возбудитель *Russinia triticina*). Установлено, что применение Амистар Экстра, СК сопровождалось значительными изменениями генофонда вирулентности популяции патогена. Наблюдали элиминацию изолятов, вирулентных к линиям с генами устойчивости Lr15, Lr20, Lr21, Lr25, Lr29, Lr36, и снижение частоты встречаемости генов p3bg, p16, p23, p28, p40. Средняя вирулентность популяции гриба под влиянием обработки растений фунгицидом снижалась с 22,9% до 16,9%.

Полученные результаты имеют как важное теоретическое значение в плане познания микроэволюционных процессов, происходящих в популяции гриба под действием фунгицидов, так и большую практическую ценность. Проведенные исследования позволяют прогнозировать изменения в генофонде вирулентности популяции возбудителя буровой ржавчины пшеницы под действием фунгицида и могут быть использованы для учреждающей селекции устойчивых сортов и их территориальном размещении.

Автор выражает благодарность научному руководителю д.б.н. Волковой Г.В., а также ст.н.с. Алексеевой Т.П. и н.с. Добрянской М.В. за помощь в проведении исследований.

**Прооксидантная активность дереворазрушающих базидиомицетов в условиях твердофазного культивирования**  
**Корнейчик Татьяна Валерьевна (Белоруссия, Минск, kornejchik@mail.ru)**

В ряду микроорганизмов, которые могут быть использованы для биоремедиации, в качестве наиболее перспективных следует рассматривать дереворазрушающие базидиальные грибы. Способность данных грибов к разрушению стойких химических загрязнителей связана, в первую очередь, с тем, что они продуцируют комплекс лигнинолитических окислительно-восстановительных ферментов, к которым относятся пероксидазы, лакказы, а также некоторые другие оксидоредуктазы. Целью данной работы явилось изучение прооксидантных свойств дереворазрушающих базидиомицетов в условиях твердофазного культивирования на лигноцеллюлозном субстрате – льняной костре.

Прооксидантную активность КФ дереворазрушающих базидиомицетов определяли по скорости поглощения кислорода в реакции перекисного окисления линолевой кислоты с помощью Оксиграфа. Активность марганец-пероксидазы измеряли спектрофотометрически по скорости окисления  $Mn^{2+}$  и модельного фенольного соединения 2,6-диметоксифенола (ДМФ). Параллельно измеряли активность лакказы с ДМФ, но в этом случае в реакционную смесь не добавляли растворы  $MnSO_4$  и  $H_2O_2$ . Активность широкоспецифичной пероксидазы (ШСП) также измеряли в реакции с ДМФ, однако в этом случае в реакционную смесь не вносили  $MnSO_4$ .

В результате проведенных исследований установлено, что прооксидантной активностью обладали КФ грибов *Bjerkandera adusta* ( $1,25 \pm 0,05$  ед/мл), *Pleurotus ostreatus*

(1,2±0,03 ед/мл). Эти грибы являются типичными возбудителями белой гнили древесины и обладают способностью активно разрушать лигнин. *Crepidotus variabilis* и *Trametes versicolor* также относятся к возбудителям белой гнили древесины, но прооксидантная активность в КФ этих грибов выявлена не была. *Gloeophyllum sepiarium*, который является типичным грибом бурой гнили древесины, не проявлял прооксидантную активность в условиях твердофазного культивирования на льняной костре.

Прооксидантная активность культур дереворазрушающих базидиомицетов обусловлена ферментами, которые продуцируют эти грибы. При сопоставлении изменения значений прооксидантной активности и активности лигнинолитических пероксидаз в динамике роста культуры *Pleurotus ostreatus* обнаружился их согласованный характер. Данные активности появлялись в КФ после 7 суток роста, достигали максимума на 21-е сутки, после чего отмечалось их одновременное снижение. Изменения значений прооксидантной активности и активности лигнинолитических пероксидаз в КФ *Bjerkandera adusta* были менее согласованы и носили более сложный характер.

Обнаружение прооксидантной активности в КФ дереворазрушающих базидиомицетов при твердофазном культивировании свидетельствует о возможности их использования для биоремедиации, т.к. свободно-радикальное окисление липидов, инициируемое прооксидантной активностью, обеспечивает деградацию самых разнообразных стойких органических загрязнителей.

#### Лишайники свежеповаленных деревьев ЗБС МГУ

**Куцинина М., Юдахина Е.Д., Румянцев К.А., Попова Е.А.** (Москва, [lazymary@rambler.ru](mailto:lazymary@rambler.ru))

Изучение распределения эпифитных лишайников по высоте ствола сопряжено с методическими трудностями. Поэтому исследование свежеповаленных стволов даёт очень важный материал. Нашу работу обусловил ураган (3 июня), оставивший множество поваленных деревьев. Исследование проведено с 15 по 19 июня 2009 г. на ЗБС МГУ в рамках студенческих самостоятельных работ. Было изучено 29 поваленных стволов: 1 клён (*Acer platanoides* L.), 2 сосны (*Pinus sylvestris* L.), 5 осин (*Populus tremula* L.), 6 елей (*Picea abies* (L.) Karst.) и 15 берёз (*Betula pendula* Roth). Выявлен видовой состав лишайников и их распределение по длине ствола. Всего обнаружено 25 видов: *Biatora* sp., *Bryopogon jubatus* (L.) Link, *Bryoria implexa* (Hoffm.) Brodo & D. Hawksw., *Chaenotheca ferruginea* (Turner ex Sm.) Mig., *Cladonia* sp., *Evernia mesomorpha* Nyl., *Evernia prunastri* (L.) Ach., *Graphis scripta* (L.) Ach., *Hypogymnia farinacea* Zopf, *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl., *Hypogymnia tubulosa* (Schaer.) Hav., *Lecanora chlorotera* Nyl., *Lecanora* cf. *subrubra* Hue, *Lecanora* cf. *symmicta* (Ach.) Ach., *Lecidea* sp., *Melanohalea olivacea* (L.) O. Blanco, A. Crespo, Divakar, Essl., D. Hawksw. & Lumbsch, *Ochrolechia androgyna* (Hoffm.) Arnold., *Parmelia sulcata* Taylor, *Physcia caesia* (Hoffm.) Fürnr., *Physcia hispida* (Schreb.) Frege, *Physcia stellaris* (L.) Nyl., *Platismatia glauca* (L.) W.L. Culb. & C.F. Culb., *Tuckermanopsis chlorophylla* (Willd.) Hale, *Usnea subfloridana* Stirt., *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. Наиболее часто встречаются: *H. tubulosa*, *H. physodes*, *P. sulcata*, *Cladonia* sp. Они обнаружены практически на всех обследованных деревьях; эти же виды имеют максимальные значения проективного покрытия на ствалах деревьев. Максимальное число видов отмечено для осины (15; из них 8 накипных) и берёзы (14; накипных не обнаружено). При этом на берёзе только 4 вида встречены на всех обследованных ствалах, а на осине постоянно встречаются 8 видов. На ели, клёне и сосне видовое богатство значительно ниже – всего 6, 4 и 2 вида соответственно. В целом представители большинства видов были найдены лишь однократно. В процессе работы выявлено, что встречаемость лишайников на ствалах зависит от высоты; многие виды обнаружены только на уровне более 3 м от земли. Для берёзы составлена схема распределения доминантных видов: *H. physodes* начинает массово встречаться с 2,5-3 м, *H. tubulosa* – с 5 м, *P. sulcata* – с 11-12 м. Наибольшее проективное покрытие этих видов наблюдается с высоты примерно 9 м. Предположительно, такое изменение видового состава с высотой связано с различными требованиями этих видов к уровню освещённости.

## Исследования морфометрических характеристик *Blumeria graminis*

на территории Акмолинской области Казахстана

Лянгэ Елена Робертовна (Казахстан, Астана, elena\_enu@mail.ru)

Казахстан относится к числу лидеров стран по производству зерна, при этом ценные сорта пшеницы высшего качества выращиваются преимущественно в северных и центральных областях. Значительная площадь посевов расположена на территории Акмолинской области.

Одним из серьезных и распространенных заболеваний зерновых культур в данном регионе является мучнистая роса, вызываемая сумчатым грибом *Blumeria graminis* (DC) Speer. Негативное влияние данного патогена на растения связано с тем, что она в основном поражает листовую пластинку – основного органа, осуществляющего фотосинтетический процесс. При среднем поражении растений мучнистой росой урожай зерна снижается до 35% и ухудшается качество зерна за счет снижения белка и крахмала (Головин, 1980).

Нами в Акмолинской области путем маршрутного обследования были обнаружены следующие формы мучнистой росы на злаках: *Blumeria graminis* f. *agropyri* Jacz., *B. graminis* f. *poae* Marchal., *B. graminis* f. *elytrigia*, *B. graminis* f. *tritici* Marchal, *B. graminis* f. *bromi* Marchal.

Морфометрические измерения клейстотеций и конидий проводили микроскопом Olympus BH-2 со встроенным фотоаппаратом Canon, при этом изображение выводилось на экран компьютера в диалоговом окне программы Cameram, конечные результаты обрабатывались в приложении MS Excel.

Анализ результатов показал, что по морфометрическим показателям близкими между собой являются формы *Blumeria graminis* f. *agropyri* Jacz., *B. graminis* f. *poae* Marchal., *B. graminis* f. *elytrigia*, в цикле развития у этих форм наблюдается конидиальная и сумчатая стадии. Отклонения минимальных и максимальных размеров длины и ширины конидий варьируют до  $\pm 3$  мкм. Размеры клейстотеций в диаметре имеют наибольшие различия: диапазон варьирования у f. *agropyri* Jacz 129,9–212 мкм, а f. *poae* Marchal 166,1–189,4 мкм. Значительно отличается от остальных форм по размерам конидий и клейстотеций форма f. *tritici* Marchal и f. *bromi* Marchal.

Автор благодарит д.б.н., профессора А.С. Абиеva за помощь в подготовке тезисов.

## Влияние препарата Мелафен на рост грибов рода *Trichoderma*

Панкова Анна Викторовна (Казань, rpankova-anuya@mail.ru)

Род *Trichoderma* имеет важное хозяйственное значение в связи с широким использованием многих видов для получения ферментов, биологически активных веществ и препаратов для защиты растений. Некоторые виды этого рода являются более эффективными агентами биоконтроля против различных почвенных фитопатогенов, чем известные пестициды, и их воздействие намного более безопасно для окружающей среды.

Актуальной остается проблема поиска новых более экономичных препаратов, действие которых приводило бы к стимуляции роста *Trichoderma*.

Значительный интерес представляет регулятор роста нового поколения – синтетический препарат Мелафен, представляющий собой меламиновую соль бис(оксиметил)-фосфиновой кислоты. Мелафен активно используется при предпосевной обработке семян сельскохозяйственных культур в чрезвычайно низких концентрациях ( $10^{-8}$ – $10^{-7}$  г/л) приводящей к значительному повышению энергии прорастания семян. Полевые испытания препарата, проведенные в течение ряда лет, показали его высокую эффективность.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния препарата Мелафен на скорость роста штаммов грибов рода *Trichoderma*.

Объектами исследования были моноспоровые штаммы двух видов – *Trichoderma asperellum* и *Trichoderma longibrachiatum*. Мелафен был синтезирован в Институте органической и физической химии им. А.Е. Арбузова (г. Казань).

Воздействие Мелафена осуществляли следующим способом: препарат как термостабильное соединение добавляли в питательную среду (картофельно-глюкозный агар) перед автоклавированием с последующим высевом на нее исследуемых изолятов и

выращиванием при 28 °C, являющейся оптимальной температурой. Исследовали расширенный ряд концентраций Мелафена –  $10^{-3}$ – $10^{-16}$  и  $10^{-18}$  г/л.

При оценке результатов было выявлено, что скорость роста штамма *T. asperellum* под действием Мелафена увеличивается. Наиболее интенсивно это наблюдается при использовании концентраций препарата  $10^{-12}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-14}$ , при этом скорость роста по сравнению с контролем увеличивается на 83%, 67%, 65%, 57% соответственно. Исключением являлись концентрации препарата  $10^{-13}$ ,  $10^{-15}$ , при которых наблюдалось ингибирование скорости роста штамма.

При исследовании скорости роста штамма *T. longibrachiatum* под влиянием Мелафена наблюдалось ее ингибирование. Исключением являлись концентрации  $10^{-16}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-15}$ , которые стимулировали скорость роста штамма, увеличивая ее на 34%, 25%, 5% соответственно.

Такая закономерность влияния Мелафена связана, по-видимому, с физиологическим состоянием и метаболизмом исследуемых штаммов грибов рода *Trichoderma*. Результаты опыта подтверждают, что Мелафен способен действовать на рост и развитие грибов, что было ранее показано другими авторами.

### Инфекционные болезни различных видов тополей (*Populus*) в насаждениях города Сургута

Перевалова Юлия Валерьевна (Сургут, yulchik.87@mail.ru)

В насаждениях города Сургута тополь является одним из лесообразующих пород. Проведенные лесопатологические наблюдения, за состоянием разных видов тополей в насаждениях города, свидетельствуют о сильной поражаемости культуры различными фитопатогенными организмами. Развитие патогенных грибов приводит к снижению темпов роста растений и потере декоративных свойств культуры.

В результате проведенных полевых исследований нами были выявлены следующие типы инфекционных болезней: мучнистая роса, поражающая тополь *Populus tremula* L. и *P. balsamifera* L., возбудителем является *Uncinula adunca* (класс *Ascomycetes*, порядок *Erysiphales*); ржавчина, поражающая тополь *P. tremula* L., возбудитель – *Melampsora tremulae* Kleb. (класс *Uredinomycetes*, порядок *Uredinales*); бурая пятнистость, поражающая тополь *P. nigra* L., возбудитель *Marssonina populi* Kleb. (порядок *Leotiales*).

Степень поражения видов *P. balsamifera* L. и *P. tremula* L. мучнистой росой в смешанных посадках составила 68,8 и 53,0%, в чистых культурах, соответственно 49,2 и 41,3%. Отмечено, что у молодых растений *P. balsamifera* L. средняя степень поражения болезнью составила 78,8%, что на 10% выше, чем у старых деревьев. Это говорит об избирательности патогена тщательно заселять молодые и здоровые растения. Вредоносность мучнистой росы в насаждениях лесопарковой зоны составляет 80,1%, тогда как на городских улицах – 60,0%. Это связано с тем, что в лесопарковой зоне формируются смешанные густые посадки лиственных и хвойных пород, способствующих возникновению более повышенной влажности и стабильной температуры воздуха, оптимальной интенсивности освещения, чем в насаждениях городской зоны. В результате складываются благоприятные условия для развития фитопатогена.

Степень распространения буровой пятнистости на тополе *P. nigra* L. в смешанных посадках составила 66,0%, в чистой культуре 52,5%, а степень поражения растений в различных насаждениях 89,0% и 70,0%, соответственно. Было установлено, что ухоженные деревья (стриженные) поражаются на 60,2–80,0%, деревья без стрижки на 67,5–90,1%.

Ржавчина зарегистрирована только на листьях тополя *P. tremula* L., произрастающего в лесопарковой зоне города вблизи с сосновой обыкновенной. Это объясняет массовое развитие болезни на данной территории, т.к. сосна является промежуточным растением в цикле развития ржавчинного гриба *Melampsora*. Средняя степень распространения ржавчины в насаждениях города составляет 78,0%, степень поражения – 58,0%.

На основании полученных данных можно предположить, что вредоносность болезней в насаждениях города зависит от нескольких факторов: возраста растений, агротехнических

приемов их выращивания и типа насаждения. В большей степени поражаются молодые, не стриженые деревья, произрастающие в смешанных посадках.

**Видовой состав и устойчивость к некоторым фунгицидам  
возбудителей альтернариоза картофеля и томата  
Плуталов П.Н., Романова С.С. (Москва, [plutalov@yandex.ru](mailto:plutalov@yandex.ru))**

Некоторые виды рода *Alternaria* – возбудители альтернариоза, опасного заболевания картофеля и томата. Основной метод борьбы с альтернариозом – опрыскивание посадок фунгицидными препаратами. Для их эффективного действия в популяциях патогенов не должно быть высокой доли устойчивых штаммов.

Мы провели исследование устойчивости штаммов возбудителей альтернариоза картофеля и томата из удаленных регионов Европейской части России (Костромской, Астраханской, Нижегородской, Московской, Ленинградской и Самарской областей, Республики Марий Эл и Татарстан, Ставропольского и Приморского краев) к некоторым широко применяемым фунгицидам: системным азоксистробин (Квадрис), и дифеноконазол (Скор) и контактному манкоцеб (Манкоцеб, Дитан М-45, Метаксил, Ридомил Голд МЦ, Акробат МЦ, Сектин Феномен).

Оценку устойчивости изолятов проводили в чашках Петри на агаризованной среде на основе пивного сусла с добавлением соответствующего фунгицида. Для каждого изолята определяли показатель EC50, т.е. концентрацию фунгицида, необходимую для замедления скорости радиального роста колонии в 2 раза относительно контроля (среда без фунгицида).

В большинстве регионов европейской части России с листьев картофеля и томата выделялись мелкоспоровые виды *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. infectoria*. Крупноспоровый *A. solani* встречался значительно реже: он был обнаружен только в сборах из Республики Марий Эл, Астраханской, Ленинградской областей и Приморского края. Разные виды возбудителей альтернариоза обладали различной устойчивостью к фунгицидам. Штаммы *A. solani* были наиболее восприимчивыми к манкоцебу. Среди них не было выявлено высокоустойчивых форм. Показатель EC50 варьировал в пределах 7,3–85,3 мкг/мл. В то же время все мелкоспоровые виды, напротив, отличались очень высокой вариабельностью устойчивости. Высокоустойчивые штаммы среди мелкоспоровых видов были отмечены почти во всех исследованных регионах, показатель EC50 варьировал от 24,1 до 391,3 мкг/мл у *A. infectoria*, от 7,4 до 582,3 мкг/мл у *A. tenuissima*, от 9,77 до 597,6 мкг/мл у *A. alternata*. Во всех видах возбудителей альтернариоза присутствовали штаммы с высокой устойчивостью к азоксистробину. Показатель EC50 варьировал от 7,5 до 291 мкг/мл у *A. solani*, от 8,7 до 180,5 мкг/мл у *A. infectoria*, от 8,1 до 302,5 мкг/мл у *A. tenuissima*, от 8,7 до 305,7 мкг/мл у *A. alternata*. К дифеноконазолу штаммы всех исследованных видов были восприимчивы, показатель EC50 варьировал от 0,6 до 19,0 мкг/мл у *A. solani*, от 0,65 до 7,75 мкг/мл у *A. infectoria*, от 0,7 до 2,1 мкг/мл у *A. tenuissima*, от 0,63 до 16,8 мкг/мл у *A. alternata*.

Таким образом, только дифеноконазол показал высокую эффективность против всех видов грибов – возбудителей альтернариоза картофеля и томата. Манкоцеб был эффективен только против *A. solani*, его фунгицидный эффект по отношению к мелкоспоровым видам неудовлетворителен. Устойчивые к азоксистробину штаммы были выявлены среди всех видов возбудителей альтернариоза.

**Протеолитическая активность грибного симбионта, растущего в условиях грибного сада  
Семенова Татьяна Александровна (Москва, [tasem0708@mail.ru](mailto:tasem0708@mail.ru))**

Грибные сады – это мутуалистическая ассоциация муравьев, относящихся к трибе Attini (Formicidae, Hymenoptera) и грибов *Leucoagaricus gongylophorus* (Agaricales, Basidiomycota), которые служат муравьям источником питания. Мицелий грибов, в основном, растет на листовом материале, который муравьи вносят в грибные сады, поэтому гидролитические ферменты грибов, расщепляющие растительный материал, играют ключевую роль в поддержании ассоциации.

В рамках представленной работы была определена общая протеолитическая активность и ее pH оптимум в грибных садах, выращиваемых 14 видами муравьев, относящихся

к 8 родам. Спектры секретируемых протеиназ были нанесены на филогенетическое дерево грибного симбионта, построенное на основе анализа последовательностей 28S рДНК.

Показано, что протеолитическая активность в грибных садах представлена в основном металлопротеиназами (в колониях примитивных муравьев и наиболее эволюционно прогрессивных муравьев-листорезов) и сериновыми протеиназами (в колониях муравьев, относящихся к родам *Trachymyrmex* и *Sericomyrmex*). Отрицательная корреляция между значениями активностей, принадлежащими к указанным классам, предположительно может быть объяснена в терминах trade-off гипотезы. Показано, что pH в грибных садах поддерживается буферной системой, влияющей на функционирование протеиназ грибов.

Изменение pH оптимума протеолитической активности в грибных садах, выразившееся в примитивными и прогрессивными видами муравьев, вероятно, отражает эволюционные изменения грибного симбионта в ассоциации.

Работа поддержана грантом МНТЦ 3455 и РФФИ 10-04-00739.

### **Микотрофия тубероидной орхидеи в состоянии зимнего покоя**

**Целебровский М.В., Холмогоров С.В. (Ярославль, celebrowsky@yahoo.com)**

Микотрофия является ключевым фактором онтогенеза орхидных – наиболее редких представителей флоры России, нуждающихся в охране. Она проявляется в результате формирования эндомикоризы и участвует в регуляции прорастания семян, роста и развития растений в течение всей жизни. Подземные органы автотрофных орхидных подвергаются периодическому проникновению микосимбионта через корневые волоски. Свободные гифы гриба распространяются по межклетникам, проникают в паренхимные клетки и образуют клубки – пелотоны, имеющие вначале рыхлую, а затем более плотную структуру. На определенном этапе в клетках с участием ферментных систем растения начинается лизис микосимбионта. В результате образуется бесструктурная зернистая масса гриба. Значение эндомикоризы орхидных в процессах жизнедеятельности взрослых растений исследовано недостаточно. Для представителей других семейств имеются фрагментарные сведения об обмене между компонентами симбиоза водой, элементами минерального питания, витаминами и др. Это может происходить как во время лизиса гриба, так и при транспорте питательных веществ по гифам. Открытым остается вопрос о микотрофии орхидных в состоянии зимнего покоя – особого периода жизни растений, связанного с инактивацией многих процессов, но сохранением физиологического-биохимического контроля над развитием микосимбионта.

В связи с вышеизложенным нами исследованы особенности микотрофии пальчатокоренника пятнистого (*Dactylorhiza maculata* (L.) Soo), находящегося в состоянии покоя (октябрь, ноябрь и декабрь). Этот вид тубероидных орхидных довольно широко распространен в Европейской части России. Установлено, что в придаточных корнях и корневых окончаниях тубероидов степень микотрофности, частота встречаемости и коэффициент однородности микоризной инфекции увеличиваются в период с октября по ноябрь и затем остаются стабильными до декабря. Количественные параметры микотрофности в исследованных подземных органах не имеют существенных различий. Кроме того, схожей оказывается степень развития микосимбионта в их базальных и дистальных участках. В клетках придаточных корней и корневых окончаний тубероидов преобладают зернистая масса гриба и лизированные пелотоны, что свидетельствует об активном процессе переваривания микосимбионта. Наибольшее количество его лизированных форм выявлено в декабре. Короткие участки гиф встречаются единично в межклетниках, где они сильно утолщены. Проникновение микосимбионта через корневые волоски не обнаружено. Таким образом, в период покоя пальчатокоренника пятнистого микосимбионт в его подземных органах находится в угнетенном состоянии, что может быть обусловлено накоплением в клетках соединений, обладающих фунгистатическим и фунгицидным действиями, например фитоалексинов, активацией окислительных ферментов. В дальнейшем в изучении микотрофии орхидных необходимо раскрытие физиологического-биохимических взаимоотношений консортов друг с другом, поиск эндогенных факторов регуляции развития микосимбионта в клетках растения.

## ПОДСЕКЦИЯ «МИКРОБИОЛОГИЯ»

### Штамм *Bacillus intermedius* с инактивированным геном внеклеточной субтилизиноподобной протеиназы

*Абдрахманова Диана Альбертовна* (Казань, dishka19@mail.ru)

Бациллы характеризуются высокой способностью к секреции в окружающую среду различных протеолитических ферментов, среди которых у многих бацилл доминирующей является субтилизиноподобная сериновая протеиназа *B. intermedius*. Доля фермента в пулье внеклеточных протеиназ у штамма *B. intermedius* составляет около 80%. Целью данной работы явилось сравнительное изучение лабораторного штамма *B. intermedius* MK10 с инактивированным геном субтилизиноподобной протеиназы (*aprB*) с исходным штаммом *B. intermedius* 3-19 с функционально-активным геном субтилизиноподобной протеиназы. При исследовании активности рекомбинантного штамма по отношению к специальному субстрату Z-Ala-Ala-Leu-pNA было установлено, что *B. intermedius* MK10 не проявляет активности по отношению к специальному субстрату, что и свидетельствует об инактивации гена в геномной ДНК исходного штамма. Нами были установлены различия в морфологии данных штаммов. Колонии штамма бактерий с неактивным геном субтилизиноподобной протеиназы на агаризованной среде LB имели шероховатую поверхность, в отличие гладких ровных колоний исходного штамма. Микроскопирование показало, что у нокаутированного штамма *B. intermedius* клетки более крупные и большинство из них сгруппированы попарно. Так же было выявлено, что модифицированный штамм менее устойчив к различным стрессовым условиям. Было исследовано влияние высоких концентраций соли на рост нокаутированного *aprB*<sup>-</sup> штамма. Присутствие в среде хлорида натрия в концентрации 0,5 М не сказывалось на росте исходного штамма. Рост штамма с инактивированным геном *aprB*<sup>-</sup> ингибировался на 20% при добавлении в среду 0,5 М NaCl, а в присутствии 1 М NaCl – на 25%.

### Влияние производных бензимидазола на параметры роста и активность ферментов *E.coli*

*Атлашова Екатерина Юрьевна* (Самара, atlasova-ekaterina@rambler.ru)

В настоящее время арсенал химиотерапевтических средств, применяемых в клинике инфекционных болезней, чрезвычайно разнообразен. Однако, несмотря на очень большое их разнообразие, мы еще не имеем достаточного количества хорошо действующих специфических препаратов против конкретных возбудителей. Поэтому поиски новых лечебных препаратов, обладающих антибактериальной активностью, продолжаются. Кроме того, вновь синтезированные аналоги антибиотиков попадают в окружающую среду и деградируются микроорганизмами в различные производные, возможно экологически опасные. В связи с вышеизложенным, было изучено влияние вновь синтезированных на кафедре органической химии СамГУ доцентом З.П. Белоусовой производных бензимидазола, отличающихся по положению OH-группы в фенильном радикале: 4-(2-метил-1Н-бензимидазол-1-ил-метил)фенол (I); 1-(2-метил-1Н-бензимидазол-1-ил-метил)фенол (II) на рост и протеолитическую (ПР) и дегидрогеназную (ДГ) активность *E.coli*. Полученные в ходе исследования данные выявили изменение биомассы ( $\Delta y$ ) *E.coli* при добавлении в среду культивирования I и II в дозе 100 мкг/мл. Снижение прироста биомассы за первые 24 часа при добавлении вещества I составило 21%, а в присутствии вещества II количество биомассы уменьшилось на 18% от контроля. Максимальное значение удельной скорости роста ( $\mu$ ) и минимальное значение времени удвоения биомассы ( $td$ ) из контрольной пробы были выявлены через 3 и 5 часов культивирования с момента засева в присутствии вещества II и I, а в опытном варианте через 4 и 6 часов. При действии вещества I в дозе 100 мкг/мл снижение  $\mu$ , по сравнению с контролем, составляет 1,10, а  $td$  больше контрольного в 1,12 раза; для вещества II – 1,8; 2,9 раза соответственно. Культивирование *E.coli* на среде с добавлением вещества II в дозе 100 мкг/мл сопровождается достоверным снижением протеолитической и дегидрогеназной активности на 21% и 56% от контроля.

Таким образом изученные соединения достоверно уменьшают интенсивность роста и ингибируют ПР и ДГ активность *E.coli*. При этом II, которое характеризуется

параллелизмом ОН-группы, оказывает достоверно более выраженное антибактериальное действие. В дозе 100 мкг/мл разница в действии между веществами составило 8% (Δу); 50% (μ); 33% (td); 3% (ПР) и 14% (ДГ) соответственно.

**Генотоксическая активность метаболитов микоплазм**  
**Баязитова А.А., Гуляев П.Е. (Казань, alinabayazitova@yandex.ru)**

В последние годы постоянно растет интерес к гипометаболическим формам бактерий. Большой интерес вызывают механизмы перехода в состояние анабиоза. Очевидно, что переход в покоящееся состояние может происходить под влиянием различных факторов и наряду с универсальными чертами обладать какими-то особенностями и уникальными механизмами регуляции. Предполагают, что происходят морфофункциональные перестройки и изменения биохимического состава клеточной поверхности, в связи с чем могут усиливаться адгезивные свойства, что приводит к накоплению на поверхности клетки метаболитов и/или компонентов среды, что в совокупности может привести к увеличению токсического и генотоксического потенциала клеток. В связи с вышеизложенным, целью нашей работы явилась оценка возможности индукции мутаций продуктами метаболизма микоплазм при длительном культивировании. В работе решались следующие задачи: 1) сравнить генотоксическую активность вегетативных клеток и наноформ микоплазм *M. hominis* PG37 и *M. gallisepticum* S6; 2) оценить возможность индукции SOS-ответа культуральной жидкости микоплазм разного возраста. Было показано, что вегетативные клетки микоплазм обладают различным генотоксическим потенциалом. Фактор индукции SOS-ответа для *M. gallisepticum* S6 составил 19.54 ед., а для *M. hominis* PG37 – 3.79. В то же время наноформы микоплазм не обладали генотоксическими эффектами. При этом культуральная жидкость микоплазм проявила генотоксичность только в случае вегетативных клеток *M. gallisepticum* (фактор индукции SOS-ответа 7.8 ед.). Возможно, генотоксический потенциал клеток зависит от строения и физиологического статуса клетки. Молекулярные аспекты изменения генотоксических эффектов вегетативных клеток пока остаются не выясненными. Работа поддержанна ГК 02.512.12.2010.

**Внеклеточная протеолитическая активность *Proteus mirabilis***  
**Бондырева Наталья Марковна (Казань, nelya-zamatutdinova@rambler.ru)**

Энтеробактерии *Proteus mirabilis* очень часто становятся причиной заболеваний мочевыводящих путей у людей с физиологическими нарушениями. *P. mirabilis* обладают различными факторами вирулентности, к которым относятся и внеклеточные протеиназы. Например, показано, что внеклеточные протеиназы могут расщеплять иммуноглобулины класса А, которые играют важную роль в местном иммунитете. Однако не доказана роль внеклеточных протеиназ в процессах инвазии в чувствительные клетки, что, зачастую, является причиной образования камней.

Целью настоящей работы было исследование протеолитической активности в культуральной жидкости *P. mirabilis*. Известно, что некоторые бактерии при инвазии используют цитоскелет эукариотической клетки, поэтому в качестве субстратов для определения активности использовали актин, выделенный из ацетонового порошка мышц кролика, и азоказеин. Исследовалась динамика роста бактерий и динамика появления активности по отношению к азоказеину и актину, а также чувствительность внеклеточной протеолитической активности к различным ингибиторам. Активность по отношению к актину определяли электрофоретически.

Исследование динамики роста бактерий показало, что на среде LB с аэрацией бактерии выходят на стационарную фазу роста на 9-10 час культивирования. Протеолитическую активность в культуральной жидкости определяли, начиная с 2 и по 24 часа роста бактерий, через каждые два часа. Показано, что уже на 4 час культивирования бактерий в культуральной жидкости появляется протеолитическая активность, расщепляющая азоказеин и ограниченно расщепляющая в данных условиях актин с образованием большого фрагмента с молекулярной массой 36 кДа. Протеолитическая активность достигает своего

максимума к началу стационарной фазы роста и сохраняется на этом уровне до 24 часа культивирования.

Ингибиторный анализ с использованием о-фенантролина – ингибитора металлопротеиназ и PMSF – ингибитора сериновых протеиназ, показал, что основная протеолитическая активность в культуральной жидкости определяется металлопротеиназой (90% активности по азоказину) и незначительная часть обусловлена сериновой протеиназой (10%). Расщепление актина с образованием 36 кДа фрагмента полностью подавляется 2 мМ о-фенантролином и не подавляется 10 мМ PMSF. Таким образом, в культуральной жидкости *P. mirabilis* обнаружены металлопротеиназы и сериновые протеиназы. Ограниченный протеолиз актина обусловлен действием металлопротеиназы.

#### **Получение рекомбинантных белковых антигенов для диагностики локализованного агрессивного пародонита, вызываемого *Aggregatibacter actinomycetemcomitans***

*Верниева Екатерина* (Москва, v-kate@mail.ru)

Среди поражений пародонта (околозубных тканей десен) наиболее тяжелым течением характеризуется локализованный агрессивный пародонит (ЛАП). Этим заболеванием подвержены и дети, и взрослые. Заболевание слабо поддается лечению. В основе патогенеза лежит прогрессирующее разрушение тканей пародонта, приводящее к потере зуба.

Возбудителем является *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, – грамотрицательная анаэробная неподвижная бактерия, относящаяся к семейству Pasteurellaceae. Основную роль в патогенезе играют продуцируемые им токсины: токсин гигантских клеток (cytolytic distending toxin, Cdt) и лейкотоксин (Ltx). Эти токсины относятся к группе малоизученных токсинов. Cdt – это термолабильный белок, состоящий из трех субъединиц (A, B и C). Cdt-A и Cdt-C необходимы для взаимодействия с эукариотическим рецептором для проникновение в клетку-мишень. Cdt-B обладает ДНКазной активностью. В результате действия токсина возникают повреждения в ядерном аппарате, что приводит к задержке клеточного митотического цикла на этапе G2-M. В итоге клетка подвергается апоптозу. Лейкотоксин относится к группе RTX токсинов. Основная мишень токсина – клетки лимфоидного и миелоидного ряда.

Трудность в быстрой постановке диагноза определяется отсутствием методов быстрой диагностики. Как известно, факторы патогенности бактерий могут являться удобными маркерами соответствующих микроорганизмов. Поэтому разработка тест-систем, направленных на индикацию соответствующего продукта бактерий может приводить к появлению чувствительных, специфичных и быстрых методов идентификации возбудителя и диагностики заболевания.

Целью нашей работы было создание генетических конструкций и штаммов-продуцентов *Escherichia coli* для получения токсинов в препаративных количествах.

В результате исследования были клонированы соответствующие гены и на их базе были созданы генетические конструкции. Однако экспрессия клонированных генов была низкой. В связи с этим был проведен анализ гидрофобности соответствующих молекул и были получены редуцированные, но обладающие достаточной иммуногенностью фрагменты субъединиц Cdt и лейкотоксина. Иммунизация лабораторных животных позволила получить высокоспецифичные антисыворотки с титром 1/100 000 – 1/1 000 000 в иммуноблоте. На их базе будут созданы иммуно-серологические тест-системы для выявления токсинов в клиническом материале, пригодные для лабораторной диагностики заболеваний, вызываемых *A. actinomycetemcomitans*.

#### **Контроль синтеза экзополисахарида *Paracoccus denitrificans* с применением реологических методов**

*Гапченко Алиса Александровна* (Москва, gapchenko\_gubkin@mail.ru)

Бактерии *P. denitrificans* образуют полимерный биопродукт ритизан, основным компонентом которого является ацилированный кислый экзополисахарид (ЭПС). Это новый на рынке ЭПС биопродукт, уже получивший положительные оценки в качестве компонента буровых растворов. Требуемое улучшение технологических характеристик этого полимера и

их стабильности было достигнуто путем изменения параметров его получения. Известно, что от условий выращивания штамма бактерий зависит не только количество синтезированного ЭПС, но также его молекулярная масса и процентное содержание неуглеводных заместителей. Эти изменения должны отражаться на реологическом поведении культуры. Поэтому для экспресс-контроля синтеза ЭПС проводили измерение динамической вязкости сырого ритизана.

Было установлено, что вязкость культуры *P. denitrificans* зависит от состава среды и условий выращивания продукента. Варьировали наличие в исходной среде пантотеновой кислоты и второго источника углерода – этианола; природу источника азота; концентрацию дрожжевого экстракта и глюкозы; аэрацию и дозу инокулята.

Установлено, что дрожжевой экстракт и глюкоза требуются в средних концентрациях (0,5% и 1%, соответственно), обеспечивая высокие показатели синтеза ЭПС и вязкости. Этианол и пантотеновая кислота не обязательны, т.к. практически не влияют на развитие культуры, выход полимера и реологические характеристики. Нитрат натрия предпочтительнее нитрата аммония, т.к. обеспечивает высокую вязкость культуры. Доза инокулята 5% способствует оптимальной продуктивности процесса при уменьшении его длительности. Дополнительная аэрация приводит к ускорению развития штамма и увеличению вязкости культуры без повышения выхода полимера.

Подобранный улучшенная среда способствует получению полимерного реагента с более ценными технологическими характеристиками: динамическая вязкость ЭПС биопродукта на улучшенной среде при малых скоростях сдвига почти в два раза превышает таковую образца, выращенного на исходной среде.

При замене 25% среды молочной сывороткой *P. denitrificans* синтезирует полисахарид (ритизан-С), отличающийся по физико-химическим свойствам от классического ритизана значительно более высокими значениями динамической вязкости и адгезивными свойствами. В то же время полисахарид сохраняет многие технологически ценные качества ритизана, в том числе стабильность реологических характеристик в процедуре многократного замораживания-оттаивания.

Для расширения областей применения ритизана и ритизана-С определяли его реологические характеристики в широком диапазоне физико-химических условий, моделирующих реальные условия нефтегазоносного пласта, а именно, температуры, pH и минерализации.

### **Выделение и скрининг перспективных азотфиксаторов для экологических биотехнологий**

**Гаязова Диана Сергеевна** (Казань, *dianagajazova@rambler.ru*)

Изначально широкий интерес исследователей азотфиксаторам был обусловлен нуждами сельского хозяйства. Результатом научных достижений в этой области стало масштабное производство и применение биоудобрений на основе азотфиксаторов для увеличения плодородия почв и повышения урожайности растений.

В настоящее время большие площади почв загрязнены отходами промышленных производств. В экономически развитых странах мира все чаще прибегают к восстановлению антропогенно нарушенной окружающей среды с помощью растений, которые не только активно участвуют в процессах фиторемедиации, но и во многих случаях благоприятно действуют на микрофлору почв. Однако в условиях загрязнения почвы рост растений и развитие их корневой системы сильно угнетается. Исследования принципов и механизмов взаимодействия микроорганизмов и растений выявили примеры взаимовыгодных отношений. Микроорганизмы ризосферного сообщества, оказывающие положительное влияние на растения, условно названы *plant growth promoting rhizobacteria* (PGPR). В последнее время возрастает интерес к PGPR в связи с фиторемедиацией загрязненных объектов. Рядом авторов показано положительное влияние интродукции диазотрофов и PGPR на деструкцию нефтяных углеводородов в загрязненной почве, однако, типично почвенные изоляты зачастую не способны функционировать в условиях загрязнения. В связи

с неблагоприятными условиями загрязненных почв целесообразно использовать адаптированную микрофлору, устойчивую к загрязнениям.

Цель данной работы – выделение перспективных азотфиксаторов из многолетних скоплений углеводородных отходов для экологических биотехнологий. Первоначальный отбор изолятов проводили на селективной безазотистой среде, с целью выделения микроорганизмов, способных к фиксации атмосферного азота. На основании данных о величине азотфиксации активности, оцененной методом газовой хроматографии, были выбраны наиболее активные изоляты. Дальнейший скрининг включал тесты на дополнительные свойства (синтез фитогормона ауксинового ряда, индолил-3-уксусной кислоты (ИУК), растворение фосфатов, антагонизм по отношению к бактериальным и грибным фитопатогенам), позволяющие оценить их с точки зрения рост-стимулирующей активности по отношению к растениям. Все выделенные азотфиксаторы в той или иной степени оказались способными к синтезу ИУК (от 3,8 до 9,25 мг/мл). Шесть из десяти исследуемых азотфиксаторов показали способность к колонбилизации труднодоступных соединений фосфора. Большинство исследуемых изолятов проявили антагонистическую активность в отношении широкого спектра фитопатогенов, включая *Pseudomonas syringae*, *Erwinia caratovora*, *Xantomonas solanocerum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Alternaria* sp. Половина исследуемых изолятов сочетала в себе все оцененные нами свойства PGPR. Полученные нами данные позволяют рассматривать промышленные углеводородные отходы как источник биотехнологически ценных изолятов для технологии фиторемедиации.

### **Сравнительная характеристика микромицетов коллекционных штаммов и местных изолятов-биодеструкторов**

*Горбань Мария Викторовна* (*Сургут, gmariy@yandex.ru*)

Большинство материалов, используемых в промышленности и в быту, подвергаются разрушающему действию микроорганизмов. Главными агентами биоповреждений являются микроскопические грибы, что объясняется их высокой физиологической избирательностью.

В системах водоснабжения и канализации всё шире применяются трубы из полимерных материалов. Полимерные трубы вытесняют металлические, так как обладают рядом преимуществ: они легче, технологичнее и не подвергаются электрохимической коррозии.

В данной работе оценивалась грибостойкость образцов полимерных труб, наиболее часто используемых в системах водоснабжения и канализации. Образцы труб изготовлены из полипропилена, полипропилена рандом-сополимера, полипропилена рандом-сополимера термостойкого, полиэтилена низкого давления, металлопластика.

Грибостойкость полимерных материалов определяли по ГОСТу 9.048-089 «Методы лабораторных испытаний на стойкость к воздействию плесневых грибов» методами №1, 2 и 4. Грибостойкость материала соответствует стойкости этого материала к воздействию плесневых грибов коллекционных штаммов, рекомендованных ГОСТом: *Paecilomyces variotii*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Penicillium funiculosum*, *Aureobasidium pullulans* var. *pullulans*, *Gliocladium virens* (syn. *Trichoderma virens*), *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Penicillium ochrochloron*. Грибостойкость материалов оценивали по 6-ти балльной шкале, согласно ГОСТу. Проводилась сравнительная оценка грибостойкости полимеров по отношению к коллекционным штаммам грибов и к штаммам местных изолятов. В исследованиях использовались 8 коллекционных штаммов микромицетов (выше перечисленные) и 8 грибов местных изолятов (5 относятся к роду *Aspergillus*, 3 – к роду *Penicillium*). Места выделения местных штаммов грибов следующие: техническая вода, почва, изоляция трубопровода, поверхность пластикового окна.

По результатам проведённых исследований наиболее стойким к воздействию плесневых грибов является образец трубы из полиэтилена низкого давления, самый негрибостойкий – образец трубы из полипропилена рандом-сополимера термостойкого. Также выявлено, что изоляты местных грибов являются более агрессивными по сравнению с коллекционными – повреждают образцы на более высокий балл. Вместе с тем, повреждения во всех случаях не превышали 2 баллов по всем методам. Наиболее агрессивным агентом биоповреждений среди всех участников испытаний является штамм местного изолята, выделенный

с поверхности пластикового окна, относящийся к роду *Aspergillus*. Этот микромицет повреждает образцы на более высокий балл, чем остальные участники, и является единственным, повреждающим образец трубы из полиэтилена низкого давления.

### **Биологические эффекты бактериальных протеиназ Данилова Юлия Васильевна (Казань, [Danilova146@mail.ru](mailto:Danilova146@mail.ru))**

В связи с тем, что ряд опасных заболеваний, таких, как инсульты, инфаркты, тромбофлебиты и др. связан с возникновением тромбов, в фокусе современной медицины – разработка новых эффективных тромболитических препаратов, в том числе на основе ферментов бактериального происхождения. Ранее в нашей лаборатории были изучены тромболитические и фибринолитические свойства протеиназы *Bacillus intermedius* 3-19. Было показано, что в условиях *in vitro* она обладает высокой дозозависимой фибринолитической и тромболитической активностью. В настоящей работе приведены результаты изучения *in vitro* тромболитических и антикоагулянтных свойств металлопротеиназы рекомбинантного штамма *Bacillus subtilis* BG 2036, несущего на плазмиде pSA5 ген секретируемой металлопротеиназы *Bacillus intermedius*. Внеклеточная металлопротеиназа выделена из культуральной жидкости с применением гидрофобных сорбентов бактиратин-силохрома и бутил-сифарозы.

Изучение антикоагулянтного и тромболитического действия протеиназы проводили в условиях *in vitro* на плазме крови человека. Было проведено 2 серии экспериментов. В первой серии оценивали тромболитические свойства протеиназы, для чего аликвоту плазмы крови человека (0,25 мл) смешивали с 0,05 мл раствора тромбина и выдерживали в течение 5 минут в водяном термостате при 37°C для образования сгустков. К сгусткам добавляли по 0,5 мл раствора препарата фермента и помещали в водяной термостат (в контрольные пробирки добавляли 0,145 M NaCl). Отмечали время полного лизиса сгустков. Во второй серии для определения антикоагулянтной активности металлопротеиназы 0,25 мл плазмы крови человека инкубировали с 0,5 мл раствора препарата фермента в течении 10 минут при температуре 15-20°C, затем добавляли 0,05 мл раствора тромбина и отмечали время образования и последующего растворения сгустка.

В первой серии экспериментов было показано, что после добавления фермента к образовавшимся сгусткам, их лизис происходил в течении 24 часов на 80%. Результаты второй серии показали, что при инкубации плазмы крови с протеиназой фермент не оказывал заметного антикоагуляционного действия. Время образования сгустков после добавления тромбина было соответственно 2 мин против 1 мин в контроле, где вместо протеиназы добавляли тот же объем физиологического раствора. Таким образом, показано, что металлопротеиназа *Bacillus intermedius* обладает тромболитической активностью, а также антикоагуляционными свойствами. Работа поддержана грантом РФФИ 09-04-99044 р-офи. Автор выражает благодарность д.н., проф. Шариповой М.Р. за помощь в оформлении тезисов.

### **Оптимизация технологии биологической рекультивации глубокозагрязненных нефтью почв ХМАО**

**Егорова Анастасия Владимировна (Сургут, [Lisenok8277@ya.ru](mailto:Lisenok8277@ya.ru))**

В Ханты-Мансийском автономном округе площади загрязненных нефтями углеводородами составляют десятки тысяч гектаров. Современные технологии рекультивации составляют комплекс агротехнических мероприятий, направленных на ускорение деструкции нефти на месте разлива. После откачки свободной нефти, почва подвергается фрезерованию с целью разрушения асфальтеново-битумной корки, и улучшения воздушного режима. Параллельно с рыхлением проводится стабилизация кислотности, внесение удобрений и бактериальных препаратов. На заключительном этапе рекультивации проводится высев луговых трав. Скорость и направленность микробного разложения остаточной нефти в почве зависит от ряда условий и может занимать от недели, а при глубоком поражении биосистемы, до нескольких месяцев. Внесение семян необходимо проводить в оптимальный момент рекультивации, с целью улучшения водно-воздушного

режима рекультивируемого слоя с продвижением процесса деструкции по горизонту почвы. Это выяснялось в лабораторном эксперименте.

Образцы нефтезагрязненной почвы, отобранный непосредственно на Самотлорском месторождении (уровень загрязнения 92-94% нефти), подвергались обработке комплексом ранее выделенных нефтеокисляющих микроорганизмов (НОМ) включающим *Pseudomonas* spp., *Rhodococcus* spp., *Artobacter* spp. (титр 11-12 млн. клеток в мл) поддержанной системой удобрений и раскислителя (NPK+СА). Травосмесь представлена: 70% – овёс посевной (*Avena sativa*) и 30% – козлятник восточный (*Galega orientalis*). Схема эксперимента: 1) контроль (абсолютно чистая почва); 2) нефтезагрязненная почва (НЗП); 3) НЗП +НОМ; 4) НЗП + НОМ + (NPK+СА). Травосмесь сносилась с промежутками 1, 2, 3 и 4 недели с момента начала опыта.

Набольшее снижение содержания остаточной нефти отмечено в 3 и 4 вариантах, к окончанию четвертой недели эксперимента уровень загрязнения составил 17 и 9% соответственно. При этом наблюдалась очень высокая микробная активность, со средними значения 23-64 млрд. клеток НОМ на г почвы. Всхожесть травосмеси на абсолютном контроле составило 96-98%. Во втором варианте всхожесть на протяжении эксперимента отсутствовала. Применение НОМ способствовало незначительной всхожести и прорастания семян 21-24%, в не зависимости от времени внесения в почву. Наилучшие результаты прорастания травосмеси отмечены в четвёртом варианте на 4 неделе после начала действия внесенных ингредиентов, и составило 78-81% от контрольных. При этом овёс посевной – 86-88%, козлятник восточный – 68-72%.

Таким образом, выявлена высокая деструктурирующая способность данного комплекса НОМ на почвах с высоким уровнем нефтезагрязнения, и определено оптимальное время внесения травосмесей, используемых в системе применения микробных препаратов.

### Изменение физиолого-биохимических свойств бактерий на ранних этапах перехода к гипометаболизму

*Елисеева А.А., Евтиюгин В.Г., Захаров И.С. (Казань, anna\_mar@rambler.ru)*

Регулирование перехода микроорганизмов в состояние покоя имеет огромное значение для биотехнологии и медицины. Прикладной аспект этой проблемы связан с потенциальной возможностью управления такими процессами, как образование некультивируемых форм патогенов, устойчивых к различным стрессовым условиям, в том числе к фармакологическому воздействию, и сохранение целевой активности промышленных штаммов микроорганизмов – продуцентов биологически активных веществ. В связи с вышеизложенным, целью нашей работы явилась оценка возможности разделения вегетативных и гипометаболических клеток бактерий в криогелях, содержащих привитые заряженные группировки. В работе решались следующие задачи: 1) сравнить ферментативную активность вегетативных и гипометаболических клеток; 2) оценить различия в зарядовых свойствах вегетативных и гипометаболических клеток микробных культур разной грампринадлежности. Для определения активности ферментов использовали стандартные методики. Для разделения микробных клеток по зарядовым свойствам использовали ряд криогелей, содержащих привитые алифатические цепи с заряженными группировками. В качестве группировки с положительным зарядом использовался трисоксиметиламинометан, с отрицательным – тиогликолевая кислота. Столбики гелей находились в медицинских шприцах на 5 мл, и доходили до середины шприца. В период между постановками экспериментов гели содержались в растворе азота натрия. В результате было установлено, что активность щелочной фосфатазы и протеаз снижается в 3-4 раза с увеличением времени инкубирования культур, в то время как активность  $\beta$ -галактозидазы значительно (в 3-5 раз) возрастает. Также показано, что гипометаболические клетки после 4-х месяцев инкубирования адсорбируются в геле значительно хуже (в 1,5-2 раза), чем молодые 18-часовые культуры. В целом, показано, что сорбция в геле с привитыми положительно заряженными группировками выше, чем в контроле, где сорбция неспецифическая. Работа выполнена в рамках программы «Развитие научного потенциала

высшей школы» (РНП 2.1.1.1005). Авторы благодарят профессора, д.х.н. Лозинского В.И. (ИИЭОС РАН, Москва) за предоставление криогелей и участие в обсуждении результатов.

**Метод ПЦР-РВ для оценки титра вируса краснухи в вирусодержащей жидкости**  
**Забияка Юлия Игоревна** (Москва, [yulia.zabiyaka@yahoo.fr](mailto:yulia.zabiyaka@yahoo.fr))

Одной из важнейших проблем при производстве вакцины является оценка титра вируса в процессе культивирования для определения времени сбора вирусного материала. Специфическая активность вируса краснухи определяется в реакции бляшкообразования и титрованием по цитопатическому действию (ЦПД), которые имеют ряд существенных недостатков – они длительны, трудоемки, сложны в стандартизации и зависят от внешних факторов. Целью данного исследования явилась разработка метода оценки титра вируса краснухи в вирусодержащей жидкости с помощью ПЦР с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

К консервативному участку генома вакцинного штамма вируса краснухи RA-27/3 были подобраны последовательности двух праймеров и зонда для реакции обратной транскрипции и ПЦР-РВ. Специфичность праймеров и зонда была показана в ПЦР-РВ и подтверждена методом электрофореза в агарозном геле. В качестве калибратора был приготовлен контрольный препарат – живой аттенуированный штамм вируса краснухи с титром 6,3 IgTЦД<sub>50</sub>/мл, путём последовательных разведений которого были получены 2 калибровочных образца с титрами 5,3 IgTЦД<sub>50</sub>/мл и 3,3 IgTЦД<sub>50</sub>/мл. Вирусный материал собирали на различных сроках (1-12 дней) при культивировании вирусного штамма краснухи Wistar RA27/3 (полуфабрикат вакцинного препарата на 27 пассаже, полученный от ФГУП НПО Микроген (титр 3,8-4,0 IgTЦД<sub>50</sub>/мл)) на культуре клеток VERO и оценку титра вируса проводили параллельно методами ЦПД на культуре клеток RK-13 и ПЦР-РВ. Интервал времени после заражения, в котором разница между значениями титра вируса, полученными методом ПЦР-РВ и в реакции ЦПД, не превышает величины, рекомендуемой ВОЗ (0,3 IgTЦД<sub>50</sub>/мл), составил от 2 до 7 суток (0,04<Δlg<0,3). Коэффициент корреляции между значениями титра, определенными методом ПЦР-РВ и ЦПД, для этого временного интервала был близок к 1, что указывает на хорошее совпадение результатов. На ранних и более поздних сроках культивирования отмечено достоверное расхождение значений, что связано с постепенной гибелью и выходом в культуральную жидкость разрушенных вирионов (после 7 дней), РНК которых также количественно учитывается в ПЦР-РВ, а для первого дня – большим количеством репликативных форм в культуральной жидкости. В контрольных образцах – препарате международного стандарта краснухи (3,9 IgTЦД<sub>50</sub>/мл) и коммерческом препарате вакцины против краснухи (Индия, 4,5-4,8 IgTЦД<sub>50</sub>/мл), – разница между величиной титра вируса краснухи, определенная методом ПЦР-РВ и в реакции ЦПД, находилась в пределах 0,2lg, что меньше допустимой ВОЗ величины.

Таким образом, был разработан метод оценки титра вируса краснухи в вирусодержащей жидкости с помощью ПЦР-РВ, обеспечивающий высокую специфичность, чувствительность, стандартность и малую длительность проведения процедуры в сравнении с классическими методами.

**Влияние гомосеринлактона на активность бета-галактозидазы**

**Ибрагимова В.Р., Маргулис А.Б., Бушманова О.В.** (Казань, [ibragimovaviktoriya@yahoo.ru](mailto:ibragimovaviktoriya@yahoo.ru))

Гомосеринлактон является одним из важнейших факторов коммуникации бактерий и широко используется в межвидовых взаимодействиях в качестве сигнального агента. В связи с этим, интересным представляется изучение влияния гомосеринлактона на биосинтез и активность конститутивных и индуцируемых ферментов микроорганизмов. Известно, что бета-галактозидаза штамма *Escherichia coli* PQ 37 находится под промотором *SOS*-оперона и синтезируется в ответ на сигнал, представляющий собой появление оноцепочечной и частично фрагментированной ДНК вследствие действия сильных ДНК-повреждающих агентов. В нашу задачу входило выяснение вопроса, может ли гомосеринлактон как сигнальная молекула, вызывающая активацию многих оперонов, включить гены *SOS*-оперона. Было установлено, что гомосеринлактон, добавленный непосредственно

в реакционную смесь, вызывал изменение активности фермента, увеличивая её в среднем в 5 раз, то есть являлся эффектором белка бета-галактозидазы. При этом уровень экспрессии генов *SOS*-оперона при совместном добавлении гомосеринлактона и известного *SOS*-индуктора митомицина С оставался фоновым, то есть гомосеринлактон блокировал их экспрессию. Увеличение времени инкубации должно было бы привести к увеличению биосинтеза бета-галактозидазы, если гомосеринлактон является индуктором *SOS*-оперона, но этого не было (и это подтверждается данными *SOS*-хромотеста, полученными ранее). Отсюда следует, что гомосеринлактон, по-видимому, вызывал блокирование экспрессии генов *SOS*-оперона, хотя оказывал стимулирующее действие непосредственно на активность фермента бета-галактозидазы. Таким образом, можно сделать вывод, что гомосеринлактон увеличивает активность бета-галактозидазы *E. coli*, не влияя на уровень ее биосинтеза.

*Работа выполнена в рамках программы «Развитие научного потенциала высшей школы» (РНП 2.1.1.1005).*

#### **Поликомпонентный иммобилизованной пробиотик с антимутагенными свойствами Кистаубаева Аида Сериковна (Казахстан, Алматы, aida\_kaz@mail.ru)**

Лечебно-профилактическое действие пробиотиков обусловлено синтезом метаболитов, которые, оказывая корректирующее действие на нарушенную нормальную микрофлору, обладают еще и целым комплексом полезных для макроорганизма свойств, одним из которых является их генопротекторная способность. Для усиления эффекта пробиопротектора необходим рационально подобранный состав штаммов микроорганизмов и обеспечение их адресной доставки в целевой орган – толстый кишечник, что может быть обеспечено созданием иммобилизованных форм пробиотиков, в которых бактериальные клетки прикреплены к поверхности носителей-сorbентов.

Цель исследования: Конструирование бактериального консорциума на основе штаммов *L.acidophilus*, *L.fermentum* и *L.plantarum*, иммобилизованных на карбонизованном носителе. Исследованы генопротекторные свойства 12 штаммов лактобацилл с помощью алгоритма, включающего бактериальный Rec- и SOS-хромотесты, систему Эймса и метафазный анализ костного мозга белых мышей. Селекционированы штаммы лактобацилл, обладающие высокой антимутагенной активностью в отношении модельных мутагенов.

При оценке технологических свойств отобраны 3 биосовместимых штамма лактобацилл, в дальнейшем используемые для иммобилизации бактериальных клеток на карбонизованном сорбенте из зауглероженной рисовой шелухи. На модели антибиотикового дисбактериоза, вызванного пероральным введением ципрофлоксацина мышам, изучены лечебно-профилактические свойства конструируемого препарата. Показано, что новый иммобилизованный пробиотик характеризуется повышенным лечебным эффектом за счет более длительного сохранения вводимых бактериальных клеток в кишечнике экспериментальных животных.

Установлено, что препарат полностью подавляется мутагенез, индуцируемый N-нитрозо-N-метилмочевиной и 2-нитрофлуореном, оцениваемый по частоте реверсий в гистидиновом локусе у индикаторных штаммов *Salmonella typhimurium* TA 100 и TA 98. Мутагенный эффект N-метил-N-нитро-N-нитрозогуанидина снижается на 97%, 4-нитрохинолин-1-оксида на 82%.

Число хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей, индуцированных прямым мутагеном N-нитрозо-N-метилмочевиной и промутагеном N-нитрозоморфолином, при введении в рацион питания препарата исследованного препарата снижается на 70–75%. Выявлено также снижение генотоксичности фекалий у экспериментальных животных, получавших иммобилизованные клетки лактобацилл после предварительной мутагенной нагрузки.

Таким образом, разработан новый сорбированный на носителе из зауглероженной рисовой шелухи комплексный лактосодержащий пробиотик с выраженным антимутагенным и лечебно-профилактическим действием. Препарата зарегистрирован в качестве биологически активной добавки к пище.

**Результаты применения технологии микробной биорекультивации биоценоза, поражённого трансформаторным маслом**  
**Конева Ирина Сергеевна (Сургут, oduvanchik\_live@mail.ru)**

Наряду с углеводородным загрязнением в округе увеличиваются площади, нарушенные иными загрязнителями, в частности трансформаторными маслами. Представленный участок является боковым поверхностным водотоком (3-4°), расположенный в лесном массиве с поступлением осадочных вод с загрязнителем. После поступления трансформаторного масла (2005 год) был проведён его механический сбор, что привело к смешению верхнего горизонта почвы с обнажением подзолистого горизонта. В последующем произошло проникновение загрязнителя в почвенные участки с образованием анаэробных условий и угнетению растительности. Для формирования технологии рекультивации в отобранных почвенных образцах определён ряд показателей (31.07.2009 г.): содержание углеводородов –  $9,3 \pm 0,4$  г/кг почвы, общее микробное число (ОМЧ) –  $3,6 \times 10^3$  клеток/г почвы, активность углеводородокисляющей микрофлоры (УОМ) – не выявлена.

Предложена следующая технология рекультивации: 1) внесение комплекса бактерий; 2) формирование оптимальной экологической ниши для жизнедеятельности бактерий и прорастания высеваемых семян травосмеси путем внесения минеральных удобрений и вермикулита; 3) рыхление на доступную глубину (20-25 см). Биопрепарат представлен ранее выделенными из загрязнённых почв углеводородокисляющими бактериями: *Pseudomonas* spp., *Rhodococcus* spp., *Artobacter* spp. и азотфикссирующих бактерий: *Rhizobium* spp. Минеральное удобрение: нитроаммофоска дозой до 60 г/м<sup>2</sup>. Сорбент: вермикулит (доза внесения 0,2 литра/м<sup>2</sup>). Травосмесь: 40% – тимофеевка луговая (*Phleum pratense*), 20% – овсяница луговая (*Festuca pratensis*), 20% – райграс многолетний (*Lolium perenne* L.), 20% – козлятник восточный (*Galega orientalis*).

Через 3 недели после применения технологии визуально выявлено следующее: исчезновение (местами полное) корки на поверхности почвы, отсутствие запаха анаэробно разлагающейся органики, прорастание семян внесенной травосмеси с формированием узлов кущения и активизация аборигенной растительности. Контрольные показатели составили: содержание углеводородов  $0,2 \pm 0,02$  г/кг почвы, ОМЧ –  $2,7 \times 10^7$  клеток/г почвы, активность УОМ –  $1,5 \times 10^4$  клеток/г почвы. Всхожесть внесенной травосмеси составила 38-42%.

При проведении контроля (30.09.2009) было выявлено поступление (благодаря поверхностному стоку) дополнительного количества загрязнителя с участка основного разлива, расположенного непосредственно на трансформаторной площадке и проведена его повторная рекультивация по той же технологии. На лесном участке проведено повторное рыхление всего участка с последующим внесением семян травосмеси.

По окончании сезона контрольные показатели составили: содержание углеводородов  $0,34 \pm 0,02$  г/кг почвы, ОМЧ –  $2,3 \times 10^8$  клеток/г почвы, активность УОМ –  $4,8 \times 10^4$  клеток/г почвы. Всхожесть внесенной травосмеси составила 76-77%. Автор выражает благодарность Фахрутдинову Айвару Инталовичу, научному руководителю.

**Изучение биоразнообразия сульфатредуцирующих бактерий в аэробных водах и зоне хемоклина Черного моря с использованием метода FISH**  
**Корнеева Валерия Алексеевна (Москва, busenica@yandex.ru)**

Чёрное море представляет собой самый большой в мире меромиктический водоём (Lin et al., 2006). Глубже границы аэробных и анаэробных вод в черноморских водах присутствует сероводород, концентрация которого на глубине 2000 м достигает 370 мкМ. Накопление H<sub>2</sub>S в водной толще Чёрного моря происходит, главным образом, в результате жизнедеятельности сульфатредуцирующих бактерий (СРБ) (Ivanov, Lein, 2006). Однако рядом гидрохимиков зафиксировано присутствие восстановленных серных соединений и в аэробных водах (Волков и др., 1992), что, по их мнению, может происходить за счёт биогенного восстановления сульфатов СРБ.

В данном исследовании был проведен анализ распространения СРБ в аэробных водах и зоне хемоклина Чёрного моря, а также накопительных культур, выделенных из соответствующих горизонтов, с помощью метода гибридизации *in situ* с 16S рРНК-

специфичными олигонуклеотидными зондами, меченными флуоресцентным красителем цианином 3 (метод FISH).

В аэробной зоне на глубине 30 м было выявлено значительное количество сульфатредуцирующих бактерий, относящихся к родам *Desulfotomaculum*, *Desulfovibrio* и *Desulfobacter*, тогда как на глубинах 150 м у верхней границы хемоклина среди сульфатредукторов преобладали представители рода *Desulfomicrobium*. Количество активных клеток сульфатредукторов, обнаруженных в пробах воды в летний период, значительно превышало таковое в зимних пробах из глубоководной зоны Чёрного моря. Присутствие физиологически активных сульфатредукторов в кислородных водах и зоне хемоклина Чёрного моря подтверждает полученные ранее данные гидрохимиков, отмечающие наличие восстановленных соединений серы в аэробной водной толще.

В анаэробных накопительных культурах СРБ, выделенных из аэробной зоны (30 и 70 м) Чёрного моря, преобладали представители родов *Desulfomicrobium*. Накопительные культуры СРБ, полученные из водных проб нижней зоны хемоклина глубоководной части Чёрного моря, содержали представителей родов *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum* и *Desulfomicrobium*. Представители рода *Desulfobacter* обнаружены не были.

#### **Ферментативная активность бактерий при действии гомосеринлактона**

*Кудрявцева Д.Н., Белоногова Н.В.* (Казань, *foxy\_foxy@rambler.ru*)

Значимой проблемой медицинской практики является распространение устойчивых форм микроорганизмов, снижающее эффективность применения антибактериальных препаратов. Особенно высока лекарственная устойчивость бактерий в биоплёнках. Для формирования биоплёнок, а также для синтеза факторов вирулентности бактерии используют реакции квorum-сенсинга. Такие межклеточные сообщения играют ключевую роль во взаимодействии бактерий с высшими организмами, животными и растениями, как при симбиозе, так и при патогенезе и, следовательно, определяют инфекционные процессы и развитие болезней. Изучение механизмов квorum-сенсинга открывает новые возможности для предупреждения и лечения болезней, вызванных микробными агентами, а также позволяет понять сложный комплекс межвидовых бактериальных взаимодействий в природных местах обитания микроорганизмов. В связи с вышеизложенным, целью настоящей работы явилась оценка возможности гомосеринлактона изменять активность гидролитических ферментов прокариот. В качестве модельных объектов выбраны протеаза и щелочная фосфатаза *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 и *Escherichia coli* K12. На пути к достижению цели решались следующие задачи: 1) охарактеризовать токсические эффекты гомосеринлактона по отношению к микроорганизмам; 2) определить содержание ацилированных лактонов гомосерина в культуральной жидкости с добавлением и без добавления гамма-бутиrolактона; 3) выявить влияние гомосеринлактона на активность и биосинтез протеазы и щелочной фосфатазы. Было показано, что гомосеринлактон не проявил токсических эффектов по отношению к микроорганизмам в исследуемых концентрациях (10-1000 мкг/мл). Исследуемые микроорганизмы при краткосрочном культивировании образуют гомосеринлактоны разных видов (бутирил-, гексаноил-, октаноил-) в незначительных количествах (200-2000 нг/мл). Гомосеринлактон в концентрациях 10 и 50 мкг/мл не изменял активность протеазы, но проявлял концентрационнозависимый эффект в отношении щелочной фосфатазы, увеличивая её активность примерно в 2 раза. Биосинтез щелочной фосфатазы с возрастом культуры увеличивался у *Lactobacillus plantarum* и уменьшался у *E. coli*, как в присутствии гомосеринлактона (50 мкг/мл), так и без него. Работа выполнена в рамках программы «Развитие научного потенциала высшей школы» (РНП 2.1.1.1005).

#### **Дисбиотические изменения в микрофлоре кишечника теплокровных животных**

**под действием дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis***

*Купцова Анна Александровна* (Ульяновск, *kloushel@mail.ru*)

Нормальную микрофлору кишечника можно рассматривать как индикатор здоровья теплокровных животных и человека. При воздействии дестабилизирующих внешних или

внутренних факторов микробиота реагирует количественными и качественными сдвигами в популяциях микроорганизмов. Одним из факторов нарушения микробоценоза кишечника может являться попадание в желудочно-кишечный тракт вместе с пищей белковых токсинов бактериального происхождения, таких, как дельта-эндотоксины бактерии *B. thuringiensis*, являющиеся основой для производства биопрепаратов, широко применяемых в сельском и лесном хозяйстве для борьбы с вредными организмами.

Целью настоящего исследования явилось изучить действие дельта-эндотоксина *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* Z-52 на изменение количественных и качественных показателей микробиоты кишечника теплокровных животных.

Было установлено, что при дозе препарата от 100 мг/кг подавлялся рост нормальной микрофлоры в толстой кишке – количество доминирующих видов бактерий (встречающихся в 50-100% исследований) – бифидобактерий и лактобактерий – на 14 и 28 сутки после начала перорального введения уменьшалось по сравнению с контролем в 1,5-2 раза. Применение дельта-эндотоксина оказalo также влияние на изменение количества бактериоидной микрофлоры и эшерихий с нормальной ферментативной активностью. В результате снижения количества представителей облигатной микрофлоры размножаются микробы, попавшие извне или эндогенные виды, устойчивые к лекарственным препаратам – стафилококки, в том числе и самый патогенный вид – *S. aureus* а также клебасиэллы, протеи и дрожжевые грибы. Выявлялись также эшерихии, обладающие гемолитической активностью. Количество дрожжеподобных грибов увеличивается в 2,3 раза, а стафилококки, не обнаруживающиеся ранее в контроле, высеваются на 28 сутки в количестве 1,47 lg КОЕ/г.

Итак, попадание вместе с пищей дельта-эндотоксина в дозе выше 100 мг/кг веса в организм животных приводит к значительному снижению содержания облигатной микрофлоры толстого кишечника на фоне увеличения микробного числа транзиторных и добавочных условно-патогенных видов, что свидетельствует о глубоких дисбиотических изменениях и создает предрасположенность для развития как инфекционных, так и соматических заболеваний.

Работа поддержанна грантом аналитической ведомственной целевой программы Министерства образования и науки РФ «Развитие научного потенциала высшей школы» по теме «Разработка теоретических основ экологически безопасного регулирования численности вредных организмов дельта-эндотоксинами *Bacillus thuringiensis*» (регистрационный номер 2.1.1/2275).

### **Генетические и физиологические особенности микробного населения нефтешламов**

*Лайков Александр Владимирович* (Казань, [Alexander.laikov@yandex.ru](mailto:Alexander.laikov@yandex.ru))

Нефтяная промышленность является источником образования больших объёмов токсичных отходов – нефтешламов. Основные компоненты нефтешламов – целевые и побочные продукты нефтехимического синтеза потенциально являются биодеградабельными. В связи с ключевой ролью микроорганизмов в детоксикации и биодеградации отходов нами проанализировано сообщество аборигенных микроорганизмов углеводородных шламов. В нашей лаборатории впервые обнаружен феномен длительного выживания некоторых микроорганизмов в толще хранящегося нефтешлама, возраст которого измеряется несколькими десятилетиями. Этот факт представляет большой интерес, поскольку шламы характеризуются экстремальными условиями обитания, а именно высокой гидрофобностью, неблагоприятным воздушно-водным режимом, токсичностью и высокой концентрацией органических веществ неприродного происхождения. Для выяснения механизмов, обеспечивающих выживание бактерий, нами проанализированы изоляты аэробных гетеротрофов и специфических деструкторов, выделенных из образцов депонированного нефтешлама, на наличие плазмид. Обнаружен аномально высокий процент содержания плазмид во всех исследуемых группах микроорганизмов: деструкторах алканов, полиэтиленгликоля, нафталина. Также высока встречаемость плазмид среди аэробных гетеротрофов. Отличительной чертой обнаруженных плазмид являются их крупные размеры – от 60-100 т. п. н. Мы предполагаем, что данные плазмиды позволяют бактериям выживать в условиях высокой токсичности, поскольку могут нести гены деградации и

полирезистентности к компонентам шлама. Подобные гены определяют наличие различных путей метаболизма у микроорганизмов шлама. Это подтверждается возможностью использования в качестве единственного источника углерода и энергии различных групп углеводородов. Большинство изолятов, выделенных из нефтешлама, обладают широкими метаболическими возможностями и способны утилизировать весь спектр исследуемых компонентов шлама. Данный признак стабилен во времени – микроорганизмы не утрачивают способность к деструкции при многократных пересевах на богатые питательные среды. Выявленные нами специфические генетические и физиологические особенности шламовых микрорганизмов представляют как прикладной, так и фундаментальный интерес с точки зрения понимания общих механизмов устойчивости микроорганизмов в экстремальных условиях.

**Идентификация нового рода магнитотактических бактерий  
с применением методов магнитной сепарации и молекулярной экологии**  
*Малеева А.Н., Груздев Д.С., Дзюба М.В. (Ярославль, [annmaleeva@yandex.ru](mailto:annmaleeva@yandex.ru))*

Наноразмерные магнитные частицы имеют широкий спектр применения – от адресной доставки хемотерапевтических средств в пораженный орган до использования в качестве контрастирующих агентов в магнитно-резонансной томографии и при гипертермии злокачественных опухолей. Однако для большинства задач необходимо иметь калиброванные частицы с одинаковыми размерами, составом и магнитными свойствами. С задачей синтеза такого рода частиц прекрасно справляются магнитотактические бактерии, способные продуцировать магнетосомы – наночастицы магнетита ( $Fe_3O_4$ ) или сульфида железа ( $Fe_3S_4$ ), окруженных липопротеидной мембраной. Зрелые магнетосомы имеют видоспецифичную форму и размеры кристаллов, наличие липопротеидной мембранны расширяет спектр их возможного применения за счет модификации мембранных белков.

На данный момент показана возможность использования магнетосом для магнитной сепарации клеток и белков, выделения ДНК и РНК непосредственно из биологических жидкостей. Магнитотактические бактерии могут выступать в качестве диагностического инструмента для выявления дефектов металлических конструкций на наноуровне. Также показана возможность создания на основе магнитотактиков нанороботов и биосенсоров.

В связи с перспективностью использования магнитотактических бактерий появилась необходимость поиска и идентификации микроорганизмов – источников магнетосом. Цель настоящего исследования заключается в выявлении новых видов магнитотактических бактерий с помощью определения биологического разнообразия накопительных культур, полученных на основе магнитной сепарации из природных сообществ.

Для определения видового состава культур был выбран подход, основанный на оценке разнообразия клонированных фрагментов генов 16S рРНК (филогрупп), представленных в 16S рДНК амплификатах суммарной ДНК изучаемого сообщества.

В ходе проделанной работы были исследованы накопительные культуры, полученные из прибрежного ила р. Ольховка, г. Кисловодск. По данным филогенетического анализа выявлена ранее не описанная бактерия, принадлежащая к новому роду семейства Rhodospirillaceae. С помощью просвечивающей электронной микроскопии было показано наличие магнетосом внутри клеток исследуемых бактерий. Последовательность генов 16S рРНК предполагаемой магнитотактической бактерии была депонирована в международную базу данных GenBank (№ депонирования – GU724731).

*Работа выполнена в рамках проекта РАН «Нанотехнология». Авторы выражают искреннюю благодарность научному руководителю к.н.н. Кузнецовой Б.Б. и д.н.н. Горленко В.М. за помощь в проведении исследований и подготовке тезисов.*

**Активность почвенных экзоферментов цикла углерода при внесении новых комплексных азотно-фосфорных удобрений в типичный серозём**  
*Мамасалиева Лазиза Элмурадовна (Узбекистан, Ташкент, [lazizochka@mail.ru](mailto:lazizochka@mail.ru))*

Ферментативная активность четко выявляет разницу между почвами разного уровня плодородия, тесно связанного с биомассой, а главное, метаболическим потенциалом

почвенных микроорганизмов. В частности, гидролазы широко распространены в почвах и, разрушая высокомолекулярные органические соединения, играют важную роль в обеспечении растений и микроорганизмов питательными веществами и обусловливают интенсивность круговорота углерода. Скорость разложения почвенного органического вещества в условиях поливного земледелия в Узбекистане достаточно высока, что критично для плодородия малогумусных сероземов. Поэтому при разработке новых средств химизации (в том числе, удобрений) предпочтение должно отдаваться препаратам, не оказывающим стимулирующего влияния на почвенные гидролазы.

Целью исследований является изучение влияния новых комплексных азотно-фосфорных удобрений (КАФУ 1 и 2) на активность карбогидраз цикла углерода в типичном серозёме под культурой хлопчатника. КАФУ получены из бедных фосфоритов Центральных Кызылкумов путем неполного их разложения нитратом и сульфатом аммония. Состав КАФУ: N – 8-12%;  $P_2O_5$ общ – 10-12%;  $P_2O_5$ усв – 8-10%. Для сравнения вносили концентрированное фосфорное удобрение аммофос (N – 10%;  $P_2O_5$ усв – 46%). Активность глюкозидазы, ксиланазы, целлобиогидролазы и хитиназы определяли флюорометрическим методом с MUF-субстратами.

Наибольшая активность глюкозидазы обнаружена в исходной почве – 846,5  $\mu$ Mol MUF. После применения удобрений в течение двух вегетационных периодов, т.е. осенью 2005 г., было установлено достоверное снижение  $\beta$ -глюкозидазной активности в вариантах NK и с внесением аммофоса на 12,0 и 7,4%, а с КАФУ – всего на 0,3% и 1,2%.

Целлюлазная активность в исходной почве была равна 19,2  $\mu$ Mol MUF, в конце же опыта отмечено значительное её снижение. Наибольшее ингибирующее действие отмечено в варианте с NK-19,3%, тогда как фосфорные удобрения на фоне NK оказывали более мягкое действие: при внесении аммофоса наблюдалось снижение на 12,0%; а внесение КАФУ – на 10,9–15,1%. Исследования показали меньшие значения активности ксиланазы по сравнению с глюкозидазой, но большие, чем с целлобиогидролазой. Под воздействием NK ксиланазная активность за 2 года исследований снизилась на 7,8%. Напротив, отмечено достоверное увеличение ксиланазы в вариантах с фосфорными удобрениями на фоне NK: аммофосом, КАФУ-1 и 2 – на 6,4; 6,0 и 3,2% соответственно. Потенциальная хитиназная активность была довольно высокой – 475,6  $\mu$ Mol MUF/ г почвы в час. Применение удобрений в течение двух лет привело к увеличению хитиназной активности: NK – на 8,5%, аммофос – на 8,0; КАФУ 1 и 2 на – 3,2 и 5,1% соответственно. Изменения суммарной активности экзокарбогидраз за 2 года применения КАФУ и аммофоса на фоне NK в исследуемой почве не превышали  $\pm 1,0$ –1,7%, тогда как в NK варианте снижение составило 5%.

Выражаю благодарность моему научному руководителю ст.н.с. Института общей и неорганической химии АН РУз, к.б.н. Мячиной О.В. за научное руководство при выполнении научно-исследовательской работы.

#### Роль света в контроле транспортных систем аммония у одноклеточной зелёной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* Минаева Екатерина Сергеевна (Санкт-Петербург, katerina-min88@mail.ru)

Одноклеточная зелёная водоросль *Chlamydomonas reinhardtii* транспортирует основной источник азота – аммоний на разных стадиях жизненного цикла. Установлено, что вегетативные клетки и прегаметы (некомпетентные гаметы, получаемые путем инкубирования вегетативных клеток в среде без источника азота в темноте) использовали эффективно только систему с низким сродством к аммонию/метиламмонию, LATS (от англ. low-affinity transport system), тогда как гаметы экспрессировали две системы: LATS и систему с высоким сродством к аммонию/метиламмонию, HATS (от англ. high-affinity transport system). Анализ кинетики транспорта [ $^{14}$ C]-метиламмония показал, что (1) LATS контролируется светом на посттрансляционном уровне, и (2) активность HATS контролируется одновременным действием двух сигналов: отсутствие азота в среде и светом. Световой контроль HATS зависит от синтеза белков *de novo*.

Методом ПЦР в режиме реального времени выявлена световая регуляция экспрессии четырех генов из семейства *Amt1*: *Amt1.1*, *Amt1.2*, *Amt1.4* и *Amt1.5*. Сравнительный анализ

особенностей регуляции экспрессии генов *CrAm1;1-8*) в вегетативных клетках, прегаметах и гаметах дикого типа и инсерционного мутанта *CF59*, демонстрирующего гаметогенез в отсутствие светового сигнала, позволяет предположить, что регуляторы гаметогенеза вовлечены в контроль транскрипции гена *Am1.5*. Показано, что световой контроль транскрипции генов *Am1.1*, *Am1.2*, и *Am1.4* не связан с процессом дифференцировки вегетативных клеток в гаметы. (Работа поддержанна грантом РФФИ 07-04-00277). Я выражаю благодарность за помощь и поддержку своему научному руководителю Елене Викторовне Ермиловой и всем сотрудникам лаборатории Адаптации микроорганизмов.

### **Особенности биосинтеза внутриклеточной протеиназы *Serratia grimezii* Митрофанова Ольга Владимировна (Казань, [olgunhik.ru@mail.ru](mailto:olgunhik.ru@mail.ru))**

Внутриклеточные протеолитические ферменты микроорганизмов играют важную роль во многих физиологических процессах. Ранее в клетках *Serratia grimezii* была обнаружена протеиназа, которая предположительно участвует в инвазии бактерий. В настоящее время, физиологическая роль данной протеиназы до конца не изучена. Представляло интерес выяснить закономерность биосинтеза этого фермента бактериями.

Цель данной работы заключалась в исследовании протеолитической активности в культуральной жидкости и во внутриклеточном экстракте *S. grimezii*. В качестве субстрата для определения активности использовали актин, выделенный из ацетонового порошка мышц кролика. Внутриклеточный экстракт получали из отмытых клеток методом замораживания-оттаивания. Расщепление актина определяли электрофоретически.

Была исследована динамика роста бактерий и динамика появления активности по отношению к актину в культуральной жидкости и в клеточном экстракте микроорганизмов. Было показано, что на среде LB с аэрацией стационарная фаза роста *S. grimezii* приходится на 8 час культивирования. Ранняя и поздняя стационарные стадии приходятся на 10 и 24 часа роста культуры соответственно.

Протеолитическую активность в клеточном экстракте определяли на всех фазах роста культуры (с 4 по 58 час). Показано, что актинолитическая активность появляется на ранней стационарной фазе роста (10 ч.) и сохраняется в клетках до 58 часа роста. Протеолитическая активность в культуральной жидкости на тех же часах роста полностью отсутствует. Это доказывает, что данная протеиназа является цитоплазматическим ферментом, не секретируемым в культуральную среду. Во всех исследуемых пробах протеолиз актина происходит ограниченно с образованием только одного большого фрагмента (36 кДа).

Также был проведен ингибиторный анализ с использованием *o*-фенантролина – ингибитора металлопротеиназ и PMSF – ингибитора сериновых протеиназ, который показал, что расщепление актина полностью подавляется *o*-фенантролином и не подавляется PMSF. Таким образом, ограниченный протеолиз актина обусловлен наличием в клеточном экстракте *S. grimezii* металлопротеиназы, синтезирующейся в клетках бактерий на ранней стационарной фазе роста.

### **Внутриклеточные протеиназы *Proteus mirabilis* Мовчан О.А., Михайлова Е.О. (Казань, [orbit339@list.ru](mailto:orbit339@list.ru))**

Условно-патогенные энтеробактерии *Proteus mirabilis* обладают различными факторами вирулентности, к которым относятся и внеклеточные протеиназы. Зачастую эти бактерии становятся причиной различных гнойно-воспалительных процессов и, в частности, инфекции мочевыводящих путей больных с физиологическими нарушениями. Показано, что внеклеточные протеиназы *P. mirabilis* могут специфически расщеплять иммуноглобулины класса А, которые играют важную роль в местном иммунитете. Однако, роль внутриклеточных протеиназ этих бактерий в патогенезе не известна.

Целью настоящей работы было исследование протеолитической активности во внутриклеточном экстракте *P. mirabilis*. В качестве субстратов для определения активности использовали азоказеин и актин, выделенный из ацетонового порошка мышц кролика. Исследовалась динамика роста бактерий и динамика появления активности по отношению к азоказеину и актину, а также чувствительность внутриклеточной

протеолитической активности к различным ингибиторам. Внутриклеточный экстракт получали из отмытых клеток методом замораживания-оттаивания. Активность по отношению к актину определяли электрофоретически.

Исследование динамики роста бактерий показало, что на среде LB с аэрацией бактерии выходят на стационарную фазу роста на 9-10 час культтивирования. Поэтому для определения активности брали клетки на экспоненциальной фазе роста (8 час), на ранней (16 час) и поздней стационарной фазах роста (24 и 48 час). Показано, что активность по азоказину и актину появляется уже на 8 час и присутствует в клетках на всех стадиях роста. Показано, что актин расщепляется ограниченно с образованием большого фрагмента с молекулярной массой 36 кДа.

Ингибиторный анализ с использованием о-фенантролина – ингибитора металлопротеиназ и PMSF – ингибитора сериновых протеиназ, показал, что основная протеолитическая активность в клеточном экстракте определяется металлопротеиназой (85% активности по азоказину) и незначительная часть обусловлена сериновой протеиназой (15%). Расщепление актина с образованием 36 кДа фрагмента полностью подавляется о-фенантролином и не подавляется PMSF. Таким образом, во внутриклеточном экстракте обнаружены металлопротеиназы и сериновые протеиназы. Ограниченный протеолиз актина обусловлен действием металлопротеиназы. *Автор выражает признательность доценту, к.б.н. Мардановой А.М. за помощь в подготовке тезисов.*

### **Селекция микроорганизмов-активаторов деструкции растительных остатков Муравьева Юлия Валерьевна (Астрахань, julia\_mur@mail.ru)**

Компостирование представляет собой самый продуктивный прием переработки отходов растительного происхождения, полученный продукт – компост является экологически чистым органическим удобрением, а выделенный представители микроорганизмов могут быть использованы в качестве основных составляющих для создания компостной закваски. Биоконверсия растительного сырья в продукты для сельского хозяйства основана на воздействии ферментов микроорганизмов на структуру растительных остатков. В связи с этим изучение целлюлозолитической активности микроорганизмов актуально и своевременно.

Целью работы являлось выделение бактерий-деструкторов растительных остатков и исследование их ферментативной активности. Объектами исследования послужили компосты на основе: газонной травы, тростника южного, бумаги. Наибольшая численность микроорганизмов наблюдалась в накопительной культуре с компоста, богатого зелёными растительными остатками, а наименьшая – в накопительной культуре с компоста, составленного из бумажных остатков. На среде Гетчинсона выделены 15 изолятов, из которых по способности к росту в чистой культуре отобраны 5 изолятов. Определение целлюлазной активности штаммов показало, что наибольшей активностью обладают 3 чистые бактериальные культуры, выделенные с компоста, в состав которого входят остатки тростника. Как известно, растительные отходы являются смешанными источниками углерода и азота, необходимыми для компостирования. Оптимизация процесса компостирования может быть обеспечена реализацией – соотношение С : N в субстрате 25–30 : 1. Из компостируемых остатков выделены чистые культуры свободноживущих азотфиксаторов, которые впоследствии можно использовать в качестве одного из компонентов компостной закваски и дополнительного источника пополнения азота. Данные по изучению азотфиксацией активности выделенных штаммов методом газовой хроматографии показали, что наиболее активными являются два штамма (23,31 мкг N<sub>2</sub>/ч и 13,56 мкг N<sub>2</sub>/ч).

Таким образом, применение микроорганизмов, обладающих высокой биохимической активностью, возможно в качестве активаторов для создания компостной закваски, которая позволит увеличить скорость деструкции растительного сырья и получить органическое удобрение хорошего качества, что одновременно решит проблему утилизации отходов сельского хозяйства. *Особая благодарность выражается научному руководителю д.б.н. профессору Сопруновой Ольге Борисовне за помощь в подготовке тезисов.*

**Выявление и характеристика метаболитов растений,  
индуцирующих систему квorumа *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043**  
**Мухамедова Л.Н., Горшков В.Ю., Мухаметшина Н.Е. (Казань, snisumtumriick@gmail.com)**

Процесс взаимодействия фитоассоциированных бактерий и растений предполагает осуществление множества приспособительных реакций двух организмов, необходимых для распознавания партнера и адекватного реагирования на него. У фитопатогенных микроорганизмов вирулентность регулируется на популяционном уровне посредством межклеточной коммуникации, примером которой является ацилгомосерин лактон (АГЛ)-зависимая система «квorum сенсинга». Функционирование системы квorumа основано на синтезе и восприятии АГЛ, образование которых регулируется по принципу положительной обратной связи.

В наших экспериментах показано, что у грамотрицательной бактерии, вызывающей заболевание «черная ножка» картофеля – *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043, система квorumа, в дополнение к классическому механизму, может активироваться метаболитами растений. При культивировании бактерий *P. atrosepticum* SCRI1043 на минимальной среде в присутствии тканей растений – представителей семейства пасленовых – табака и картофеля уровень экспрессии гена АГЛ-синтазы был значительно выше, чем при культивировании бактерий на полноценных питательных средах. Уровень экспрессии определяли при помощи отработанной нами тестовой системы на основе ПЦР в реальном времени.

Высокий уровень транскрипции гена АГЛ-синтазы свидетельствовал об активации системы квorumа *P. atrosepticum* SCRI1043, что также подтверждалось более высоким уровнем АГЛ в супернатантах культур микроорганизма, инкубированных в присутствии растительных тканей, чем на полноценных питательных средах. Содержание АГЛ мы контролировали при помощи АГЛ-сенсорного штамма *Escherichia coli* JLD271, несущего репортерную плазмиду AL103 с генами люциферазной системы.

Особого внимание заслуживает то, что система квorumа *P. atrosepticum* SCRI1043 активировалась при культивировании бактерий в присутствии тканей специфичного растения-хозяина (картофеля) в большей степени, чем неспецифичного (табака). Это позволяет считать, что система квorumа *P. atrosepticum* SCRI1043 интегрирована в глобальные сигнальные системы, ответственные за распознавание растения в качестве организма хозяина.

Дальнейшую характеристику растительных метаболитов, влияющих на синтез АГЛ *P. atrosepticum* SCRI1043 проводили только на примере картофеля. Для этого была проведена постадийная очистка растительного экстракта (ультрафильтрация, осаждение растворителями, ионообменная хроматография, гель-хроматография). Благодаря этому было выявлено несколько фракций, которые обладали способностью индуцировать синтез АГЛ у *P. atrosepticum* SCRI1043. Установлено, что целевые соединения растительной природы являются термостабильными, низкомолекулярными (молекулярная масса менее 1000 Да), заряженными, полярными. По нашему мнению их дальнейшая характеристика и идентификация позволят значительно расширить представления о растительных эрвениозах при взаимодействии со специфичными и неспецифичными хозяевами.

**Идентификация бактерий рода *Bacillus*, выделенных из различных экологических ниш  
с помощью секвенирования гена 16S рРНК**

**Мынбаева Марьяна Жандосовна (Казахстан, Астана, maryana.81@mail.ru)**

Классификация бактерий, основанная на последовательности нуклеотидов 16S рРНК, позволяет на основании сравнения первичной структуры части гена 16S рРНК с известными структурами из GenBank или EMBL библиотек нуклеотидных последовательностей отнести исследуемые виды бактерий к различным таксономическим группам и видам. Ген 16S рРНК имеет как высококонсервативные, так и быстро эволюционирующие, вариабельные районы, исследование совокупности которых дает важную эволюционную информацию. Исследование структуры гена рРНК позволяет не только установить или уточнить таксономическое положение штаммов, но и в иных ситуациях дает начало совершенно новым таксономическим группам. В последние годы особенно продуктивно этот метод

используется для изучения биоразнообразия и филогенетических взаимоотношений внутри бактериальных сообществ.

Ген 16S рРНК содержит ~1550 п.н. Значительную часть гена занимают консервативные области, имеющие практически одинаковый нуклеотидный состав у различных микроорганизмов. Это позволяет подбирать универсальные праймеры для амплификации фрагментов гена различной длины.

Целью данной работы является подтверждение родовой принадлежности штаммов бацилл выделенных из различных экологических ниш, с помощью секвенирования гена 16S рРНК.

Объектом исследований были 50 штаммов *B. subtilis*, выделенные из почвы, растений, муки, хлебобулочных изделий, зерна пшеницы, которые сравнивали с коллекционными штаммами разных видов бактерий рода *Bacillus*.

Выделение ДНК проводили согласно стандартному протоколу описанному Vizert GenBank DNA Purification Kit (Promega, USA). Качественный анализ выделенной геномной ДНК учитывали с помощью электрофореза в агарозном геле. Количественный анализ выделенной геномной ДНК провели с помощью Thermo Scientific Nano Drop 1000 Spectrophotometer. Для определения нуклеотидной последовательности была поставлена ПЦР реакция с использованием праймеров: forward 8F и reverse 806R. Электрофоретический анализ проводили в 1% агарозном геле. После чего провели дефосфорилирование полученных ампликонов. Реакцию секвенирования провели с использованием BigDye® v 3.1 и forward праймера 8F. После проведения ПЦР-секвенирования исследуемые образцы загрузили в автоматический генетический анализатор 3730 xl DNA Analyzer для последующего разделения фрагментов методом капиллярного электрофореза. Полученную нуклеотидную последовательность сопоставляли с нуклеотидными последовательностями международных баз данных – GenBank.

В результате целевого поиска соответствий полученной нуклеотидной последовательности 16S rRNA с нуклеотидными последовательностями GenBank получены следующие результаты: 49 культур подтвердили свою родовую принадлежность к роду *Bacillus*, но видовое название не соответствует у двух штаммов. Таким образом, генотипирование подтвердило видовую принадлежность 47 культур – *Bacillus subtilis*, а две культуры принадлежали к *Bacillus licheniformis*. Автор выражает признательность к.б.н. Ануарбековой С.С., д.б.н., профессору Алмагамбетову К.Х. за помощь в подготовке тезисов.

#### **Определение мутагенной активности экстрактов содержимого кишечника**

**Нагуманова Лилия Аслановна** (Казахстан, Алматы, *lilu2008@mail.ru*)

Нормальная микрофлора кишечника принимает участие в обезвреживании мутагенов путем их ферментативной инактивации, или за счет продукции антимутагенов. В результате микробной трансформации нормофлорой пищевых ингредиентов и ксенобиотиков, могут образовываться их мутагенные метаболиты. Эндогенное образование мутагенов и канцерогенов может осуществляться также и дисбиозной микрофлорой. Следует ожидать, что нарушение баланса микробов-симбионтов может привести к повышению содержания мутагенов в кишечнике, которое можно определить в генотоксикологических тестах. Дисбактериозы кишечника, как правило, характеризуются снижением популяционного уровня бифидобактерий, лактобацилл и эшерихий. Содержание фекальных мутагенов при таких микроэкологических нарушениях практически не исследовалось. В связи с этим, цель настоящего исследования – определение мутагенной активности экстрактов фекалий при стандартном и сниженном популяционном уровне этих основных групп индигенной кишечной микрофлоры.

Мутагенный потенциал кишечных проб, взятых у 52 человек, определяли с помощью бактериальной тест-системы Эймса, состоящей из индикаторных штаммов *Salmonella typhimurium* TA 98 и TA 100. Предварительно в фекалиях пациентов бактериологическим методом был проанализирован качественный и количественный состав кишечного микробиоценоза. Данные микробных карт позволили разделить обследуемый контингент на две группы: первую (12 чел) без выраженных отклонений от принятого стандарта содержания основных представителей резидентной микрофлоры и вторую (40 чел)

с выраженным снижением популяционного уровня бифидобактерий и лактобацилл. В состоянии нормобиоценоза мутагенность была обнаружена только в 8,3% исследованных экстрактов. При дефиците бифидобактерий и лактобацилл (снижении популяционного уровня на 2 и более порядков) мутагенная активность обнаружена в 65% случаев. Содержание мутагенов в этих фекальных экстрактах было в 4,8; 3,6 и 5,2 раза больше, чем в экстрактах их фекалий людей со стандартным популяционным уровнем бифидобактерий и лактобацилл. Связь между качественным и количественным составом эшерихиозной флоры и мутагенной активностью экстрактов фекалий не установлено. Ферментативные экстракты фекалазы, полученные из проб с высоким содержанием бифидобактерий и лактобацилл, снижали мутагенный эффект модельных мутагенов N-нитро-N-нитрозогуанидина и N-нитрозо-N-метилмочевины в 2 и 3,2 раза соответственно.

Таким образом, на эталонных штаммах *Salmonella typhimurium* системы Эймса показано, что снижение более чем на порядок стандартного количества бифидобактерий и лактобацилл в кишечнике приводит к повышению мутагенного фона в его содержимом.

### **Обнаружение и культивирование термофильных анаэробных представителей филогенетического типа Planctomycetes**

**Непомнящая Яна Николаевна** (*Москва, yanann@rambler.ru*)

Представители филогенетического типа Planctomycetes представляют большую группу микроорганизмов и детектируются повсеместно в водных и наземных природных экосистемах с помощью молекулярных методов. В настоящее время в типе Planctomycetes условно выделяют три группы: (1) – культивируемые таксономически описанные микроорганизмы, (2) – некультивируемые микроорганизмы WPS-1 (самая обширная группа, включающая основное количество представителей типа Planctomycetes (GenBank)), (3) – отдаленная филогенетическая ветвь анаэробных аммоний-окисляющих бактерий, представители которых не были выделены в чистые культуры. Первая чистая культура планктомицет была получена в жидкой бедной органической среде в 1973 году. На сегодняшний день в чистые культуры выделено и описано 12 видов и 10 родов типа Planctomycetes.

Три накопительные культуры анаэробных термофильных железовосстанавливающих микроорганизмов были получены из наземных гидротерм Камчатки в слабоминерализованной бикарбонатно-забуференной среде. В качестве потенциального акцептора электронов выступал ферригидрит (90 мМ), изолированный от прямого контакта с клетками, путем заключения его в гранулы альгината (1,5%). Донором электронов служил ацетат (9 мМ). Накопительные культуры инкубировались при 60°C и 65°C и pH 6,8–7,0. В результате филогенетического анализа основанного на сравнении нуклеотидных последовательностей генов 16S РНК в накопительных культурах были обнаружены бактерии типа Planctomycetes, ближайшими родственниками которых по данным GenBank были некультивируемые микроорганизмы. Клетки планктомицет были эллипсоидной формы с кратероморфными структурами и пиявами длиной 0,6–0,8 мкм и 0,45–0,6 мкм в диаметре. Жгутиков и стапков в электронный микроскоп не наблюдали. Для детекции планктомицет в накопительных культурах использовался метод флюоресцентной гибридизации *in situ* с использованием зондов (PLA886) специфичных к представителям типа Planctomycetes. В зависимости от времени генерации накопительных культур, клетки находились в виде отдельных клеток или формировали группы из множества клеток. Накопительные культуры восстанавливали оксид Fe (III) и нитрат, заключенные в гранулы альгината. Рост отсутствовал на средах с гранулами альгината и ацетатом в отсутствии внешних акцепторов электронов. Клетки наблюдались в световой микроскоп только на пленках альгината. По-видимому, гранулы альгината не только используются в качестве потенциального донора электронов и стимулируют рост, но и способствуют развитию биоплёнок планктомицет, очевидно требующих прикрепления к поверхности твёрдого субстрата.

Проведенное исследование расширяет наши знания в понимание биологии представителей филогенетического типа Planctomycetes и требует дальнейших исследований.

## Микромицеты – возможные альтернативные источники активаторов протеина С плазмы крови

Оスマловский Александр Андреевич (Москва, aostmol@mail.ru)

Регуляция свертывания крови является одним из важнейших физиологических механизмов гемостаза человека и животных, где особую роль играет система протеина С. Протеин С (PC) является витамин-К-зависимым проферментом сериновой протеиназы, который под действием комплекса тромбин-тромбомодулин на поверхности эндотелия превращается в активированный протеин С (APC). Последний выполняет антикоагулянтную и профибринолитическую функции, препятствуя чрезмерному тромбообразованию при появлении в системе кровотока первых признаков свертывания.

Недостаточность содержания в крови PC может привести к тромбоэмбolicким осложнениям вплоть до летальных исходов. Ввиду значимости функционирования APC важным представляется диагностика содержания в плазме его предшественника – PC. Экзогенные специфические активаторы PC были случайно обнаружены только в яде змей, принадлежащих к родам *Agkistrodon* и *Gloydius*. Из яда южно-американского щитомордника *Agkistrodon contortrix contortrix* были выделены протеиназы, способные *in vitro* активировать PC и нашедшие широкое применение в составе диагностикумов для клинических лабораторий.

Поиск альтернативных змеиному яду источников активаторов PC очевиден из-за дороговизны препарата, обусловленной трудностями получения таких активаторов. Ранее, в результате скрининга большого количества штаммов микроскопических грибов была показана перспективность микромицетов, в частности, *Aspergillus ochraceus* к продукции протеиназ, обладающих антикоагулянтными свойствами.

С помощью хромогенного пептидного субстрата pGlu-Pro-Arg-pNA было показано, что антикоагулянтная активность протеиназ *Aspergillus ochraceus* связана с активацией PC. Изучение способности штаммов *A. ochraceus*, выделенных из экотопов разных географических регионов, позволило установить, что данная активность видоспецифична и исследованные изоляты являются высокоактивными продуцентами внеклеточных протеиназ – активаторов PC. Дальнейшее изучение физиологии *A. ochraceus* показало, что способность к образованию внеклеточных протеиназ – активаторов PC носит индуцибельный характер и реализуется при культивировании продуцентов на средах, богатых гидролизатами белков. В процессе роста культур было выявлено два пика активаторной к PC активности, значения которых зависели от штамма и качества посевного материала. Наличие двух пиков может быть связано как с образованием двух ферментов с одинаковой специфичностью, так и регуляцией секреции данных ферментов по принципу отрицательной обратной связи. На основании полученных данных был разработан микробиологический способ получения активаторов PC. Сопоставление активаторной активности белков культуральной жидкости штаммов *A. ochraceus* и препаратов активаторов из яда щитомордника разных фирм показало, что их активность сопоставима, в связи с чем микробные активаторы PC в дальнейшем могут найти применение в составе аналогичных диагностикумов.

## Новая грамотрицательная ультрамикробактерия из рода *Chryseobacterium* – факультативный эпифитон *Bacillus subtilis*

Поливцева В.Н., Абашина Т.Н. (Пущино, eritro@rambler.ru)

Из ила озера Байкал и многолетнего нефтешлама Нижнекамского нефтекомбината выделены изоляты грамотрицательной хемоорганотрофной, аэробной бактерии – штаммы NF4 и NF5, представленные ультрамелкими коккоидными клетками и короткими палочками с размерами от 0,2 до 0,4 мкм в поперечнике и от 0,2 до 0,5 мкм в длину; их объем составляет в среднем от 0,004 до 0,04 мкм<sup>3</sup>; среди них значительную часть (30–60%) занимают наноформы – предельно мелкие клетки с диаметром 180–300 нм и объемом 0,004–0,02 мкм<sup>3</sup>.

На основании этих данных изолированные бактерии можно отнести к наиболее мелким ультрамикробактериям. Характерным признаком изолятов является отсутствие у них экзоклеточных деполимераз, таких как протеазы, липазы, пектиназы и цепллюлазы.

По сходству в последовательности нуклеотидов в гене 16S рДНК и составу клеточных жирных кислот изоляты наиболее близки к некоторым видам рода *Chryseobacterium* (*C. antarcticum*, *C. jeonii* и *C. marinum*). Однако имеющиеся различия в нуклеотидных последовательностях гена 16S рДНК, а также в фенотипических признаках, таких как образование ультрамелких клеток, отсутствие ряда экзогидролаз, выраженный олиготрофизм и способность к эпифизу на бактериальных клетках позволяют предполагать, что охарактеризованные изоляты являются, новым видом рода *Chryseobacterium*.

Особым свойством выделенных изолятов является их способность к эпифизу – существованию в плотно прикрепленном состоянии на хозяеких клетках *Bacillus subtilis*.

Предполагается, что адгезия к хозяеким клеткам у штаммов NF4 и NF5 (представителей филума *Bacteroidetes*) осуществляется тем же уникальным механизмом, который описан нами ранее у представителей альфапротеобактерий (*Kaistia* sp., штаммы NF1 и NF3), у которых в качестве улавливающих и стягивающих клетки канатов функционируют ловчие полисахаридные цепи, снабженные липкими узелками-транулами.

Работа выполнена при поддержке гранта Аналитической ведомственной целевой программы «Развития научного потенциала высшей школы» № 2.1.1/1187. Выражаю благодарность руководителю проф., д.н. Дуде Виталию Иосифовичу за помощь и ценные советы при выполнении работы.

### **Внеклеточная протеазная активность микроорганизмов гидротерм Байкальской рифтовой зоны**

**Раднагуруева А.А., Лаврентьева Е.В.** (Улан-Удэ, агуна\_rg@mail.ru)

В работе представлены результаты изучения внеклеточной протеазной активности культур из коллекции лаборатории микробиологии ИОЭБ СО РАН: T4, Ur-6, Br-2-2, Ga-9-2, Al-9-1, Se-1-10, выделенных из горячих источников Байкальской рифтовой зоны. Особенностью этих гидротерм являются высокие значения температуры до 84°C и значения pH до 9,9. По данным молекулярно-генетического анализа наибольшее сходство у культуры Ur-6 выявлено с *Bacillus hemicellulosolyticum* C-11 (99%), Br-2-2 на 97% с *B. licheniformis* BBDC6, Ga-9-2 на 95% с *A. flavithermus* DSM 2641 (Z26932). Штамм Al-9-1 образует отдельный кластер на филогенетическом дереве и ближайшим гомологом является *Anoxybacillus pushchinoensis* AT-2 (AB234214), сходство составляет 96%. Штамм T4 отнесен к новому виду *Anoxybacillus mongoliensis*.

Анализ внеклеточной протеолитической активности показал, что все изученные штаммы культур активны на субтилизин-подобном субстрате. Многие авторы считают, что именно усиленный синтез субтилизинподобных протеиназ является одним из способов адаптации бактерий к экстремальным условиям окружающей среды. Интересен факт, что культуры Ur-6, Br-2-2, Ga-9-2, выделенные из микробных матов горячих источников, кроме субтилизинподобной, обладают высокой аминопептидазной активностью. Характерно, что штаммы не гидролизуют субстраты, специфичные для химотрипсинподобных и цистеиновых протеиназ.

Отмечено, что синтез протеаз у культур T4 и Se-1-10 начинается в конце экспоненциальной фазы роста культуры. Это связано с тем, что в конце экспоненциальной фазы роста, когда в среде истощается запас легкометаболизируемых низкомолекулярных субстратов, возникает потребность в экзоферментах, обеспечивающих поступление питательных веществ в результате разложения полимерных веществ.

Выживание микроорганизмов в гидротермах и их функционирование обеспечивается благодаря сохранению каталитической активности в широких пределах pH и температур. Было показано, что все изученные культуры активны в широком диапазоне значений pH от 7,3 до 12. Протеазы стабильны в диапазоне 40–60°C, оптимум активности наблюдался при 50°C.

Проведенный анализ функциональных групп активного центра показал, что активность внеклеточных протеиназ по субстрату GlpAALpNA, у большинства изученных культур, подавляется специфическим ингибитором сериновых протеиназ – фенилметилсульфонил-фторидом (ФМСФ). Полученные в работе результаты позволяют отнести их к классу

сериновых протеиназ субтилизиноподобного типа. Культура Se-1, кроме сериновой протеазы синтезирует металлопротеазу, ингибируемая специфическим ингибитором этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА).

*Работа выполнена при поддержке грантов МО РФ РНП 2.1.1/2165, НОЦ «Байкал». Авторы выражают глубокую благодарность д.б.н., проф. Дунаевскому Я.Е. за оказанную помощь в проведении работы.*

### **Участие метаболитов *Bacillus subtilis* СКБ 256 в защите растений**

**Ражсабов Улугбек Рахимбаевич** (Узбекистан, Ташкент, *i.rajabov@mail.ru*)

Использование бактерий-антагонистов или препаратов полученных на их основе, является одним из эффективных биологических методов борьбы с фитопатогенными микроорганизмами. Одним из перспективных и широко изучаемых объектов являются спорообразующие бактерии рода, *Bacillus*. Из различных видов бацилл выделены ряд веществ с антибиотической активностью и описана их природа. Среди метаболитов *Bacillus subtilis* есть и низкомолекулярные вещества с пептидной природы. Ранее нами было показано, что *Bacillus subtilis* СКБ 256 является активным антагонистом *Fusarium oxysporum* и *Pseudomonas syringiae*, что свидетельствует о широком спектре антагонистических веществ у этого штамма.

С целью выделить экзометаболитов с антифунгальной активностью, из культуральной жидкости штамма *Bacillus subtilis*. Изучены внеклеточные метаболиты штамма *Bacillus subtilis* СКБ 256. Из фильтрата культуральной жидкости выделено термолабильное вещество пептидной природы, ингибирующие рост и развитие фитопатогенного гриба *Fusarium oxysporum*. Проведено хроматографическая очистка веществ с ингибирующей активностью. Определена минимальная ингибирующая концентрация очищенного вещества, по отношению к *Fusarium oxysporum*, которая составила 0,10-0,15 мг/мл.

ТСХ и БХ, позволили выявить фракции после мембранный очистки в составе внеклеточных метаболитов *Bacillus subtilis* СКБ 256 шесть компонентов, различающихся по подвижности. Анализ данных БХ показала присутствие трёх компонентов с антифунгальной активностью в отношении *Fusarium oxysporum*. Два из них с перекрывающимися относительной подвижностью (Rf), а один минимальную. Приблизительная оценка их молекулярной массы с использованием низкомолекулярных белковых маркеров показала, что два наибольее подвижных компонента имели мол. массу <6 кДа, поскольку мигрировали дальше инсулина (6,2 кДа.). Менее подвижный компонент имел массу (14 кДа), сравнимую с мол. массой цитохрома С, лизоцима и соевого ингибитора трипсина.

Действие внеклеточных метаболитов *Bacillus subtilis* СКБ 256 на *Fusarium oxysporum* в условиях питательной среды характеризовалось нарушениями морфологического развития мицелия гриба, сопровождавшимися ограничением роста гиф, частичным лизисом спор.

Изучение физико-химических свойств низкомолекулярной фракции *Bacillus subtilis* СКБ 256 показало, что её активные компоненты стабильны в диапазоне значений pH 6,0-8,0 и 40-60°C. Препарат практически не инактивировался при 40-50°C и сохранял более 80% от первоначальной активности в течение 1 часа при 60°C.

### **Влияние условий культивирования *Bacillus* sp.**

**на липолитическую активность экстрацеллюлярных ферментов**

**Сармурзина З.С., Кожахметов С.С. (Казахстан, Астана, *sarmurzina@list.ru*)**

В пищевой и перерабатывающей промышленности, в производстве мыла, всевозможных дегрентов, красок и пластмасс наиболее перспективным в настоящее время является использование ферментов, катализирующих разложение триглицеридов доmono-, диглицеридов и жирных кислот. В качестве таких ферментов наиболее привлекательными являются липазы бактериального происхождения. Среди бактерий основными продуцентами липаз выступают штаммы родов: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Serratia* и *Rhodococcus*. Известно, что на ферментативную активность липаз, выделенных из различных штаммов влияют такие параметры культивирования как: состав, температура и pH питательной среды.

Объектами исследований являлись бактерии рода *Bacillus* sp. выделенных из различных источников окружающей среды: активный ил, сточные воды мясокомбината, речная вода, почва. В задачу входило выявление липазной активности выделенных изолятов и определение наиболее оптимальных условий их культивирования.

Для определения липополитической активности, исследуемые изоляты высевали на среды, содержащих тварины лауриловой, стеариновой и олеиновой кислот. На наличие липаз, в качестве экстрацеллюлярных ферментов, указывали образованные вокруг колонии непрозрачных зон кальциевых солей жирных кислот, высвобожденных из твари. Липазную активность определяли по методу Лонона (Lonon M.K.).

В результате скрининга 172 изолятов, 38 из них показали высокую липополитическую активность на всех трех средах. Их липазная активность составила 19,7-25,0 ЕД/мг общего белка, и на основании чего данные штаммы были отобраны для следующей серии экспериментов. При их культивировании меняли следующие условия: температуру (в диапазоне от 25°C до 45°C, рН-среды (от 4 до 9), время культивирования составляло 12-72 часа. Состав питательной среды изменяли введением: глюкозы, мальтозы, галактозы, лактозы, сахарозы, ксилозы, фруктозы, арабинозы, сорбита и маннитола в качестве источника углерода и дрожжевого экстракта, желатины, мочевины, хлорида аммония, нитратов калия и аммония, как азот-содержащих соединений. Субстратам липаз являлись глицерин, подсолнечное, оливковое и кукурузное масла.

Установлено, что активность липаз в наибольшей степени зависит не от типа углевода и азотсодержащего соединения в составе питательной среды, а от условий культивирования. Наилучшими вариантами являются: 32°C-42°C, рН-среды 7-9 и время 24-30 часов. Добавление оливкового масла в качестве специфического субстрата позволило значительно увеличить показатель липополитической активности. Автор выражает признательность к.м.н. Ануарбековой С.С. и к.х.н. Хасенову Б.Б. за помощь в подготовке тезисов.

### Эффекты бактериальных ауторегуляторов на характеристики окислительного взрыва нейтрофилов при фагоцитозе

Свирилова Татьяна Геннадьевна (Оренбург, kobjg@yandex.ru)

В процессе своей жизнедеятельности бактерии вырабатывают ряд низкомолекулярных веществ – внеклеточных ауторегуляторов, обеспечивающих межклеточную коммуникацию. Биологическая функция факторов группы алкилоксисбензолов АОБ заключается в индукции перехода клеток метаболически неактивные формы. Молекулы группы гомосеринлактонов ГСЛ обеспечивают проявление «чувств кворума». Универсальный характер взаимодействия АОБ и ГСЛ с биополимерами допускает возможность проявления их биологических эффектов в отношении эукариотических клеток. Целью данной работы стало исследование возможных эффектов бактериальных ауторегуляторов на характеристики окислительного взрыва нейтрофилов при фагоцитозе.

В качестве материалов исследования использовались химические аналоги АОБ и ГСЛ с длиной углеводородного радикала 1, 6 и 12 атомов. Оценку хемилюминесценции проводили измеряя степень свечения нейтрофилов при фагоцитозе. При этом, фракцию выделенных клеток инкубировали с ауторегуляторными факторами в концентрациях  $5 \cdot 10^{-5}$ ,  $5 \cdot 10^{-6}$ ,  $5 \cdot 10^{-7}$ ,  $5 \cdot 10^{-8}$ ,  $5 \cdot 10^{-9}$  моль/л. Жизнеспособность фагоцитов изучали путем подсчета в камере Горяева после окраски трипановым синим. Для оценки прямых про- и антиоксидантных свойств ауторегуляторов использована бесклеточная система  $\text{H}_2\text{O}_2$ -пероксидаза-люминол-ауторегуляторный фактор».

Показано, что все ауторегуляторные факторы дозозависимо уменьшали уровень активности нейтрофилов при повышении их концентрации в системе, а с увеличением длины углеводородного радикала в структуре молекулы усиливалась их способность снижать степень активации фагоцитов. Объяснение подобных результатов потребовало проведения серии экспериментов по изучению про- и антиоксидантных свойств ауторегуляторов. Показано, что АОБ в зависимости от концентрации проявляют как про-, так и антиоксидантные свойства. При этом свойства антиоксиданта в более выражены у С<sub>12</sub>-АОБ. Для ряда концентраций С<sub>6</sub>-ГСЛ и С<sub>12</sub>-ГСЛ показано прооксидантное действие.

Наличие подобных свойств данных молекул никак не объясняет и даже противоречит их способности гасить респираторный взрыв при фагоцитозе у нейтрофилов, в связи с чем была дана оценка влияния АОБ и ГСЛ на жизнеспособность нейтрофилов в тестах с трипановым синим. Выявлено, что внесение в их систему значимо повышает процент гибели клеток.

Таким образом, проведенные экспериментальные исследования позволили констатировать наличие у АОБ и ГСЛ способности подавлять функциональную активность нейтрофилов, что не связано с собственными антиоксидантными эффектами АОБ и ГСЛ, но частично может быть объяснено развивающейся в этих условиях гибелью фагоцитирующих клеток.

#### **Молекулярно-филогенетический анализ азотфикссирующих микроорганизмов, населяющих шлам химического производства**

*Соловьева В.В., Григорьева Т.В. (Казань, solovyovaavv@gmail.com)*

Биологическая фиксация азота – уникальная способность азотфикссирующих микроорганизмов. Способность к азотфиксации даёт возможность прокариотам существовать в экологических нишах с крайне низким содержанием азота. Играя важную роль в развитие природных экосистем в качестве первичных продуцентов биологически-доступного азота, азотфиксаторы распространены повсеместно, от арктических льдов до геотермальных источников, и представлены во всех группах прокариот. Однако устойчивость азотфиксаторов к ксенобиотикам и присутствие их в антропогенных экологических нишах недостаточно исследованы. Обнаружение специфических генов азотфиксации, в частности *nifH* (кодирующего малую субединицу нитрогеназного комплекса), с помощью молекулярно-генетических методов широко применяют в исследовании данной группы микроорганизмов.

Цель нашей работы – анализ сообщества азотфикссирующих микроорганизмов, обитающих в экстремальных условиях углеводородного шлама химического производства предприятия ОАО «Казаньоргсинтез».

Для оценки аборигенного сообщества пробы отбирали из толщи депонированного отхода на глубине около 1 м. Общую ДНК выделяли из шлама с помощью фенольной экстракции. Исследование сообщества азотфиксаторов шлама проводили по специфическому гену азотфиксации *nifH* с использованием универсальных праймеров, предложенных Widmer с соавторами (1999) для почвенных азотфиксаторов. Продукты ПЦР-амплификации клонировали в плазмидный вектор. Нуклеотидную последовательность клонированных фрагментов гена *nifH* определяли с помощью автоматического секвенирования.

Анализ полученных нуклеотидных последовательностей индивидуальных клонов свидетельствует о низком разнообразии сообщества шламовых азотфиксаторов. Среди созданной нами библиотеки клонов обнаружено всего 6 различных фрагментов гена *nifH*, среди которых не выявлено сходства с почвенными микроорганизмами. Более того, сопоставление нуклеотидных последовательностей фрагментов гена *nifH* показало низкую степень идентичности с какими-либо описанными ранее азотфикссирующими микроорганизмами. Однако филогенетический анализ позволил классифицировать подавляющее большинство аборигенных азотфиксаторов как узкую группу близкородственных организмов, принадлежащих к гамма-протеобактериям.

Полученные результаты свидетельствуют об уникальности азотфикссирующих организмов, населяющих химический углеводородный шлам. В дальнейшем мы планируем продолжить исследования по определению видовой принадлежности этих микроорганизмов и их физиолого-биохимических свойств.

*Авторы выражают благодарность к.б.н. Ph.D. Ризванову А.А. и д.б.н. Наумовой Р.П. за научное руководство, помочь в проведении экспериментов и подготовке тезисов.*

**Плотностно-зависимые эффекты в голодашей популяции  
энтеробактерии *Pectobacterium atrosepticum* SCRI 1043  
при окислительном стрессе и повышенной температуре**

**Сорокина Ю.В., Хусаинов И.Ш., Даминова А.Г. (Казань, [yljka@mail.ru](mailto:yljka@mail.ru))**

К настоящему времени практически неизученными остаются механизмы персистенции бактериальных популяций низкой плотности. Выяснение стратегии выживания в природных условиях патогенных микроорганизмов представляется актуальным с точки зрения контроля над распространением инфекций. В настоящей работе нами исследованы особенности адаптации популяций энтеробактерии *P. atrosepticum* SCRI 1043 к стрессу, вызванному голоданием, с различным исходным титром бактерий, а также устойчивость голодашей культуры к окислительному стрессу и воздействию повышенной температуры.

Показано, что в условиях голодания по углероду и фосфору, титр культур *P. atrosepticum* SCRI 1043, инокулированных до  $10^5$  клеток/мл, повышался до значений  $5 \cdot 10^5 - 1 \cdot 10^6$  КОЕ/мл в течение первых трех дней. При высоком исходном титре  $10^8$  клеток/мл наблюдалось снижение показателей КОЕ, и достигала тех же значений. Параллельно с высевом КОЕ пробы отбирали на количественный ПЦР-анализ. Тенденции, выявленные при определении КОЕ голодашущих культур, нашли свое подтверждение и по результатам ПЦР-анализа. Показатели КОЕ/мл стабилизировались на уровне около  $10^6$  клеток/мл, независимо от исходного титра.

Электронная микроскопия показала, что клетки, инкубированные на безуглеродной среде, имеют более округлую форму и меньший размер по сравнению с вегетативными клетками. В голодашущих культурах, с высоким исходным титром  $10^8$  клеток/мл, присутствовали лизированные клетки. В то же время в культурах с низким исходным титром КОЕ ( $10^5$  клеток/мл), мы наблюдали делящиеся клетки.

Установлено, что голодашущие культуры с высоким начальным титром обладают повышенной устойчивостью к окислительному стрессу, вызванному 0,01% перекисью водорода, и воздействию повышенной температуры ( $50^\circ\text{C}$ ), в то время как при голодании с низким начальным титром наблюдается снижение устойчивости бактерий к указанным факторам.

Таким образом, в условиях голодания в популяциях *P. atrosepticum* SCRI 1043 реализуются различные стратегии выживания в зависимости от исходной плотности популяции. При высокой начальной плотности в голодашущих культурах снижается количество вегетативных клеток за счет процессов автолиза и, вероятно, образования покоящихся форм, тогда как при низкой исходной плотности происходит увеличение численности популяции в результате клеточного деления, сопряженного с редукцией размеров бактериальных клеток.

**Исследование способности адамантансодержащих веществ  
угнетать образование биопленки *S. aureus***

**Стрелец Т.И., Гриневич С.В. (Украина, Киев, [TetianaStrelets@gmail.com](mailto:TetianaStrelets@gmail.com))**

Одной из актуальных проблем медицины является профилактика и лечение заболеваний, обусловленных биопленками. Биопленки, в том числе сформированные стафилококками, развиваются на медицинских имплантантах, колонизируют медицинский инструментарий, вызывают заболевания различных органов и систем, нередко с летальным исходом, в связи с их резистентностью к антимикробным препаратам.

Цель работы – изучить способность адамантансодержащих соединений ЮК-21, ЮК-50, ЮК-86 и ЮК-97 предотвращать формирование биопленок клиническим штаммом *S. aureus* 155. Производные адамантана синтезированы в Институте органической химии НАН Украины канд. фарм. наук Ю.В. Коротким. Штамм *S. aureus* 155 выделен от больного гнойно-воспалительным процессом.

Способность производных адамантана нарушать образование биопленок изучали в пластиковых планшетах для иммуноферментного анализа. Минимальные подавляющие концентрации (МПК) соединений определяли методом серийных микроразведений в жидкой среде Мюллера-Хинтон. Для определения пленкообразования суточную культуру

стафилококка (плотность инокулята  $10^7$  КОЕ/мл), выращенного на среде Мюллера-Хинтон, вносили в лунки, содержащие питательную среду и адамантанодержащие вещества в концентрациях 0,5 МПК, 1МПК, 2,5 МПК и 5МПК. Планшеты инкубировали на протяжении 24 ч при 37°C. После инкубации содержимое лунок удаляли, вносили 0,1% р-р генцианвиолета и выдерживали при комнатной температуре 45 мин. После трехкратного промывания лунок дистиллированной водой в них вносили 200 мкл 96% этанола для экстракции красителя. Через 45 мин интенсивность окрашивания спирта регистрировали на ридере (ELX808, Biotek, США).

Проведенные эксперименты показали, что МПК адамантанодержащих веществ по отношению к *S.aureus* 155 составляют: ЮК-97 – 3,12мкг/мл; ЮК-21 – 6,3мкг/мл; ЮК-50 – 6,3мкг/мл; ЮК-86 – 12,5мкг/мл. Исследованиями установлено, что все вещества в концентрации 0,5 МПК не нарушают пленкообразование золотистым стафилококком. В концентрации 1 МПК соединения ЮК-50, ЮК-97, ЮК-21 и ЮК-86 угнетают образование биопленки на 8%, 31%, 41% и 43% соответственно в сравнении с контролем. Повышение концентраций веществ до 2,5МПК сопровождается увеличением ингибирующей активности, значение которой составляет: для ЮК-97 – 34%, ЮК-50 – 36%, ЮК-21 – 63%, ЮК-86 – 65%. При концентрации соединений 5 МПК способность к пленкообразованию у *S.aureus* под действием ЮК-86 уменьшалась на 75%, у ЮК-21 – на 67%, у ЮК-50 – на 63%, у ЮК-97 – на 62%.

Таким образом, производные аминоадамантана дозозависимо угнетают пленкообразование *S.aureus*. Наиболее выраженная активность выявлена у ЮК-86. Полученные данные свидетельствуют о целесообразности дальнейшего поиска новых более активных соединений среди производных аминоадамантана с целью разработки на их основе эффективного препарата антимикробной направленности.

Исследования были проведены на базе ГУ «Института фармакологии и токсикологии АМН Украины» под руководством и.о. зав. отдела патофизиологии, к.б.н. Врынчану Н.А. Авторы также выражают благодарность научному руководителю доц. каф. Промышленной биотехнологии ф-та Биотехнологии и биотехники НТУУ «КПИ», к.т.н. Тодосийчук Т.С.

### Особенности микробных сообществ лесных почв в районах нефтедобычи Субхангулова Айгуль Расыковна (Казань, [ajgul\\_sub@bk.ru](mailto:ajgul_sub@bk.ru))

К настоящему времени не существует единых критерии оценки состояния почвенных экосистем, подверженных антропогенному воздействию. Используемые физико-химические, токсикологические и другие параметры не могут в полной мере дать представление о степени нарушения равновесия в экосистеме и о ее способности к ремедиации (восстановлению). В то же время известно, что микробное население почвы, являясь одним из наиболее сложных и разнообразных сообществ в биосфере, реагирует на антропогенные воздействия различного характера, что проявляется в изменениях таксономического разнообразия и структуры как всего микробиоценоза в целом, так и отдельных физиологических групп в его составе. Так, определение наиболее чувствительных звеньев почвенного сообщества и выявление границ их метаболической активности может способствовать развитию методов экспресс-диагностики углеводород-загрязненных почв. Нами проведены микробиологические исследования экстремальной по физико-химическим параметрам среды обитания, а именно застарелого углеводородного отхода (бурового шлама), а также незагрязненных почв в районе нефтедобычи, подверженных тем не менее высокой антропогенной нагрузке (почвы с промышленных площадок). Контролем служила лесная почва в сходном экотопе. Согласно результатам высеяна на плотные питательные среды, микробное сообщество шлама характеризуется наименьшим среди исследованных образцов почв разнообразием микромицетов (идентифицировано 4 морфотипа по сравнению с 9-13-ю морфотипами в почвах с промышленных площадок) и полным отсутствием культивируемых мицелиальных актиномицетов. При этом общая численность аэробных гетеротрофных бактерий в шламе выше, чем в лесной почве, и сравнима с численностью аэробных гетеротрофов в почвах с промышленных площадок ( $3,5 \cdot 10^6$  КОЕ / г сухого шлама против  $1,8 \cdot 10^6$  КОЕ / г сухой лесной почвы). Отсутствие метаболически активных

представителей автохтонной почвенной биоты (таких, как актиномицеты, играющие ключевую роль в гумусообразовательных процессах и разложении труднодоступной органики) в шламе на фоне высокой численности других групп микроорганизмов может свидетельствовать о низком потенциале высокозагрязненных почв к биологическому и физико-химическому восстановлению. С другой стороны, установление и устранение возможных причин низкого разнообразия мицелиальных организмов в таких биоценозах (механическая деградация почвы, отсутствие вегетационного покрова в местах нефтедобычи, крайне высокий уровень гидрофобного углеводородного загрязнения) будет способствовать разработке технологий ремедиации.

### **Резистентность *Lactobacillus* spp. к желчному шоку**

**Тыныбаева Индира Кажымухановна** (Казахстан, Астана, *indiara@mail.ru*)

В настоящее время применение пробиотических препаратов и продуктов является наиболее перспективным при профилактике и лечении различных заболеваний. Поступая в организм пробиотические микроорганизмы подвергаются действию различных стрессовых факторов, поэтому важным критерием отбора является их выживаемость. В тонкой кишке пробиотики подвергаются воздействию желчных кислот и панкреатических ферментов. Вследствие этого многие микробы почти полностью погибают. Это может объясняться усилением проницаемости клеточной мембраны бактерий, которое возникает в ответ на воздействие желчных кислот. Выживание же большинства бактерий зависит от того, каким образом они принимаются: в защитной капсуле, в виде йогурта, с молоком или без всякой защиты. Так, согласно Kailasapathy K., многие штаммы, например, лактобациллы из кисломолочных продуктов либо не достигают кишечника, либо выживают в нем только в течение нескольких дней.

Желчные кислоты являются амфипатическими молекулами и играют важную роль в усвоении жиров и поглощении растворимых в жирах витаминов. Концентрация желчных кислот в тонком кишечнике человека находится в диапазоне от 0,2 до 2%. Настоящая работа выполнена на 13 штаммах *L.casei*, выделенных из кумыса, айрана, шубата, и являющихся уникальными, что было подтверждено с использованием метода мультилокусного секвенингирования. В качестве контрольной группы использовались штаммы *L.fermentum*, *L.helveticus*, *L.casei*, *L.fermentum* ATCC 9338 из фонда Республиканской коллекции микроорганизмов Казахстана.

Резистентность к желчному шоку исследовали с использованием 0,3% желчи. Культуры в стадии лаг-фазы с оптической плотностью OD<sub>600</sub> 0,5 подвергали действию 0,3% желчи, инкубировали в течении 30 минут при комнатной температуре, и затем инокулировали на МРС-агар в разведениях 10<sup>3</sup>–10<sup>6</sup>. Учет результатов проводился через 48 часов. Аналогично проводили контрольный опыт, без воздействия желчи.

В результате было установлено, что у 18 культур имеется резистентность, которая составила 10<sup>3</sup>–10<sup>6</sup>, у оставшихся 5 культур имеется чувствительность к действию желчи. При этом показатели резистентности контрольных штаммов *L. fermentum* составили – 10<sup>4</sup>, *L.helveticus* – 10<sup>4</sup>, *L.fermentum* ATCC 9338 – 10<sup>4</sup>, *L.casei* – 10<sup>6</sup>, а из числа уникальных штаммов *L.casei*, 2 продемонстрировали высокую резистентность 10<sup>5</sup>.

Наряду с резистентностью к действию желчи, для пробиотических микроорганизмов важным является сохранение их функциональных характеристик. Основными пробиотическими свойствами являются адгезивная активность, антагонизм по отношению к условно-патогенной и патогенной флоре, устойчивость к действию антибиотиков и антиоксидантные свойства. Нами проводятся работы по исследованию вышеуказанных свойств с использованием технологий real-time PCR анализа генов *ldh*, *ccpA*, *ticus adhesin gene*.

***Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194 – продуцент антибиотического комплекса широкого спектра действия**

**Устюгова Екатерина Александровна (Москва, usstyugova.katya@mail.ru)**

Молочнокислые бактерии имеют большое значение в хозяйственной деятельности человека в связи с их способностью образовывать метаболиты, обладающие антибиотическими свойствами. К антимикробным веществам, образуемым бактериями *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, являются органические кислоты, диацетил, гидрокси-пропионовый альдегид и ингибиторы пептидной природы – бактериоцины. Штаммы, принадлежащие к роду *Lactococcus*, как правило, являются продуцентами большого разнообразия бактериоцинов, широко используемых в качестве биоконсервантов. Известны лактицин 3147, лактицин 481, лактококцин 140, низины (A, B, C, D, E, Z, R, Q). В пищевой промышленности широко используют препарат «Nisaplin», активным веществом которого является низина А.

Выделенный нами из коровьего молока Бурятии штамм *L. lactis* ssp. *lactis* 194 обладал широким спектром антимикробного действия: подавляя рост грамположительных бактерий, в том числе и термостойкие споровые, кислотоустойчивые бактерии *Bacillus coagulans*, а также грамотрицательных – *Escherichia coli*, *Comamonas terrigena*, грибов рода *Aspergillus*. В популяции штамма присутствовали колонии двух типов, различающиеся по уровню антибиотической активности на 15%. Штамм 194 образовывал сложный антибиотический комплекс, состоящий из четырех биологически активных веществ (A,B,C,D). Отдельные компоненты комплекса различались по хроматографической и электрофоретической подвижности, растворимости и спектру антимикробного действия. Компонент 194-А являлся гидрофобным высокомолекулярным веществом, содержащим ароматические и алкильные группы, и не имел аналогов в компьютерной базе данных биологически активных веществ (Database 1.Berdy). Этот компонент был активен в отношении грамположительных и некоторых грамотрицательных бактерий. Компонент 194-С являлся гидрофильным веществом, обладающим фунгицидным действием. По химической природе компонент 194-Д – пептид, но отличается от низина А, продуцируемого многими штаммами *Lactococcus lactis*, по ряду физико-химических свойств. Компонент 194-В является миорным веществом этого антибиотического комплекса.

**Очистка Х-вируса картофеля и приготовление антисыворотки**

**Файзиеев В.Б., Хусанов Т.С. (Узбекистан, Ташкент, vaxid@inbox.ru)**

При помощи индикаторных методов с использованием *Gomphrena globolsa* (некротическое симптомы) и *Datura stramonium* (системная реакция-мозаика), контролированием иммуноферментным анализом (фирма CIP) из местного сорта картофеля «Дияра» выявлен ХВК. Перезаражением через мононекроз ХВК накопили на растениях *D. stramonium*.

Очищенные препараты ХВК получили из листьев, зараженных вирусом растений *D. stramonium*. Для этого взяли 500 г мозаичных листьев дурмана (*D. stramonium*), гомогенизировали в присутствии 0,1 М фосфатного буфера содержащий 0,01 М ЭДТА и натрий тиосульфата, pH 7,5. Полученный гомогенат центрифугировали в течение 20 минут при 8000 об./мин. Надосадочную жидкость обрабатывали 1/8 хлороформом и снова центрифугировали. Вирус из надосадочной жидкости осаждали 4% полиэтиленгликолем (ПЭГ) с м.м. 6000 и 4% NaCl. Через час вирусный осадок отделили центрифугированием при 8000 об./мин. в течение 20 минут. Полученный частично очищенный препарат подвергали гельфильтрации на колонке, в котором верхняя часть заполнена сефадексом (G-200), а нижняя с 3% агаром. В процессе гельфильтрации вирус элюировался в свободном объеме, а пигментированные клеточное компоненты во втором элюционном пике. Полученные пиковые фракции тестировали на инфекционность. Первый пик содержал инфекционные вирусные частицы, о чём свидетельствовали некрозы на *G. globolsa*. Пиковые фракции снова концентрировали ПЭГ (м.м. 6000). При спектрофотометрировании вирус поглощала УФ максимум при 260 нм, минимум 240 нм, соотношение 260/ 280 было равно 1,2.

Выход вируса из 1 кг заражённого материала составляет 1,35 мг. Полученный вирусный препарат использовали для приготовления антисыворотки путём иммунизации кроликов пароды Шиншилла. Иммунизировали кроликов введением очищенного препарата ХВК внутримышечно с адьювантом Фрейнда, всего было введено 20 мг вируса в каждого кролика. Титр полученной антисыворотки был равен 1:16 при постановке двойной диффузии по Ухтерлони.

### **Влияние симбиотических инокулянтов на микробное сообщество ризосфера *Medicago sativa***

**Федоренчик Анастасия Александровна** (Белоруссия, Минск, ar7nica@mail.ru)

В условиях интенсивного земледелия перспективным способом повышения урожайности многолетних бобовых трав является инокуляция растений высокоеффективными штаммами симбиотических микроорганизмов, таких как клубеньковые бактерии и арбускулярные макоризные грибы (АМГ) и их симбиотрофными ассоциациями. Клубеньки бобовых растений способны усваивать из вегетацию до 125-480 кг/га азота воздуха. Это обеспечивает высокие урожаи дешевого растительного белка без применения дорогостоящих и экологически небезопасных минеральных азотных удобрений.

Цель настоящей работы состояла в изучении влияния штамма клубеньковых бактерий *Sinorhizobium meliloti* S3, арбускулярных макоризных грибов (субстратно-корневой инокулум) и их ассоциации, интродуцированных в ризосферу люцерны посевной, на состав микробного сообщества. В начале сезона до посева люцерны изучали количественный состав и структуру сапротифного микробного сообщества почвы опытных делянок. В ходе исследования определяли численность микроорганизмов группы азота (олигонитрофильные, аммонифицирующие, в том числе спорообразующие аммонификаторы; усваивающие минеральные формы азота, в том числе актиномицеты), фосфатомобилизующих микроорганизмов и микроскопических грибов. Общая биогенность почвы до посева составила  $4,33 \cdot 10^7$  КОЕ/г абс. сух. почвы с преобладанием микроорганизмов группы азота. Дальнейший отбор образцов почвы производился на стадиях первого тройчатого листа, стеблевания и ветвления.

Изучение функционирования микробоценоза дерново-подзолистой почвы в условиях мелкоделяночного опыта показало, что интродукция АМГ и *S. meliloti* S3 оказывает положительное влияние на общую биогенность ризосферы на протяжении всего периода вегетации. Общая численность микроорганизмов была максимальна в варианте с обработкой *S. meliloti* S3 в фазу первого тройчатого листа и составила  $7,01 \cdot 10^7$  КОЕ/г абс. сух. почвы, в фазе стеблевания в варианте с совместной обработкой АМГ и клубеньковыми бактериями она равнялась  $7,79 \cdot 10^8$  КОЕ/г абс. сух. почвы, а в фазе ветвления общая биогенность была практически одинакова во всех вариантах с обработкой симбиотическими микроорганизмами и достигала  $2,5 \cdot 10^7$  КОЕ/г абс. сух. почвы. Преимущество в развитии имели следующие группы микроорганизмов: аммонифицирующие, усваивающие минеральный азот и олигонитрофильные. В конце периода наблюдения за ростом и развитием люцерны в условиях полевого опыта снижалась температура почвы, что в значительной степени отразилось на численном составе микроорганизмов отдельных эколого-трофических групп.

Таким образом, использование симбиотических инокулянтов (*S. meliloti* S3 и АМГ) при возделывании люцерны *M. sativa* увеличивает количество микроорганизмов различных эколого-трофических групп в ризосфере, что приводит к повышению общей биогенности.

### **Влияние горизонтального переноса генов на разнообразие клубеньковых бактерий, вступающих в симбиоз с чиной весенней (*Lathyrus vernus* (L.) Bernh.)**

**Халилова Ляйсан Халиловна** (Уфа, andr0002@list.ru)

Ранее сотрудниками лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ИБГ УНЦ РАН на территории Республики Башкортостан (РБ) была обнаружена популяция чины весенней, вступающей в симбиоз преимущественно с бактериями *Rhizobium tropici* (больше 90%), на долю *Rhizobium leguminosarum*, обычного симбионта данного растения

приходилось менее 10%. Остальные исследованные популяции данного растения на территории РБ вступали в симбиоз только с *Rhizobium leguminosarum*. *Rhizobium tropici* является симбионтом фасоли, и симбиоз данных бактерий с чиной весенней только в отдельно взятой популяции растений вызывает некоторый интерес. В настоящее время описано большое количество случаев, когда за счет горизонтального переноса симбиотических генов бактерии меняли не только свою специфичность, но даже из несимбиотических превращались в симбионты бобовых растений. Для проверки предположения участия процесса горизонтального переноса генов при образовании симбиоза между чиной весенней и *Rhizobium tropici* мы провели сравнительный анализ генов *nifD* и *nifH*. В начальном этапе анализ проводили методом ПЦР-ПДРФ. По результатам данного анализа с использованием трех мелкоцепящих эндонуклеаз рестрикции было обнаружено, что размеры и расположение рестрикционных фрагментов на электрофорограмме были идентичны. Исходя из этого можно было сделать предположение, что превичные структуры исследуемых генов у *Rhizobium leguminosarum* и *Rhizobium tropici* идентичны, или имеют незначительные отличия. Для более точного сравнения последовательностей генов *nifD* и *nifH* у исследуемых штаммов *Rhizobium leguminosarum* и *Rhizobium tropici* данные последовательности были секвенированы. При сравнительном анализе полученных последовательностей были обнаружены определенные отличия в нуклеотидной последовательности как между генами *nifD*, так и между генами *nifH*. Но тем не менее, филогенетический анализ показал, что секвенированные последовательности генов *nifD* и *nifH* у исследуемых штаммов *Rhizobium tropici* родственно более близки к таковым последовательностям *Rhizobium leguminosarum*, чем *Rhizobium tropici*. Таким образом, можно предположить, что именно за счет горизонтального переноса генов между *Rhizobium leguminosarum* и *Rhizobium tropici* последние стали способны вступать в симбиоз с чиной весенней.

#### *Aliivibrio logei* KCh1 (изолят Камчатка):

**биохимические и люминесцентные характеристики, клонирование lux-оперона**  
**Хрульнова Светлана Алексеевна (Москва, Khrulnovas@mail.ru)**

Изолирован новый штамм светящихся морских бактерий рода *Aliivibrio* (ранее *Vibrio*) из кишечника бычка *Cottida* sp. (акватория Охотского моря, Камчатка, штамм маркирован как KCh1). Определены основные условия роста штамма на лабораторных средах. Показано, что штамм KCh1 относится к группе психрофильных бактерий: оптимальная температура роста около 15°C. Определена нуклеотидная последовательность гена 16S rPHK и показано, что она практически идентична последовательности 16S rPHK *Aliivibrio logei* и *A. salmonicida*, но значительно отличается от таковой *A. fischeri*. В работе было проведено секвенирование гена *luxB*. Сравнение штаммов, принадлежащим трём видам *A. logei*, *A. salmonicida*, *A. fischeri*, и KCh1 по нуклеотидной последовательности 16S rPHK и гена *luxB*, показывает близость штамма KCh1 к виду *A. logei*. Биохимические признаки (редукция нитрата, декарбоксилирование лизина, ферментация D-галактозы) штамма KCh1 совпадают с таковыми штаммов *A. logei* и *A. fischeri*. Определена антибиотикограмма штамма KCh1. Клонирован lux-оперон KCh1 в клетках *Escherichia coli*, и определена частично его нуклеотидная последовательность, которая обнаруживает высокую гомологию с lux-опероном бактерий *A. salmonicida*. Бактерии этого вида привлекают особое внимание исследователей, так как являются патогенными, в частности, для промыслового атлантического лосося. Выражала благодарность Завильгельскому Г.Б. и Манухову И.В. за оказанную помощь в проведении работы.

#### **Влияние осмотического стресса на продукцию экзополисахаридов** **бактериями рода *Paenibacillus***

**Худайгулов Гайсар Гараевич (Уфа, gaisar-1986@mail.ru)**

Микробные экзополисахариды (ЭПС) с их уникальными реологическими характеристиками представляют большой интерес в качестве гелеобразователей для различных отраслей промышленности. Штамм *Paenibacillus ehimensis* 739 из Коллекции

микроорганизмов Института Биологии УНЦ РАН показал способность продуцировать ЭПС в существенных количествах (до 25 г/л).

Культивирование велось в среде Федорова, на качалочных колбах, в качестве источника углерода использовалась меласса в количестве 30 г/л (температура – 25°C, аэрация – 200 об/мин, в течение 7 суток). ЭПС выделяли осаждением «ледяным» изопропиловым спиртом с последующим высушиванием в токе теплого воздуха.

Для изучения влияния осмотического стресса на продукцию ЭПС в питательную среду вносился этанол в различных концентрациях (0 – контроль, 1, 2, 3 и 4% об/об). По истечении времени культивирования были приготовлены 1% растворы КЖ для получения вязкостных характеристик, измерения проводились на капиллярном вискозиметре типа ВПЖ – 2, с диаметром капилляра 0,56 мм. Также проводились анализы на количество колониеобразующих единиц (КОЕ) и массу сухого препарата ЭПС в КЖ.

При внесении в среду двух и более процентов этанола ингибировался рост и образование экзополисахарида. Наилучшие результаты были получены для варианта с 1% этанолом: при меньшем количестве КОЕ (на 7% в сравнении с контролем), вязкость увеличилась на 3%, масса сухого ЭПС была такой же, как и в контрольном варианте. Вероятно, добавление в среду 1% этанола ведет к образованию альгинатов с более высокими молекулярными массами и это отражается на вязкости раствора ЭПС.

Можно сказать, что данный штамм может рассматриваться в качестве потенциального продуцента экзополисахарида. При разных условиях можно получать продукт с различными характеристиками, что позволяет расширить ассортимент и производить биополимер в зависимости от потребностей той или иной области применения.

### **Извлечение цинка из отходов флотационного обогащения с помощью микроорганизмов**

**Черкасова Дарья Владимировна (Уфа, belka-strelka8031@yandex.ru)**

В связи с постепенным истощением запасов богатых рудных ископаемых все больший интерес исследователей привлекает возможность использования нетрадиционных источников сырья для получения металлов: отходов металлургии, обогащения руд и т.д. Однако в связи со специфическим составом их использование может требовать внедрения новых или модифицированных методов переработки.

Цель работы – поиск микроорганизмов, способных к биологическому выщелачиванию цинка из отходов флотации Сибайского филиала Учалинского горно-обогатительного комбината и сравнение результатов их воздействия на руду с результатами ее кислотного выщелачивания.

В качестве агентов биологического выщелачивания были использованы бактерии вида *Acidithiobacillus ferrooxidans*. 500 мл суспензии железобактерий в солевой основе среды 9К смешивали с отработанными рудами в количестве 100 г и 21 день инкубировали при температуре 30°C. Содержание серной кислоты в среде 0,03% (pH 1,8). Исходное содержание цинка в отходе флотационного обогащения 1,88 г/кг.

Кислотное выщелачивание было проведено в стеклянных сосудах емкостью 100 мл, в которых содержалось по 10 г руды и 50 мл растворов с концентрацией серной кислоты 0,03%, 0,3%, 1%, 3% и 30%, с добавлением 18г/л  $Fe_2(SO_4)_3$  в качестве окислителя или без его добавления. Температура 30°C, продолжительность 24 часа соответствует условиям автоклавного кислотного выщелачивания.

При сопоставлении результатов воздействия серной кислоты на отходы обогащения выявлено, что увеличение ее концентрации с 0,03% до 30% лишь незначительно усиливало эффект выщелачивания цинка. При 0,03% и 0,3% содержании серной кислоты было извлечено 37-38% от содержащегося в руде цинка, при 1% и 3% содержании кислоты – 41%, при 30% содержании кислоты – 45%.

Также не было доказано положительного воздействия дополнительного введения в раствор соли трехвалентного железа в качестве окислителя. Доля извлеченного цинка была сопоставима или несколько ниже при 0,03% и 1% концентрации кислоты (36% и 41% соответственно) и немного превышала показатели в вариантах опыта без соли железа при

0,3%, 3% и 30% концентрации кислоты (40,7%, 43,6% и 47% соответственно). В то же время, количество цинка, извлеченного из отходов обогащения Сибайского филиала Учалинского ГОКа с помощью бактерий, было гораздо выше и составило 66,5%.

Таким образом, использование технологии биологического выщелачивания позволяет осуществлять более глубокую вторичную переработку отходов флотационного обогащения Сибайского филиала Учалинского ГОКа по сравнению с их кислотным выщелачиванием при нормальном давлении и температуре 30°C. Очевидно, наблюдаемый эффект связан с осуществляемыми бактериями окислительными процессами, так как простое введение ионов трехвалентного железа, являющихся основными продуктами жизнедеятельности *Acidithiobacillus ferrooxidans*, в растворы при кислотном выщелачивании не приводит к значительному увеличению его эффективности.

### **Новое поверхностно-активное вещество из бактерий**

**Чжан Данянь** (Москва, [zdn\\_bc@mail.ru](mailto:zdn_bc@mail.ru))

Поверхностно-активные вещества (ПАВ) из природных источников используются в различных отраслях сельского хозяйства, медицины, промышленности, включая добычу и переработку нефти. По сравнению с химическими, полученными ПАВ они имеют лучшую совместимость с окружающей средой, высокое пенообразование, селективность и специфическую активность при повышенных температурах, pH и солёности. Помимо этого, они биодеградабельны и нетоксичны. Биосурфактанты условно могут быть разделены на две группы. К первой группе относятся ПАВ с низким молекулярным весом, такие как гликолипиды (рамнолипиды, трегалозолипиды, софоролипиды) и липопептиды (сурфактин, стрептофактин, полимиксин, грамицидин). Ко второй группе принадлежат полимерные ПАВ большого молекулярного веса, представленные полисахаридами, липопротеинами, липополисахаридами и их комплексами (Назина и др., 2003).

С целью поиска ПАВ выделяли чистые культуры бактерий из проб воды, отходов нефтепереработки, пластовой воды нефтяного месторождения и нефти. ПАВ-образующие штаммы отбирали экспресс-методом на плотной среде с сафранином (Liu et al., 2008). После культивирования в жидкой среде с углеводородами определяли поверхностное натяжение культуральной жидкости методом отрыва кольца и образование эмульсии типа «масло в воде» (Назина и др., 2003). Способность к образованию ПАВ выявлена у двух штаммов бактерий, относящихся к родам *Rhodococcus* и *Pseudomonas*. Наибольшие значения поверхностного натяжения и устойчивая эмульсия получены для культуры *Pseudomonas* sp. Из культуральной жидкости этих бактерий выделяли ПАВ по методу Аrimы (Назина и др., 2003) и определяли его химическую природу аналитическими методами. По их совокупности новое ПАВ представляет собой гликолипид.

### **Разработка универсального биопрепарата для ликвидации нефтяных разливов**

**Шпакова Мария Андреевна** (Москва, [mshpakova@bk.ru](mailto:mshpakova@bk.ru))

Решение проблем загрязнения вод Мирового океана, в том числе углеводородами, должно идти несколькими путями. Биотехнологический подход не может полностью заменить существующие механические методы, но способен дополнить их, тем самым способствуя достижению лучших результатов.

Для создания универсального бактериального препарата первоочередной задачей было определение сходства и различий ассоциаций нефтеокисляющих бактерий разных акваторий. При этом было выделено 16 штаммов углеводородокисляющих бактерий из Балтийского и Черного морей, а также Волги и Москвы-реки. Выделение штаммов бактерий проводили, используя плотную минеральную среду Чапека с нефтью (малопарафинистая маловязкая лёгкая Западносибирская), керосином и н-гексадеканом. Было установлено, что каждая бактериальная ассоциация содержит в своем составе представителей родов *Rhodococcus* и/или *Pseudomonas*. Таким образом, необходимо включение в биопрепарат бактерий именно этих двух родов. Методом подбора было установлено оптимальное качественное соотношение *Rhodococcus* и *Pseudomonas* для более интенсивной биодеструкции нефти и разработан препарат на основе этого активного начала.

Предложенный биопрепарат включает материалы только природного происхождения, в соответствии с экологическими требованиями. Главные питательные элементы азот, фосфор и калий вносятся в виде дешёвого комплексного субстрата-подкормки, являющегося отходом пищевой промышленности. Помимо этого, он выполняет функции носителя биомассы, способствует иммобилизации (адгезии) бактерии и является источником легкодоступного углерода. Были разработаны варианты препарата для ликвидации разливов различной локализации (открытые воды, прибрежная зона, береговая линия). Также предложены технологии использования биопрепарата совместно с другими методами. Показано положительное влияние специального сорбента нефти на развитие бактерий и скорость окисления пленки углеводородов.

В процессе исследования была разработана новая методика стерилизации нефти и тяжёлых фракций углеводородов. Она включает использование диатомита и позволяет предотвратить потерю легколетучих компонентов и/или деструкцию более сложных молекул.

#### **Получение углеводородов из бактериальной биомассы и сапропеля**

*Шувалов Сергей Александрович (Москва, shuvalov\_sa@mail.ru)*

В XXI веке достаточно остро всталла проблема альтернативного топлива. Актуально производство биоэтанола из злаковых культур, сахарного тростника и сахарной свеклы в процессе брожения. Серьезное внимание уделяется производству биодизеля из растительных масел и липидов грибов через получение метиловых эфиров жирных кислот. Но особенно заманчивой представляется идея непосредственного получения углеводородов методами биотехнологии. Это возможно как в результате контролируемого биосинтеза этих соединений микроорганизмами, так и при осуществлении физико-химических процессов пиролиза различных биоматериалов.

В данной работе выясняли возможность получения углеводородов из биомассы и мортмассы бактерий и сапропеля путем пиролиза. Исследовали чистые и накопительные культуры различных анаэробных и аэробных бактерий, полученные при выращивании их в жидких питательных средах в физиологических условиях. Для первичной оценки липидного содержания бактериальной массы как углеводородного потенциала использовали метод ТГ-ДСК (термогравиметрия – дифференциально-сканирующая калориметрия).

Сущность этой разновидности метода окислительного пиролиза заключается в нагревании образца со скоростью 40°C/мин. в ячейке при доступе воздуха и регистрации пиков, которые соответствуют специфическим тепловым эффектам определённых классов соединений. Полученные спектры показали, что содержание липидов максимально в биомассе анаэробных азотфиксаторов (29,4%) и минимально в озёрном сапропеле (10,8%).

В качестве основного метода исследований использовали метод сухого (вакуумного) пиролиза. Исследуемый образец подсушивали в течение 20 ч при 80°C и запаивали в кварцевую ампулу. Ампулу с образцом выдерживали в муфельной печи в течение 8 ч при температуре 500–700°C. Выделенные экстракцией из полученной смеси углеводороды анализировали методами жидкостной хроматографии и масс-спектроскопии. С целью получения наиболее ценных светлых углеводородов изучали влияние на процесс пиролиза следующих факторов: (1) природы образца; (2) температуры и времени выдержки в муфельной печи; (3) природы экстрагента.

Проведённые эксперименты моделируют естественные условия реального нефтегазоносного пласта и, по всей вероятности, соответствуют современному генезису нефти из массы бактерий в глубинной биосфере.

#### **Оксид азота (NO) лактобацилл: вклад в пробиотический потенциал продуцентов**

*Яруллина Д.Р., Смоленцева О.А. (Казань, yadinka@mail.ru)*

Лактобациллы – важный компонент естественной микрофлоры кишечного и уrogenитального трактов человека и животных. В силу своих биологических особенностей эти бактерии интенсивно используются в производстве пробиотических препаратов и продуктов функционально питания. Ранее нами у бактерий *Lactobacillus plantarum* была обнаружена способность синтезировать оксид азота (NO) – универсальный регулятор

клеточного и тканевого метаболизма в организме человека и животных. NO-синтазная (NOS) активность лактобацилл открывает широкие возможности её использования в пробиотикотерапии, а также актуализирует исследование влияния бактериального NO на клетки продуцентов и состояние макроорганизма.

Целью настоящей работы явилась разработка подходов к управляемому синтезу регуляторной молекулы NO у пробиотических лактобацилл *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 для усиления их полезных свойств.

Мы показали, что субстрат NO-синтазы L-аргинин активирует синтез оксида азота в клетках лактобацилл. Для регистрации и количественного измерения NO использовали методы прямого определения оксида азота – ЭПР-спектроскопию и окраску флуоресцентными индикаторами NO DAA и DAF-FM DA и флуоресцентную микроскопию. С помощью техники атомно-силовой микроскопии (ACM), а также избирательного флуоресцентного окрашивания бактерий с различной жизнеспособностью мы показали, что индуцированный L-аргинином синтез NO не оказывает влияние на жизнеспособность бактерий, но специфически изменяет морфо-физиологическое состояние поверхности бактериальных клеток, существенным образом слаживая её. Последнее можно рассматривать как индукцию образования S-слоя, участвующего в адгезии лактобациллы на эпителии кишечника. Исследуемые лактобациллы демонстрировали значительную адгезивную активность в экспериментах с линией клеток adenокарциномы толстого отдела кишечника человека Caco-2. Существенно, что адгезивными качествами характеризуются только жизнеспособные бактерии, тогда как мертвые лактобациллы утрачивают способность к адгезии на клетках Caco-2. Оценили эффекты донора NO нитропруссида натрия, скавенжера (поглотителя) NO СРТІО и субстрата NOS L-аргинина на способность бактерий *Lactobacillus plantarum* формировать биопленки. Хотя методом ACM было обнаружено изменение структуры поверхности лактобациллы под действием NO, в teste на образование биопленок влияние указанных веществ на адгезивные свойства бактерий не выявлено.

Представленные результаты являются первыми свидетельствами участия оксида азота в пробиотической активности бактерий и открывают перспективы направленного исследования биологической роли NO, продуцируемого комменсальными кишечными лактобациллами, как для продуцентов, так и для организмов человека и животных.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (гранты №07-04-01051, №09-04-97032) и «Михаил Ломоносов» DAAD и Министерства образования и науки РФ (A/06/91824; A/08/72787). Авторы выражают благодарность К.Бойерляйну (Институт фармакологии им. Рудольфа Буххайма, г.Гиссен, Германия) за помощь в проведении флуоресцентной микроскопии.

**Анализ антагонистических свойств бактерий-деструкторов хлорфеноксикусных кислот**  
**Ясаков Т.Р., Коробов В.В., Жарикова Н.В., Мавляиева Р.Р., Анисимова Л.Г.**

(Уфа, [yasakovt@gmail.com](mailto:yasakovt@gmail.com))

Известно, что в смешанных консорциумах микроорганизмов часто наблюдается избирательное подавление членов сообщества за счет разнообразных химических соединений. Доказана высокая специфичность воздействия антибиотиков по отношению к организмам-мишеням. Способность выделять в среду антибиотики является важным конкурентным преимуществом микробов. Понимание антагонистических отношений является необходимым условием применения бактерий в практических целях.

Целью настоящего исследования явилось изучение антагонистических свойств штаммов-деструкторов хлорфеноксикусных кислот. Объектами исследований являлись штаммы бактерий, выделенные из образцов смешанных популяций микроорганизмов почв Уфимского промузла. Типирование штаммов проведено по результатам сравнения последовательностей 16S рДНК, а также прямого бактериального профилирования, базирующегося на применении MALDI масс-спектрометрии с последующим анализом данных в рамках программного пакета Biotype 2.0. Согласно используемых технологий исследуемые штаммы были идентифицированы как *Bacillus subtilis* 16S, *Brenneria salcis* 38Ph, *Stenotrophomonas* sp. 33T и *Pseudomonas kilonensis* 34T.

Тестирование активности штаммов проводилось на твердой агаризированной питательной среде методом перпендикулярных штрихов. При этом каждый бактериальный штамм выступал последовательно в качестве микроорганизма-продуцента и тест-организма. Бактериальные штаммы-продуценты инкубировались при температуре +30°C в течение двух суток для достоверного накопления антибиотика в среде. После этого к ним подсевали тест-организмы. Об антибиотической активности судили по наличию или отсутствию роста тест-организма после суток культивирования.

В ходе работы было показано, что штамм *Bacillus subtilis* 16S не обладает антагонистической активностью по отношению к штамму *Stenotrophomonas* sp. 33T и имеет выраженную антагонистическую активность в отношении штаммов *Brenneria salcis* 38Ph и *Pseudomonas kilonensis* 34T. В то же время штаммы *Brenneria salcis* 38Ph, *Pseudomonas kilonensis* 34T и *Stenotrophomonas* sp. 33T не имеют выраженной антагонистической активности как по отношению друг к другу, так и по отношению к штамму *Bacillus subtilis* 16S. Результаты работы указывают на то, что штаммы *Brenneria salcis* 38Ph, *Pseudomonas kilonensis* 34T и *Stenotrophomonas* sp. 33T как организмы, не имеющие антагонистических взаимоотношений, могут быть использованы в создании специального консорциума микробов для деструкции хлорфеноксиккусусных кислот.

*Работа выполнена при содействии грантов Программы Президиума РАН «Поддержка молодых учёных», У.М.Н.И.К. и программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Биоразнообразие и динамика генофондов».*

## ПОДСЕКЦИЯ «МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ»

### Characterization of a Novel Transcript from Human Locus *ATP4A-HAUS5* (chr19)

*Vanichkina Darya Pavlovna* (Moscow, Darya.Vanichkina@mail.bio.msu.ru)

One of the main goals of molecular biology is to shed light on the organization and function of the genomes of higher organisms. Determining the genome sequence *per se* is but the first step of such an undertaking, and does not provide information on the function of different genes and the regulation of their expression. As a result of the ENCODE pilot project, in which 1% of the human genome was characterized, it was discovered that 93% of DNA is transcribed, but less than 2% encodes proteins, the rest being expressed as non-coding RNA. Numerous ncRNA have been shown to play important roles in genome function, underlying such processes as transcriptional and post-transcriptional gene silencing (via sequence-specific epigenetic mechanisms), X-chromosome dosage compensation, hybrid dysgenesis, reprogramming of germ cells etc.

At the Laboratory of Structure and Function of Human Genes there is an ongoing effort to create an integral map of the regulatory regions of the *FXYD5-TZFP* locus on chromosome 19, a megabase-long genomic region. As part of these studies, it was shown that there is a segment of open chromatin with hypomethylated DNA between the *ATP4A* and *HAUS5* genes. However, no evidence of transcription existed.

In this study, the transcriptional activity of this locus was evaluated, and a novel, previously uncharacterized human RNA was found. Using SMART Step-Out RACE its 5' and 3' termini were determined, and a panel of human cell lines and tissues was used to evaluate its tissue-specific expression. The RNA is transcribed from a 24 kilobase long region of chromosome 19, located between the *TMEM147* and *HAUS5* genes. The transcript (Genbank Accession Number GU595397) is 497 base pairs long, polyadenylated, and consists of three spliced fragments: the 5' terminal fragment, 72 bp long, maps to one of the introns of the *ATP4A* gene; the central fragment, 318 bp long and mapping approximately 18 kbp downstream, contains regions, homologous to rRNA and tRNA<sup>Lys</sup>; and the 3' terminal, located another 6 kbp away, contains a region homologous to the LINE L1. Bioinformatic analysis revealed that this RNA does not encode for proteins, i.e. belongs to the lncRNA group. An assessment of possible folding patterns was carried out using the Mfold algorithm, and the conservation of the queried locus among primates was evaluated.

Our study demonstrates a correlation between the epigenetic state of the probed locus and its transcriptional activity, and unravels a novel tissue-specific human non-coding RNA, which contains extensive regions of homology to repetitive sequences in the *Homo sapiens* genome.

*This study was carried out under the supervision of Dr. Tatyana L. Azhikina, at the Laboratory of the Structure and Function of Human Genes, Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences.*

### Рибосомальных белки S12 и P0 и их внерибосомальные функции

по контролю клеточного деления и дифференцировки

*Аверков Владимир Станиславович* (Украина, Харьков, kontemerling@gmail.com)

Многие рибосомальные белки обладают внерибосомальными функциями, в том числе они могут контролировать клеточную пролиферацию и специализацию клеток. Экспрессия человеческого рибосомального L13α запускает в клетках апоптоз. У дрожжей L7 останавливает клеточный цикл в фазе G1 и также заставляет клетку гибнуть.

В ходе нашей работы мы проверяем воздействие экспрессии различных человеческих генов на ход развития глаза *Drosophila melanogaster*. Образование данного органа происходит в результате комплексного взаимодействия множества механизмов, контролирующих клеточный цикл, деление и дифференцировку клеток, что делает этот процесс чувствительным объектом изучения молекулярных механизмов развития. Гены, экспрессия которых нарушает формирование глаза, могут схожим образом нарушить нормальное деление клеток во взрослой ткани. То есть, это потенциальныеprotoонкогены. Чтобы запустить синтез человеческих белков в глазе *D. melanogaster*, мы встраиваем в геном мушки гены из библиотеки кДНК, выделенной из раковой опухоли молочной железы человека.

Как оказалось, экспрессия человеческих рибосомальных белков S12 и P0 вызывает устойчивый в поколениях мутантный фенотип мушиного глаза. Этот мутантный фенотип указывает, что белки S12 и P0 нарушают нормальное деление и дифференцировку клеток. Таким образом, наши результаты идентифицируют гены *RPS12* (40S ribosomal protein S12) и *RPLP0* (ribosomal protein, large, P0) как потенциальныеprotoонкогены.

Участие белков *RPS12* и *RPLP0* в процессах контроля клеточного деления и дифференцировки ранее уже было показано на человеческих раковых перерождениях. S12 описан как один из маркеров ранних стадий развития карциномы шейки матки, повышенная экспрессия P0 присутствует в карциномах печени и прямой кишки. Полученные нами линии *D. melanogaster*, экспрессирующие данные гены – удобные модели для дальнейшего изучения внерибосомальных функций S12 и P0 и нарушений, которые эти белки могут вызвать в клетке. Важно в данной связи упомянуть, что фенотипическое проявление суперэкспрессии P0 и S12 в глазу мушки различно. Суперэкспрессия P0 приводит к типичной «рыхлости» глаза, тогда как экспрессия S12 вызывает «зеркализацию» глаза – более редкий фенотип, происходящий из молекулярных дефектов иного типа. Проводимый на данный момент анализ микроструктуры этих дефектных глаз позволяет определить молекулярные механизмы, на которые влияет экспрессия белков P0 и S12. Не всякий человеческий рибосомальный белок при суперэкспрессии в глазу дрозофилы приводит к дефектам развития. Например, экспрессия человеческого S23 не вызывает мутантных фенотипов, это позволяет предположить, что S23 не участвует во внутриклеточной сигнализации. Также анализ литературы показал, что данный белок не описан как protoонкоген. Я благодарен моему научному руководителю Владимиру Катанаеву за возможность выполнения этой работы в исследовательской группе Генетики развития Института белка РАН.

### **Молекулярные механизмы регуляции соматического гипермутирования иммуноглобулиновых генов**

**Благодатский Артем Сергеевич** (*Пущино, bswin2000@gmail.com*)

Генерация разнообразия иммуноглобулиновых генов была одной из фундаментальных проблем как иммунологии, так и молекулярной генетики на протяжении последних нескольких десятилетий. За эти десятилетия часть процессов, уникальных для генов антител, была детально изучена, однако, ряд явлений, связанных с тонкой «настройкой» работы генов, отвечающих за иммунитет, остается загадкой и сейчас. К таким процессам соматическое гипермутирование иммуноглобулиновых генов. Это уникальное явление, воспроизводящее в ускоренном темпе процесс эволюции и направленного отбора для популяции В-лимфоцитов отдельно взятого организма. Исследование соматического гипермутирования помимо расширения области знаний о генетике иммуноглобулинов, поможет применить механизмы используемой организмами позвоночных «молекулярной эволюции» в области биотехнологии, а также понять природу связанного с аберрантным гипермутированием канцерогенеза.

Целью настоящей работы являлся поиск и характеристика цис-действующих элементов, контролирующих соматическое гипермутирование. Нами была создана репортерная конструкция на основе зелёного флуоресцентного белка, позволяющая количественно оценивать интенсивность соматического гипермутирования на модели линии куриных В-лимфоцитов DT40. В ходе экспериментов по делециям и инсерциям последовательностей локуса легкой цепи иммуноглобулинов курицы нами охарактеризована цис-действующая последовательность ДНК, необходимая и достаточная для индукции соматического гипермутирования в любом геномном локусе. Эту последовательность размером 9,8 тыс. п.о. мы назвали элементом DIVAC от англ. «активатор диверсификации». Центральная последовательность элемента DIVAC, размером 4 тыс. п.о., способна активировать гипермутирование с интенсивностью более чем в 100 раз выше фонового уровня; фланкирующие регионы обладают на порядки меньшей активностью сами по себе, но способны стимулировать гипермутирование, будучи объединены с центральным участком.

Элемент DIVAC способен действовать, находясь по обе стороны от репортерной конструкции и на достаточно больших расстояниях.

**Экспрессия метилтрансферазы клостеровируса желтухи свёклы в растениях *Nicotiana benthamiana*, инокулированных вектором на основе тобамовирусного генома**  
*Богословская Анна Дмитриевна* (Москва, ann19876@yandex.ru)

Вирус желтухи свёклы (beet yellows virus, BYV), представитель семейства *Clasteroviridae*, имеет (+)РНК геном (15,5 тыс. нт), в 5'-концевой части которого расположены гены *1a* и *1b*, продукты которых выполняют репликативные функции. В гене *1a* закодированы консервативные домены папапин-подобной протеиназы, метилтрансферазы (MTR) и NTPазы/РНК хеликазы, в гене *1b* – домен РНК-полимеразы. Клостеровирусная инфекция сопровождается преобразованием мембран заражённой клетки и формированием мультивезикулярных комплексов (MVC), служащих сайтами вирусной репликации. MVC индуцируются репликативными белками *1a* и *1b*. Определенную роль в этом процессе может играть метилтрансфераза BYV, которая содержит потенциальный трансмембранный субдомен и, возможно, способна встраиваться в клеточные мембранны. Однако молекулярные механизмы взаимодействия клостеровируса и клетки изучены мало, и их выяснение представляет существенный интерес.

Целью настоящей работы является изучение взаимодействия MTR BYV (и её фрагментов) с клеточными мембранами, идентификация субклеточных органелл, являющихся специфической «мишенью» вирусного белка, а также способности MTR BYV вызывать индукцию клостеровирусных MVC.

Вставку кДНК, кодирующую 30-кДа фрагмент MTR BYV, клонировали в вектор p30B\_GFP. Этот вектор содержит, под T7 промотором, инфекционную кДНК генома вируса табачной мозаики (TMV), включая репортерный ген зелёного флюoresцентного белка (GFP). Ген репортерного белка в p30B\_GFP заменили на вставку, кодирующую 30-кДа фрагмент метилтрансферазы BYV, и получали вектор p30B\_MTR. Копированные T7 транскрипты химерного генома TMV использовали для инокуляции (заражения) растений *Nicotiana benthamiana*. На 7–9 дн. после инокуляции наблюдали появление симптомов листовой мозаики. В инокулированных листьях, проводящих тканях стебля и листьях верхнего яруса контрольных растений, заражённых транскриптами p30B\_GFP, наблюдалась флюoresценция репортерного белка. Экспрессию целевой вставки 30K MTR BYV определяли с помощью иммуноблотов суммарных белков растений с моноклональными антителами к MTR BYV, ранее полученными в нашей лаборатории. На иммуноблотах белков из растений, инокулированных p30B\_MTR, выявлялась специфическая зона белка ожидаемого размера (30 кДа), которая отсутствовала в контролях – на дорожках белков из здоровых растений и растений, инокулированных p30B\_GFP. Таким образом, нами показана экспрессия 30K MTR BYV *in vivo* с помощью вектора на основе вируса табачной мозаики. Полученные результаты открывают возможность идентификации клеточных органелл, к которым может прикрепляться MTR BYV, и тестирования возможной трансформации мембран клетки, сопровождающей индукцию мультивезикулярных структур.

**Получение и анализ специфичности антител к «узловой» структуре между белком VPg и РНК пикорнавирусов**

*Гавришина Е.С., Зацепин Т.С., Торопыгин И.Ю.* (Москва, esgavtushina83@mail.ru)

К семейству пикорнавирусов относятся вирусы полиомиелита, энцефаломиокардита и Менго, поражающие центральную нервную систему, вирусы обыкновенной простуды человека, вирусы ящура и гепатита А. Актуальность работы определяется необходимостью создания новых инструментов для исследования механизма пикорнавирусных инфекций. Особый интерес представляет изучение инициации репликации генома пикорнавирусов, а также калици- и потивирусов, у которых 5'-концевой остаток уридиновой кислоты РНК ковалентно связан с остатком тирозина белка VPg и праймером для синтеза РНК является либо сам белок VPg, либо его предшественник. В данной работе в качестве такого инструмента предложены антитела к «узлу» ковалентной связи Туг-pUp, которые могут

позволить детально исследовать процесс инициации репликации генома пикорнавирусов и создать новые методы диагностики и профилактики пикорнавирусных заболеваний.

Для получения препарата антител к «узлу» ковалентной связи между белком VPg и РНК пикорнавирусов было синтезировано имитирующее его модельное соединение. Структура модельного соединения была доказана методами ОФ ВЭЖХ, УФ-спектроскопии, ион-парной хроматографии и масс-спектрометрии. Был синтезирован антитела – конъюгат модельного соединения с лизоцимом, данным антигеном иммунизировали кролика, получали антисыворотки и подвергали их сульфат-аммонийному фракционированию и аффинной хроматографии на протеин G сефарозе. Специфичность антисывороток и препаратов антител на всех стадиях очистки определяли методом «иммунозолото» на нитратцеллюлозных мембранах. Было показано, что антитела к модельному соединению специфически узнают РНК пикорнавирусов (вируса энцефаломиокардита и вируса Менго). Методом флуоресцентной микроскопии на клетках HeLa, инфицированных вирусом обыкновенной простуды человека 2, было показано, что антитела к «узловой» структуре специфически узнают сайты инициации репликации пикорнавирусной РНК.

Данное исследование было проведено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 06-04-90609) и Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (гос. контракт № 5635Р/8091). Авторы выражают благодарность профессору Ю.Ф. Дрыгину за руководство и помощь в проведении экспериментов, В.Н. Ташлицкому за проведение ион-парной хроматографии модельного соединения, И.Ю. Торопыгину за проведение масс-спектрометрии модельного соединения, П.В. Лидскому и О.В. Михитась за предоставление культуры клеток HeLa В, профессору Д. Блаасу и А.М. Пикль-Херк за предоставление препарата вируса обыкновенной простуды человека 2 и особую благодарность С.А. Брянцевой за анализ инфицированных и неинфицированных клеток HeLa В методом иммунофлуоресцентной микроскопии.

### **Идентификация и анализ белков внутренней мембранны митохондрий сердца *Bos taurus* масс-спектрометрическими методами**

*Дайнichenko Екатерина Владимировна (Москва, danone2006@yandex.ru)*

Впервые митохондрии обнаружены в виде гранул в мышечных клетках в 1850 году (Taylor et al., 2003), а в дальнейшем было показано, что эти органеллы являются основными поставщиками энергии в клетке (до 95% всего АТФ клетки). Вследствие своих функциональных особенностей митохондрии содержат от 1500 до 3000 белков, а именно: белки окислительного фосфорилирования, цикла Кребса, метаболизма липидов, рибосом и так далее – причём, большинство из них кодируются в ядерном геноме. Трудность идентификации такого количества белков была преодолена путём разработки методов выделения и идентификации протеомных подмножеств – протеомов субкомпартментов. В результате такого анализа было достигнуто упрощение анализируемых смесей, что сделало возможным обнаружение «минорных» белков, которые при изучении целой органеллы на фоне других могли оставаться незамеченными. В настоящей работе проводилось выделение смеси белков внутренней мембранны митохондрий, которые в условиях эксперимента находились в замкнутых мембранных везикулах (СМЧ – субмитохондриальные частицы), причем могли образовываться везикулы, с нативной ориентацией белков мемbrane, а также «вывернутые» везикулы с обратной ориентацией мембранных белков. СМЧ были обработаны трипсином с целью получения экстрамембранных пептидов. Поскольку трипсинолизу была подвергнута смесь из обоих типов СМЧ, то в результате такой обработки ожидалось получение пептидов, относящихся как к наружным, так и к внутренним экстрамембранным фрагментам белков внутренней мембранны митохондрий. Для экстракции и фрагментации трансмембранных компонентов белков был выбран другой способ обработки СМЧ – метод расщепления бромцианом по остаткам метионина с последующей модификацией остатков гомосеринолактона этилендиамином. Далее смесь пептидов подвергалась последовательным катионобменному и обращённофазовому фракционированием, сопряжённым с tandemной масс-спектрометрией. Ключевой частью эксперимента был поиск белков по базам данных аминокислотных

последовательностей. При этом поиск белков проводился с учётом как используемых способов расщепления белков (например, гидролиз трипсином), так и возможного неспецифического расщепления. Это позволило значительно расширить список идентифицированных белков.

В результате удалось достоверно определить 305 белков, для которых был проведён анализ выполняемых функций и локализации белков в клетке.

*Автор выражает благодарность научному руководителю доценту, к.х.н. Гринкевичу В.А. за помощь в проведении экспериментов и подготовке тезисов.*

#### **Исследование генетической вариабельности локуса *ARTS1*, фактора генетического риска развития спондилоартритов**

*Дородных Валерия Юрьевна (Москва, v.dorodnykh@gmail.com)*

В настоящее время с помощью ассоциативного анализа был определен ряд генов, аллеи которых являются факторами риска развития спондилоартритов. Одним из этих генов является *ARTS1*, кодирующий аминопептидазу семейства M1, которая участвует в процессе презентации пептидов на главном комплексе гистосовместимости, а также в регуляции чувствительности клеток провоспалительных интерлейкинов. Ранее была показана строгая ассоциация со спондилоартритами ряда несинонимичных однонуклеотидных замен в кодирующей части гена *ARTS1*, которые, предположительно, влияют на функциональные свойства продукта данного гена.

В нашей работе проводилось исследование вариабельности локуса *ARTS1* по пяти маркерам, для которых была показана наиболее строгая ассоциация. Нами разработана оригинальная ПЦР-система для генотипирования, включающая серию аллель-специфических праймеров. Генотипирование проведено для положительных по HLA B-27 представителей двух выборок: больных спондилоартритом (66 человек) и здоровых доноров (76 человек).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программ Haplovew 4.1 и Genetic Data Analysis 1.0. Определены частоты встречаемости 10 аллелей среди представителей обеих групп. Показано статистически достоверное снижение частоты встречаемости минорных аллелей несущих маркеры rs10050860 (0.12 vs 0.24, P=0.018) rs17482078 (0.11 vs 0.21, P=0.02), rs2287987 (0.09 vs 0.22, P=0.01) у больных спондилоартритом. Кроме того, показано значительное снижение гетерозиготности по указанным маркерам в группе больных.

С использованием результатов генотипирования и анализа структуры кДНК, для группы пациентов, страдающих спондилоартритом, были определены гаплотипы по пяти маркерам. Выявлены два преобладающих гаплотипа AGGGG и AAGGC, которые составляют 44% и 23%, от общего числа проанализированных гаплотипов, соответственно. Остальные гаплотипы составляют менее 10%.

*Выражаю благодарность своему научному руководителю Лебедеву Юрию Борисовичу, а также всему коллективу лаборатории «Сравнительной и функциональной геномики» ИБХ РАН.*

#### **Оценка структуры редактируемого домена криптогена *A6* у представителей рода *Leptomonas***

*Ефимова Надежда Сергеевна (Москва, shordome@gmail.com)*

Уникальной особенностью структуры митохондриального генома трипаносоматид (группа Euglenozoa) является наличие в нем криптогенов. Последовательность криптогена не содержит полноценной открытой рамки считывания функционального белка. Образование транслируемой мРНК из пре-мРНК происходит в процессе уридилирового редактирования, который заключается во вставке или удалении остатков уридилиевой кислоты при участии особого вида молекул РНК – гидовых РНК. Участок криптогена, на протяжении которого происходит редактирование, называется редактируемым доменом. Размер и структура редактируемых доменов разных генов и одного гена у разных видов может варьировать. Так для гена субъединицы 6 АТФазы (*A6*) характерно редактирование по всей длине криптогена для рода *Trypanosoma*, представители которого являются дигенетиками.

У представителей рода *Leishmania* редактируется 5' половина криптогена, а у *Leptomonas seymouri* размер редактируемого домена уменьшается. Эволюция структуры редактируемых доменов на сегодня недостаточно изучена. Задача данного исследования выяснить, варьирует ли размер редактируемого домена конкретного криптогена у представителей одного рода моноксенных трипаносоматид? Нами был выбран род *Leptomonas*, поскольку по современным гено-систематическим данным (в частности, на основании филогенетического дерева, построенного по первичной структуре гена 18S рРНК) род не является монофилетичным. Интересно – отражается ли это в структуре редактируемого домена исследуемого криптогена?

В данной работе нами была установлена первичная структура криптогена субъединицы 6 АТФазы (A6) у трех видов рода *Leptomonas*: *Leptomonas pyrhocorrys*, *Leptomonas collosoma*, *Trypanosomatidae* (*Leptomonas*) sp. (WSD). В качестве видов для сравнения взяты два представителя других родов *Leishmania tarentolae* и *Criithidia fasciculata* и представитель данного рода *L. seymouri*, для которых известны первичная структура криптогена и отредактированная мРНК. Проведенное выравнивание первичных структур показывает, что длина редактируемого домена различается у разных представителей рода. На основании структуры редактируемого домена исследуемого криптогена выделяются две группы внутри рода *Leptomonas*: в первую попадают *L. pyrhocorrys* и *L. seymouri*, во вторую – *L. collosoma* и *Trypanosomatidae* sp. (WSD), у которых размер редактируемого домена значительно уменьшен. Следует отметить, что у *Trypanosomatidae* sp. (WSD), в отличие от всех других представителей рода в криптогене существует стартовый ATG кодон. На основании полученных нами данных и данных литературы можно предположить, что представители второй группы могут относиться к другому роду.

### **Изучение транскриптома *Mycobacterium avium* при заражении мышей линий I/St и B6** *Игнатов Дмитрий Васильевич (Москва, dmita.ignatov@gmail.com)*

*Mycobacterium avium* – факультативный внутриклеточный патоген, вызывающий ряд серьёзных заболеваний: диссеминированные инфекции у людей с иммунодефицитом, болезнь Джонса у жвачных животных и, вероятно, болезнь Крона у человека. Недавно в Центральном научно-исследовательском институте туберкулёза РАМН была разработана модель иммунопатологии, позволяющая проследить ход инфекционного процесса. Заражению *M. avium* подвергались две линии мышей. Линия I/St устойчива к инфекции, вызываемой *M. avium*, а линия B6 восприимчива к инфекции. В мышах линии B6, в отличие от мышей линии I/St, развивается тяжёлое поражение лёгочной ткани. Восприимчивость мышей линии B6 связана с тем, что они несут нефункциональный аллель гена *Nramp1*, кодирующего ионный насос, выкачивающий катионы дивалентных металлов из пространства эндосомы, в которой персистирует *M. avium*. Целью проведенного исследования стал анализ транскрипции всех генов *M. avium* в ходе инфекционного процесса в резистентной и восприимчивой к заболеванию линиях мышей. В работе были использованы мыши линии I/St, устойчивые к инфекции *M. avium*, и мыши линии B6, чувствительные к инфекции. Тотальная РНК из лёгких мышей обеих линий была выделена через 13 недель с момента заражения *M. avium*. На матрице тотальной РНК была синтезирована кДНК. Методика Coincidence cloning, заключающаяся в денатурации и ренатурации кДНК с избытком бактериальной геномной ДНК позволила выделить фракцию бактериальной кДНК. Проведено пиросеквенирование полученных образцов, данные обработаны биоинформационными и статистическими. В результате анализа данных были получены сведения о качественных и количественных отличиях в профилях транскрипции генов бактерии при персистировании в резистентной и восприимчивой к инфекции линиях мышей. На основании этих отличий сделаны выводы об изменении метаболизма *M. avium*. При персистировании в лёгких резистентной мыши наблюдается повышенная экспрессия генов, отвечающих за изменение свойств клеточной поверхности, переход к анаэробному нитратному дыханию, деградацию жирных кислот, биосинтез микобактина – поликетида, отвечающего за восполнение недостатка железа. В *M. avium*, персистирующей в лёгких мыши устойчивой линии, повышена экспрессия генов, отвечающих за осуществление цикла

Кребса и окислительное фосфорилирование, биосинтез жирных кислот, репликацию и трансляцию, а также инактивацию NO, выделяемого макрофагами. В результате исследования получены профили транскрипции всех генов *M. avium* при инфицировании мышей устойчивой и восприимчивой линий. На основании этих данных определены изменения метаболизма *M. avium*, свидетельствующие о том, что в организме мыши устойчивой линии наблюдается переход микроорганизма к латентному состоянию, вызванный дефицитом ионов дивалентных металлов.

*Работа выполнена под руководством д.б.н. Ажикиной Татьяны Леодоровны.*

#### **Влияние 5'-прилегающих последовательностей на транскрипцию РНК-полимеразой III гена 4,5SH РНК в системе *in vitro* и в живой клетке**

**Коваль Анастасия Павловна (Москва, panikoval@yandex.ru)**

4,5SH РНК – это малая РНК длиной 94 нуклеотида, синтезируемая РНК-полимеразой III. 4,5SH РНК распространена только среди представителей 6 семейств из отряда грызунов и ее последовательность имеет значительную гомологию с 7SL РНК-родственными ретропозонами грызунов (B1-элемент) и приматов (Alu-элемент). Функции данной РНК остаются неизвестными, хотя показано, что 4,5SH РНК ассоциирована с поли(A)-содержащими молекулами РНК в живой клетке и взаимодействует с девятью различными клеточными белками *in vitro*.

Гены 4,5SH РНК содержат внутренний промотор РНК-полимеразы III, состоящий из боксов A и B. Долгое время считалось, что при наличии данного типа промотора последовательности, окружающие ген, не оказывают значимого воздействия на транскрипцию РНК-полимеразой III. Однако оказалось, что это не так. В ряде работ было показано, что 5'-прилегающие последовательности могут изменять эффективность транскрипции различных генов РНК-полимеразы III.

Целью представленной работы было определение роли последовательностей, прилегающих к гену 4,5SH РНК, в его транскрипции. Нами обнаружено, что для гена 4,5SH РНК влияние 5'-прилегающих последовательностей на эффективность транскрипции может быть исключительно сильным: различные последовательности могут как полностью репрессировать транскрипцию, так и обеспечивать ее высокую эффективность. В свою очередь, укорочение геномной 5'-прилегающей к гену 4,5SH РНК мыши последовательности приводит к активации дополнительной точки старта транскрипции, расположенной перед началом гена. Таким образом, 5'-прилегающие к гену 4,5SH РНК последовательности играют большую роль, как определяя эффективность транскрипции, так и принимая участие в точном определении точки ее старта.

В ходе экспрессии гена 4,5SH РНК мыши с различными 5'-прилегающими последовательностями в культуре клеток HeLa было показано, что в клетке эффективную транскрипцию обеспечивает только геномная 5'-прилегающая последовательность гена 4,5SH РНК мыши. Следовательно, требования к структуре 5'-прилегающей последовательности для транскрипции гена 4,5SH РНК в живой клетке «строже», чем *in vitro*. Это свидетельствует о важности flankирующих последовательностей в регуляции транскрипции данной малой РНК и их оптимизации для обеспечения высокоеффективной транскрипции в ходе эволюции. *Работа осуществлена при поддержке РФФИ (грант 08-04-00350) и Программы РАН «Молекулярная и клеточная биология». Выражая огромную благодарность своему научному руководителю, Дмитрию Александровичу Крамерову.*

#### **Влияние рельефа поверхности специфического РНК-узнавающего модуля рибосомного белка L1 на его взаимодействие с РНК**

**Костарева О.С., Кляшторный В.Г., Никонова Е. (Пущино, olgacat@inbox.ru)**

Для функционирования многих биологических систем важна способность белков специфически узнавать определенные участки на поверхности РНК, однако правила, по которым происходит это узнавание, слабо изучены. Объектом наших исследований является рибосомный белок L1. Он образует L1-выступ рибосомы, участвующий в высвобождении

деацетилированной тРНК из Е-сайта. Кроме того, он специфически связывается с мРНК и осуществляет регуляцию собственного синтеза по принципу «обратной связи».

Ранее в нашей лаборатории были определены пространственные структуры белка L1 в свободном состоянии и в комплексе со специфическими фрагментами мРНК и рРНК. Анализ данных комплексов показал, что на поверхности домена I белка L1 присутствует область, состоящая из консервативных аминокислотных остатков, формирующих с РНК консервативные, недоступные для растворителя, водородные связи.

Мы исследовали влияние рельефа поверхности данной области в домене I на взаимодействие белка L1 со специфическим фрагментом 23S рРНК. В консервативную триаду аминокислотных остатков Thr-Met-Gly методом сайт направленного мутагенеза вводились замены для того, чтобы получить бугорок (Thr/Phe) или впадину (Thr/Ala) на поверхности РНК-узнавающего модуля, или оставить рельеф неизменным (Thr/Val). РНК-связывающие свойства белка дикого типа и его мутантных форм анализировались методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР). Данный метод позволяет наблюдать взаимодействие белка с фрагментом РНК в реальном времени и определять кинетические константы ассоциации и диссоциации, а также кажущуюся константу диссоциации комплекса. Все вышеперечисленные замены приводили к значительному увеличению кинетической константы скорости диссоциации комплекса, а две из них – к уменьшению константы скорости ассоциации. Для объяснения полученных результатов были закристаллизованы мутантные формы белка и определены их пространственные структуры. Анализ полученных структур показал, что две замены (Val и Ala) приводят к серьёзным конформационным изменениям в областях отдалённых от точки мутации. Замены треонина на аминокислотный остаток похожего или меньшего размера создавали бугорок на поверхности белка, уменьшая, таким образом, сродство мутантной формы белка к рРНК. Замена на фенилаланин привела к изменениям лишь в области связывания с РНК и не оказала аллостерического эффекта на конформацию белка. Данная мутация уменьшила стабильность комплекса, но не изменила скорости его формирования.

Из полученных нами данных можно сделать вывод, что возникновение даже небольших (1-2А) дополнительных бугорков на поверхности белка, контактирующей с РНК, приводит к значительной дестабилизации комплекса, но не влияет на специфичность его формирования.

Работа финансировалась Программой поддержки ведущих научных школ (НШ-4435.2010.4), Программой МКБ РАН, Федеральным агентством по науки и инновации (ГК № 02.740.11.0295), грантом РФФИ (№ 10-04-00618). Авторы выражают благодарность за научное руководство профессору, д.б.н. М.Б.Гарбер и к.б.н. Тищенко С.В.

### Детекция и молекулярная филогения генов малых транс-действующих РНК у высших растений

**Красникова Мария Сергеевна** (Москва, : [marialaur@mail.ru](mailto:marialaur@mail.ru))

У растений, как и других зукариот, *mi*-РНК и *ta-si*РНК играют важнейшую роль в дифференцировке тканей организма и ответе на различные типы стрессов. Особенностью *ta-si*РНК является то, что они инактивируют не те гены, которыми кодируются (TAS гены). Так, последовательное действие miR390 и tasiARF РНК контролирует активность генов факторов транскрипции ARF3 и ARF4.

Для расширения знаний о молекулярных механизмах образования и действия *ta-si*РНК в растениях, мы ставили задачу выявить разнообразие ранее не изученных генов *ta-si*РНК у ряда высших растений. Мы разработали новый метод детекции растительных *ta-si*РНК, биогенез которых зависит от miR390. Этот метод основан на ПЦР с использованием праймеров, комплементарных miR390, и геномных ДНК или кДНК в качестве матриц. Для изучения эволюции TAS-генов, зависимых от miR390, мы изучили их разнообразие у растений семейства Solanaceae. Использование этого метода на ДНК табака и арабидопсиса выявило явные отличия среди продуктов реакции ПЦР. У арабидопсиса обнаруживается один главный продукт реакции длиной около 270 пн, а у табака нами получены 2 продукта 280 пн и 170 пн. Сходные по размеру фрагменты образовывались на матрицах ДНК ряда других представителей Solanaceae. Оказалось, что в дополнение

к разнице в длине TAS-генов они отличаются также тем, что длинные гены содержат tandemно-дуплицированный район ta-siARF РНК и короткие гены содержат протяженный консервативный район в 3'-концевой области. Анализ баз нуклеотидных последовательностей растений выявил короткие и длинные TAS гены также в порядках Malpighiales, Fabales, Malvales, Sapindales, Asterales, Caryophyllales, Vitales.

Важное значение генов *TAS* в установлении адаксиально-абаксиальной полярности листовых примордияев у *A. thaliana* и *Z. mays* делает актуальным для решения проблемы фациальности листа поиск подобных генов и у других покрытосеменных. Особый интерес в этой связи представляют виды рода *Senecio* – *S. spiculosus* (Seph.) Rowl., *S. articulatus* (Haw.) Sch. Bip., различающиеся по фациальности листьев. У обоих видов *Senecio* нами выявлены *TAS*-подобные гены, структурно сходные с типичными *TAS3* генами *A. thaliana*. Это позволяет предположить, что *TAS3* гены представляют собой универсальный компонент генома покрытосеменных растений, регулирующий становление фациальности листа в онтогенезе и, возможно, в эволюции. Важно, что *S. spiculosus* с унифациальными листьями имеет те же гены *TAS3*, что и *S. articulatus*, которому свойственны бифациальные листья. Следовательно, развитие унифациальных листьев *S. spiculosus* не обусловлено простой делецией генов регуляторных tasiARF РНК. Их последующее преобразование в унифациальный орган, вероятно, вызвано различиями в транскрипционной активности генов *TAS3* в разных участках развивающегося листа.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 09-04-00707-а и 09-04-01324.

### Структурно-функциональное разнообразие хитин-связывающих доменов растительных пероксидаз и их практическое применение

Кузьмина Ольга Ильинична (Уфа, olya.kuzmina.ibg@gmail.com)

В настоящее время в биотехнологической промышленности значительный интерес представляют специфические нейтральные пептиды, способные афинно- или ионообменно связываться с биологическими матрицами. Этот интерес связан с возможностью создания на их основе химерных конструкций, с помощью которых из множества белков, синтезируемых в рекомбинантных организмах, можно фракционировать целевые белки с меньшим количеством этапов. В этих условиях домены, взаимодействующие с хитином, представляют значительный интерес, поскольку этот биополимер является относительно распространенным и дешевым. Использование ионообменно – взаимодействующих с биологической матрицей пептидов, например, таких как у хитин-специфичных пероксидаз, является перспективной наряду с ионообменной хроматографией. В связи с этим цель работы состояла в анализе структуры хитин-связывающего домена гена анионной пероксидазы пшеницы и определению функциональной активности этого фрагмента.

Фрагмент гена пероксидазы, предположительно кодирующий хитинспецифичный домен, был выделен и просеквенирован. Анализ просеквенированного ампликона, полученного с ДНК *Triticum militinae* и *Triticum compactum* показал его гомологию до 98% с геном пероксидазы *TC 151917 Triticum aestivum*, а также с геном *prx126* пероксидазы до 81% риса *Oryza sativa (japonica* cultivar-group). Нами получена генно-инженерная конструкция, созданная на основе вектора pCambia 1305.1 с репортерным геном *GUS*, находящегося под контролем 35S промотора, для направленного клонирования смыслового фрагмента хитин-связывающего сайта гена анионной пероксидазы. Трансформированные бактериальные колонии *E. coli* активно синтезировали ряд белков, отсутствующих в «диком» штамме, в том числе, проведенный SDS-форез выявил белок размером ~110 кДа, который, по нашему предположению, и является трансформированным химерным белком. Экспериментально доказано, что химерный белок  $\beta$ -глюкуронидазы, содержащий хитин-связывающий домен пероксидазы, обладает способностью взаимодействовать с хитином.

Таким образом, в этой работе нам удалось синтезировать фрагмент кодирующей части гена пероксидазы в химерной конструкции с геном  $\beta$ -глюкуронидазы, продукт которого обладал способностью взаимодействовать с хитином. Полученные данные доказывают то, что у хитин-специфичных пероксидаз растений на поверхности белка существуют непосредственные сайты, ответственные за их связывание с хитином патогенных грибов.

Полученная генно-инженерная конструкция позволяет использовать его в практических целях, например, для создания химер с целевыми белками и дальнейшего их фракционирования с помощью аффинно-ионообменной хроматографии на хитиновом сорбенте. Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 08-04-90259-Узб-а и Всероссийского молодежного научного инновационного конкурса «УМНИК» (2009). Автор выражает признательность д.б.н. Максимову И.В. за помощь в подготовке тезисов.

### Разработка подхода для изучения активации трансляции инкапсионированной РНК

Х вируса картофеля в процессе межклеточного транспорта

Кулёгин С.Е., Смирнов А.А. (Москва, sleiden@yandex.ru)

Ранее в нашей лаборатории было показано, что РНК Х-вируса картофеля (XBK), находящаяся в составе вирусной частицы, не доступна для трансляции *in vitro*. Фосфорилирование белка оболочки (БО) в составе частицы XBK, или связывание с ней транспортного белка 1 (ТБ1) XBK активирует трансляцию инкапсионированной РНК *in vitro*. Нашей следующей задачей является изучение активации трансляции инкапсионированной РНК XBK *in vivo*. Имеющиеся на сегодняшний день данные, позволяют предположить, что РНК XBK транспортируется из клетки в клетку как в составе вириона, так и «однохвостой частицы», представляющей собой не полностью собранный вирион, связанных с ТБ1 XBK. Одной из возможных функций ТБ1 является обеспечение активации трансляции вирусной РНК, входящей в состав транспортной формы, после её перехода в соседнюю незараженную клетку.

Для изучения этого процесса *in vivo* необходимо иметь возможность независимо детектировать два события: переход транспортной формы вируса в соседнюю незараженную клетку и последующую трансляцию содержащейся в её составе РНК.

Для детекции межклеточного транспорта РНК XBK мы решили использовать подход, основанный на способности белка оболочки бактериофага MS2 (BOMS2) с высокой специфичностью связываться с уникальной 19 нуклеотидной последовательностью (MS2 шпилька) геномной РНК фага. В состав исследуемой РНК встраивается последовательность MS2 шпильки. Слитый с зеленым флуоресцентным белком БО MS2 связывается с MS2 шпилькой, что позволяет детектировать локализацию исследуемой РНК в интактной клетке. Таким образом, целью данной работы было создание вирусного вектора на основе кДНК копии геномной РНК Х вируса картофеля, содержащего последовательность MS2 шпильки и ген красного флуоресцентного белка (RFP). Мы, предполагаем, что наличие MS2 шпильки в составе вирусной РНК позволит детектировать её переход в соседнюю незараженную клетку, с помощью описанного выше подхода. А последующая экспрессия красного флуоресцентного белка в этой клетке – трансляционную активацию вирионной РНК.

Исходя из анализа функциональной значимости различных участков геномной РНК вируса, нами были выбраны области для встраивания гена RFP и MS2 шпильки. Для проверки влияния MS2 шпильки на экспрессию окружающих ее генов, в клетках листа *Nicotiana benthamiana* была экспрессирована мРНК, в которой после открытой рамки считываивания RFP была встроена последовательность MS2 шпильки. Было показано, что MS2 шпилька не блокирует экспрессию RFP.

Таким образом, исходя из полученных результатов, была определена область вирусной РНК предположительно подходящая для встраивания гена RFP и MS2 шпильки. Далее, нами был получен вирусный вектор на основе кДНК копии геномной РНК XBK, содержащий ген RFP под контролем дуплицированного субгеномного промотора БО и последовательность MS2 шпильки.

Целью дальнейшей работы будет определение возможности использования полученной системы для детекции межклеточного транспорта и трансляционной активации инкапсионированной РНК XBK *in vivo*.

**Использование метода FRAP для изучения эффективности действия специфичных к мРНК белка eGFP антисмыловых олигонуклеотидов различной вторичной структуры**  
**Молчанова Е.С., Кошелева Н.В. (Москва, [alena.molchanova@gmail.com](mailto:alena.molchanova@gmail.com))**

Открытиями последних десятилетий в области генетики и молекулярной биологии показана возможность модуляции экспрессии генов антисмыловыми олигонуклеотидами (АсОДН), направленными на матричные РНК и ингибирующими трансляцию. Целью исследования стала разработка способа полуколичественной оценки экспрессии флуоресцентного белка eGFP в живой клетке и изучение с применением этой методики эффективности воздействия АсОДН на экспрессию этого белка в клетках eGFP+ мышей в зависимости от вторичной структуры олигонуклеотидов.

На основе метода FRAP (восстановление интенсивности флуоресценции после фотоотбеливания) мы разработали способ, позволяющий оценить изменение количества белка-мишени eGFP по изменению интенсивности его флуоресценции. Работа выполнена на культуре дермальных фибробластов мышей линии C57BL/6-Tg(ACTB-EGFP)1Osb/J. Различия интенсивности флуоресценции eGFP оценивали по степени восстановления интенсивности флуоресценции в ядрах клеток, подвергшихся фотоотбеливанию. В циклах FRAP характер восстановления флуоресценции у соседних клеток одного образца зависел от уровня интенсивности флуоресценции до начала фотоотбеливания. Кривые изменения интенсивности флуоресценции аппроксимировали квадратичной функцией, на полученном графике находили точку, производная в которой равна нулю (точка выхода на плато), рассчитывали разницу в интенсивности флуоресценции в точке начала восстановления флуоресценции и в точке выхода на плато. Данная величина прямо пропорционально зависела от интенсивности флуоресценции до начала фотоотбеливания. Рассчитываемая разница интенсивности флуоресценции белка-мишени в циклах FRAP позволила полуколичественно оценить уровень белка eGFP в клетках.

С применением разработанного метода полуколичественной оценки уровня экспрессии белка на основе метода FRAP исследовали эффективность действия специфичных к мРНК *egfp* АсОДН, имеющих линейную вторичную структуру, и АсОДН, формирующих вторичную структуру «шпилька». Дермальные фибробlastы GFP+ мышей культивировали в стандартных условиях, ежедневно добавляли олигонуклеотиды в экспериментальные группы и на восьмой день оценивали эффективность действия АсОДН. Линейный АсОДН практически не влиял на экспрессию белка eGFP: в циклах FRAP разности в интенсивности флуоресценции в точке начала восстановления флуоресценции и в точке выхода на плато в контрольном образце и в образце после инкубации с линейным АсОДН были сходны и напрямую зависели от интенсивности флуоресценции до начала фотоотбеливания. После инкубации с АсОДН «шпилькой» белка eGFP в клетках стало настолько мало, что его количество после фотоотбеливания не восстанавливалось (рассчитываемая в циклах FRAP разность была отрицательна). Снижение уровня экспрессии белка eGFP после воздействия АсОДН «шпилька» было подтверждено с помощью вестерн-блота.

*Исследования выполнены в рамках Программы поддержки научно-исследовательской работы молодых ученых ВУЗов России компании Carl Zeiss, Германия (грант №2-13).*

**Изучение структуры и свойств вирусных частиц, собранных из белка оболочки фитовируса и гетерологичных РНК**  
**Петрова Екатерина Кирилловна (Москва, [katerina519@mail.ru](mailto:katerina519@mail.ru))**

Важной стадией в жизненном цикле вируса является упаковка вирусного генетического материала в вирион. Многие вирусы можно реконструировать *in vitro* из вирусной РНК и белка оболочки (БО), однако эффективность сборки *in vitro* и *in vivo* сильно различается. Очевидно, что в упаковке вирусного генома участвуют не только вирусные компоненты, но и компоненты клетки-хозяина.

Целью работы является изучение структуры, свойств и условий сборки вирусных частиц, собранных из БО фитовируса и гетерологичных РНК *in vitro*.

Исследована гомологичная и гетерологичная сборка БО Х-вируса картофеля (ХВК) с РНК вирусов, относящихся к различным таксономическим группам вирусов растений и к вирусам

животных. Для этого были использованы гомологичная РНК (РНК ХВК) и гетерологичные (чужеродные) РНК: вируса мозаики нарцисса (ВМН), вируса аукубы мозаики картофеля (ВАМК), вируса мозаики альтернантеры (ВМАльт), вируса табачной мозаики (ВТМ), вируса мозаики костра безостого (ВМК) – тотального препарата и отдельно трех геномных и субгеномной РНК, вируса Менго (вирус животных). Показана возможность сборки «гибридных» вирусных частиц, состоящих из БО ХВК и гетерологичных РНК. С помощью электронной (ЭМ) и атомно-силовой микроскопии (АСМ) впервые показано, что по своей структуре вирусные рибонуклеопротеиды (вРНП) с гетерологичной РНК идентичны вРНП с гомологичной РНК (БО ХВК – РНК ХВК). Эффективность сборки вРНП, содержащих гетерологичные РНК, сопоставима с гомологичной сборкой. Размеры гетерологичных частиц соответствуют размерам гомологичных частиц. Ранее в нашей лаборатории было продемонстрировано, что РНК ХВК в составе вРНП (БО ХВК – РНК ХВК) не доступна для рибосом, но начинает транслироваться при взаимодействии с транспортным белком 1 (ТБ1). Показано, что гетерологичная нуклеиновая кислота недоступна для рибосом в составе собранных вРНП. Получены экспериментальные данные о трансляционной активации гетерологичных нуклеиновых кислот в составе этих частиц при добавлении к ним ТБ1 ХВК. Можно сделать вывод, что сборка *in vitro*, по-видимому, не является нуклеотид-специфичной, то есть она не зависит от нуклеотидной последовательности 5'-конца РНК.

На следующем этапе была проверена возможность сборки БО ХВК с субгеномной (4-й) РНК ВМК, выделенной из тотального препарата, и фрагмента, полностью соответствующего по нуклеотидной последовательности 4-й РНК, полученного при разрезании 3-й геномной РНК ВМК в присутствии олиго-d(T) РНКазой Н (SH-фрагмент). SH-фрагмент отличался от РНК4 только отсутствием кэп-структуры. Оказалось, что РНК4 ВМК образует вРНП, как и другие гетерологичные РНК. При инкубации БО ХВК с SH-фрагментом образование вРНП зафиксировать не удалось.

Изучен возможный вклад кэп-структуры при сборке вРНП *in vitro* на примере природных РНК, а также кэпированных и некэпированных транскриптов 5'-концевой области РНК ХВК.

#### **Изучение экспрессии гена сладкого белка тауматина II из *Thaumatooccus daniellii* в трансгенных растениях табака**

**Пущин Александр Сергеевич** (*Пущино, aspushin@rambler.ru*)

Сверх сладкий белок тауматин II впервые выделен из плодов западноафриканского растения *Thaumatooccus daniellii* Benth. Сравнение аминокислотной последовательности тауматина, определенной по кДНК, с аминокислотной последовательностью, определенной секвенированием белка, показало, что тауматин синтезируется в виде предшественника (препротауматина), который содержит N-концевой гидрофобный сигнальный пептид, состоящий из 22 а.к. остатков и С-концевой пептид, состоящий из 6 а.к. остатков. Целью наших исследований было изучить влияние удаления N- и С-сигнальных последовательностей препротауматина на характер экспрессии тауматина в трансгенных растениях табака. Для этого были синтезированы несколько нуклеотидных последовательностей, кодирующие разные формы тауматина: форму с удаленным С-концевым сигнальным пептидом; форму с удаленными N- и С-сигнальными пептидами; форму с удаленным N-концевым сигнальным пептидом. В качестве контроля использовали ген, кодирующий препротауматин – форму, содержащую оба сигнальных пептида. Все нуклеотидные последовательности клонировали в бинарный вектор *pBI121* вместо гена *uidA*, под контроль промотора 35S РНК вируса мозаики цветной капусты и терминатора гена нопалинсингазы. Полученные векторы переносили в супервирулентный обезоруженный агробактериальный штамм СВЕ21, который использовали для трансформации растений табака сорта Petite Havana SR. Отобранные трансгенные линии табака использовали для анализа. Анализ экспрессии гена тауматина при помощи иммуноблотинга с применением поликлональных антител, специфичных к тауматину, показал следующие результаты. При наличии N- и С-сигнальных последовательностей тауматин накапливался внутриклеточно (предположительно в вакуолях) и соответствовал по подвижности зрелому белку, что свидетельствует о прохождении процесинга. Удаление С-концевого

гексапептида, привело к секреции тауматина в межклеточное пространство, при этом процессинг проходил корректно. Иммуноферментный анализ показал, что удаление обоих сигнальных пептидов или только N-концевого снизило уровень накопления тауматина в трансгенных растениях табака.

**Изучение участия 5'-UTR *CUP1* *S. cerevisiae*  
в HSP104 опосредованной регуляции экспрессии генов**  
**Рубель А.А., Игнатова В.В. (Санкт-Петербург, arubel@mail.ru)**

В настоящее время не вызывает сомнения тот факт, что белки в клетке не ограничиваются выполнением одной функции. Было показано, что многие шапероны участвуют в различных клеточных процессах, в том числе участвуют в регуляции экспрессии генов. Такие данные получены для дрожжевого шаперона Zutin (семейство Hsp40/DnaJ) и для представителей семейства Hsp100/ClpB – растительного Hsp101 и дрожжевого Hsp104, которые являются ортологами. Показано, что эти шапероны могут участвовать в регуляции экспрессии за счет связывания с UTR мРНК определенных генов. Нами показано, что независимо от уровня транскрипции, экспрессия генов, находящихся под контролем промотора гена *CUP1* позитивно регулируется шапероном Hsp104. В геноме *Saccharomyces cerevisiae* присутствуют две копии этого гена. *CUP1-1* и *CUP1-2* имеют абсолютно идентичные промоторные области и кодируют белки металлотионеины, детоксифицирующие ионы меди и кадмия, что может свидетельствовать о том, что Hsp104 участвует в дополнительной тонкой регуляции ответа клетки на стресс, вызванный их действием. Возможно также, что роль Hsp104 не ограничивается только стрессовым ответом на ионы двухвалентных металлов, а является частью HSF-зависимого каскада реакции клетки на разные виды стресса.

Мы исследовали роль 5'-UTR мРНК *CUP1* в регуляции экспрессии на посттранскриptionном уровне при участии шаперона Hsp104 у дрожжей *S. cerevisiae*. Был проведен *in silico* анализ вторичных структур, которые могут формировать два альтернативных варианта 5'-UTR *CUP1* и находящихся в этих последовательностях сайтов потенциального связывания факторов транскрипции и трансляции. Было установлено, что 5'-UTR мРНК *CUP1* содержит четыре tandemных повтора (CAAU). С помощью флуоресцентной микроскопии и Вестерн-блот гибридизации, мы показали, что делеции или мутагенез этих повторов приводят к отсутствию продукции репортерных белков. Для изучения влияния 5'-UTR *CUP1*, мы сконструировали плазмиды, несущие репортерный ген *GFP*, под разными промоторами с неизмененными лидирующими участками и с дополнительными последовательностями 5'-UTR мРНК *CUP1* перед стартовым кодоном. Мы использовали метод ОТ-ПЦР РВ для разграничения изменений, происходящих при введении в конструкцию дополнительного 5'-UTR, на уровне транскрипции и на уровне трансляции. Уровень продукции репортерных белков был исследован в штаммах с нормальным уровнем продукции Hsp104, сверхпродукции Hsp104 и в изогенном штамме с делецией гена *hsp104*. Нами установлено, что введение дополнительной последовательности 5'-UTR мРНК *CUP1* приводит к позитивной регуляции экспрессии репортерного гена вне зависимости от промотора. *Работа выполнена при поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы.*

**Модель сборки шаперонной системы GroEL/GroES клеток *E. coli* *in vitro*:  
равновесные и кинетические исследования процессов самоорганизации  
шаперона GroEL и ко-шаперона GroES**

**Рябова Наталья Александровна (Пущино, ryabova@phys.protres.ru)**

Шаперонная система клеток *Escherichia coli*, представленная двумя олигомерными белками – шапероном GroEL (850 кДа) и ко-шапероном GroES (70 кДа), участвует в сворачивании многих клеточных белков, взаимодействуя с их ненативными конформационными состояниями и предотвращая их неспецифическую агрегацию. Вместе с тем, процесс сворачивания самих шаперонов изучен недостаточно, хотя это важно для понимания общего механизма самоорганизации сложных олигомерных белков.

В настоящей работе исследована сборка *in vitro* олигомерной частицы GroEL, состоящей из 14-ти субъединиц с молекулярным весом 57 кДа каждая и олигомерного ко-шаперона GroES, состоящего из 7-ми субъединиц с молекулярным весом по 10 кДа каждая.

Показано, что ренатурация и олигомеризация GroES происходит спонтанно и эффективно без каких-либо дополнительных факторов или лигандов. Ренатурация GroEL до мономерной формы так же не нуждается в дополнительных факторах, в то время как для олигомеризации GroEL требуется присутствие  $Mg^{2+}$  и АТФ. Также обнаружено, что при небольших концентрациях мономерной формы GroEL (менее 0,1 мг/мл) MgATФ-индуцируемая сборка олигомерной структуры GroEL происходит только в присутствии его ко-шаперона GroES. При более высоких концентрациях мономерной формы GroEL для сборки олигомерной GroEL-частицы присутствие GroES не обязательно, но оно значительно ускоряет процесс самоорганизации шаперонной системы.

Исследована зависимость скорости сборки олигомерной частицы GroEL, индуцируемой присутствием MgATФ, от молярного избытка GroES. Показано, что скорость более быстрой фазы в кинетике олигомеризации GroEL зависит от молярного избытка GroES, а вторая более медленная не зависит, что позволяет предположить наличие взаимодействия GroES с кинетическим олигомерным интермедиатом. Процесс сборки GroEL-частицы был исследован также с помощью кругового диахроизма в присутствии  $Mg^{2+}$  и 20% глицерина. Показано, что окончательное формирование вторичной структуры GroEL происходит в две стадии, первая из которых предположительно отражает формирование элемента вторичной структуры, ответственного за специфические межмолекулярные взаимодействия, а вторая – доворачивание вторичной структуры в составе олигомера. По результатам исследований была предложена модель сборки шаперонной системы GroES/GroEL *in vitro*.

Работа поддержанна программами «Молекулярная и клеточная биология», ФЦП №02.740.11.0295, ФЦП № П304 и грантами «Научная школа» (НШ-2791.2008.4), РФФИ (09-04-00768-а) и ННМИ – 55005607. Выражаю благодарность научному руководителю Семисотнову Г.В., а также Марченкову В.В., Котовой Н.В. и всем сотрудникам лаборатории физики белка.

### Влияние метилирования гена *sdh 1-2* сукцинатдегидрогеназы на уровень его экспрессии при прорастании семян *Zea mays* L.

*Селиванова Н.В., Федорин Д.Н., Гончаренко И.Н. (Воронеж, kir2202@yandex.ru)*

Метилирование ДНК играет важную роль в модуляции структуры хроматина, регуляции транскрипции и стабильности генома. У растений степень метилирования CG-динуклеотидов, входящих в состав промоторной части генов сильно изменяется при прорастании семян, при переходе к цветению и после заражения грибами и вирусами. В связи с этим целью данной работы явилось изучение влияния степени метилирования гена *sdh1-2* субъединицы А сукцинатдегидрогеназы (СДГ, КФ 1.3.99.1) на уровень его экспрессии при прорастании семян кукурузы. В качестве объектов исследования использовали кукурузу *Zea mays* L.

Исследование уровня экспрессии гена *sdh1-2* в щитках кукурузы показало, что интенсивность его транскрипции в течение всего периода развития неодинакова. Установлено, что при прорастании семян происходит изменение уровня экспрессии гена *sdh1-2* СДГ: с первого по пятый день прорастания он активно транскрибируется, достигая максимума на четвертый день экспозиции. Однако уже на 7-е сутки количество транскрипта гена *sdh1-2* снижалось на 37% от максимального значения, стабилизируясь в дальнейшем на том же уровне. В ходе анализа промотора гена *sdh1-2* СДГ выявили наличие одного CpG-островка размером 140 п.н. (в положении с -617 до -756 н.). Степень метилирования определяли у трех CG-динуклеотидов в положении -631, -583 и -912. Результаты метилспецифичной полимеразной цепной реакции показали, что степень метилирования отдельных CG-динуклеотидов в составе промотора гена *sdh1-2* изменяется в течение прорастания семян кукурузы. В первые дни экспозиции все исследуемые CG-динуклеотиды были неметилированы. Однако, начиная с шестого дня прорастания наблюдалось частичное метилирование цитозина в положениях -631 и -912, что может быть одним из механизмов

регуляции скорости экспрессии исследуемого гена в данный период. Полученные данные о характере метилирования промотора исследуемого гена коррелируют с изменением количественных показателей транскрипта гена *sdh1-2* сукцинатдегидрогеназы при прорастании семян кукурузы. При этом увеличение степени метилирования CG-динуклеотидов в промоторе исследуемого гена проявляется в снижение скорости его транскрипции.

Таким образом, установлено снижение скорости транскрипции гена *sdh1-2* субъединицы А СДГ при прорастании семян и смене типа питания растительной клетки с гетеротрофного на автотрофный. Механизм ингибирования транскрипции следуемого гена на начальном этапе онтогенеза кукурузы обусловлен, в частности, изменением степени метилирования CG-динуклеотидов в составе его промотора.

#### **Анализ энхансер-подобного элемента, расположенного во втором инtronе гена *U2AF1L4***

**Смирнов Николай Андреевич (Москва, smirnov.kolek@gmail.com)**

Одними из ключевых регуляторов транскрипции эукариот являются энхансеры, которые представляют собой класс цис-регуляторных элементов, активирующих транскрипцию генов. Располагаться энхансеры могут как в межгенных участках, так и внутри генов. Для ряда клеточных энхансеров характерным является то, что их активность сосредоточена в коротком фрагменте 20-30 п.н., названном коровым элементом. Как правило, коровий элемент содержит один или несколько сайтов связывания транскрипционных факторов, которые определяют особенности функционирования энхансера.

Среди исследованных энхансеров не обнаруживается четкой гомологии в последовательностях ДНК. Однако информация о нуклеотидных последовательностях геномов различных организмов, как близкородственных, так и далеко отстоящих друг от друга в эволюционном ряду, позволяет использовать методы сравнительной геномики для идентификации функциональных областей генома, а также позволяет в некоторых случаях выявить коровье участки внутри уже известных цис-регуляторных областей генома.

Ранее в нашей лаборатории внутри локуса 19q13.12 хромосомы 19 человека был идентифицирован ряд последовательностей, обладающих активностью энхансеров в клетках HeLa. В этой работе мы провели поиск кор-последовательности, отвечающей за энхансерную активность одного из обнаруженных энхансер-подобных элементов (энхансер №12), расположенного во втором инtronе гена *U2AF1L4*.

Нами были определены гомологичные энхансеру №12 последовательности в геномах 7 видов приматов. С помощью метода сдвига электрофоретической подвижности в геле мы показали, что обнаруженные последовательности приматов конкурируют *in vitro* с последовательностью энхансера №12 за связывание с ядерными белками. Мы предположили, что за взаимодействие ядерных белков с энхансером ответственны наиболее консервативные участки нуклеотидной последовательности. С помощью сравнительного анализа гомологичных последовательностей мы выделили пять консервативных участков (CNS 1-5) внутри исследуемого элемента.

Деленционный анализ энхансера №12 с использованием системы двойной люциферазной детекции показал, что его центральная область, содержащая консервативный участок CNS4 длиной 22 п.н., существенна для функционирования энхансера. Консервативный участок CNS4 содержит мотив СССТСС, который представляет гипотетический сайт связывания белков Sp-семейства, в частности, распространенного активатора транскрипции Sp1. С помощью метода сдвига электрофоретической подвижности в геле мы показали что, CNS4 специфически взаимодействует с ядерными белками клеток HeLa, распознающими Sp1-консенсус (GC-бокс).

#### **Разработка методики выделения регуляторных клеточных белков фосфатазы PP1, участвующих в репликации вируса иммунодефицита человека**

**Темкина О.А., Клотченко С.А., Шалджаян А.А. (Санкт-Петербург, o-temkina@yandex.ru)**

CDK9/циклин T1 – это протеинкиназа, которая фосфорилирует С-концевой домен большой субъединицы РНК полимеразы II (RNAPII). Ранее *in vitro* было показано, что

автофосфорилирование CDK9 на С-конце играет важную роль для эффективного связывания CDK9/циклин T1 с TAR РНК и Тат вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). При этом в дефосфорилировании CDK9 в культивируемых клетках участвует протеинфосфотаза-1 (PP1) и, таким образом, вносит вклад в активацию транскрипции ВИЧ-1 белком Тат. Наши предыдущие исследования показали, что PP1 стимулирует Тат-зависимую транскрипцию ВИЧ-1 как *in vitro*, так и в культивируемых клетках. Тат содержит PP1-связывающий мотив и, таким образом, может функционировать как PP1 регуляторная субъединица. При транскрипции ВИЧ-1 PP1 может привлекаться к RNAPII белком Тат ВИЧ-1, который может выступать в роли специфической CDK9 направленной субъединицы.

Наше исследование направлено на определение регуляторных клеточных субъединиц, которые направляют PP1 к RNAPII и/или CDK9, с использованием протеомного подхода. Клеточный экстракт, приготовленный из 293T клеток, был фракционирован на линейном градиенте глицерина от 10% до 30% в буфере, содержащем 20 mM НЕРС-КОН, pH 7,9, 150 mM KCl, 200 мКМ EDTA. На градиент наносили по 1 мл лизата и центрифугировали на ультрацентрифуге “Beckman L8-60M” (ротор SW 41Ti) при 38000 об/мин 20 часов при +4°C. После центрифугирования фракции собирали по 500 мкл, всего отбирали 21 фракцию. Далее из полученных фракций переосаждали белки и проводили дальнейший анализ методом иммуноблотинга с антителами к PP1 и RNAPII. Для дальнейшего анализа отбирали только фракции, в которых выявляли PP1 и/или RNAPII. Далее для очистки PP1 и RNAPII, а также комплексов, ассоциированных с ними белков, использовали 2 типа аффинных колонок, содержащих сепарозу, конъюгированную с микроцистином, который позволяет высокоспецифично связываться с PP1, и моноклональными антителами к РНК-полимеразе II. После хроматографического разделения фракции разделяли методом двумерного электрофореза. Полученные зоны в дальнейшем будут использованы для проведения масс-спектрометрического анализа.

### **Разработка векторных систем для сайт-специфической интеграции и стабилизации трансгенов**

**Ткачук Артем Петрович** (Москва, [artem.p.tkachuk@gmail.com](mailto:artem.p.tkachuk@gmail.com))

Важной проблемой при создании трансгенных организмов является стабилизация трансгенов после их интеграции в геном (Ноу, 2000). Для получения трансгенных насекомых используют неавтономные транспозоны. При этом трансген остается окружён функциональными инвертированными повторами. При каком-либо внешнем источнике транспозазы, например, вследствие заражения вирусом, трансген способен к ремобилизации, что потенциально опасно. Для стабилизации трансгена после его интеграции необходимо удалить одно из плечей транспозона, с помощью которого произошла встройка. Существуют разные подходы к решению этой задачи, однако универсального, простого и эффективного способа до сих пор не найдено (Handler et al., 2004).

Известно, что репарация двуцепочечных разрывов ДНК иногда приводит к потере небольшого участка генома. Это чаще всего происходит вследствие того, что разрыв произошел между двумя сонаправленными гомологичными участками хромосомы. В таком случае активируется консервативный SSA путь репарации разрывов, который и приводит к потере дистального участка гомологии (Kappeler et al., 2008). Мы использовали этот принцип для создания вектора, позволяющего не только сайт-специфически ввести в геном реципиента интересующую нас последовательность (с помощью интегразы phiC31), но и стабилизировать её.

В составе разработанного вектора трансген окружен последовательностями, гомологичными соответствующим последовательностям геномного локуса, куда произошла интеграция. Участки гомологии flankируют уникальные сайты узнавания хоминг-эндонуклеаз рестрикции I-Sce I с 3' конца и I-Cre I с 5' конца. За ними расположены гены маркёровых белков (красный флуоресцентный белок – *RFP* с 5' конца и ген *white*, отвечающий за красную окраску глаз насекомого – на 3' конце) и плечи транспозона, с помощью которого происходит интеграция конструкции в геном реципиента. Внесение двуцепочечных разрывов (в результате введения хоминг-рестриктазы путем скрещивания

с насекомым – носителем гена *I-Sce I* и *I-Cre I*) инициирует репарацию по SSA пути, в результате которой происходит потеря плечей транспозона, генов маркёровых белков и одной из гомологичных последовательностей. В результате трансген остается интегрирован непосредственно в геномный контекст. Эффективность SSA репарации в нашей системе достигает 70% (у существующих методов – 2%). Наличие удаляемых маркеров позволяет легко детектировать продукты репарации. Векторная система была протестирована на *Drosophila melanogaster*.

### Изучение биологических свойств и терапевтического потенциала ФНО-связывающих белков поксивирусов

*Третябчак Татьяна Владимировна (Новосибирск, treg-@mail.ru)*

В геноме представителей рода *Ortopoxviridae* закодировано множество иммуномодуляторов, функция которых заключается в обеспечении эффективного уклонения от защитных реакций поражаемого организма. Одними из таких иммуномодуляторов являются Crtm-белки (cytokine response modifier). В геноме вириуса натуральной оспы (ВНО) представлен только один белок данного семейства – это белок CrtmB, эффективно связывающий фактор некроза опухолей (ФНО) и хемокины. Как эффективный антагонист ФНО, данный белок может быть рассмотрен в качестве основы для создания ФНО-блокаторов, направленных на лечении заболеваний, связанных с гиперпродукцией ФНО (болезнь Крона, ревматоидный артрит и др). Наиболее перспективными в вопросе выбора основы для создания терапевтического средства, по-видимому, являются иммуномодулирующие белки ВНО, эволюционно наиболее адаптированного к защитным системам человеческого организма.

Ранее для белка CrtmB ВНО на мышиной модели ЛПС-индуцированного эндотоксического шока был показан значительный терапевтический эффект, поэтому следующим этапом исследования CrtmB ВНО в качестве лекарственного средства было определение иммуногенности данного белка. Нами впервые была определена иммуногенность рекомбинантного белка CrtmB ВНО относительно белка оболочки поксивирусов A30L ВНО. Исследования сывороток, полученных после иммунизации мышей, методами ИФА и Вестерн-блот анализа показали, что белок CrtmB ВНО активирует гуморальный иммунный ответ, столь же эффективно, как и белок A30L, эмульгированный в адьюванте Фрейнда. Таким образом для белка CrtmB ВНО была показана высокая иммуногенность.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая белок CrtmB, также представлена в геноме вириуса оспы коров (ВОК). Ранее было показано, что CrtmB ВОК образует димерные формы, в отличие от образующего высокомолекулярные формы CrtmB ВНО. Причины показанных различий являются не выясненными. Для установления этих отличий нами впервые выполнена работа по созданию делеционных вариантов белков CrtmB ВНО и CrtmB ВОК, а также рекомбинантных белков, сконструированных из функциональных доменов белков CrtmB ВНО и CrtmB ВОК в бакуловирусной системе экспрессии. Ожидается, что некоторые из полученных белков утратят способность к олигомеризации и будут обладать пониженной иммуногенностью относительно CrtmB ВНО, но при этом сохранят способность эффективно связывать ФНО. У белка CrtmB выделяют SECRET-домен, связывающий хемокины, домен, связывающий ФНО, кроме того, внутри ФНО-связывающего домена выделяют PLAD-домен, предположительно участвующий в олигомеризации. Определение вклада доменов белка CrtmB в процесс олигомеризации, определение видоспецифичных отличий и установление биологических свойств и терапевтического эффекта химерных вариантов белков, созданных на основе доменов CrtmB ВНО и CrtmB ВОК, позволит определить наиболее оптимизированную структуру вирусных белков для создания на их основе более эффективных лекарственных препаратов.

*Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант 09-04-00055а).*

## Изучение возможности сборки антигенных комплексов на основе вирусов растений *in vitro*

Трифонова Е.А., Никитин Н.А. (Москва, katecat88@mail.ru)

В настоящее время активно разрабатываются подходы для получения вакцин, основанные на презентации антигенных детерминант на поверхности высокомолекулярных носителей. Эта стратегия обладает рядом преимуществ перед традиционно используемыми вакцинами: отсутствие реверсии к патогенной форме, высокая иммуногенность, простота хранения, дешевизна.

Целью работы является разработка подходов для сборки антигенных комплексов *in vitro* на основе вирусов растений. Преимущество использования фитовирусов заключается в отсутствии общих патогенов у растений и человека.

Низкомолекулярные белки не обладают достаточной иммуногенностью, тогда как высокая иммуногенность вирусов и вирусоподобных частиц (ВПЧ) широко известна. Белок оболочки (БО) X-вируса картофеля (ХВК) способен образовывать ВПЧ с РНК ХВК *in vitro*, поэтому, было решено использовать его как носитель антигенных детерминант другого вируса.

В качестве модельной системы были выбраны эпитопы вируса оспы сливы (ВОС). Получено два варианта рекомбинантных БО ХВК, несущих на N-конце эпитоп ВОС. В первом случае эпитоп был слит с БО ХВК, у которого были удалены первые 20 N-концевых аминокислотных остатков. В другом варианте эпитоп был расположен на N-конце полноразмерного БО ХВК. Рекомбинантные белки имели на N-конце шесть аминокислотных остатков гистидина и сайт расщепления протеазой «фактор Xa», который позволил удалить гистидиновые аминокислотные остатки. Белки были очищены методом аффинной хроматографии и обработаны протеазой Xa.

Показано, что полученные белки эффективно реагируют с антисывороткой против ВОС, то есть эпитоп ВОС доступен в составе рекомбинантного БО ХВК.

Методом электронной микроскопии была изучена возможность сборки *in vitro* рекомбинантных белков с шестью гистидинами и белков, обработанных фактором Xa с РНК ХВК.

На следующем этапе работы рекомбинантные белки были экспонированы на поверхности структурно модифицированных частиц вируса табачной мозаики (ВТМ), ранее полученных в нашей лаборатории. Посадка белка на вирусную частицу происходила за счет электростатического взаимодействия. С помощью специфических антител к ВОС и вторичных антител, конъюгированных с флюорофором, методом флуоресцентной микроскопии было показано, что рекомбинантные БО ХВК, содержащие эпитоп ВОС, полностью покрывают структурно модифицированную частицу ВТМ. При этом эффективное взаимодействие антисыворотки против ВОС с полученными комплексами свидетельствует о сохранение антигенных свойств эпитопов ВОС при их презентации на структурно модифицированных частицах.

Исследована возможность получения специфических антител к ВОС с использованием ВПЧ ХВК и нанокомплексов структурно модифицированных частиц ВТМ с полученными рекомбинантными белками.

Подобные антигенные комплексы можно использовать в качестве вакцин, а также для получения дешевых антител для диагностики заболеваний человека, животных и растений.

## Двухкомпонентная система сигнальной трансдукции ResDE участвует в регуляции экспрессии гена гемолизина II цереусной группы микроорганизмов

Шапырина Екатерина Валерьевна (Луцино, epoxidka@rambler.ru)

*Bacillus cereus* – грам-положительные спорообразующие бактерии, условно-патогенные для человека. Некоторые штаммы *B. cereus* могут вызывать пищевые отравления, посттравматические инфекции, а также другие заболевания. Патогенные свойства *B. cereus* определяются синтезом многочисленных белковых токсинов, которые различаются по механизму действия: Одним из таких потенциальных факторов патогенности представителей группы *Bacillus cereus* является гемолизин II (*hlyII*), токсин, относящийся

к классу порформирующих токсинов. Описано, что его экспрессия контролируется собственным транскрипционным регулятором *HlyIIR*, а также *Fur* – регулятором метаболизма железа и патогенности. Недавно в промоторной области гена гемолизина II была выявлена последовательность, узнаваемая *ResD* – транскрипционным регулятором редокс-чувствительной системы сигнальной трансдукции *ResDE*. Эта двухкомпонентная система участвует в регуляции генов при анаэробном росте и регуляции генов метаболизма углеводов, а также в биосинтезе энтеротоксинов *Bacillus cereus* – *hblC*, *nhe*, а так же участвует в регуляции транскрипции гена капсулы – *capA* *Bacillus anthracis*.

На основе исследований штаммов цереусной группы, представленной в коллекции ВКМ, а также анализа геномов, представленных в базе GenBank, нами было выявлено два типа промоторно-операторных областей *hlyII*. Это- PRD-, которые характерны для *B. anthracis* и *B. cereus* с патогенными свойствами, и PRD+, характерные для микроорганизмов, выделенных из почвы и насекомых. Проведены эксперименты *in vivo* на модели *Bacillus subtilis* по изучению экспрессии транскрипционных фьюджнов двух групп промоторно-операторных областей *hlyII* и бета-галактозидазы. В ходе этих исследований было показано, что *ResD* является негативным транскрипционным регулятором для гена *hlyII* PRD+ в аэробных условиях.

Были проклонированы генетические детеминанты гена *resD* и *resE* двухкомпонентной системы *B. cereus* ATCC 14579. С помощью металл-хелатной хроматографии получены препараты рекомбинантных белков *ResD* и *ResE*. Проведены эксперименты по взаимодействию продукта регуляторного гена *resD* в фосфорилированной и нефосфорилированной форме с двумя типами промоторно-операторных областей гена *hlyII*.

Создана транскрипционная система *in vitro*, включающая промоторы гена гемолизина II и отдельные субединицы РНК-полимеразы *B. cereus* для выяснения детальных механизмов регуляции транскрипции.

*Выражаю глубокую признательность моему научному руководителю Александру Сергеевичу Солонину, а также Шадрину Андрею.*

## ПОДСЕКЦИЯ «НЕЙРОФИЗИОЛОГИЯ И ФИЗИОЛОГИЯ ВНД»

### Нейрофизиологические механизмы взаимодействия сенсорных и моторных компонентов ССП в зависимости от сложности сенсомоторной реакции

*Айдаркина Екатерина Сергеевна (Ростов-на-Дону, aydkate@mail.ru)*

Взаимодействие моторный и сенсорных компонентов ССП представляет особый интерес в рамках изучения взаимосвязи между перцептивными и двигательными процессами, а также роли внимания при формировании сенсомоторной интеграции (Айдаркин, 2007; Славуцкая, Моисеева, Шульговский, 2008; Andersen, Cui, 2009). В современных исследованиях премоторные компоненты с фокусом максимальной выраженности в лобных отведениях связывают с процессами подготовки двигательной реакции с участием внимания и памяти (Brunia et al., 2001). Активация внимания обеспечивается взаимодействием неспецифических таламо-фронтальной и таламо- pariетальных систем, оказывающих модулирующие влияния на анализ сенсорной информации на уровне таламуса (Posner, 1990).

Целью работы было изучение взаимоотношений сенсорных и моторных компонентов ССП при произвольных нажатиях и сенсомоторных реакциях различной сложности. В исследовании приняли участие 14 студентов ЮФУ в возрасте от 20 до 30 лет. В качестве зрительных стимулов применялись вспышки, для слуховой стимуляции использовались щелчки. Испытуемые выполняли 1) произвольные нажатия правой рукой с интервалом 2 с; 2) простая аудиомоторная реакция (ПАМР); 3) простая зрительно-моторная реакция (ПЗМР); 4) go-noGo тест на звуковые стимулы различной длительности; 5) сложная сенсомоторная реакция (ССМР). Вычислялись суммарные моторные ССП и на их основе изопотенциальные карты.

Анализ конфигурации моторных ССП показал, что двигательная реакция в виде негативно-позитивно-негативного комплекса с фокусом в лобно-центральных отведениях развивалась на фоне негативных (ПАМР, Go-noGo), либо позитивных (ПЗМР, ССМР) колебаний, связанных с анализом стимула. Усложнение задачи сопровождалось ростом амплитуды премоторной негативной волны, обеспечивающей подготовку двигательной реакции и анализ стимула. Анализ динамики изопотенциальных карт моторных ССП при произвольных нажатиях правой рукой показал, что подготовка движения сопровождалась формированием потенциала готовности (ПГ) с фокусом максимальной выраженности в левой центральной области, что связано с его контролатеральным доминированием (Shibasaki et al., 2006), а также с преимуществом левого полушария в контроле над двигательной сферой, процессами прогнозирования и моторного внимания (Брагина, Доброхотова, 1988; Omori, 1991; Rushworth et al., 2003). Далее следовал негативный моторный потенциал (МП). Следовавший за ним позитивный фокус (125-200 мс) соответствовал постмоторной позитивности (ПМП), которая была связана с процессами релаксации коры (Cui et al., 1999). Одновременная активация теменно-затылочной области отражала механизм коррекции текущей двигательной программы после выполнения движения. Вероятно усложнение сенсомоторной реакции, связанное с ростом премоторной негативности, обеспечивается дополнительной активацией таламо-фронтальной системы внимания, совместно с активацией стриарно-таламо-корковой петли, регулирующей активность лобных двигательных областей (Alexander et al., 1990).

### Пролиферация клеток, нейроанальная дифференцировка и гибель нейронов в мозге крыс при судорожной активности

*Аниол Виктор Александрович (Москва, aniviktor@narod.ru)*

Нарушения постнатального нейрогенеза наблюдаются при многих патологических состояниях мозга человека и животных. Одним из наиболее распространенных заболеваний, сопровождающихся дегенерацией и гибелью нейронов, а также нарушениями постнатального нейрогенеза, является эпилепсия. Удобным экспериментальным подходом к исследованию механизмов изменений, связанных с эпилепсией, является пентилентетразоловый киндлинг (ПТЗК). Мы использовали ПТЗК для изучения

соотношения процессов нейродегенерации, пролиферации и дифференцировки клеток в мозге при развитии судорожной активности.

Хроническое введение крысам пентилентетразола (ПТЗ) в субконвульсивной дозе (37,5 мг/кг) приводило к постепенному усилению судорожной активности животных в ответ на каждое последующее введение ПТЗ. Начальные этапы ПТЗК не сопровождались выраженным морфологическим изменениями в гиппокампе, однако по мере увеличения числа инъекций ПТЗ и усиления судорожной активности нарастили проявления нейродегенерации, проявлявшиеся в увеличении числа дистрофичных нейронов и снижении общей нейрональной плотности в гиппокампе.

Для оценки интенсивности пролиферации мы использовали анализ включения бромдезоксиуридина (BrdU) в клетки мозга крыс. После 1 инъекции ПТЗ происходило существенное снижение числа BrdU-позитивных клеток в герминативных областях мозга крыс – в субвентрикулярной зоне (СВЗ) и в зубчатой фасции (ЗФ) и поле СА4 гиппокампа. Дальнейшее развитие ПТЗК и усиление судорожной активности приводило к восстановлению числа BrdU-позитивных клеток в этих герминативных зонах. Введение ПТЗ в дозе 80 мг/кг сопровождалось развитием выраженных судорог и приводило к увеличению числа BrdU-позитивных клеток в СВЗ и ЗФ, что позволяет говорить о связи силы судорожной активности и интенсивности пролиферации клеток в мозге крыс.

Развитие ПТЗК приводило к усилению экспрессии даблкортина в гиппокампе, что может свидетельствовать об усилении гиппокампального нейрогенеза на поздних этапах ПТЗК. Одним из механизмов, который может регулировать процессы пролиферации и дифференцировки клеток в мозге крыс, является оксид азота (NO). В связи с этим мы изучали экспрессию нейрональной изоформы синтазы оксида азота (nNOS) в мозге крыс при развитии ПТЗК. Число nNOS-позитивных нейронов снижалось в новой коре и в гиппокампе животных на поздних этапах ПТЗК. Кроме того, уменьшалось содержание МРНК nNOS. Обнаруженные изменения экспрессии nNOS могут отражать вклад нитрергической системы в регуляцию процессов пролиферации и дифференцировки клеток в мозге при развитии судорожной активности. *Исследование поддержано грантами РФФИ, РГНФ и программы ПРАН Фундаментальная медицина.*

### **Видеокулография и электроэнцефалография в исследованиях языковых функций** *Анисимов Виктор Николаевич (Москва, v\_anisimov@rambler.ru)*

В работе описан метод регистрации движений глаз и ЭЭГ у человека во время чтения. Уникальность метода состоит в том, что регистрация электроэнцефалограммы одновременно с видеозаписью движений глаз открывает возможность анализа зрительно-моторной деятельности и сопровождающих ее физиологических параметров, отражающих функциональное состояние головного мозга, в любой момент времени. Фиксация видеоизображения глаза с высоким временным разрешением даёт возможность анализа глазодвигательных паттернов во время чтения с высокой точностью, а также их сопоставления с ЭЭГ. Показана возможность анализа изменения в ЭЭГ человека при прочтении им предложений, содержащих синтаксическую неоднозначность. Также рассматриваются варианты оценки динамики движений глаз при чтении таких предложений. Приводятся данные, количественно описывающие глазодвигательные паттерны человека во время чтения.

В проведенных экспериментах испытуемым предлагались для чтения предложения, содержащие синтаксическую неоднозначность вида «неопределенность с определительным придаточным женского рода». Всего в одном эксперименте испытуемым получали 160 предложений, половину из которых представляли собой контрольные. Использование видеокулографии позволяет строить траектории движения взора, наложенные на читаемые предложения, а также количественно оценивать параметры саккад и фиксаций взора испытуемых во время чтения. Для оценки результатов применялись несколько взаимодополняющих методов: метод вызванной синхронизации/десинхронизации ЭЭГ, оценка регрессивных саккад при чтении предложения, оценка средней скорости чтения частей предложения, содержащих неоднозначность. Средняя скорость является параметром,

интегрирующим в себе как количество регрессивных саккад, так и длительности и количество фиксаций при чтении. В экспериментах были получены отличия при анализе чтения тестовых и контрольных предложений у разных испытуемых.

В комплексе с анализом движений глаз при чтении применялся метод вызванной десинхронизации. Анализируя видеозапись движения глаза одновременно с ЭЭГ, существует возможность получать необходимую информацию о функциональном состоянии испытуемого. Можно определить, какие изменения в ЭЭГ наблюдаются в различные моменты времени, при фиксациях на определенных местах предложения, а также установить, в каких областях коры данные изменения выражены наиболее отчетливо. Проводили анализ депрессии ЭЭГ в альфа-диапазоне (8-13 Гц) после того, как испытуемый в процессе чтения совершил фиксацию на определенном месте предложения. Усреднения проводили по всем предъявлениям отдельно для предложений, содержащих синтаксическую неоднозначность, и предложений без неоднозначности.

Показана возможность применения различных методов анализа физиологического состояния испытуемых во время чтения с целью обоснования критерии оценки результатов этих методов для исследования семантических процессов на примере разрешения синтаксической неоднозначности. Благодарю своего научного руководителя Латанова А.В. за поддержку, ценные советы и помочь в проведенной работе.

### **Серые вороны добывают приманку из трубы с ловушкой**

*Багоцкая Мария Сергеевна (Москва, kskpoisk@yandex.ru)*

Задачи на добывание приманки из трубы с ловушкой широко применяют при исследовании рассудочной деятельности у приматов. Во всех исследованиях человекообразным обезьянам требовалось некоторое количество проб и ошибок, чтобы научиться добывать приманку, избегая ее попадания в ловушку.

Мы использовали модифицированный вариант этой задачи, адаптированный для животных с недостаточно развитой манипуляционной активностью. Внутрь трубы заранее помещали поршень, вытягивая который птицы могли подтянуть приманку. На стадии предварительного обучения использовали трубку без ловушек. Ворону обучали подтягивать приманку с помощью поршня. Из восьми птиц шесть быстро научились добывать приманку в данной ситуации. В следующей задаче использовали трубку, в дне которой с одной стороны была действующая ловушка (если приманка падала в ловушку, она становилась недоступной для животного). Применили критерий решения: 24 правильных выбора в 30 последовательных предъявлениях. Если на протяжении 200 предъявлениях птица не достигала критерия, обучение прекращали. Четыре птицы достигли критерия обученности, им потребовалось для этого 50-130 предъявленияй. Далее этим четырем птицам предъявили трубку с двумя ловушками. Одна ловушка была действующая, в другой отсутствовало дно. И если приманка попадала в эту ловушку, то проваливалась вниз и птица могла ее съесть. Приманку помещали между двумя ловушками. Эту задачу предъявили до достижения критерия, но не более 50 раз. Ее решили две из четырех птиц. Далее этим двум птицам предъявили предыдущую задачу – с одной ловушкой. Задачу предъявили так же до достижения критерия, но не более 50 раз. При повторном предъявлении этой задачи одна из птиц перешла к решению на случайном уровне. Вторая птица продолжала в достоверном большинстве случаев вытягивать приманку минуя ловушку. Ей была предложена третья задача. В этой задаче установка была видоизменена таким образом, что приманку можно было добить через единственную ловушку без дна. Боковые отверстия трубы были закрыты, и если приманку двигали в противоположную от ловушки сторону, то стержень поршня попадал внутрь трубы, и крышка трубы препятствовала его вытягиванию в обратную сторону, т.е. птица лишалась возможности добить приманку. За 50 предъявленияй птица так и не достигла критерия, т.е. решала эту задачу случайным образом.

Ни одна из птиц не справилась со всеми предложенными задачами, что очевидно свидетельствует об их высокой сложности для врановых. Птица могла обучиться правильному решению за счет двух механизмов: уловить в процессе обучения логическую структуру задачи, либо выучить ряд частных правил. Тесты на перенос позволили

определить, какой именно механизм лежал в основе решения задачи. Вероятно птица не решила третью задачу, поскольку выполняла первые две за счет правила «вытягивай в сторону противоположную ловушке с дном». *Работа поддержанна грантом РФФИ 07-04-01287.*

**Исследование нейрофизиологических механизмов процесса решения примеров на умножение и сложение двузначных чисел**

**Богун Анна Сергеевна (Ростов-на-Дону, a\_bogun@mail.ru)**

В предыдущем исследовании нами были выявлены нейрофизиологические корреляты процессов распознавания и дифференцировки однозначных чисел. Показано, что данные операции являются сложной процедурой, зависящей от левополушарных механизмов, связанных с детекцией вербальных стимулов. В литературе редко приводится анализ этапов вычислений, т.к. в большинстве работ условие задачи предъявляется целиком. Для оценки когнитивных процессов, сопровождающих различение операндов, их сохранение в оперативной памяти и реализацию вычислений, целесообразно последовательное предъявление частей задачи и анализ ее этапов. Целью работы было исследование нейрофизиологических коррелятов решения примеров на умножение и сложение по параметрам связанных с событием потенциалов (ССП). Обследовано 8 человек (25-30 лет, праворукие), информированных о процедуре исследования и дававших согласие на участие. Методика заключалась в решении примеров на сложение и умножение двузначных чисел. Каждый блок состоял из 100 примеров. Длительность предъявления операндов составляла 700 мс. Стимулы предъявлялись последовательно (первый операнд-знак-второй операнд) в программной среде «Аудиовизуальный слайдер». ССП регистрировались с помощью электроэнцефалографо-анализатора «Энцефалан-131-03» монополярно по системе 10-20. Рассчитывалось время решения (ВРеш) (достоверность различий оценивалась с помощью *t*-критерия Стьюдента) и усредненные ССП относительно стимула. Значения ВРеш составляли 5,85 с для сложения и 25,72 с для умножения. Качество деятельности для сложения составляло 93%, для умножения 72%. Распознавание и запоминание первого операнда приводило к образованию в теменных областях слабой Е-волны и С1. N100, существовавший при сложении в виде 2 фокусов в теменных областях, при выполнении умножения распространялся в центральные и лобные области и имел левостороннюю асимметрию. При сложении Р200, локализованный в лобных областях, возникал раньше, и на 300 мс переходил в Р300, состоящий из 2 фокусов. При умножении Р200 выражен слабее, а высокомощный Р300 захватывал все области коры. При сложении в лобных областях формировался мощный N400, имеющий при умножении большую латентность. Особенности ССП при работе с первым операндом связаны с кратковременной памятью; N400, согласно литературным данным, отражает лексико-семантическую обработку чисел. ССП при распознавании знака был схожен со зрительным ответом (т.к. внимание не акцентировалось на анализе знака), отличаясь при умножении наличием четкого С1 в правой теменно-затылочной области, малой амплитудой N100 в левой гемисфере и Р300 в правой и поздними негативными волнами в теменных зонах. Распознавание и запоминание второго операнда отличалось увеличением Е-волны и С1, снижением амплитуды N100, имеющего правостороннюю асимметрию, слабым Р300, и замещением N400 поздними негативными волнами.

**Корреляционная размерность ЭЭГ при измененных состояниях сознания**

**Бородина Ольга Сергеевна (Ярославль, akizo@mail.ru)**

В эксперименте участвовало 7 человек практикующих состояние медитации. Была сделана фоновая запись ЭЭГ длительностью 300 сек. В процедуре медитации (измененное состояние сознания) выделили три последовательные стадии: входжение в медитацию – 5 мин.; глубокая медитация 10–50 мин.; выход из состояния медитации – 5 мин. Регистрацию ЭЭГ проводили на 10 минуте в течение 300сек после входжения испытуемого в измененное состояние сознания.

ЭЭГ регистрировали от 6 отведений, расположенных в симметричных точках правого и левого полушарий по системе 10/20, от фронтальных (F3-F4), центральных (C3-C4),

затылочных (O1-O2). В качестве референтного использовали объединенный ушной электрод. Для регистрации биопотенциалов использовали компьютерный электроэнцефалограф «КЭЭГ-21» фирмы «Астел ltd.» (Россия). Частота дискретизации – 250 Гц. Спектральный и топографический анализ биопотенциалов ЭЭГ осуществлялся с помощью компьютерной программы «BrainGraf» данной фирмы. В результате компьютерной обработки реализаций ЭЭГ рассчитали величины корреляционной размерности по 6 отведениям ЭЭГ для каждого испытуемого индивидуально. Расчет величин корреляционной размерности вели по алгоритму Грасбергера-Прокачина. Статистический анализ и обработку результатов проводили при помощи пакета Excel.

Показатели СД были различны, в связи с тем, что для расчёта величины СД брали паттерны разной длительности. Как показали предыдущие исследования, для состояния покоя, когда в основном доминирует альфа-ритм, адекватным будет выбор длительности паттерна 96 и 112 мсек. В дальнейшем, в анализе использовали среднюю величину корреляционной размерности СД (сг), которая, на наш взгляд, может отражать суммарную характеристику ЭЭГ. У фоновой ЭЭГ средний уровень СД (сг) составил от 3,91 до 4,12. Максимум активности наблюдался в правом полушарии в лобной области – 4,11, а минимум активности в левом полушарии затылочной области – 3,72. При измененном состоянии сознания СД (сг) была выше, чем у фоновой ЭЭГ. Средний уровень активации СД (сг) составил от 3,95 до 4,11. Максимум активности наблюдался в левом полушарии в лобной области – 4,35, а минимум активности в правом полушарии затылочной области – 3,79.

В измененном состоянии сознания электроэнцефалограмма фиксирует изменения работы мозга в виде высокой амплитудной гиперритмичности, то есть такого типа работы мозга, в котором задействованы все его режимы одновременно: режим бодрствования, медленно волнового и парадоксального сна. Этот объективный научный метод отчасти объясняет происходящее с человеком и его психикой при гипнозе и медитации: отключение в той или иной степени сознания, спноподобный эффект, наличие обманов восприятия и связанные с этим переживания и ощущения.

### **Структурно-функциональные изменения в поверхностных слоях коры больших полушарий головного мозга при их экспериментальной локальной ишемии у крыс**

*Волкова Дарья Анатольевна (Москва, dawkavolk@gmail.com)*

**Введение.** Известно, что поверхностные и нижние слои коры больших полушарий в функциональном отношении имеют свою определенную специфику, однако их конкретная роль и взаимодействие в процессе обработки информации и участие в генерации, в частности, определенных ритмов ЭЭГ до сих пор остается малоизученной. Целью настоящего исследования было определить вклад верхних слоев коры больших полушарий в модуляцию ритмов ЭКоГ.

**Методы.** Эксперименты проводились на крысах-самцах линии Вистар (n=12, средний вес – 370 г). Ишемию поверхностных слоев моделировали путем фотохимического тромбирования сосудов: животным внутривенно вводили фотосенситивный краситель бенгаловский розовый, после чего производили засветку лазером (длина волны – 535 нм, мощность светового потока – 0,6 мВт/мм<sup>2</sup> диаметр области – 2мм), область воздействия – сенсомоторная кора. ЭКоГ регистрировали над областью поражения и в симметричной точке контралатерального полушария. В конце эксперимента производили перфузию раствором формальдегида на фосфатном буфере, исследуемые участки мозга осмировали, обезвоживали, заключали в эпоксидную смолу, резали и окрашивали по методу модифицированного Нисселя. Было проведено две серии экспериментов.

1 серия: Под уретановым наркозом (1,2 г/кг) записывали ЭКоГ до ишемического воздействия и через 4 часа после воздействия.

2 серия: У бодрствующих животных через 24 часа после ишемического воздействия анализировали динамику ЭКоГ при введении общего анестетика.

**Результаты.** При локальной ишемии поверхностных слоев в этих слоях коры больших полушарий происходил отек различных элементов нейропиля и появление темных нейронов. В нижних слоях нейроны и нейропиль остаются интактными. Вышеописанные воздействия

вызывали снижение в диапазоне мощности всех частот ЭКоГ, кроме нижнего дельта, мощность которого наоборот увеличивалась. Ранее нами было показано, что инактивация всех слоев коры приводит к уменьшению мощности по всем частотам спектра ЭКоГ. Появление низкочастотной активности в ЭКоГ, вызванное введением общего анестетика, происходило раньше, чем в интактных областях коры.

**Выводы.** Таким образом, можно предположить, что усиление частот в области нижнего дельта диапазона может быть связано с выключением поверхностных слоёв коры при их ишемизации, что ведет к усилению генерации этого ритма нижними слоями коры и наблюдается при естественном глубоком сне.

**Устойчивость компонента N1 потенциалов коры мозга в интерфейсе мозг-компьютер «на волне P300» к вариациям пространственных характеристик стимулов**  
**Ганин Илья Петрович (Москва, iluxa\_biology@mail.ru)**

Интерфейс мозг-компьютер (ИМК) позволяет человеку управлять различными устройствами, используя электрические сигналы коры мозга. В основу работы одной из разновидностей такого интерфейса положен анализ ответов мозга на представление человеку зрительных стимулов. Известно, что когда испытуемый должен реагировать на редкие целевые стимулы среди частых нецелевых («одбоя-парадигма»), в составе потенциалов мозга, связанных с событиями (ПСС), наблюдается волна P300. На ее использование и ориентирована работа данного типа ИМК (далее ИМК-Р300). Пользователь находит в таблице букву, которую он хочет ввести, и считает ее подсветки. Эта буква определяется по более высокой амплитуде волны P300 в ответ на ее подсветки в сравнении с подсветками других букв.

В нашей группе мы ранее показали, что использование наряду с Р300 другого компонента ПСС – латерально-затылочного N1 – значительно улучшает распознавание вводимых букв. Однако в классической зрительной одбоя-парадигме чувствительность компонента N1 в той же области к целевым стимулам была значительно ниже. Одним из главных факторов, отличающих ИМК-Р300 от одбоя, является то, что в первом случае значимость стимула (целевой или нецелевой) определяется его положением в таблице, тогда как во втором все стимулы появляются в одной позиции. Представлялось вероятным, что факторы, определяющие различия N1 в ИМК-Р300 и одбоя-парадигме, связаны с механизмами избирательного пространственного внимания. Однако в литературе нет данных по влиянию пространственных факторов на N1 в ИМК-Р300.

Мы провели исследование с варьированием расстояния между символами. 15 испытуемым предлагалось считать подсветки центрального символа в матрице 3×3. Помимо стандартного размера матрицы (расстояние между символами 2,2°), использовались варианты с очень разреженным (7,3-12°) и очень плотным (0,13°; вся матрица располагается в фoveальной области зрения) расположением символов, а также т.н. одностимульная парадигма (единственный стимул предъявлялся в центре экрана, все стимулы были целевыми) и одбоя-парадигма. Амплитуда N1 во всех этих условиях, кроме одбоя-парадигмы, была одинакова. В частности, в одностимульной парадигме и в разреженной матрице ПСС практически полностью совпадали по форме, но резко отличались от ПСС в одбоя-парадигме.

Мы также сравнили ПСС при использовании в матрице 6×6 стандартных, значительно увеличенных и уменьшенных размеров букв. В этих режимах компонент N1 практически полностью совпал.

Наши данные позволяют предположить, что различие ПСС в парадигме ИМК-Р300 и в классической одбоя-парадигме объясняется не только включением в ИМК избирательного пространственного внимания, сколько работой механизма детекции событий в заданной позиции в пространстве. Устойчивость компонента N1 при больших вариациях расстояния между символами и их размеров показывает его несомненную ценность для данного типа ИМК и открывает перспективы создания новых его разновидностей.

**Анализ влияния фактора пола на количественные характеристики ядер  
миндалевидного комплекса мозга крыс линии WAG/Rij  
Гарипова Ирина Ринатовна (Уфа, OWL55580@mail.ru)**

Миндалевидный комплекс (МК) является одним из высших нейроэндокринных центров мозга. Интегрируя полимодальную сенсорную информацию, он способен модулировать деятельность центров регуляции секреции гонадотропинов, что проявляется его участием в организации адаптивного поведения животных. Большую роль в деятельности МК играют половые стероиды, рецепторы которых расположены преимущественно в нейронах зон полового диморфизма.

Целью данной работы являлось изучение влияния фактора пола на количественные характеристики ядер переднего отдела МК. Исследование проведено на крысах линии WAG/Rij. Для определения различий между двумя различными по половой принадлежности группами крыс были измерены общая площадь МК и его ядер на каудальном уровне переднего отдела (переднего кортикального ядра (СОа) и медиального ядра (МЕ)). Измерение площади проводили в программном пакете Universal Desktop Ruler (AVP Soft, USA) в  $\text{мм}^2$ . Для работы использовали парафиновые срезы головного мозга крыс ( $n = 12$ ) в возрасте шести месяцев, окрашенные по методу Нисселя.

Результаты планиметрии достоверно показали: площадь СОа мозга самцов крыс больше по сравнению с самками. Полученные данные позволяют рассматривать переднее кортикальное ядро в качестве зоны полового диморфизма исследованной области мозга.

**Способность к решению теста на экстраполяцию и уровень тревожности мышей  
на начальных этапах селекции мышей на высокие показатели данного теста  
Голиброда Василиса Антоновна (Москва, Vasilisa2006@gmail.com)**

В лаборатории физиологии и генетики поведения начата селекция на высокие показатели решения теста на экстраполяцию на основе генетически гетерогенной популяции мышей, полученной путем скрещивания четырех ранее селектированных на большой и малый вес мозга аутбредных линий. Следует отметить, что лабораторные мыши в целом не способны к решению теста на способность к экстраполяции направления движения (тест на элементарную рассудочную деятельность, по Л.В. Крушинскому) – доля их правильных решений не отличается от случайной. Критерием отбора производителей линии на высокие показатели решения данного теста (линия ЭКС) была высокая общая доля правильных решений задачи (не ниже 85%), правильное решение при первом ее предъявлении, а также низкий уровень тревожности животного. В качестве контроля используют генетически гетерогенная популяция, на основе которой была начата селекция (Ко-ЭКС). В настоящей работе были протестированы способность к экстраполяции и уровень тревожности мышей 4-го поколения селекции. После оценки показателей поведения животных в teste на экстраполяцию и в приподнятом крестообразном лабиринте половине животных обеих групп вводили анксиолитический препарат афобазол (внутрибрюшинно, 5 дней), после чего их поведение тестировали повторно. Второй половине животных вводили физиологический раствор. Было проведено две серии экспериментов (лето и осень 2009 г). Ранее, в предыдущих поколениях селекции доля правильных решений теста на экстраполяцию у мышей ЭКС была достоверно выше 50% случайного уровня. В первом эксперименте доля правильных решений теста линии ЭКС была 61,53% при первом предъявлении и 60,63% – по данным многократных предъявлений. У мышей контрольной популяции эти величины были равны соответственно 81,81% и 64,39%. Во втором эксперименте доля правильных решений теста линии ЭКС была 83,33% при первом предъявлении и 64,55% – по данным многократных предъявлений. У мышей контрольной популяции эти величины были равны соответственно 50% и 75,85%. После введения афобазола мышам ЭКС и Ко-ЭКС доля правильных решений у них повысилась и была достоверно отличной от 50% случайного уровня. Сравнение показателей решения этого теста внутри группы показало недостоверность различий, видимо, в связи с малыми размерами выборок.

По данным обоих экспериментов у мышей ЭКС (до фармакологических экспериментов) выявились достоверно более низкие показатели тревожности по сравнению с группой

Ко-ЭКС ( $p \leq 0,05$ ). После введения афобазола и физиологического раствора это соотношение нарушилось, и были обнаружены случаи усиления тревожности после введения анксиолитика.

Таким образом, по данным тестирования поведения у мышей F4 селекции на данный когнитивный признак отмечено некоторое увеличение успешности решения теста на экстраполяцию после инъекций анксиолитического препарата афобазола с парадоксальным усилением проявлений тревожности мышей в тесте ПКЛ.

Данные частично поддержаны грантом РФФИ (№ 04-07-00287). Выражаю благодарность своим научным руководителям Полетаевой Инге Игоревне и Перепелкиной Ольге Викторовне за переданные ими знания, обучение различным методикам и терпение.

### **Вызванная десинхронизация альфа-подобной активности**

**в задачах на взаимодействие со сложной зрительной средой**

**Ермаченко Н.С., Ермаченко А.А. (Москва, natalia@neurobiology.ru)**

В поле зрения человека практически всегда одновременно присутствует множество объектов различного характера. При этом субъективная значимость каждого объекта в отдельности зависит от множества условий, таких как локализация в поле зрения, свойства (например, форма, ориентация), инструкция и т.п. Взаимодействие с такой сложной средой, как правило, в той или иной мере включает процессы, связанные с движениями глаз. В настоящей работе мы проанализировали вызванные изменения амплитуды альфа-подобной активности (в диапазоне 8–12 Гц) в трех сериях экспериментов, в которых одни и те же зрительные объекты были использованы в экспериментальных парадигмах, предполагающих различное вовлечение движений глаз и различные условия предъявления стимулов. Движения глаз регистрировали методом видеоокулографии.

Мы провели три эксперимента с использованием различных парадигм: зрительный поиск (ЗП) с одновременным предъявлением 45–57 нерелевантных (НРС) стимулов, среди которых был один релевантный (РС), расположенный в случайно определенной области экрана; odd-ball (ОБ) с предъявлением НРС и РС по одному в центре экрана (вероятность предъявления РС – 0,1) и odd-ball с дистракторами (ОБД) – аналогично ОБ, но в качестве фона для центрального стимула использовали множество НРС как в эксперименте 1. Во всех трех экспериментах мы использовали одну и ту же пару стимулов (РС и НРС). В парадигмах ОБ и ОБД испытуемых инструктировали считать количество предъявленных РС, а в парадигме ЗП – находить РС, после чего совершать на нем продолжительную (около 2 с) фиксацию взора. В качестве контроля в парадигме ЗП использовали изображения, содержащие 4 РС одинакового размера и ориентации, на которых, согласно инструкции, нужно было последовательно совершать фиксации.

Фиксация взора на РС в ЗП вызывала снижение мощности альфа-подобной активности примерно на 50% (в контроле – вдвое слабее) по сравнению с уровнем в течение секунды, предшествующей фиксации. Предъявление РС в ОБ приводило к менее выраженному эффекту – амплитуда потенциалов снижалась не более чем на 20%. Различие между реакциями на РС и НРС отмечалось лишь в центральных и теменных отведениях. Добавление дистракторов привело к тому, что в опыте десинхронизация возникала не всегда и не превышала по величине таковую в случае предъявления стимулов по одному, но в контроле (фиксация на НРС), напротив, наблюдалась синхронизация альфа-подобной активности (до двухкратного увеличения амплитуды).

Мы предполагаем, что поскольку различия между опытом и контролем видны только в случаях, когда испытуемый видит большое количество стимулов одновременно, сложность зрительной среды существенно оказывается на особенностях функционирования зрительного селективного внимания. Наблюдаемые различия между изменениями выраженности альфа-подобных колебаний, вызванных фиксацией на РС в парадигмах ЗП и ОБД мы связываем с различным характером движений глаз.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 09-04-00350).*

**Новый метод исследования внутрисемейного взаимодействия  
экспериментальных животных**  
**Захаров Антон Михайлович (Москва, zam1561@yandex.ru)**

Одной из наиболее сложных областей, которая изучается физиологией поведения, является сфера внутривидового взаимодействия. Она включает взаимоотношения детеныш-родитель, сибс-сибс, сибс-чужак и т.д. В психологии существует целый ряд теорий, описывающих соответствующие аспекты жизни человека (например, теория привязанности Мэри Эйнсворт). Актуальная задача физиологии является создание экспериментальных моделей для изучения данных форм поведения на лабораторных животных. Такие модели позволяют оценивать различные составляющие внутривидового взаимодействия, его нарушения, способы фармакологической коррекции и др.

Нами была разработана оригинальная методика, позволяющая осуществлять количественные измерения параметров, которые являются характеристикой внутрисемейных отношений у детенышей белых крыс. Экспериментальная установка собрана на основе Т-образного лабиринта, удаленные от центра части правого и левого отсеков которого отделены решетчатыми перегородками. В зависимости от исследуемой формы поведения за перегородки правого и левого отсеков помещаются: (1) мать и не кормящая самка; (2) мать и другая кормящая самка; (3) сибс и «чужак» (самец другого выводка того же возраста). При тестировании животное переносится в стартовый отсек лабиринта, а затем осуществляется наблюдение за его реакциями в течение 3-х мин. Всего производится 3 посадки с интервалом 20–30 сек.

Взаимодействие с сибсом и чужаком изучали у детенышей крыс в возрасте 35 дней. Показано, что рядом с сибсом животные проводили в среднем одинаковое время в течение всех 3-х посадок. В отличие от этого времени, проведенного рядом с чужаком, достоверно уменьшалось в каждой следующей посадке ( $p<0,01$ , по критерию Фридмана). Эффект был достоверно выражен в подгруппе самцов ( $p=0,02$ ), но не самок ( $p=0,14$ ). Можно заключить, что угасание внутривидового взаимодействия распространяется только на контакт с чужаком; значимость контактов с сибсом остается постоянной. При этом взаимодействие самцов с чужаком в ходе 1-й посадки было более выраженным по параметрам обноихания и числа стоеек в соответствующем отсеке.

Взаимодействие с матерью и чужой самкой изучали у детенышей крыс в возрасте 21 дня. Показано, что рядом с матерью животные проводили достоверно больше времени ( $p<0,05$ ). При этом количество стоеек и обноиханий также оказалось значимо большим. Достоверность этих различий сохранялась в подгруппе самок, но не самцов. Вместе с тем, при изучение детенышей того же возраста никаких заметных отличий во взаимодействии с матерью и другой кормящей самкой не выявлено.

В целом можно заключить, что разработанный методический подход достаточно информативен и позволяет эффективно исследовать внутрисемейное (детеныш-родитель, сибс-сибс и др.) поведение крыс. В настоящее время на его основе проводится изучение действия фармакологических препаратов на данные формы поведения.

**Изменение астроцитарной кальциевой активности в переживающих срезах  
гиппокампа крыс под действием разных концентраций глутамата**  
**Калинцева Ярослава Игоревна (Нижний Новгород, yasya13@mail.ru)**

Обработка информации в мозге связана с активностью нейронов, но недавние исследования показали, что астроциты также влияют на этот процесс. Астроциты – это электрически невозбудимые клетки, которые способны генерировать  $\text{Ca}^{2+}$  сигналы, которые, в свою очередь, могут регулировать локальный кровоток. Было показано, что астроциты экспрессируют метаботропные рецепторы глутамата. В связи с этим, глутамат рассматривается как один из основных передатчиков в нейрон-астроцитарных взаимодействиях.

В работе проводились исследования  $\text{Ca}^{2+}$  сигналов в астроцитах, индуцированных различными концентрациями экзогенного глутамата. Эксперименты проводились на переживающих срезах гиппокампа крыс. Уровень  $\text{Ca}^{2+}$  в астроцитах оценивался

по уровню флуоресценции Oregon Green 488 BAPTA 1. Астроциты идентифицировались с помощью специфического флуоресцентного маркера сульфородамин 101. В работе был использован лазерный сканирующий микроскоп Carl Zeiss LSM 510 Duoscan. Записи изменения флуоресценции велись в режиме полного кадра, с цифровым разрешением  $256 \times 256$  пикселей, частотой сканирования 1 Гц и пространственным разрешением  $400 \times 400$  мкм. Флуоресценция индикаторов регистрировалась в диапазонах 500–530 (Oregon Green 488 BAPTA 1), 650–710 нм (сульфородамин 101). Данные обрабатывали с помощью оригинального программного пакета. В данной работе было показано, что при добавлении небольших концентраций глутамата (0,7 и 1 мкмоль) в астроцитах повышается частота  $\text{Ca}^{2+}$  событий, а при добавлении 10 мкмоль глутамата значительно повышается базовый  $\text{Ca}^{2+}$  уровень. Также при добавлении глутамата увеличивалось количество активных астроцитов в срезе. Амплитуда и длительность кальциевых сигналов не изменялись.

Полученные данные демонстрируют связь между внеклеточной концентрацией глутамата и активностью астроцитов. Увеличение внеклеточной концентрации глутамата может происходить при повышенной активности мозга, например во время исследовательского поведения. Наши данные указывают, что такое повышение глутамата должно привести к повышению  $\text{Ca}^{2+}$  активности астроцитов. Мы предполагаем, что эта зависимость является механизмом усиления внутримозгового кровообращения при повышении активности мозга.

*Работа поддержанна РФФИ (08-02-00724, 08-04-97109, 09-04-01432, 09-04-12254-офи\_м), программой МКБ Президиума РАН, грантом Роснауки 2.1.1/6223 Аналитическая ведомственная целевая программа «Развитие научного потенциала высшей школы» (2009-2010 гг.). Данные эксперименты проводились при поддержке Института Мозга RIKEN, Япония; Нижегородской Государственной Медицинской Академии; Нижегородского Государственного Университета им. Н.И. Лобачевского. Автор выражает благодарность Семьянову А.В. д.б.н., проф.; Казанцеву В.Б. д.ф.м.н.; Мухиной И.В. д.б.н., проф.; Захарову Ю.Н. к.ф.м.н.; Пимашкину А.С.*

### **Влияние пренатальной гипобарической гипоксии на перекисное окисление липидов мембран в неокортиксе и гиппокампе у потомства Кислин Михаил Сергеевич (Санкт-Петербург, kislin\_m@mail.ru)**

Пренатальная гипобарическая гипоксия может вызывать целый ряд функциональных нарушений связанных с работой головного мозга, проявляющихся у потомства во взрослом состоянии, например, в повышенной двигательной активности и депрессивности, нарушении способности к обучению. Структуры ЦНС крыс окончательно формируются, в основном, постнатально. Одним из критических процессов, протекающих на 2-ой недели постнатального развития, является миелинизация. Совместно с миелинизацией, в этот период кардинально меняется липидный состав структур головного мозга, в эти процессы активно вовлекается перекисное окисление липидов (ПОЛ) клеточных мембран.

Беременных самок подвергали действию тяжелой гипобарической гипоксии (3 дня по 3 часа 1 раз в сутки в барокамере при 180–200 мм рт. ст. (что соответствует подъему на высоту 10–11 км) на 11–13, 14–16 или 18–20-е сутки беременности. Для исследования статуса перекисного окисления липидов клеточных мембран гиппокампа и неокортикса нами был проведен анализ отдельных его продуктов (определяли содержание диеновых и триеновых конъюгантов, продуктов ПОЛ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБКАП), оснований Шиффа, степень окисленности мембран оценивали по коэффициенту Клейна) в экспериментальных и контрольных группах 14-ти дневных (Р14) крысят линии Вистар, а также и у контрольных взрослых крыс весом 180–220 г.

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют, что процессы ПОЛ у контрольных 14-ти дневных крысят протекают более интенсивно, нежели чем у взрослых. При этом наибольшие отличия в ряду исследованных продуктов ПОЛ характерны для ТБКАП (в неокортиксе – в 4 раза, а в гиппокампе в 7 раз). В экспериментальных группах 14-ти дневных крысят выявлены незначительные отличия от контроля в неокортиксе и выраженные изменения системы ПОЛ в гиппокампе (Р14 ТГ14-16 увеличение на 25% относительно контрольного уровня ТБКАП, а Р14 ТГ18-20 на 35,5%). Данные изменения

могут вовлекаться в процессы дальнейших функциональных нарушения, а также сужать адаптивные возможности структур головного мозга к последующим стрессовым воздействиям.

### **Постнатальное развитие хабенуло-интерпедункулярного тракта у крыс**

*Клепуков Алексей Александрович (Москва, pomer2.718@mail.ru)*

Узелочка является парной структурой, которая присутствует у всех позвоночных, и является своеобразным звеном в составе дорзальной проводящей системы промежуточного мозга, связывающей ядра лимбической системы со структурами среднего мозга. Компактный хабенулоинтерпедункулярный тракт (ХИт), содержащий как эfferентные, так и afferентные нервные волокна, связывает узелочку с ядрами среднего мозга. Хотя этот тракт хорошо изучен у взрослых крыс, однако данные о его развитии отсутствуют. Значимость исследований ХИт определяется его участием в патогенезе шизофрении. Целью данной работы является исследование формирования связей узелочки со средним мозгом в процессе раннего постнатального развития. Для этого был использован метод диффузии липофильного карбоцианинового красителя DiI. Работа проводилась на крысах Вистар с датированной беременностью, материалом служил фиксированный мозг на 2; 3.5; 4; 6; 9; 11 и 20 дни постнатального развития (П2-20). Кристаллы DiI наносили на узелочку, интерпедункулярное ядро (ИПН), тегментальную область и ядра шва. Анализ распределения меченых структур проводили на серийных 80мкм вибраторных срезах.

Меченные волокна в составе ХИт были обнаружены на всех исследованных сроках развития, было описано последовательное формирование отдельных проекционных систем. На П2 (наложение DiI на узелочку) эfferентные аксоны нейронов узелочки достигали ИПН не образуя значительных терминальных ветвлений, а часть из них прорастала в область покрышки среднего мозга. Меченные тела нейронов были обнаружены дорсальнее изгиба среднего мозга. На П4 были выявлены формирующиеся терминальные ветвления аксонов узелочки в ИПН, а также ретроградно меченные тела нейронов в тегментальной области. К П20 весь объем ИПН был заполнен мечеными терминальными ветвлениями. Анализ распределения нейронов ядер узелочки, посылающих аксоны в ХИт, показал, что на П3.5 и П4 при нанесении DiI на ИПН немногочисленные нейроны выявлялись в вентральной части медиального ядра узелочки (МУ), а в вентральной и дорсокаудальной частях латерального ядра узелочки (ЛУ) обнаруживались скопления мелких нейронов. На П11 резко возрастило количество нейронов в МУ, иннервирующих ИПН. Нанесение DiI на медианное ядро шва на П6 выявило незначительное число тел нейронов в вентральной части МУ, а в ЛУ многочисленные меченные клетки образовывали скопления с максимальной концентрацией в дорсомедиальной области. На П6 нанесение DiI на дорсальную тегментальную область выявило тела нейронов в вентральной части МУ и дорсокаудальной области ЛУ без образования чётких скоплений. На П9 при наложении DiI на медианное ядро шва картина распределения нейронов в ядрах узелочки напоминала таковую на П6, но возрастило количество клеток, выявляемых в ядрах узелочки. Таким образом, было показано прогрессивное развитие иннервации ИПН нейронами узелочки. Полученные данные свидетельствуют о дифференцировке ядер узелочки и формировании их связей со средним мозгом в раннем постнатальном периоде. Поддержка: РФФИ 10-04-00568.

### **Влияние острой и хронической скученности на поведение и привес массы тела у крыс**

*Князева Станислава Игоревна (Москва, s.i.knyazeva@gmail.com)*

Перенаселенность в обществе – важная проблема нейроиммунноэндокринологии и социальной медицины. В эксперименте её часто моделируют путём скучивания грызунов в одной клетке. Задачи настоящей работы заключались: 1) в сравнительном анализе совокупности показателей поведения у крыс, содержащихся в условиях кратковременной (острой) и долговременной (хронической) скученности, в тестах «открытое поле», «свет-тень», «приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ), используемых для оценки тревожности; 2) в оценке привеса массы тела у этих животных.

Работа проводилась на 32 самцах крыс линии Wistar одной массы. Все крысы содержались в стандартных условиях (n=4 в клетке) в течение 30 дней после привоза. Затем животные были разделены на 4 равных группы: острого и хронического периода скученности (ОСк и ХСк соответственно), и 2 группы контролей, для ОСк (К1) и для ХСк (К2). Группы ХСк и ОСк были сажены в одну клетку. Поведенческие тесты проводили с помощью программы RealTimer. Всех крыс взвешивали за день до скученности, на 4-й, 10-й и 13-й дни скученности. Статистическое сравнение групп проводили по критерию Манна-Уитни, внутригрупповые сравнения выполняли по критерию Уилкоксона.

В тесте «открытое поле» все крысы были протестированы дважды: сразу после привоза и в периоды острой или хронической скученности. У всех групп крыс ко второму сеансу опыта снижалась двигательная активность (число пересеченных квадратов) и исследовательская активность (число и время норковых реакций, число и время стоек), и увеличивалось время неподвижности. Длительность груминга в группе ХСк увеличивалась, тогда как в остальных группах, наоборот, уменьшалась. В тесте «свет-темнота» в группах ОСк и ХСк время первого пребывания в светлом отсеке было меньшим по сравнению с группами К1 и К2 соответственно, причем этот показатель в группе ХСк был меньшим, чем в группе ОСк. В группе ХСк также было снижено общее время выглядывания из темного отсека по сравнению с группами К2 и ОСк и число выглядываний из темного отсека по сравнению с группой ОСк. В группе ХСк по ряду показателей наблюдались отличия от групп К2 и ОСк, свидетельствующие об усилении тревожности, а так же о снижении двигательной и исследовательской активности при хронической скученности. При взвешивании крыс было выявлено, что периоды проведения поведенческих тестов отрицательно влияли на привес массы тела как скученных, так и контрольных животных. Сама скученность (без поведенческих экспериментов), наоборот, приводила к повышению привеса в острой и хронической фазах.

Таким образом, скученность у крыс приводит к увеличению тревожности, которая более выражена в хроническом периоде. Кроме того, при хронической скученности снижаются показатели двигательной и исследовательской активности (тест ПКЛ). Привес массы тела при острой и хронической скученности увеличивается.

#### **Альфа- и бета-ритмы в динамике рецептивных полей нейронов первичной зрительной коры кошки**

**Кожухов Сергей Александрович** (Долгопрудный, sergeykozh@mail.ru)

Одним из важнейших свойств зрительной системы является инвариантность восприятия формы объекта по отношению к определённой группе преобразований (перемещений, поворотов, сжатий-растяжений и пр.). По поводу механизмов данного типа распознавания существует несколько гипотез. Одной из них является гипотеза, выдвинутая Pitts и McCulloch (1947), согласно которой зрительная система сначала имитирует вышеперечисленные преобразования, после чего оценивает форму как данного объекта, так и результата его различных преобразований. При этом для уменьшения количества нейронных популяций, занимающихся оценкой формы такого количества преобразований, используется принцип временной развертки. Однако, для того, чтобы подтвердить наличие данного принципа в зрительной системе млекопитающих, необходимо, но не достаточно, чтобы элементы зрительной системы были способны генерировать колебания в диапазоне альфа-частот в ответ на зрительную стимуляцию.

Мы исследовали динамику площади и веса рецептивного поля (РП) нейронов первичной зрительной коры за время развития ответа. Было проведено две серии острых опытов. В первой серии экспериментов РП картировали стимулами, вспыхивающими в случайном порядке в точках матрицы 10×10. (классическое картирование). Во второй серии экспериментов частоту фоновых разрядов нейрона искусственно повышали предъявлением полоски, осциллирующей в центре РП независимо от предъявления стимула. (сочетанное картирование).

Было обнаружено что динамика РП может быть представлена в виде суммы двух различных компонент. Одна из них представляет собой аperiодические изменения РП.

Другая представляет собой колебания с частотой  $13,3 \pm 0,9$  Гц и  $18,8 \pm 0,7$  Гц для классического и сочетанного картирования соответственно. Длительность всей динамики составляет  $192 \pm 12$  мс и  $107 \pm 8$  мс для классического и сочетанного картирования соответственно. Вышеуказанные различия между обеими сериями оказались достоверными. В обеих случаях большинство колебаний оказались затухающими, но количество затухающих колебаний в случае сочетанного картирования было меньше.

Существование осцилляций является одним из доводов в пользу гипотезы Мак-Каллоха и Питтса. При этом предполагается, что при искусственноном увеличении фоновой активности увеличивается наклон передаточной характеристики отдельного нейрона, что влечёт за собой увеличение эффективности обратной связи, обуславливающей наличие обнаруженных колебаний. Данный феномен может быть качественно описан с помощью модели, представленной в (Wilson, Cowan, 1972), из которой следуют все вышеописанные различия.

Автор доклада хотел бы поблагодарить своего научного руководителя Лазареву Наталью Александровну за неоценимую помощь в проведении данного исследования.

### **Модулирующее действие каннабиноидной системы на синаптическую передачу в диссоциированной культуре клеток гиппокампа**

**Коротченко Светлана Александровна** (Нижний Новгород, *svetlana\_neuron@mail.ru*)

В организме млекопитающий, в том числе человека, присутствует эндогенная каннабиноидная система (ЭКС), включающая два типа рецепторов (CB1 и CB2), распространенных в различных отделах нервной системы, и их эндогенные лиганды (эндоканнабиноиды). ЭКС играет защитную роль при ишемическом и цитотоксическом повреждении нейронов головного мозга. Агонисты CB1-рецепторов на пресинаптической мемbrane угнетают глутаматергическую передачу, а также уменьшают феномен «долговременной потенциации», что ведет к понижению уровня внутриклеточного кальция в постсинаптической клетке. Таким образом, ЭКС обладает отрицательной обратной связью, чем и обусловлено ее нейропротективное действие. N-арахидонилдофамин, использовавшийся нами, является искусственно синтезированным аналогом эндогенных каннабиноидов млекопитающих. Эксперименты проводились на нейронных сетях, образовавшихся в диссоциированных культурах клеток гиппокампа, выделенных из мозга 17-18 дневных мышьных эмбрионов, и культивированных в течение не менее 10 дней. Регистрация электрической активности культуры, спонтанной и модулированной N-арахидонилдофамином и другими веществами, производилась при помощи мультиэлектродной матрицы MED64. Электрические параметры нейронной сети при ответе на химическое воздействие (частота, амплитуда ответа, время молчания после добавления какого-либо вещества, и т.д.) изменялись в зависимости от возраста культуры. Также был произведен флуоресцентный имиджинг культур при добавлении различных химических агентов и зарегистрировано изменение частоты и амплитуды кальциевых осцилляций.

### **Исследование спонтанной активности в нейронной сети гиппокампа на мультиэлектродной матрице MED64**

**Корягина Екатерина Александровна** (Нижний Новгород, *katerina\_neuron@mail.ru*)

Целью настоящего исследования было изучение спонтанной биоэлектрической активности нейронов гиппокампа *in vitro* в зависимости от возраста культуры.

Обнаружена спонтанная нейронная активность на самых ранних этапах развития культуры в виде случайных некоррелированных спайков (внеклеточных потенциалов). Несмотря на случайный характер событий, их генерация носит пороговый характер и возникает только на определенном этапе развития культуры. Число событий, регистрируемых на электродах, существенно возрастает, что свидетельствует об активации большего числа клеток в сети. Дальнейшее развитие культуры гиппокампа характеризуется формированием межнейронных связей и появлением сетевой коррелированной активности. Такая активность характеризуется появлением функциональных взаимосвязей между разрядами, регистрируемыми на различных электродах.

Для внеклеточной активности в культурах типично возникновение пачечной активности, или burst активности – моментальной пространственно-временной последовательности спайков одного или нескольких нейронов с короткими межспайковыми интервалами. Такие разряды синхронно возникают на различных электродах. Генерация спонтанной пачечной активности возникает за счет интеграции локальных возбуждений, приходящих по большому числу активных входов. Поэтому чем выше плотность нейронов, тем больше вероятность установления локальных синаптических связей с ближайшими соседними нейронами. Активность внутри пачки представляет собой спайковые последовательности. Такие последовательности можно рассматривать как передачу возбуждения между элементами сформированной сети и, как следствие, возникновение коррелированных спайков в различных ее участках. Спайковые паттерны в пределах burst-разрядов являются самоподдерживающимися, возбуждения циркулируют по сети без специфического воздействия извне.

Burst-активность сохраняется на протяжении всего времени жизни культуры, но пространственно-временная структура в процессе развития изменяется. С развитием сети активность усиливается и синхронизация повышается. Разнообразные значения интенсивности, связанной с генерацией бёрстов показывают постоянные изменения в сети динамического уровня. С возрастом культуры отмечается усложнения паттерна активности и появление устойчивости рисунка пачек, что характеризует этапы становления зрелой нейронной сети с максимально возможным числом синапсов в отсутствии афферентации от внешних сигналов.

Экспериментальные данные являются основой для проверки существующих теоретических гипотез и разработки математических моделей работы нейронных сетей.

*Работа поддержана грантами РФФИ, программами «Молекулярная и клеточная биология» Президиума РАН и Министерства науки и образования.*

**Влияние трансплантации клеток красного костного мозга  
на ориентировочно-исследовательские поведение крыс  
линии Крушинского-Молодкиной, страдающих врожденной эпилепсией**

**Кривопалов Сергей Александрович** (Екатеринбург, krivopalov\_s@e1.ru)

Данная работа является частью комплексных исследований, в которых предпринимается попытка дать физиологическое обоснование применения клеточных технологий в лечении эпилепсии. Она базируется на предположении о том, что стволовые клетки красного костного мозга способны проникать через гематоэнцефалический барьер, а затем прямо или опосредованно влиять на судорожную готовность мозга. А, так как, судорожная готовность мозга, по нашему мнению, откладывает непосредственный отпечаток на ориентировочно-исследовательское поведение крыс в открытом поле, задачей нашей работы явилось обнаружение феномена влияния стволовых клеток красного костного мозга на поведение животных. Объектом исследования были выбраны крысы линии Крушинского-Молодкиной (К-М), с врожденной аудиогенной эпилепсией ( $n=40$ , по 10 животных в группе). В эксперимент попали одновозрастные самцы крыс (6 месяцев), обладающие высокой активностью в открытом поле. Взвесь костного мозга, получали из бедренных костей самцов трехмесячных беспородных животных. После гомогенизации и разведения в среде №199 клетки костного мозга вводились внутривенно: первой группе в дозе 10 млн. клеток, второй – 100 млн. клеток. Третьей группе вводилась чистая среда, в том же объеме, а четвертая – состояла из интактных особей. Аналогичные исследования были проведены и на беспородных крысах (четыре группы по 10 животных). Исследования в открытом поле проводились до и после введения на первые, пятые, десятые и пятнадцатые сутки, одинаково для всех групп крыс, по общепринятой методике (3 минуты в открытом поле, четыре повторения, с интервалом в 30 минут).

В результате проведенного факторного анализа исследуемых признаков было выделено два фактора: «эмоциональность» и «реактивность». Обнаружено, что у крыс линии К-М, на 10 день после введения клеток костного мозга наблюдалось значительное снижение частоты актов дефекации, продолжительности груминга и длительности периода замирания.

Традиционно эти показатели связывают с эмоциональным состоянием животного. Кроме того, все эти изменения в динамике поведения наблюдались на фоне повышения показателей общей локомоторной активности. Причем, в той группе, где количество введенных клеток было равно 100 млн., характер таких изменений был ярче выражен. Выявленная динамика изменения показателей активности в открытом поле животных, которым вводили взвесь стволовых клеток, качественно отличалась от таковой в остальных группах. Возможно, одновременное снижение основных показателей активности у интактных животных и контрольной группы к пятнадцатому дню связано с привыканием их к открытому полю.

**Дозозависимое воздействие иммуномодулятора тактивина на поведение крыс как показатель взаимосвязи иммунной и нервной систем**  
*Крючкова Алина Викторовна (Москва, likkavolkhova@mail.ru)*

В последнее время высокими темпами развивается изучение взаимодействия нервной, иммунной и эндокринной систем. Одним из методов нейроммунноэндокринологии является исследование нейромодуляторных свойств иммуноактивных веществ. Тактивин – полипептидный иммуномодулятор, получаемый из тимуса крупного рогатого скота. Как иммунопротектор он широко применяется в клинике, при этом его влияние на поведение животных и человека изучалось мало.

В данной работе изучалось влияние иммуномодулятора тактивина на поведение крыс-самцов линии Wistar (n=27). Исследовали ряд параметров поведения животных в teste «открытое поле» (ОП), предъявлением животным трижды (до введения препарата, на 8-й и на 17-й дни введения), «тёмно-светлая камера» (ТСК) и «приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) на фоне хронического ежедневного интраназального введения малой (0,05 мкг на крысу) и большой (1 мкг на крысу) доз тактивина. Контрольным животным вводился физиологический раствор. Данные статистически обрабатывались с использованием критерия Вилкоксона для зависимых и критерия Манна-Уитни для независимых признаков.

Было обнаружено, что у животных, получавших малую дозу тактивина, наблюдалось в трёх тестах незначительное усиление двигательной и исследовательской активности, которое в тестах ТСК и ПКЛ может свидетельствовать о снижении уровня тревожности. В ТСК животные показывали увеличение длительности пребывания в светлом отсеке и число стоек в нем, в ПКЛ – уменьшение числа периодов неподвижности, увеличение общей длительности выглядываний. Такой устойчивый параметр поведения, как груминг, введение малой дозы не затрагивало. Животные, получавшие большую дозу препарата, показывали ярко выраженное нарушение привыкания к обстановке камеры в teste ОП, тревожно-депрессивный паттерн поведения в teste ПКЛ (снижение числа пересечений квадратов, выглядываний, стоек, увеличение длительности периодов неподвижности), и изменения длительности груминга в этих двух тестах.

Было также показано, что введение тактивина в обеих дозах влияет на морфофункциональное состояние некоторых структур мозга крыс (число ядрышек в нейронах).

Полученные данные позволяют судить о существовании нейромодуляторных свойств тактивина, и о выраженному дозозависимом эффекте этого препарата. Показанные изменения в поведении животных могут свидетельствовать о влиянии тактивина как на двигательную функцию, так и на эмоциональное состояние животных, причем, в зависимости от дозы препарата, в сторону уменьшения или увеличения. Полученные данные свидетельствуют о роли пептидов тимуса в регуляции нервной деятельности животных, что служит очередным доказательством глубокой взаимосвязи нервной и иммунной систем.

Представляется перспективным дальнейшее изучение влияния пептидов тимуса на поведение животных и морфо-функциональное состояние структур их мозга, а также на такие процессы высшей нервной деятельности, как обучение и память.

*Автор выражает благодарность своим научным руководителям д.б.н. А.Н. Иноземцеву, д.б.н. Е.В. Лосевой, проф. В.Я. Ариону.*

## Разработка моделей обучения виноградных улиток *Helix lucorum*

Куличенкова К.Н., Ефимова О.И. (Москва, [Gorthoure@yandex.ru](mailto:Gorthoure@yandex.ru))

Крупные нейроны нервной системы моллюсков с детально изученными электрофизиологическими характеристиками, морфологией и функцией в поведении позволяют регистрировать молекулярно-генетические модификации в одном и том же нейроне в разные временные интервалы после обучения, как в норме, так и на фоне введения ингибиторов или веществ, потенциально усиливающих память. Однако для исследования этих механизмов необходимы модели обучения, в которых память формируется за короткий период времени. К настоящему времени считается, что ассоциативное обучение у моллюсков требует многократных сочетаний в течение продолжительного времени, но есть и данные, что некоторые моллюски (*Lymnaea stagnalis*, *Limax flavus*, *Pleurobranchaea californica*, *Hermisenda*) способны быстро формировать долговременную память. Целью работы была разработка моделей быстрого ассоциативного обучения моллюсков *Helix lucorum*. В моделях с пищевым подкреплением (пищевая аверсия, вкусовая аверсия, снижение пищевой неофобии, Y-образный лабиринт) животных депривировали от пищи в течение 3–7 дней. Пищевую аверсию вырабатывали предъявлением новой пищи (морковь) в сочетании с аппликацией в глотку 10% раствора хинидина гидрохлорида. Вкусовую аверсию вырабатывали инъекцией раствора 0,3 М хлорида лития после 30 мин поедания незнакомой пищи (салат, перец). Снижение пищевой неофобии исследовали при предъявлении новой съедобной пищи (морковь). В этих моделях при тестировании регистрировали латентный период захвата пищи. В модели распознавания объектов животным предъявляли несъедобные объекты для исследования (монетка, флаажок) и фиксировали время взаимодействия с объектом. Обучение в вертикальном Y-образном лабиринте (длина рукава 6 см) проводили на привычную еду (капуста) в левом/правом рукаве для разных животных. Предъявления во всех моделях делали 3 раза через 10 мин (кроме вкусовой аверсии). Тестирование долговременной памяти проводили через 24 ч после обучения на условный стимул, 3 теста через 10 мин (в пустом Y-образном лабиринте 1 тест). Виноградные улитки *Helix lucorum* способны к быстрому обучению пищевой аверсии («контроль» (mean $\pm$ SD) 45 $\pm$ 21,08 сек, «обучение» 97,08 $\pm$ 30,53 сек, дифф. 46,25 $\pm$ 22,71,  $p\leq 0,05$ ), вкусовой аверсии («контроль» 58,93 $\pm$ 30,03 сек, «обучение» 72,29 $\pm$ 33,34 сек, дифф. 33,16 $\pm$ 7,62 сек,  $p\leq 0,0005$ ), снижению пищевой неофобии («контроль» 67,6 $\pm$ 33,69 сек, «обучение» 28,4 $\pm$ 7,73 сек, дифф. 25,6 $\pm$ 6,65 сек,  $p\leq 0,05$ ), распознаванию объектов («контроль» 52,6 $\pm$ 38,95 сек, «обучение» 15,44 $\pm$ 22,50 сек,  $p\leq 0,05$ ). Обучение в лабиринте также приводило к формированию памяти: латентный период захвата пищи при обучении в 1 попытке – 267,66 $\pm$ 80,27 сек, во 2 и 3 попытке – 128,33 $\pm$ 21,50 сек,  $p\leq 0,05$ ; количество заходов в подкрепляемый рукав через 24 ч после обучения: «контроль» – 50%, «обучение» – 75%. Разработанные модели односессионного обучения виноградных улиток могут применяться в исследовании нейрональных субстратов разных форм памяти методом молекулярного картирования.

## Влияние ароматических веществ на реализацию сенсомоторного навыка

Кундульян О.Л., Кундульян Ю.Л., Старостин А.Н. (Ростов-на-Дону, [diamanta@mail.ru](mailto:diamanta@mail.ru))

Изучение нейрофизиологических механизмов влияния ароматических веществ на функциональное состояние мозга человека и реализацию перцептивных и двигательных навыков в условиях сенсомоторной интеграции является актуальным как в прикладном, так и в теоретическом плане. Целью нашего исследования было изучить динамику реализации навыка в условиях сенсомоторной интеграции при действии розмарина и мелиссы по показателям ЭЭГ, связанных с событием потенциалов (ССП) и времени реакции (ВР).

В исследовании принимали участие 20 человек в возрасте от 17 до 30 лет. В качестве модели деятельности была выбрана сложная сенсомоторная реакция (ССМР), которая регистрировалась в ответ на случайно чередующиеся вспышки и щелчки с межстимульным интервалом 4 секунды, выполняемая в течение 60 минут. Для осуществления аромокоррекции текущего состояния через 20 минут после начала серии испытуемому предъявляли аромат розмарина или мелиссы открытым способом на расстоянии 2 см

от кончика носа в течение 5 минут. Выбор и реализация режимов стимуляции, регистрация ЭЭГ и времени реакции (ВР) осуществлялись при помощи компьютерного энцефалографа-анализатора «Энцефалан-131-03» (изготовитель – НПКФ «Медиком – ЛТД», г. Таганрог). Оцифрованная ЭЭГ и время реакции (ВР) экспорттировались в программную среду MATLAB, где проводилась дальнейшая обработка сигналов.

В результате проведенных исследований было обнаружено, что в процессе привыкания к разномодальной стимуляции в условиях сложной сенсомоторной реакции наблюдается резкое снижение общей активации мозга как в теменной ассоциативной системе, связанной с деятельностью механизмов, лежащих в основе непроизвольного внимания и проявляющиеся в снижении дельта-активности, так и в лобной, отвечающей за произвольное внимание и связанной с генераторами тета1-диапазона. Данные процессы приводят к увеличению ВР, качественно не изменяя характер локальной активации. Коррекционные ароматические воздействия в процессе реализации сенсомоторного навыка восстанавливают исходные общие активационные процессы. Розмарин более активно влияет на теменные ассоциативные структуры, а мелисса – на лобные. Более чувствительной к модуляции общего уровня активации является слуховая система (доминирование непроизвольных механизмов), которая в условиях реакции различения менее эффективна, чем зрительная (преобладание произвольных процессов).

**Электрографические корреляты реальных и мысленных движений**  
*Лазуренко Дмитрий Михайлович (Ростов-на-Дону, mityasky@yandex.ru)*

Известно, что создание BCI-систем (нейро-компьютерного интерфейса) способно обеспечить прямую связь мозга человека с внешними устройствами на основе анализа его электрической активности. Подобные устройства предназначены, прежде всего, для людей, утративших в результате болезни или травмы способность общаться с внешним миром, но обладающих сохранным интеллектом. В частности, исследования Leuthardt (2004) и других показали, что пациенты клиники могут быстро научиться модулировать ЭЭГ-активность моторных областей и центра Брока с тем, чтобы управлять одномерным компьютерным курсором в режиме реального времени.

Целью настоящего исследования являлось выявление ЭЭГ-коррелятов, связанных с процессами организации двигательных актов и их мысленных представлений. В обследовании принимали участие 8 человек (3 девушки и 5 юношей), студенты и сотрудники ЮФУ. Средний возраст группы составил 23,5 года. Во время обследования участники находились в свето-звукозализированной камере, в кресле, в удобной для них позе. В процессе работы они выполняли 3 типа движений отдельно левой и правой руками. Обследуемому надлежало либо реально выполнять соответствующие движения, либо мысленно представлять их выполнение. В качестве стимулов, указывающих, какое движение следует совершить, использовались стрелки, указывающие направление движения, и круг, указывающий на необходимость сжать пальцы в кулак.

ЭЭГ регистрировали от 14 областей коры (по схеме 10×20). Оценивали величину амплитудного спектра (СпА) дельта-, тета-, альфа-, бета-1- и бета-2-, гамма-1- и гамма-2-частотных диапазонов.

Результаты ANOVA-анализа показали, что, по сравнению с состоянием оперативного покоя, при реализации движений (как реальных, так и мысленных) в ЭЭГ обследуемых регистрируются односторонние изменения, заключающиеся в выраженном снижении практически по всей поверхности коры альфа- и бета-частот при параллельном росте выраженности медленных (дельта и тета) частот. Рост гамма-частот, особенно в ситуации мысленного представления движений, указывает на протекание в соответствующих областях коры специфических информационных процессов. Наиболее выраженный рост гамма-частот наблюдался при мысленном движении руки в вертикальной плоскости.

Учитывая, что гамма-осцилляции имеют небольшую длительность и могут быть идентифицированы в реальном времени, указанные эффекты в области гамма-частот могут быть рекомендованы для использования в реальных BCI-системах и обеспечить высокую скорость общения, в частности, полностью парализованных пациентов с миром.

## **Влияние размеров открытого поля на активацию полей СА1, СА3 и зубчатой фасции каудальной части гиппокампа мышей**

**Лебедев Илья Владимирович** (Москва, [elie\\_lebedev@neurobiology.ru](mailto:elie_lebedev@neurobiology.ru))

Для гиппокампа (ГП), одной из ключевых структур мозга, необходимой для нормального пространственного поведения, показана функциональная гетерогенность вдоль ростро-каудальной оси, однако трактовки функций отдельных его частей противоречивы. Функциональные различия между отдельными полями ГП (СА1, СА3, зубчатая фасция (ЗФ)) изучены недостаточно. В особенности это касается каудальной части.

Ранее в нашей лаборатории обнаружено, что при передвижении мышей в знакомом открытом поле в большей степени активируется именно каудальная часть ГП. Ее удаление влияет на выполнение задач в большом открытом пространстве (нарушение обучения в водном тесте Морриса, изменение исследовательской активности в открытом поле), но не на пространственное поведение в небольшой, узкой установке (реакция спонтанного передоведения в Т-образном лабиринте).

В настоящей работе оценивали характер активации каудальных частей полей СА1, СА3 и ЗФ при исследовании животными больших и малых пространств. Для этого мышей помещали в отгороженные черным куполом арены разного размера. Во всех аренах животным открывался одинаковый обзор.

Эксперимент проводили на 20 самцах мышей линии C57BL/6, которые были распределены на четыре группы. Животных выпускали на 20 минут в круглые арены разного диаметра (220 см для первой, 150 для второй, 75 для третьей и 37 для четвертой группы). Траектории мышей регистрировали с помощью системы EthoVision (Noldus). Через полтора часа после тестирования животных декапитировали. Активацию мозга выявляли, оценивая экспрессию с-Fos на фронтальных срезах толщиной (20 мкм) стандартным avidin-биотин перексидазным методом на уровне  $-3,28$  мм каудальнее брегмы.

Показано, что в аренах большего диаметра мыши проходили большие расстояния на большей скорости. Самую высокую активацию с-Fos наблюдали у животных, помещенных в арену диаметром 220 см. Эффект наиболее выражен в ЗФ: для этой группы плотность с-Fos положительных клеток составила в среднем  $80,7 \pm 15,3$  кл/мм<sup>2</sup>, отличие от уровня контрольных мышей, взятых из домашней клетки ( $32,4 \pm 8,2$  кл/мм<sup>2</sup>), достоверно при  $p < 0,05$ . Другие группы практически не различались:  $46,5 \pm 8,6$  кл/мм<sup>2</sup> (150 см),  $46,1 \pm 9$  кл/мм<sup>2</sup> (75 см), и  $60,9 \pm 19,1$  кл/мм<sup>2</sup> (37 см). Их отличия от уровня контроля недостоверны. Необходимо отметить, что для арены диаметром 220 см выявлена положительная корреляция между активацией с-Fos в ЗФ и длиной маршрута ( $r = 0,9$   $p < 0,05$ ), в то время как в аренах среднего диаметра, 150 и 75 см, наблюдается тенденция к отрицательной корреляции ( $r = -0,88$  и  $r = -0,65$  соответственно). В малом поле (37 см) корреляция отсутствует.

Таким образом, обнаружено, что характер активации каудальной части ГП неодинаков в разных полях и зависит от диаметра арены. В больших, средних и малых аренах наблюдали разнонаправленные корреляции между пройденным путем и уровнем активации. Эти данные указывают на то, что активация исследуемых структур может быть обусловлена разными формами поведения в аренах разного размера. *Поддержано РФФИ № 07-04-01287.*

## **Исследование инкрементных временных порогов различения двух вспышек одного цвета**

**Лекомцева Анна Александровна** (Нижний Новгород, [lecomtseva\\_anna@km.ru](mailto:lecomtseva_anna@km.ru))

Для процесса зрительного восприятия большое значение имеет фактор времени, так как по скорости переработки зрительной информации можно судить не только о состоянии зрительного анализатора, но и функциональном состоянии всего мозга в целом. Изучение временных характеристик зрительной перцепции простых стимулов (например, вспышек одного цвета) позволит лучше понять механизмы формирования зрительного образа.

Целью данной работы являлось исследование инкрементных временных порогов различения двух вспышек одинакового спектрального состава, предъявляемых на разные участки поля зрения в условиях монокулярного и бинокулярного тестирования. В качестве зрительных стимулов использовались вспышки красного (623 нм), зеленого (525 нм), синего (470 нм) цвета длительностью 10 мкс. Пара вспышек одного цвета предъявлялась сначала

одновременно, затем между ними вводилась нарастающая межстимульная временная задержка ( $\Delta T$ ) с шагом в 1 мс до момента формирования у испытуемого ощущения двух вспышек ( $\Delta T_{kr-kr}$ ;  $\Delta T_{zel-zel}$ ;  $\Delta T_{sin-sin}$ ). Светодиод фиксировался на дуге периметра в 3-х позициях: в центральном поле зрения, со смещением на 5 градусов в назальную и темпоральную области. Дуга периметра была удалена от глаз испытуемого на 35 см. Фоновая освещенность в помещении составляла 250 люкс. Всего было обследовано 20 студентов в возрасте от 17 до 27 лет с нормальным зрением.

Полученные результаты показали, что инкрементный порог различения вспышек одного цвета не зависел от длины волны излучения, тестируемого глаза и стимулирующихся участков полей зрения. Так, например, при бинокулярном тестировании в центральном поле зрения задержка для красных вспышек составила  $44 \pm 6$  мс, для зеленых –  $44 \pm 5$  мс, для синих –  $46 \pm 7$  мс. При предъявлении пары красных вспышек, смещенных в назальную область,  $\Delta T_{kr-kr} = 44 \pm 8$  мс, в темпоральную область –  $45 \pm 10$  мс,  $\Delta T_{zel-zel} = 44 \pm 6$  мс и  $45 \pm 9$  мс,  $\Delta T_{sin-sin} = 43 \pm 9$  и  $44 \pm 9$  мс соответственно.

Обсуждается вопрос о том, что инкрементный порог различия двух вспышек одного цвета отражает возможности магноцеллюлярной системы и поэтому не зависит от характеристик, важных для парвочеллюлярной системы, в частности, спектрального состава.

**Оценка показателей тревожности двух гомозиготных популяций крыс, различающихся по локусу гена рецептора дофамина D2 в тесте свето-темнового выбора и при предъявлении незнакомой пищи в новых условиях**  
**Леушкина Наталья Федоровна (Уфа, leona55@mail.ru)**

В настоящее время очевидно, что получение новых линий грызунов с патологическими особенностями функционирования мозга необходимо для разработки методов диагностики и лечения заболеваний человека. Крысы линии WAG/Rij – широко используются как модельные объекты для изучения абсанской эпилепсии. Исследования, проведенные сотрудниками кафедры морфологии физиологии человека и животных, показали наличие в исходной популяции этих крыс особей с различной модификацией локуса Taq 1A гена рецептора дофамина второго типа (DRD2). Данное обстоятельство позволило выделить и селектировать две сублинии (A1A1 и A2A2), которые могут быть использованы в дальнейшем как модели для исследования особенностей функционирования дофаминергической системы, в частности ее рецепторного аппарата. В настоящее время проводится широкое поведенческое фенотипирование этих групп в батареях разнообразных тестов. Цель настоящей работы – выявить и оценить у животных исследуемых групп поведение в других экспериментальных ситуациях, провоцирующих тревожное состояние. Нами было протестировано 6 самцов группы A1A1, 17 самцов группы A2A2 в возрасте 6 месяцев. В тесте свето-темнового выбора (черно-белая камера) крысы выпускали в светлый отсек и в течение 5 минут регистрировали ряд параметров. Обнаружили, что крысы сублинии A2A2, по сравнению с A1A1 в два раза быстрее заходили в темный отсек. Значения латентного периода соответственно у A2A2 –  $20,53 \pm 3,29$ , у A1A1 –  $42,00 \pm 4,80$  с ( $p < 0,01$ ). Численное значение количества выглядываний из темного отсека у A2A2 было больше, чем у животных A1A1. Для A2A2 показатель был равен  $10,47 \pm 0,39$ , для A1A1 –  $7,33 \pm 1,93$  ( $p < 0,05$ ). Таким образом, тест выявил большую тревожность у крыс линии A2A2 по сравнению с крысами A1A1. Длительность пребывания в темном отсеке у животных A2A2 практически не отличалась от таковой у животных A1A1, и была равна соответственно A2A2 –  $173,59 \pm 5,64$ , A1A1 –  $177,67 \pm 6,86$  с.

Тест предъявления новой пищи в новых условиях (hyponeophagia) показал, что у крыс A2A2 первый латентный период был значительно больше, чем у A1A1 (A2A2 –  $4,52 \pm 0,48$ , A1A1 –  $1,43 \pm 0,44$  ( $p < 0,01$ )). У животных A2A2 оказалась больше также и общая длительность эксперимента, по сравнению с крысами A1A1 (у группы A2A2 она составила  $8,42 \pm 0,55$ , у группы A1A1 –  $3,18 \pm 0,55$  ( $p < 0,001$ )). Таким образом, проведенные эксперименты с использованием различных тестов позволяют сделать вывод, что крысы сублинии A2A2 демонстрируют большую тревожность, чем животные группы A1A1. Для решения вопроса о том, связаны ли выявленные различия с особенностями функционирования D2 рецептора

у этих сублиний, требуются дополнительные исследования. Выражаю Благодарность коллектику лаборатории Физиологии и генетики поведения кафедры ВНД МГУ имени М.В.Ломоносова за помощь в проведение эксперимента и подготовке работы!

### **Методы электро- и видеоокулографии в изучении глазодвигательных реакций в норме и при болезни Паркинсона**

*Литвинова А.С., Анисимов В.Н. (Москва, lexx-las@ya.ru)*

Саккады (быстрые скачкообразные движения глазных яблок) играют важную роль в зрительном восприятии. Рассматривая детали зрительных объектов, человек постоянно сканирует зрительное пространство с помощью саккад. В среднем за 1 секунду глаз совершают 2-3 саккады, разделяемые периодами фиксации на рассматриваемых объектах. Глазодвигательные реакции зависят от многих факторов: возраста, состояния здоровья человека, функционального состояния, и изменяются при некоторых заболеваниях.

Целью данной работы явилось сравнение зрительно-вызванных и произвольных глазодвигательных реакций у испытуемых без неврологической симптоматики и у пациентов с болезнью Паркинсона (БП), а также построение возрастной шкалы параметров саккад.

В исследовании приняли участие здоровые испытуемые разного возраста (от 17 до 73 лет) и пациенты с ранними стадиями БП. Для записи зрительно-вызванных саккад испытуемым попеременно предъявляли центральный и периферические стимулы, на которых нужно было фиксировать взор. Движения глаз регистрировали методом электроокулографии. Для того, чтобы оценить глазодвигательные реакции в условиях, приближенных к естественному рассматриванию предметов, испытуемым предлагали произвольно смотреть на объекты различного уровня сложности. В этом случае движения глаз регистрировали с использованием метода видеоокулографии.

По результатам электроокулографического исследования построена возрастная шкала параметров зрительно-вызванных саккад. Показано, что у здоровых испытуемых среднегрупповые значения латентных периодов саккад и доли мультисаккад значительно увеличиваются после 60 лет. У пациентов с БП значения данных параметров превышают таковые у здоровых испытуемых тех же возрастных групп, при этом фактор наличия заболевания оказывает большее влияние, чем возраст пациента. Длительность одиночных зрительно-вызванных саккад в меньшей степени зависит от возраста и не изменяется при БП. Методом видеоокулографии выявлено, что при рассматривании простых объектов максимальное число произвольных движений за определенное время снижается с возрастом и при БП. С усложнением формы объекта различия между молодыми и пожилыми испытуемыми без неврологической симптоматики нивелируются. С возрастом у здоровых испытуемых увеличивается средняя длительность одной фиксации, а у пациентов с БП значение данного параметра значительно выше, по сравнению со здоровыми пожилыми людьми. Кроме того, при БП резко возрастает время инициации первой глазодвигательной реакции, в то время как у здоровых испытуемых этот показатель с возрастом меняется мало.

Таким образом, и зрительно-вызванные, и произвольные движения глаз зависят от возраста и изменяются при БП. Работа выполнена при поддержке Российского гуманитарного научного фонда, проект № 08-06-00362а.

### **Анализ ассоциаций полиморфного локуса *Fnu4HI* в гене моноаминооксидазы МАОА с показателями невербального интеллекта человека**

*Маралёва А.В., Гумерова О.В. (Уфа, hihih-hahaha@mail.ru)*

Моноаминооксидаза А (МАОА) – это фермент, играющий важную роль в метаболизме нейроактивных и вазоактивных аминов в центральной нервной системе и периферических тканях. Ген, кодирующий МАОА, локализован на X хромосоме (p11.4-p11.3). Проведен анализ ассоциаций полиморфного варианта *Fnu4HI* гена МАОА с уровнем невербального интеллекта человека.

Материалы и методы. Анализ *Fnu4HI* полиморфизма в гене МАОА проведен у 200 не родственных индивидов в возрасте 18–35 лет методом полимеразой цепной реакции (ПЦР) с последующей обработкой амплификонов соответствующей рестриктазой. Уровень

интеллектуального развития (IQ) у испытуемых определялся по методике Кеттеля. В соответствии с показателями IQ испытуемые разделены на две группы: с высоким (выше 110 баллов) и нормальным (90–110 баллов) уровнем интеллектуального развития.

Результаты. Анализ ассоциаций показал достоверно значимые различия в распределении частот генотипов между исследуемыми группами, вследствие повышения частоты гетерозиготного генотипа МАОА +/– (36,84% против 19,75%,  $P=0,002$ ) и снижения частоты генотипа МАОА –/– (48,42% против 65,43%,  $P=0,035$ ) в группе лиц с высоким уровнем интеллектуального развития.

Таким образом, установлена ассоциация Fnu4Н1 полиморфного локуса в гене МАОА с показателями невербального интеллекта. Работа выполнена при частичном финансировании гранта министерства образования РФ «Тематический план 2008–2010».

#### **Ретинотопические карты внутреннего оптического сигнала зрительной коры мозга крыс** *Минакова Е.Е., Иванов Р.С. (Москва, minakova\_ee@inbox.ru)*

По данным Всемирной организации здравоохранения, во всем мире более 161 миллиона человек страдает нарушениями зрения; из них 124 миллиона имеют пониженное зрение, а 37 миллионов полностью слепы. В настоящее время созданы экспериментальные модели некоторых дегенеративных заболеваний сетчатки, на основе которых возможна разработка методов лечения указанных поражений зрительной системы. При использовании данных моделей важную роль играет регулярное объективное тестирование зрительной функции: остроты зрения, контрастной чувствительности и динамических характеристик зрительного стимула. Для такого тестирования чаще всего используют поведенческий и электрофизиологический методы.

Мы предлагаем использовать метод оптического картирования по внутреннему сигналу. Метод основан на измерении локального увеличения концентрации дезоксигемоглобина в мозговой ткани, которое происходит в результате активации нейронов, усиленно потребляющих кислород. Изменения концентраций двух форм гемоглобина могут быть измерены с помощью высокочувствительной CCD-камеры. Регистрация этого «внутреннего» оптического сигнала («intrinsic signal») позволяет строить функциональные карты поверхности мозга, на которых активированные участки выглядят более тёмными. В качестве стимула использовали движущуюся по монитору компьютера полоску. Оптический сигнал от коры мозга регистрировали через полупрозрачные у молодых животных кости черепа. В экспериментах с изменением контраста использовали три его градации: 25, 50 и 100% от максимального значения. Полученные функциональные карты содержат популяционный ответ нейронов коры в виде комплекса тёмных и светлых пятен. Кроме того, возможно построение фазовых карт, на которых цвет кодирует фазу цикла стимуляции – положение полоски в поле зрения животного. После пространственной фильтрации на фазовых картах можно выделить характерную ретинотопическую организацию зрительной коры. Сравнение индивидуальных функциональных карт выявляет принципиальное сходство в расположении, размере и общей структуре ответа коры у разных особей. Определенные различия в топографии ретинотопических функциональных карт сигнала можно объяснить с точки зрения накопления индивидуального опыта и формирования мозга молодых животных. Функциональные карты коры мозга, построенные для одного животного в разные промежутки времени в течение эксперимента, характеризуются стабильностью получаемой структуры. Количественно сходство между картами может быть измерено с помощью коэффициента корреляции, который в такой ситуации изменялся в промежутке от 0,82 до 0,95.

В некоторых случаях для тестирования зрительной коры использовали высококонтрастные ориентационные решетки. По нашему предположению, такой стимул должен вызывать устойчивую активацию первичной зрительной области коры. Фокус активности обнаруживали в предполагаемом месте локализации стриарной коры. При этом амплитуда ответа была на 30% больше, чем при активации одиночной светлой полоской.

**Изменение параметров вызванной электрической активности мозга человека  
при восприятии иллюзорных фигур**

**Миняева Надежда Руслановна (Ростов-на-Дону, chyan-bo@rambler.ru)**

Согласно современным представлениям восприятие является активной психической деятельностью, состоящей из многих звеньев и включающей различные структуры мозга. Изучение восприятия иллюзорных фигур при выполнении задач различного уровня сложности, является актуальным как для оценки операторской деятельности, так и для уточнения механизмов восприятия иллюзорных объектов.

Целью проведенного исследования являлось изучение вызванной электрической активности мозга человека при восприятии иллюзорных фигур в различных задачах.

Изучались изменения латентных периодов (ЛП) компонентов зрительного ВП и вызванного высокочастотного ответа (30–100 Гц) мозга у 19 мужчин-правшей в трех типах заданий: пассивное восприятие (PP), простая сенсомоторная реакция (SR), сложная реакция выбора по эталону (Go/NoGo). Регистрировались компоненты P1 (30-70 мс), N1 (70-100 мс), P2 (80-150 мс), N2 (150-250 мс), P3a (270-370 мс), P3b (420-550 мс), и вызванный компонент высокочастотного ответа (0-200 мс). Анализ вызванных потенциалов осуществляли с использованием пакета прикладных программ EEG VISION, разработанного в лаб. НИИ НК им. А.Б. Когана, ЮФУ. Для анализа высокочастотного компонента ответа использовали вейвлет трансформацию исходного ЭЭГ сигнала. Статистическую оценку осуществляли с помощью дисперсионного анализа (MANOVA).

Показано, что усложнение задачи от пассивного восприятия к простой сенсомоторной реакции приводит к удлинению ЛП компонентов в передних отведениях P2 (F3, C3, C4, Cz) и N2 (F3, C3, Cz), а P3a во всех исследовавшихся областях. Дальнейшее усложнение – переход от простой сенсомоторной реакции к релевантному стимулу в задаче выбора – приводит к увеличению латентности компонентов N1 (в левой центральной и симметричных теменных областях), N2 (в центральных и теменно-затылочных областях), и к уменьшению латентности компонента P3a (в симметричных лобных, левом центральном и левом затылочном и вертексе). При сравнении компонентов ВП на нерелевантный стимул (в задаче выбора) с компонентами ВП при пассивном восприятии также наблюдается увеличение ЛП компонентов N2 и P3a во всех отведениях.

Анализ ЛП вызванного высокочастотного компонента ответа выявляет аналогичное увеличение при усложнении задания практически во всех исследуемых областях.

Полученные данные показывают, что усложнение задачи при восприятии иллюзорных фигур, сопровождающееся более детальным анализом объекта восприятия, приводят к увеличению ЛП поздних компонентов (N2, P3a) зрительного ВП.

Изменения раннего компонента высокочастотного ответа, показывающего сходную динамику с компонентами вызванного потенциала, могут свидетельствовать о его взаимосвязи как с параметрами воспринимаемого объекта, так и с типом задачи.

**Показатели пик-волновой активности (SWD) соматосенсорной коры**

**у крыс с модификацией рецептора дофамина DRD2**

**Мусина Альбина Мубараковна (Уфа, marmishka-06@mail.ru)**

Важной характеристикой абсанской эпилепсии являются разряды пик-волна – высокоамплитудная, широко генерализованная по коре ритмическая электрическая активность. В настоящее время в результате исследования крыс линии WAG/Rij – модель генетически обусловленной абсанской эпилепсии – получены, доказательства тому, что абсанная эпилепсия является кортикоталамическим типом эпилепсии. При этом кортикальный фокус в соматосенсорной коре является ведущим в распространении пик-волновой активности (hot spot theory) (Меерен и др., 2004)

Целью данного исследования было выявить различия по количественным характеристикам пик-волновой активности в ЭЭГ соматосенсорной коры у двух групп половозрелых крыс, различающиеся генотипом по локусу Taq 1 гена рецептора дофамина второго типа (DRD2). Крысы первой группы были гомозиготными по первому аллелю и

обозначены нами как группа A1A1, крысы второй группы были гомозиготными по второму аллелю и обозначены как группа A2A2. Обе исследуемые группы включали по 12 животных.

Анализ электроэнцефалограммы осуществляли по четырем параметрам: количество одиночных пиков в одном SWD (шт), продолжительность SWD (сек), индекс SWD (процент времени, занятый разрядами), их количество в единицу времени (шт). Анализируя полученные данные по первому параметру, мы выявили, что максимальное значение одиночных пиков наблюдается у первой группы животных A1A1 ( $34,2 \pm 0,64$ ), этот показатель у крыс группы A2A2 ниже ( $29,7 \pm 0,85$ ), но эти данные достоверно не различаются. Достоверные различия были получены при сравнении продолжительности SWD: крысы первой группы A1A1 имеют большую продолжительность SWD на ЭЭГ равную,  $5,6 \pm 0,34$  сек, чем крысы второй группы A2A2 у которых тождественный показатель составляет  $8,5 \pm 0,08$  сек ( $p < 0,05$ ). Еще одной важной количественной характеристикой ЭЭГ является количество SWD в единицу времени. Сравнивая этот параметр у исследуемых групп, мы показали, что у крыс первой группы A1A1 достоверно больше SWD в единицу времени в записанных файлах. Расчет пик-волнового индекса выявил, что время, занятое разрядами у крыс группы A1A1 равно  $9,5 \pm 0,82\%$ , что значимо выше по сравнению с тождественным показателем у группы A2A2 –  $2,71 \pm 0,25\%$  ( $p < 0,05$ ).

Обобщая полученные результаты, мы можем сделать вывод, что у крыс с генотипом A/A по локусу Taq 1A DRD2 по сравнению с крысами с генотипом A/A имеет место большая выраженность SWD в соматосенсорной коре, который является основным эпилептогенным очагом при этой форме эпилепсии.

### **Возрастная динамика спектральных характеристик ЭЭГ в фоне и при мыслительной деятельности**

**Наумова Екатерина Сергеевна (Ростов-на-Дону, catia.naumova@mail.ru)**

Выяснение возрастных особенностей мозговой организации высших психических процессов и механизмов, лежащих в основе их формирования является одной из актуальных задач современной нейрофизиологии. Одной из наиболее важных индивидуальных особенностей, определяющей когнитивные стили и особенности мыслительной деятельности, является латеральный статус (профиль ФМА мозга). Индивидуальный профиль асимметрии определяется присущим данному субъекту сочетанием моторных, сенсорных и психических асимметрий. Профиль ФМА оказывает влияние на индивидуальные особенности мыслительной деятельности и успешность обучения каждого учащегося.

Цель нашей работы – исследование возрастной динамики пространственно-временных характеристик ЭЭГ в состоянии покоя и при вербальной и образной мыслительной деятельности. Нами были исследованы спектральные характеристики ЭЭГ 166 человек 3-х возрастных групп. В качестве верbalного теста использовался тест «Исключение лишнего». В качестве простого пространственного теста использовался аналогичный вербальному тест «Картинки». Сложный пространственный тест включал 20 заданий теста Равена. Проведен статистический анализ спектральных мощностей основных ритмов ЭЭГ в фоне и при мыслительной деятельности с помощью программы однофакторного дисперсионного анализа ANOVA.

В нашей работе исследовались пространственно-временные характеристики ЭЭГ школьников и студентов с разным латеральным фенотипом в процессе вербальной и образной мыслительной деятельности. Исследование взаимосвязи латерального статуса с качеством мыслительной деятельности показало, что оно у леворуких и амбидекстров в целом ниже, чем у их сверстников с другими латеральными фенотипами. При решении пространственного теста Равена наиболее высокое качество деятельности обнаруживают девочки с односторонним правым профилем ФМА мозга.

Исследование спектральных характеристик фоновой ЭЭГ у школьников 11-12 лет показало, что у девочек с односторонним левополушарным типом доминирования мозга показатели фоновой ЭЭГ более зрелые и ближе к возрастной норме, чем у их сверстников с другими типами мозгового доминирования. Анализ спектральных характеристик основных

ритмов ЭЭГ старших школьников и студентов показал, что у учащихся с высоким качеством вербальной деятельности мощность этих ритмов, как в фоне, так и при решении тестов ниже, чем у испытуемых с низким качеством вербальной деятельности. Выявлены реципрокные изменения спектральных мощностей основных ритмов ЭЭГ в процессе зрительно-пространственной и вербальной мыслительной деятельности у старших школьников и студентов. Эти различия, по-видимому, связаны с разным уровнем активации мозга в процессе вербальной и зрительно-образной деятельности. Высокое качество вербальной деятельности связано с высоким уровнем активации мозга в целом, в то время как успешная зрительно-образная мыслительная деятельность не требует повышения уровня активационных процессов в мозге.

### **Долговременная потенциация в префронтальной коре крыс при стимуляции гиппокампа и миндалины**

*Поспелов А.С., Серков А.Н. (Москва, Zavdark@gmail.com)*

Префронтальная кора – важный отдел коры больших полушарий, функция которого связана с рабочей памятью, обучением и другими важнейшими формами поведения. Одним из важнейших направлений этих исследований является изучение синаптической пластичности в префронтальной коре. Большинство работ посвящены синапсам, образуемым аксонами нейронов гиппокампа на нейронах префронтальной коры, в то время как пластичность связей базолатеральной миндалины с префронтальной корой остаётся практически неисследованной.

В работе исследовали фокальные вызванные потенциалы (ФВП), возникающие в префронтальной коре мозга крысы при электрической стимуляции зон СА1 и субикулума гиппокампа и базолатеральной миндалины. Длительное изменение амплитуды ФВП (долговременную потенциацию) получали путём высокочастотной стимуляции (250 Гц 20 серий по 50 импульсов) этих структур. Исследование проведено на 11 животных линий Вистар и КМ. Эксперименты проводились как на свободноподвижных крысах, так и на наркотизированных хлоралгидратом.

Форма ФВП, зарегистрированных в префронтальной коре при стимуляции гиппокампа, соответствует известной из литературных данных, в то время как ФВП, зарегистрированные при стимуляции миндалины, отличались от описанных в литературе. В то же время, некоторые компоненты «гиппокампальных» и «амигдалярных» ФВП сходны между собой. После высокочастотной стимуляции как гиппокампа, так и миндалины, амплитуда ФВП возрастила на 50-200%. Изменения амплитуды ФВП носили долговременный характер (от одного часа до нескольких суток). Таким образом, нами была показана возможность получения долговременной потенциации синапсов, образованных аксонами нейронов базолатеральной миндалины на нейронах префронтальной коры. Полученная потенциация была сходна с пластическими изменениями, получаемыми путём высокочастотной стимуляции гиппокампа.

Также было исследовано влияние высокочастотной стимуляции одного из афферентов префронтальной коры на ФВП, возникающие при стимуляции другого. Получено достоверное увеличение амплитуды ФВП, регистрируемых при стимуляции гиппокампа на 30-115% (после высокочастотной стимуляции миндалины) и увеличение амплитуды ФВП, регистрируемых при стимуляции миндалины, на 10-40% (после стимуляции гиппокампа, у 3 из 7 исследованных животных). Механизмы этих изменений нуждаются в дополнительных исследованиях. Работа частично поддержана РФФИ (грант №09-04-00481).

### **Изменение спонтанной кальциевой активности нейронов и астроцитов гиппокампа крыс в период постнатального онтогенеза**

*Потанина Александра Васильевна (Нижний Новгород, potaninaalexa@mail.ru)*

Гиппокамп – это часть головного мозга, которая используется для хранения и обработки пространственной информации, а также участвует в процессе формирования долговременной памяти. Для изучения функций гиппокампа важную роль играет анализ нейрон – астроцитарных взаимодействий. Таким образом, такие процессы, как обучение и

память имеют очень сложные клеточные основы. Незрелый мозг имеет ряд особенностей, отличающих его от взрослого мозга. Прежде всего, эта особенность важна для процессов обучения. Обучение – есть результат опыта, а именно, долговременное изменение нейронных связей после электрической активности нервных клеток. История открытия и изучения спонтанной активности клеток гиппокампа накопила большое число доказательств значимости данного рода активности. Однако, большинство работ в области изучения спонтанной активности у животных разного возраста сфокусированы на явлении парадокса так называемых «молчящих синапсов», присущих в раннем постнатальном периоде развития. Данный период развития мозга характеризуется наряду с продолжающимся синаптогенезом высокой пластичностью. В этом процессе важную роль играет повышенная возбуждающая нейропередача, опосредованная глутаматными рецепторами. У крыс она максимальна на второй неделе постнатального развития. У глиальных клеток (это электрически неактивные клетки мозга) можно наблюдать увеличения внутриклеточной концентрации кальция, выделяемого из внутриклеточных депо. Это позволило сделать предположение, что астроциты, возможно, интегрируют нейронную активность.

В данной работе сравнивалась спонтанная активность клеток переживающих срезов гиппокампа молодых (P5 – P14) и взрослых крыс (P21 – P33). Уровень кальция в клетках оценивался по уровню флуоресценции кальциевых красителей – Sulforhodamine 101 и Oregon Green 488 BAPTA 1-AM. Записи спонтанной активности клеток проводили в течение 30-60 минут на лазерном сканирующем микроскопе Zeiss LSM510 NLO Duoscan. Данные обрабатывались с помощью оригинального программного пакета ASTROSCANNER по последовательности флуоресцентных изображений. С помощью данного метода можно снимать спонтанную активность астроцитов стабильно в течение 2-х часов и более. Было установлено, что частота спонтанных кальциевых осцилляций увеличивается в период постнатального развития крыс. Также экспериментально доказано, что спонтанная активность нейронов и астроцитов коррелируют. Установленный факт, что число отростков астроцитов с возрастом увеличивается, подтверждает ранее полученные данные.

*Работа поддержанна РФФИ (08-02-00724, 08-04-97109, 09-04-01432, 09-04-12254-офи\_m), 2.1.1/6223 Аналитическая ведомственная целевая программа «Развитие научного потенциала высшей школы (2009-2010 гг.)». Данные эксперименты проводились при поддержке лаборатории Института мозга Рикен, RIKEN Brain Science Institute (Япония), Нижегородской Государственной Медицинской Академии. Автор выражает благодарность д.б.н. А.В. Семьянову, д.ф.-м.н. В.Б. Казанцеву, д.м.н. И.В. Мухиной, к.ф.-м.н. Ю.Н. Захарову, к.ф.-м.н. М.И. Бакунову, А.С. Пимашкину.*

### **Исследование программирования саккадических движений глаз в экспериментальной схеме «Двойной шаг»**

*Потапова В.Д., Котенев А.В. (Москва, v\_potapova@neurobiology.ru)*

На 10 испытуемых исследовалась величина латентного периода (ЛП) саккады и топография усредненных пресаккадических потенциалов при представлении двух коротких последовательных зрительных стимулов в различных полуполях (схема «двойной шаг»). Экспериментальная схема позволяет выявить этап принятия решения в программировании саккады.

При длительности первого стимула в 50мс наблюдалось существенное увеличение числа одиночных саккад на второй стимул, по сравнению с длительностью стимула в 150 мс (75,4 и 24,6% соответственно,  $p<0,05$ ). У всех испытуемых установлено увеличение ЛП саккад при длительности первого стимула в 50 мс по сравнению со 150 мс – на  $83\pm15$  мс для двух последовательных саккад на оба стимула и на  $117\pm25$  мс для одиночной второй саккады. Этот факт может отражать тормозные влияние сдвига непроизвольного автоматического внимания при включении второго стимула через короткий интервал времени на программирование саккады. В контрольных опытах (в которых отсутствовала временная зависимость моментов предъявления соответствующих стимулов) средние значения ЛП саккады были меньше, чем в экспериментальных: при длительности стимула в 50 мс на  $102\pm15$  мс, а при длительности стимула в 150 мс – на  $70\pm9$  мс.

В схеме «двойной шаг» показано увеличение ЛП саккады на второй стимул по сравнению с саккадой на первый стимул (на  $132,6 \pm 38$  при стимуле в 150 мс и на  $249 \pm 54$  мс при стимуле в 50 мс). Можно предположить, что эта временная задержка связана с процессом «перекартирования» вектора второй саккады на основе «экстрапаретинальной» информации, которой может служить эфферентная копия моторной команды первой саккады или «corollary discharge».

Выявлены латеральные различия в количестве одиночных саккад на второй зрительный стимул и в величине их ЛП. Независимо от длительности первого стимула число одиночных саккад на второй стимул влево было больше на 28%, а величина их ЛП на 101 мс меньше по сравнению с аналогичными саккадами вправо ( $p < 0,05$ ). Эти данные свидетельствуют о ведущей роли правого полушария в процессах перекартирования и обновления зрительной сцены.

С помощью метода обратного усреднения ЭЭГ были выделены быстрые пресаккадические потенциалы в латентном периоде саккады. Предварительный анализ полученных данных выявил преобладание фокусов пресаккадических потенциалов в латентном периоде одиночной второй саккады в сагиттальных зонах коры (Fz, Cz, Pz), а также в правой теменной зоне. Подобная топография фокусов пресаккадических потенциалов может отражать включение ведущих корковых зон саккадического контроля (поля SEF, DMPFC, ACF), а также фронтально-медио-таламической и таламо-париетальной модулирующих систем избирательного внимания в процессах обновления зрительной сцены и перекартирования саккадического вектора.

Работа выполнена при поддержке фонда РФФИ (проект № 08-04-00308).

### **Влияние межущной задержки на импульсную активность нейронов в заднем холме морской свинки**

**Рочева Мария Ивановна** (Санкт-Петербург, *t4kzpt@list.ru*)

Одним из бинауральных факторов, определяющих локализацию источника звука, являются межущные различия во времени прихода звука к правому и левому уху. Межущная задержка ( $\Delta T$ ) служит основным признаком локализации звука низкой частоты (до 2 кГц). Поскольку к настоящему времени вопросы, относящиеся к пространственной организации системы нейронов бинаурального анализа звуков в заднем холме, остаются малоизученными, было проведено исследование направленное на изучение топографической организации нейронов, настроенных на низкую частоту.

Опыты проводились на наркотизированных морских свинках. Во время эксперимента животное находилось в звукозаглушенной камере. Исследовалась импульсная активность одиночных нейронов заднего холма при бинауральном предъявлении низкочастотных тоновых и шумовых сигналов (до 2 кГц) с различной величиной межущной задержки ( $\Delta T$ ). Нейронная активность регистрировалась с помощью пучка из 16 микроэлектродов.

Результаты исследования позволяют выделить три основных типа избирательности нейронов к межущной задержке. Наиболее распространенным является тип нейронов, реагирующих наибольшим ответом при локализации стимула с контрлатеральной стороны (более 80% нейронов). Два других типа нейронов, реагирующих максимальным ответом при расположении стимула по центру головы и при его смещении в ипсилатеральную сторону, встречались значительно реже (около 20%). Характерным свойством всех исследованных нейронов является периодическая зависимость величины импульсного ответа от  $\Delta T$ . При бинауральном предъявлении тонов низкой частоты (до 1,5 кГц) период изменения реакции совпадает с периодом колебаний предъявляемого сигнала. При предъявлении шумовых сигналов период изменения величины импульсации соответствует периоду характеристической частоты нейронов. Периодический характер изменения импульсной активности нейронов свидетельствует о том, что реакция на изменение  $\Delta T$  определяется чувствительностью нейронов к межущному фазовому сдвигу сигналов.

Изучение топографической организации нейронов заднего холма, избирательных к величине  $\Delta T$ , показала, что величина оптимальной задержки постепенно возрастает при переходе от ростральной области заднего холма к его каудальной области.

*Работа поддержанна грантом РФФИ №09-04-01542. Хочу выразить огромную признательность моему научному руководителю – Никитину Н.И. за помощь в проведении экспериментов. И поблагодарить организаторов за предоставленную молодым учёным возможность общаться между собой и с уже маститыми учёными.*

**Роль особенностей взаимодействия нейронов миндалины для проявления пассивной или активной стратегии поведения кроликов в эмоционально-негативных ситуациях**

*Рысакова Мария Павловна (Москва, rubia.85@mail.ru)*

Наиболее отчётливо индивидуально-типологические особенности поведения животных проявляются в эмоционально-негативных ситуациях. Показано, что при аверсивном воздействии одни проявляют пассивную, другие – активную стратегию поведения. Пассивные и активные животные различаются устойчивостью к невротизации и стрессу, чувствительностью к алкоголю и наркотическим веществам, восприимчивостью к иммунопатологическим заболеваниям. Это делает актуальным поиск нейрофизиологических механизмов, определяющих доминирование той или иной стратегии поведения. Среди структур, участвующих в возникновении тревоги и страха особую роль играет миндалина. В литературе представлены убедительные доказательства того, что данная структура необходима для приобретения, выражения и угашения страха. Кроме того, показана важная роль миндалины в определении индивидуальных особенностей животных при пищевом поведении. С целью выявления роли миндалины для выбора различных стратегий поведения в эмоционально-негативных ситуациях стояла задача сопоставить взаимодействие нейронов ядер миндалины у активных и пассивных кроликов.

Поведение кроликов исследовали в «открытом поле», «чёрно-белой камере» и при действии эмоционально-значимых раздражителей. Животные придерживались определённой стратегии поведения, сходной в различных эмоционально-негативных ситуациях. Кролики, пассивные в «открытом поле», при помещении в «чёрно-белую камеру» по сравнению с активными животными реже выглядывали из тёмного отсека и меньше времени проводили в светлом отсеке, а при действии эмоционально-значимых раздражителей – реже проявляли активные реакции и затянувшись на большее время.

Активность нейронов центрального и базального ядер миндалины регистрировали в группах активных и пассивных кроликов при предъявлении эмоционально-значимых раздражителей. При статистической обработке импульсации нейронов миндалины строили гистограммы кросскорреляции. Обнаружены межгрупповые различия во взаимодействии близлежащих нейронов миндалины. У пассивных животных по сравнению с активными наблюдалось больше возбудительных и меньше тормозных межнейронных связей с латентностью от 50 до 150 мс, взаимодействие нейронов реже осуществлялось на частотах дельта1- и тета2-диапазонов. У пассивных кроликов обнаружена асимметрия в межполушарном взаимодействии нейронов с правосторонним доминированием, которая отсутствовала у активных животных. Особенности взаимодействия нейронов миндалины у активных кроликов были сходны с обнаруженными ранее у животных при действии анксиолитика афобазола, оказывающего модулирующее действие на ГАМК-бензодиазепиновые рецепторные комплексы. Полученные данные свидетельствуют, что миндалина участвует в выборе пассивной или активной стратегии поведения. При этом у пассивных животных наблюдается более высокий уровень активации миндалины по сравнению с активными кроликами, что, возможно, связано с различиями в функционировании ГАМКергической системы данной структуры.

**Влияние интраназального введения 5-НТ-модулина на поведение белых крыс**

*Сергеева Наталья Игоревна (Москва, irey@rambler.ru)*

Патологические изменения в функционировании и взаимосвязи серотонинергической и дофаминергической систем лежат в основе развития нервно-психических заболеваний, в том числе депрессии и тревожных расстройств. Недавно открытым анксиогеном является 5-гидрокситриптамин-модулин (5-НТ-модулин) – эндогенный тетрапептид (Leu-Ser-Ala-Leu), аллостерический модулятор активности 5-НТ1B типа рецепторов серотонина.

Ранее нами были проведены поведенческие исследования прямого парентерального введения 5-НТ-модулина, где он вызывал статистически значимый отставленный дозозависимый анксиогенный и продепрессивный эффект. Однако огромный интерес представляет изучение биохимических и поведенческих эффектов 5-НТ-модулина также при интраназальном способе введения. Поэтому целью данной работы являлось изучение поведенческих эффектов 5-НТ-модулина при интраназальном введении, а также изучение биохимических изменений в стриатуме крыс, вызванных однократным интраназальным введением 5-НТ-модулина.

Интраназальное введение экспериментальным животным 5-НТ-модулина в дозе 100 мкг/крысу за 30 мин до опыта приводило к выраженным и достоверным анксиолитическим изменениям в поведении животных. В приподнятом крестообразном лабиринте статистически значимо увеличивалось количество выходов на открытые лучи лабиринта и время, проведенное на открытых лучах ( $p<0,05$  по критерию Манна-Уитни). Также статистически значимым является уменьшение времени замирания ( $p<0,05$  по критерию Фишера). Уменьшалось время замирания в тесте Порсольта одновременно с увеличением времени активного плавания.

Наблюдаемый анксиолитический и антидепрессивный эффект однократного интраназального введения 5-НТ-модулина не только сохранялся, но и усиливался спустя 24 часа после введения. В биохимическом плане при интраназальном введении 100 мкг 5-НТ-модулина увеличивались уровни ДА и ГВК, соотношение ГВК/ДА; изменения в серотонинергической системе были незначительными – только уровень 5-ОИУК был достоверно повышен по сравнению с контролем. В биохимическом плане изменения, которые были обнаружены через 30 минут после интраназального введения 100 мкг 5-НТ-модулина, через 24 часа усиливались: достоверным являлось увеличение уровня ДА, ДОФУК, снижение уровня ГВК и ГВК/ДА. В то же время появились достоверные изменения в серотонинергической системе: повысился уровень метаболита серотонина – 5-ОИУК – и соотношение 5-ОИУК/5-ОТ. Повышение уровня дофамина в данном случае может служить объяснением сохраняющегося и через 24 часа после введения анксиолитического эффекта.

Интраназальное введение 5-НТ-модулина в дозе 100 мкг/крысу сопровождается анксиолитическими и антидепрессивными изменениями в поведении животных, не только сохраняющимися, но и усиливающимися через сутки после введения препарата. Полученные данные могут быть использованы для разработки новых методов лечения состояний, связанных с повышенной тревожностью.

### **Влияние стресса на долговременную потенциацию в префронтальной коре крыс при стимуляции гиппокампа и миндалины**

*Серкова Вера Владимировна (Москва, dulsin@mail.ru)*

Со времен открытия феномена долговременной потенциации (ДВП) многих исследователей волнует вопрос о ее связи с поведением. В настоящее время единого мнения на этот счет нет. Согласно большинству исследований, стресс полностью или значительно подавляет способность к выработке долговременной потенциации. Однако в большинстве таких исследований в качестве модели стресса используется популярная схема «acute stress», в которой перед выработкой ДВП животное помещают на приподнятую освещенную платформу. Стоит отметить, что использование такой модели является достаточно слабым стрессорным воздействием, которое ставит вопрос о причине невозможности получения ДВП.

Цель настоящей работы состоит в исследовании способности к выработке ДВП после сильного стрессорного воздействия, и оценке его влияния на фокальные вызванные потенциалы (ФВП), регистрируемые в префронтальной коре крыс при стимуляции миндалины и гиппокампа. В работе использовали 4 самцов крыс линии Вистар, которым предварительно была проведена операция по вживлению регистрирующих электродов в префронтальную кору каждого полушария и стимулирующих электродов вентральный гиппокамп и базолатеральное ядро миндалины. В качестве стрессорного воздействия использовали стандартную схему удара электрическим током, известную также как «footshock» схема. Для регистрации ФВП использовали импульсы длительностью 200 мкс

надпороговой величины (80–250 мА), которые подавали пачками по 10 импульсов (частота импульсов в паче 0,1 Гц) раз в 5 минут в течение часа до и после стрессорного воздействия (длительность тока 30–60 с, амплитуда 0,5–10 мВ). Стимуляцию миндалины и гиппокампа проводили поочередно. Для выработки ДВП использовали 1–2 серии высокочастотных импульсов (50 шт.) длительностью 200 мкс, с частотой 250 Гц.

Предварительно все животные были проверены на возможность выработки ДВП без стрессорного воздействия. Потенциация успешно вырабатывалась у всех животных, как при стимуляции гиппокампа, так и при стимуляции миндалины (50–300% прирост по амплитуде ФВП) и носила долговременный характер (от одного часа до полутора недель). Воздействие стресса приводило к длительному замыранию (до 15 мин) и большому числу дефекаций (6–9), однако, ДВП (те же 50–300% прироста амплитуды ФВП) удалось получить у всех животных при стимуляции гиппокампа и миндалины. Основное воздействие стресса выразилось в депрессии амплитуды ФВП (до 50%), регистрируемых при стимуляции гиппокампа у 2 животных, в то время как депрессия амплитуды ФВП при стимуляции миндалины обнаружена у одной крысы. Увеличения амплитуды ФВП после удара электрическим током не обнаружено ни у одного животного.

Таким образом, согласно полученным данным, стресс приводит к депрессии ФВП, регистрируемых, как при стимуляции гиппокампа, так и при стимуляции миндалины, однако не влияет на способность выработки ДВП.

#### **Кооперативная деятельность нейронов сенсомоторной области коры и дорзального ядра стриатума при «импульсивном» и «самоконтролируемом» поведении кошек**

*Сидорина Виктория Вячеславовна (Москва, vikuya85@mail.ru)*

Тенденция выбирать более ценное, но отставленное во времени подкрепление в психологической литературе называют проявлением «самоконтроля» в отличие от предпочтения короткоотставленного, но малооцененного, которое определяют как «импульсивность». Литературные данные указывают на связь хвостатого ядра, его дорзальной и вентральной областей, с моторным поведением. Ключевым различием является то, что нейроны дорзального стриатума контролируют выбор соответствующего целенаправленного поведения в ответ на предсказуемые во времени стимулы, в то время как роль вентральной части стриатума (прилежащее ядро) сфокусирована на подкреплении и мотивации.

В данной работе анализировали организацию взаимодействий между нейронами сенсомоторной коры и дорзальной частью хвостатого ядра в условиях уже выработанной модели поведения «активного выбора» разного по ценности пищевого подкрепления у кошек. Получены данные по четырем животным с различными типами поведения: «импульсивным», «амбивалентным» и с выраженной способностью к «самоконтролю». Всем животным в операциях были вживлены пучки никромовых полумикроэлектродов в область сенсомоторной коры и соответствующей проекции дорзальной части хвостатого ядра с целью многодневной регистрации мультиклеточной активности в условиях хронического эксперимента.

Анализ результатов показал, что число возбудительных связей в сенсомоторной коре у животных наиболее способных к выполнению длиннолатентных реакций с целью получения высокоценного пищевого подкрепления (способность к «самоконтролю») достоверно больше, чем у «амбивалентных» и «импульсивных». Число межнейронных взаимодействий в хвостатом ядре с ростом «импульсивности» имеет тенденцию к увеличению, так, этот показатель у «импульсивного» животного достоверно больше, чем у «самоконтролирующих». Число межнейронных взаимодействий между клетками сенсомоторной коры и хвостатым ядром было наибольшим у животного «импульсивного» типа. Результаты предполагают различную межнейронную организацию локальных сетей сенсомоторной коры и дорзального стриатума, а также распределенных корково-стриарных нейронных сетей у импульсивных и способных к «самоконтролю» животных.

*Работа поддержана грантом РФФИ проект №09-04-01012.*

**Половые различия в вызванной активности зрительной коры головного мозга человека при разгруппировании изображений**

*Славуцкая Анна Витальевна (Москва, slavanna@yandex.ru)*

Данные о топографии и временных характеристиках обработки информации о целых изображениях и составляющих их деталей разного уровня сложности важны для понимания последовательности операций зрительного опознания. С учётом данных о половых различиях функции зрительного опознания мы провели сравнительный анализ чувствительности зрительной коры к разгруппированию изображения у мужчин и женщин.

В исследовании приняли участие 32 испытуемых (20 мужчин и 12 женщин в возрасте от 22 до 25 лет) с нормальным зрением. Стимулами были чёрно-белые контурные изображения объектов окружающей среды, целые и разгруппированные (4 уровня разгруппирования на детали различной сложности от простых многоугольников до набора углов и отрезков линий). Регистрировали ВП зрительных областей. Разгруппирование изображения на более простые элементы по-разному влияло на амплитуду волн ВП у мужчин и женщин. Наиболее чёткие гендерные различия обнаружены для ранней позитивной волны Р1 (100 мс после стимула). У мужчин при разгруппировании изображения амплитуда волны Р1 достоверно нарастала. При этом в симметричных затылочных и левой теменной областях она прогрессивно увеличивалась при упрощении наблюдаемых элементов, и была максимальна на углы и отрезки линий, и преимущественно реагировала на смещение деталей в правой теменной области. У женщин чувствительность к разгруппированию обнаружена только на более поздних этапах анализа: амплитуда негативной волны Н1 (160-180 мс после стимула) в ВП правой нижненевисочной области снижалась на более простые элементы формы по сравнению с целым изображением. Изменения амплитуды Р3 в ответ на разгруппирование не обнаружили четкой зависимости от пола испытуемых.

Нам было интересно оценить наличие линейной и монотонной зависимости между записями участков ВП, зарегистрированных в различных отведениях в одни и те же моменты времени. Анализ электрических потенциалов во временном интервале от 50 до 250 мс после подачи стимула показал, что переход от целого изображения к простым деталям сопровождается уменьшением связности процессов как внутри зрительной коры (между затылочными и височными областями), так и между зрительными областями и лобной корой, участвующей в зрительном восприятии как управляющая и «облегчающая» структура. Эти изменения были отчётливы в группе мужчин и не наблюдались у женщин.

Эти результаты, а также данные о более ранней чувствительности зрительной коры мужчин к замене целого образа на составляющие его детали и более поздние реакции на разгруппирование у женщин позволяют предполагать существование гендерных различий в стратегии переработки информации о глобальных и локальных признаках изображения. В основе этого явления, вероятно, лежат различия в степени корковой специализации анализа разноуровневой информации о зрительном образе у мужчин и женщин.

*Работа поддержана Грантом РФФИ № 08-04-01382 и программой ОБН.*

**Аудиогенная постиктальная каталепсия крыс линии КМ как модель кататонии**

*Сурина Наталья Михайловна (Москва, Opera\_ghost@inbox.ru)*

Каталепсия – тоническая обездвиженность с пластическим тонусом мускулатуры и арефлексией. Она может сопутствовать эпилепсии, паркинсонизму, синдрому Турематта, кататоническим формам шизофрении и депрессии. К наиболее употребительным способам провокации каталепсии в эксперименте относятся фармакологические, однако при этом возникают сложности в интерпретации результатов, связанные с побочными эффектами препаратов. В качестве альтернативной модели каталепсии предлагается каталептическое замирание после развернутого аудиогенного судорожного припадка (АП) у крыс линии КМ. Аудиогенная постиктальная каталепсия (АПК) крыс линии КМ характеризуется отчётливой восковой гибкостью и большим числом поз, которые эти животные способны поддерживать. К определенным преимуществам данной модели относится чёткость и воспроизводимость феномена (каталепсия после припадка развивается в 100% случаев), возможность

количественной оценки показателей и неинвазивность провокации. Степень выраженности и длительность АПК крыс линии КМ находится в прямой зависимости от интенсивности предшествующего АП. Препараты, снижающие судорожную готовность, такие как леветирацетам, уменьшают и интенсивность сопряжённой каталепсии. Были получены данные о фармакологическом профиле АПК, подтверждающие её сходство с кататонией, наблюдавшейся при клинических отклонениях. Так, было показано, что у крыс КМ в период развития тонической фазы АП уровень норадреналина, дофамина (ДА) и ДОФУК в стриатуме достоверно повышены в сравнении с фоном. Методом приживленного микродиализа было выявлено, что в фоне у крыс линии КМ уровень дофамина и ДОФУК были достоверно выше, чем у нечувствительных к звуку крыс Вистар. Развитие «галоперидоловой» каталепсии у крыс линии КМ происходит при меньших дозах галоперидола, чем у крыс Вистар. Потенциально это доказывает дофаминергическую природу АПК у крыс линии КМ, а также объясняет её большую выраженность в сравнении с каталепсией у крыс других генотипов: в случае крыс линии КМ фоновый, вероятно генетически детерминированный дефицит функции или/и количества ДА-рецепторов суммируется с подъемом уровней ДА и ДОФУК вследствие припадка. На дофаминергический дефицит указывает также наличие спонтанной каталепсии у крыс линии КМ. В клинике терапию кататонии осуществляют при помощи бензодиазепинов и НМДА-антагонистов. В то же самое время, введение феназепама крысам линии КМ в дозе 0,015 и 0,030 мг/кг сопровождалось достоверным снижением выраженности АПК (более чем в 2 раза) на всех интервалах наблюдения без уменьшения интенсивности АП. Кроме того, введение неконкурентного НМДА-антагониста дизоцилпина в дозе 0,1 мг/кг приводило к почти полному нивелированию АПК без устранения судорожных компонентов припадка. *Работа поддержанна грантом РФФИ № 09-04-00481-а.*

### **Регионарная специфичность реакции глии на хронический стресс**

**Тишикина Анна Олеговна (Москва, anna.tishkina@phystech.edu)**

Ответом на длительное воздействие стрессирующего фактора является формирование общего адаптационного синдрома. Неспецифический ответ ЦНС на стрессирующий фактор проявляется в том числе и в нейровоспалении, которое на клеточном уровне есть активация глии. В этом процессе выделяются две стадии: активацию микроглии и, следующую за ней, активацию астログлии. На модели хронического эмоционально-болевого стресса мы хотели проследить вовлечение этих подпопуляций нервных клеток в процесс адаптации. В работе использовали 15 самцов крыс линии Вистар. 5 крыс служили контролем, остальные 10 животных ежедневно помещали на 5 часов в индивидуальные ячейки. Каждые полчаса им предъявляли 12 вспышек стробоскопа, последние 6 из которых с вероятностью 50% подкреплялись током (1–1,5 мА). Эта процедура сопровождалась белым шумом (65–70 дБ). После 14 дней крыс анестезировали и перфузировали 10% раствором параформальдегида. Блоки, приготовленные из ткани мозга, дегидратировали и заливали в парафин. Фронтальные 20-микронные срезы мозга монтировали на стекла, депарафинировали и подвергали иммуногистохимическому окрашиванию. Выявление астログлии проводилось по стандартному двухдневному протоколу с использованием антител к глиальному фибрillярному кислому белку (GFAP). Для выявления микроглии мы использовали Isolectin B4 – HRP Conjugate. Количественный анализ проводился на микрофотографиях полей гиппокампа CA1, CA3, а также хилуса зубчатой фасции. Выявление статистических различий между группами проводили с помощью U-критерия Манна-Уитни. После двухнедельной невротизации микроглиальные клетки невротизированных животных не отличались от клеток контрольных животных ни по визуальным характеристикам, ни по результатам количественного анализа. По данным количественного анализа различные области гиппокампа по-разному участвуют в стрессорном ответе. В поле гиппокампа CA3 плотность GFAP-позитивных клеток уменьшилась вследствие двухнедельной невротизации на 22,5% ( $p<0,05$ ). Также было выявлено 5%-ное увеличение площади отдельно взятой GFAP-позитивной клетки в хилусе зубчатой фасции ( $p<0,05$ ). Астроциты поля CA1 гиппокампа не претерпевали каких-либо заметных изменений в процессе адаптации к хроническому стрессу. Ранее выявленная для этой модели стабилизация окислительных

процессов к концу второй недели хронической невротизации говорит о наступлении второй стадии общего адаптационного синдрома по Г. Селье, а именно стадии долгосрочной адаптации. Считается, что микроглия активируется в первые часы после воздействия. Резидентное состояние микроглии при длительной невротизации может свидетельствовать о том, что её активация уже прошла. Видимо, на стадии долговременной адаптации наступает активация астроцитов, что мы и видим в гиппокампе. При этом реакция астроцитов регионарно специфична, что может говорить о различной степени вовлечения в стрессорный ответ различных структур. Обнаруженные нами изменения могут иметь большое значение для понимания процессов адаптации. *Автор благодарит Левшину И.П., Степаничева М.Ю. и Лазареву Н.А. за работу с животными и помочь с обработкой биологического материала.*

### **Роль активности дофаминергических нейронов в формировании эффектов сеансов обратной связи по характеристикам ЭЭГ Фокина Юлия Олеговна (Украина, Симферополь, fokina1985@gmail.com)**

В настоящее время распространенным средством коррекции ряда поведенческих расстройств и нарушений функционирования ЦНС стали процедуры с использованием метода обратной связи по характеристикам ЭЭГ (ЭЭГ-ОС). В то же время применение ЭЭГ-ОС в значительной степени базируется на эмпирических подходах, а нейрофизиологические механизмы корректирующего действия этого метода остаются неизученными. Одной из важнейших аминергических систем является дофаминергическая (ДА-) система мозга. Известно, что ДА-система оказывает существенное модуляторное действие на психофизиологические состояния животных и человека. Можно ожидать, что указанная система будет вносить определенный вклад в формирование текущего паттерна ЭЭГ, а, следовательно, и в появление эффектов тренингов ЭЭГ-ОС.

Исследование проводилось на шести кошках в два этапа. Сначала, с использованием внеклеточного отведения активности ДА-нейронов центрального тегментума (стереотаксические координаты: AP3 – AP4; L1 – L2; H4 – H5) и одновременного монополярного отведения ЭЭГ (активные электроды располагали на кости черепа над лобной, затылочной, височной левой и правой областями коры) изучали вклад активности 63 ДА-нейронов в формирование спектральной мощности (СМ) каждого ритма ЭЭГ. Выявлено, что частота разрядов ДА-нейронов статистически значимо положительно коррелирует с СМ альфа-ритма (в зависимости от места отведения коэффициент корреляции  $r$  составлял от 0,37 до 0,93) и бета-ритма ЭЭГ ( $r = 0,37-0,88$ ). Для СМ дельта-, тета-, гамма-ритмов ЭЭГ не было выявлено преобладания достоверных связей. Вторым этапом исследования явилось изучение изменений активности ДА-нейронов при проведении сеансов звуковой ЭЭГ-ОС. Животному во время такой записи подавался громкий «белый» шум. Компьютерная программа изменяла уровень громкости шума в зависимости от значения отношения СМ альфа/тета-ритмов (первая группа животных) или отношения СМ бета/тета-ритмов (вторая группа животных). При увеличении уровня альфа/тета или бета/тета отношения громкость звукового сигнала уменьшалась. В результате, животное обучалось управлять ритмами собственной ЭЭГ. В контрольной серии уровень громкости звукового сигнала менялся вне зависимости от СМ ритмов текущей ЭЭГ животного. При проведении сеансов ЭЭГ-ОС наблюдалось значимое увеличение отношения СМ альфа/тета-ритмов до  $129,7 \pm 7,3\%$  (относительно контрольных значений, принятых за 100%). Также выявлено увеличение отношения СМ бета/тета-ритмов до  $130,6 \pm 4,3\%$ . Активность ДА-нейронов достоверно увеличивалась до  $116,3 \pm 5,7\%$  и  $107,9 \pm 2,8\%$  при проведении альфа/тета и бета/тета тренингов, соответственно. Полученные данные позволяют предположить, что одним из решающих факторов, определяющих эффективность сеансов ЭЭГ-ОС, является создание повышенного уровня ДА в достаточно обширных регионах мозга, что приводит к одновременной модификации состояния больших нейронных объединений, связанных с формированием альфа- и бета-ритмов ЭЭГ.

*Автор выражает признательность профессору, д.б.н. Павленко В.Б. и с.н.с., к.б.н. Куличенко А.М. за помощь в проведении исследования.*

## ПОДСЕКЦИЯ «ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ»

### Динамика содержания каротиноидов в семенах *Brassica oleracea* L. под действием температурного стресса

*Алексейчук Иван Владимирович* (Белоруссия, Минск, antonio.palaza@gmail.com)

Каротиноиды являются антиоксидантами, которые защищают фотосинтетический аппарат растений от воздействия активных форм кислорода, благодаря способности к флуоресценции обеспечивают защиту от ультрафиолетового излучения, а также выполняют мембраностабилизирующую функцию. Однако физиологическая роль каротиноидов в семенах высших растений изучена недостаточно. Предполагают, что каротиноиды могут защищать клеточные мембранные внутренних структур семени от повреждения свободными радикалами и защищать семена от фотодинамического повреждения в период прорастания, когда происходит формирование фотосинтетического аппарата проростков.

Целью исследований являлось изучение содержания каротиноидов в семенах под действием температурного стресса. Объект – семена капусты белокочанной сорта Русиновка. Для создания температурного стресса влагосодержание семян увеличивали с 0,06 до 0,14 г воды/г абс.сух.в-ва, затем герметично запаковывали и инкубировали при 40°С в течение 7 и 10 суток.

Всхожесть семян снижалась соответственно длительности инкубации и составляла 82% через 7 суток инкубации и 12% через 10 суток по сравнению с 99% в контроле.

Анализ состава каротиноидов, проведенный методом ВЭЖХ, позволяет говорить о преобладании в составе каротиноидов семян капусты ксантофилла лютеина.  $\beta$ -каротин хроматографически детектировался в «следовых» количествах. В необработанных семенах содержание каротинов составляло 1,2 мкг/г абс.сух.в-ва, а ксантофиллов – 16,3 мкг/г. Под влиянием температурного стресса содержание каротинов практически не изменялось, а ксантофиллы накапливались. Содержание ксантофиллов увеличивалось в 2,3 и 2,8 раза через 7 и 10 суток инкубации семян при повышенной влажности и температуре воздуха, соответственно.

Таким образом, отмечен эффект накопления ксантофиллов в семенах капусты в ответ на температурный стресс. Работа проводилась в лаборатории роста и развития растений Института экспериментальной ботаники им. В.Ф.Курпевича НАН Беларусь, руководителем которой является академик Ламан Н.А. Выражаю благодарность сотрудникам лаборатории м.н.с. Борисевич О.В. и к.б.н., н.с. Задворновой Ю.В.

### Участие цГМФ в трансдукции высокотемпературного стрессового сигнала в проростках *Arabidopsis thaliana*

*Бакакина Ю.С., Колеснёва Е.В., Дубовская Л.В.* (Белоруссия, Минск, bakakinay@mail.ru)

В настоящее время не вызывает сомнения, что в клетках растений циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ) выступает в качестве биологически активной сигнальной молекулы. За последние несколько лет получены свидетельства относительно участия цГМФ в ответах растений на изменение условий окружающей среды. Показано, что содержание цГМФ в арабидопсисе увеличивается при солевом и осмотическом стрессе. Нами ранее было обнаружено, что окислительный стресс, индуцированный пероксидом водорода, вызывает увеличение эндогенного содержания цГМФ в листьях табака. Показано, что цГМФ синтезируется в клетках растений в ответ на действие монооксида азота (NO). Имеются косвенные данные об участии цГМФ совместно с NO в трансдукции сигналов при биотическом стрессе. Тем не менее, вопрос об участии цГМФ в качестве вторичного медиатора в реализации стрессовых сигналов в растениях остается предметом для изучения. В литературе отсутствуют данные о влиянии температурного, в частности, теплового, стресса на метаболизм цГМФ в клетках растений, неизвестен механизм трансдукции цГМФ-опосредованных сигналов при стрессе.

Таким образом, цель работы заключалась в установлении участия цГМФ в трансдукции высокотемпературного стрессового сигнала в растениях.

Впервые показано, что в формировании ответа растительной клетки на действие высокотемпературного стресса, принимает участие гуанилаткиназная сигнальная система, активируемая NO. Обнаружено, что в ткани проростков арабидопсиса в ответ на действие высоких температур происходит значительное быстрое увеличение эндогенного содержания NO и, как следствие, цГМФ. С помощью трансгенных растений арабидопсиса, экспрессирующих  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительный фотобелок апоеукорин в цитозоле клеток, было показано, что высокотемпературное стрессовое воздействие приводит к быстрому и значительному увеличению концентрации свободных ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле клеток ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ ), причем увеличение внутриклеточного содержания цГМФ предшествует росту  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ . Следовательно, действие высокотемпературного стресса на  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$  осуществляется по цГМФ-зависимому сигнальному пути при участии NO. При этом, увеличение содержания цГМФ происходит за счет активации фермента синтеза цГМФ – гуанилаткиназы, а в наработке NO участвует как NOS-подобный фермент, так и нитратредуктаза.

Полученные нами результаты позволяют конкретизировать механизм формирования клеточного ответа растений при действии высокотемпературного стресса. Так, впервые установлен механизм и характер взаимодействия между цГМФ-, NO- и  $\text{Ca}^{2+}$ - зависимыми сигнальными каскадами при действии высоких температур и показано, что вторичные медиаторы в цепи трансдукции данного стрессового воздействия действуют в следующей сигнальной последовательности: NO, цГМФ и  $\text{Ca}^{2+}$ .

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований, грант №Б08МС-003. Авторы выражают благодарность научному руководителю, академику НАН Беларуси Волотовскому И.Д. за помощь в планировании работы и обсуждении результатов.

**Анализ распределения и накопления никеля в тканях**  
**гипераккумулятора *Alyssum obovatum* (С.А. Mey.) Turcz. и исключателя *Alyssum montanum* L.**  
**Бакланов Илья Андреевич (Москва, baklanov\_ia@list.ru)**

Перспективной для восстановления загрязненных территорий является фиторемедиация – комплекс методов биологической очистки с использованием растений гипераккумуляторов, способных, в отличие от исключателей, накапливать тяжелые металлы в побеге. Для объяснения механизмов гипераккумуляции необходим сравнительный анализ накопления и распределения металлов в растениях-гипераккумуляторах и исключателях на разных уровнях организации, что являлось основной задачей работы.

В качестве объектов исследования были выбраны два контрастных вида из рода *Alyssum* L.: *A. obovatum* (С.А. Mey.) Turcz. (гипераккумулятор) и *A. montanum* L. (исключатель). Растения выращивали в водной культуре с добавлением 30 и 300 мкМ нитрата Ni для гипераккумулятора и 30 мкМ нитрата Ni для исключателя. Контролем служили растения, выращенные без добавления Ni. Выявление Ni проводили с помощью диметилглиоксимиевого метода (Серегин и др., 2003). О присутствии Ni судили по малиново-красному окрашиванию, накопление определяли полу количественно по интенсивности окрашивания. В контроле окрашивания тканей не наблюдалось.

В апикальной части корня гипераккумулятора Ni присутствовал в корневом чехлике, тогда как в меристеме и вышележащих тканях этой части корня он практически не выявлялся. У исключателя меристема и зона растяжения окрашивались интенсивно, в корневом чехлике Ni не обнаруживался. В средней части корня у обоих видов интенсивность окрашивания тканей была выше по сравнению с апикальной, при этом Ni выявлялся в клетках коры. В отличие от исключателя, у гипераккумулятора Ni был обнаружен в тканях центрального цилиндра. В базальной части корня у обоих видов накопление Ni было существенно меньше по сравнению с другими частями корня, но у гипераккумулятора окрашивание было более интенсивным по сравнению с исключателем.

В стеблях гипераккумулятора Ni накапливается в эпидерме, а также выявлялся в проводящих тканях. Интенсивность окрашивания тканей апикальной части стебля была выше, чем средней и базальной частей. В листьях гипераккумулятора Ni выявлялся

в проводящих тканях и накапливался в клетках эпидермы. Значительное накопление Ni происходило в основаниях и телях трихом, но не в их лучах. У исключателя Ni в тканях листа и стебля не выявлялся.

По сравнению с растениями, выращенными в присутствии низкой концентрации нитрата Ni (30 мкМ), при высокой концентрации (300 мкМ) интенсивность окрашивания тканей корня и побега гипераккумулятора *A. obovatum* была значительно выше, однако характер распределения Ni не изменился.

Таким образом, нами установлено, что различные ткани корня и побега гипераккумулятора и исключателя из рода *Alyssum* L. играют разную роль в накоплении Ni.

*Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ № 08-04-00031).*

### **Влияние цитокинина на функционирование электрон-транспортной цепи**

**в митохондриях семядолей люпина (*Lupinus luteus* L.)**

**Белозерова Н.С., Балашина Л.В. (Москва, n\_belozerova@list.ru)**

Дыхание, наряду с фотосинтезом, обеспечивает процессы роста и поддержания структурной биомассы, и осуществляется митохондриями. Эффект подавления дыхания в растениях цитокинином известен уже довольно давно. В 1980-82 году проф. Miller показал, что цитокинин эффективно подавляет цианид-устойчивый (альтернативный) путь дыхания в митохондриях различных растений.

В наших экспериментах на семядолях люпина желтого так же наблюдалось снижение активности альтернативного пути (АП) под действием экзогенного цитокинина. При обработке семядолей 22 мкМ БАП (бензиламинопурин) в течение 12 часов в темноте, активность АП в митохондриях снижалась более чем в 10 раз по отношению к контролю и составляла 0,5-1,5 нмоль $O_2$ /(мин мг белка). При этом БАП не оказывал существенного ингибирующего влияния на скорость окисления с участием основного цитохромного пути (ЦП), а также на параметры окислительного фосфорилирования (величину ДК (дыхательный контроль) и коэффициента АДФ/О). При действии гормона на свету уровень активности АП несколько повышался. Свет может оказывать свое влияние через систему фитохромов. Влияние оказывают также активные формы кислорода, изменение углеводного статуса клетки и фотодыхание, которые связаны с активированным светом фотосинтезом.

Уровень белка альтернативной оксидазы (АОХ) в митохондриях семядолей определяли с помощью моноклональных антител, любезно предоставленных проф. Элтоном (Университет Небраска, США). После обработки семядолей цитокинином в темноте уровень белка АОХ в выделенных митохондриях снизился, тогда как при обработке семядолей гормоном на свету, уровень белка повысился. Полученные результаты согласуются с данными по общей активности АП. Однако следует заметить, что, несмотря на повышенное содержание белка АОХ при одновременном действии цитокинина и света, общая активность АП не превышала активности в контрольном варианте. Это говорит о том, что цитокинин влияет не только на содержание белка-фермента, но и на его активность.

Для изучения возможных путей регуляции гормоном АП и ЦП на транскрипционном уровне и на уровне содержания мРНК выбран ряд митохондриальных генов (*AOX*, *nad3*, *nad6*, *nad9*, *cox1*, *cox3*, *cctB*, *cob*, *atp9*), кодирующих белки различных комплексов электрон-транспортной цепи.

### **Влияние импульсного магнитного поля на перекисный гомеостаз зелёных клеток гороха**

**Васильева Е.А., Яшина Е.С. (Нижний Новгород, katelyn@bk.ru)**

В данный момент широко обсуждаются возможные механизмы влияния слабых переменных магнитных полей на биологические объекты и биохимические процессы. Показано воздействие подобных полей на скорость гравитропической реакции через *Ca*-зависимые ферменты и процесса гидролиза ряда белков и пептидов; на набухание семян через усиление активности эстераз (Аксенов и др., 2001; Белова, Леднев, 2001). Более тонкие механизмы воздействия магнитных полей мало изучены. Целью исследования стало

изучение изменения состояния перекисного гомеостаза клеток гороха в ответ на действие импульсного магнитного поля (ИМП).

Объектом исследования служили 2-х недельные растения гороха *Pisum sativum* L., выращенные в лабораторных условиях. Обработке полем подвергались целые растения. ИМП (пачки из 20 импульсов длительностью 227 мкс с амплитудой 1500 мкТЛ, следующих с частотой 15 Гц) создавали с помощью генератора фирмы Electro-Biology Inc., используемых в ортопедических клиниках. Длительность экспозиции 30, 60 и 120 мин, контролем служили растения, выдержаные в течение экспозиции в условиях нормального геомагнитного поля. Для оценки состояния перекисного гомеостаза хлоропластов определяли содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) – диеновых конъюгатов (ДК) и оснований Шиффа (ОШ), активности аскорбатпероксидазы (АП), содержание аскорбиновой кислоты (АК). Дополнительно проводили определение активности каталазы и глутатионтрансферазы (ГТ).

В ответ на действие ИМП в хлоропластах содержание ДК практически не изменялось, уровень ОШ колебался около контрольного, достоверно уменьшаясь на 10% после 120-минутной экспозиции. Состояние компонентов антиоксидантной системы на протяжении всей обработки было близко к контрольному значению, лишь 60-минутная экспозиция достоверно увеличивала активность АП на 40% и содержание АК на 50%.

Изменение активности каталазы носило двухфазный характер: более короткая 30-минутная экспозиция на 30% увеличивала активность фермента, тогда как более длительные воздействия снижали этот показатель относительно контрольного уровня на 10% (60 мин) и 30% (120 мин). Активность ГТ оставалась без изменения.

Т.о., импульсное магнитное поле вызывало изменение антиоксидантного компонента перекисного гомеостаза как на уровне пластид, так и на уровне клетки. При этом пластиды оказались менее чувствительными к магнитному полю, позже реагируя на воздействие. Длительное воздействие (120-мин) вызывало спад в активности каталазы, в то время, как активность АП и содержание АК в хлоропластах лишь возвращались к контрольному уровню. Отсутствие изменений в уровне продуктов ПОЛ мембран хлоропластов подтверждает меньшую чувствительность пластид к изучаемому воздействию.

#### **«Искусственные семена» как способ получения экологически чистого лекарственного сырья и сохранения исчезающих видов растений Вдовиченко Мария (Москва, verlioka@gmail.com)**

Основное внимание исследователей, работающих с растительными культурами *in vitro* при получении так называемых «искусственных семян» (ИС), уделяется изучению создания соматических эмбрионов, получаемых из пазушных и верхушечных стеблевых почек наземных частей растений. До последнего времени существовали лишь единичные данные японских исследователей по получению ИС из корневых сегментов.

В настоящей работе было изучено влияние инкапсулирования в гелевую оболочку и иммобилизации сегментов изолированно растущих pRi T-ДНК трансформированных корней лекарственного растения шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis* Georgi) на морфологические, анатомические, физиологические и биохимические особенности возобновляемых из ИС корневых культур. Ценность выбранного растения определялась широким спектром фармакологической активности флавонов, образующихся в его корнях, и острым недостатком лекарственного сырья для производства эффективно действующих препаратов.

ИС получали инкапсуляцией фрагментов стерильных корней в полисахаридный гель (альгинат) с мембранный оболочкой, предотвращающей испарение воды. Такие семена сохраняли жизнеспособность после длительного хранения их при температуре +4°C. При переносе ИС на питательную среду в условиях +26°C активизировались корневые меристемы инкапсулированных фрагментов, что на 3–4-й день приводило к прорастанию корней через альгинатную оболочку и образованию хорошо растущей массы ветвящихся корней. Ростовая активность и масса обновлённой корневой культуры, полученной из ИС, в течение одного пассажа почти в 2 раза превышала массу исходной культуры корней того

же возраста. При этом общее содержание флавонов в пересчете на 1 г сухой корневой массы сохранялось примерно на том же уровне. С помощью ИС было успешно проведено оздоровление растительного материала шлемника, проявлявшего иногда положительную реакцию при тестировании на контаминацию. Для этого апикальные корневые сегменты заключали в альгинатную оболочку, содержащую антибиотик.

При изучении морфологических и анатомических особенностей корневых культур, возобновлённых из ИС, было отмечено интенсивное формирование хлоропластов в клетках корней, культивируемых в условиях освещения. Определено общее количество хлорофилла и соотношение хлорофиллов *a* и *b*, а так же содержание флавонов в зелёных корнях. Обнаруженные физиологические изменения при определённых условиях могут стать предпосылками к регенерации целого растения шлемника, размножающегося исключительно семенами, что может обеспечить разработку микроклонального способа получения целых растений и способствовать сохранению естественных ресурсов исчезающего лекарственного растения. Применение ИС может стать также необходимым этапом в технологическом процессе планируемого промышленного выращивания корней шлемника, облегчающим транспортировку и подготовку стерильных маточных эксплантов, помещаемых в биореактор.

**АТФазы плазматической мембрany  
галотолерантной микроводоросли *Dunaliella maritima*: кинетические характеристики**  
Генатулина Айла Рахимбердиевна (Москва, [ailagr@rambler.ru](mailto:ailagr@rambler.ru))

Морская одноклеточная водоросль *Dunaliella maritima* (класс *Prasinophyceae*) способна существовать при значительных колебаниях солености окружающей среды (от 0,05 NaCl до 3 M NaCl) и представляет собой удобный модельный объект для исследования механизмов  $\text{Na}^+$ -гомеостатирования цитозоля (Oren, 2005). *D. maritima* не имеет центральной вакуоли и за поддержание оптимальных внутриклеточных концентраций  $\text{Na}^+$  у нее отвечают ион-транспортирующие системы плазматической мембрany (ПМ). Основная роль здесь, по-видимому, принадлежит  $\text{Na}^+$ -транспортирующей АТФазе, которая сравнительно недавно была обнаружена у этой водоросли (Popova et al., 2005). Показано, что наряду с  $\text{Na}^+$ -АТФазой, в ПМ *D. maritima* функционируют и другие транспортные системы, вовлеченные в поддержание ионного гомеостаза:  $\text{H}^+$ -АТФаза и  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -антитпортер (Popova и др.).

В настоящей работе исследовали транспортные активности  $\text{Na}^+$ -АТФазы и  $\text{H}^+$ -АТФазы ПМ *D. maritima*. Эксперименты проводили на инвертированных везикулах ПМ, выделенных из клеток водоросли. Активность  $\text{H}^+$ -АТФазы определяли по АТФ-индуцируемому закислению везикулярного люмена, которое регистрировали с помощью Арг-чувствительного оптического зонда акридинового оранжевого. Активность  $\text{Na}^+$ -АТФазы определяли по АТФ и  $\text{Na}^+$ -зависимой генерации электрического потенциала ( $\Delta\psi$ ) на везикулярной мембране; регистрацию  $\Delta\psi$  осуществляли с использованием  $\Delta\psi$ -чувствительного зонда оксонола VI.

Установлено, что обе АТФазы работают в широком диапазоне pH. Максимальная активность  $\text{H}^+$ -АТФазы наблюдалась при pH 6,5-7,0,  $\text{Na}^+$ -АТФазы – при pH 7,5-8,0. Обе АТФазы *D. maritima* относятся к классу АТФаз Р-типа и требуют для своей работы наличия ионов  $\text{Mg}^{2+}$ , в связи с чем исследовали зависимость активности ферментов от концентраций  $\text{Mg}^{2+}$  и АТФ. Исследовали также зависимость активности  $\text{Na}^+$ -АТФазы от концентраций  $\text{Na}^+$ . Полученные зависимости не подчиняются простой кинетике Михаэлиса-Ментен и характерны для аллостерических ферментов (Курганов, 1978).

Наблюдаемые отклонения кинетик  $\text{Na}^+$ -АТФазы и  $\text{H}^+$ -АТФазы от кинетики Михаэлиса-Ментен позволяют предположить, что: (1) исследуемые АТФазы функционируют в мембране в олигомерных формах (димеры, тетramerы), либо (2) существует несколько изоформ исследуемых ферментов.

Благодарю своих научных руководителей Попову Ларису Геннадьевну и Балнокина Юрия Владимировича за сотрудничество и полученный от них бесценный исследовательский опыт.

**Фенотипические изменения у пшеницы (*Triticum aestivum* L., сорт Инна)  
в связи с условиями азотного снабжения**

**Глазунова Марина Андреевна (Москва, marinaglazunova@mail.ru)**

Условия азотного снабжения являются важным фактором для роста и развития растений. Азот может поступать в растение в форме нитрата ( $NO_3^-$ ) и аммония ( $NH_4^+$ ), что обуславливает разную стратегию его ассимиляции в клетке и ведет к адаптивным перестройкам на уровне целого растения.

Исследовалось влияние условий азотного питания на рост и развитие растений пшеницы (*Triticum aestivum* L., сорт Инна). Растения выращивали на питательной среде, содержащей нитрат 3 мМ ( $NO_3^-$  вариант), аммоний 3 мМ ( $NH_4^+$  вариант), или не содержащей азот ( $-N$  вариант), при температуре – день/ночь 22/18°C, освещенности 110 мкМ  $m^{-2} s^{-1}$ , фотопериоде 16 ч. В корнях и втором листе 21-дневных проростков изучалась активность ростовых процессов, уровень фотосинтеза (в листе), дыхания, уровень активности некоторых ферментов-антиоксидантов, накопление МДА (малонового диальдегида). Также оценивалась устойчивость проростков к стрессу, в качестве стрессора использовался  $Zn$  (5 мМ  $ZnSO_4$  на семь суток).

Показано, что условия азотного снабжения, вызывают различия, проявляющиеся на всех уровнях структурно-функциональной организации растений. В зависимости от условий азотного питания у  $-N$  растений уменьшалось содержание восстановленного азота, а у растений  $NH_4^+$  варианта увеличивалось содержание хлорофилла и особенно белка по сравнению с вариантом, растущим на нитрате. Уровень фотосинтетической активности 2-го листа сохранялся одинаковый у растений всех вариантов. При сохранении почти одинакового для всех вариантов уровня дыхания, менялся вклад альтернативного дыхания в общее дыхание. Уровень альтернативного дыхания был выше в корнях и втором листе растений  $-N$  и  $NH_4^+$  вариантов. Уровень активности ферментов-антиоксидантов зависел от условия азотного снабжения. Активность СОД (супероксид-дисмутазы) наименьшей была в листе и корнях  $NH_4^+$  варианта, наибольшей у  $-N$  варианта. Активность глутатионредуктазы наименьшей была в корнях и листе  $-N$  варианта, наибольшей у листа  $NO_3^-$  варианта и корней  $NH_4^+$  варианта. Наименьшая активность гвяяколпероксидазы наблюдалась в листе и корнях  $NO_3^-$  варианта, наибольшая в листе у  $-N$  варианта и в корнях  $NH_4^+$  варианта. Активность катализы в листе наибольшей была у  $NO_3^-$  варианта, наименьшей – у  $-N$  варианта; в корнях: наибольшая – у  $-N$  варианта, наименьшая у  $NH_4^+$  варианта.

В результате воздействия избытка  $Zn$  растения всех вариантов испытывали стресс. Одним из признаков стресса является накопление МДА. В наибольшей степени оно увеличивалось у растений  $-N$  варианта, в наименьшей у  $NH_4^+$  варианта, при том, что наибольшее количество МДА исходно было у растений  $NH_4^+$  варианта.

Таким образом, исследования показали, что на рост, развитие растений, а также активность антиоксидантной защиты влияет не только наличие азота в среде, но и форма, в которой он поглощается растением.

**Изменение устойчивости к фитопатогенам у трансгенных растений табака с геном *hmg1*  
Ермощин Александр Анатольевич (Екатеринбург, ertosh@el.ru)**

Ген *hmg1* отвечает за синтез в клетках растений мевалоновой кислоты, с которой начинается ацетатно-мевалонатный путь синтеза изопренонидов. На данном метаболическом пути синтезируются такие важные для растения вещества, как фитогормоны (цитокинины и брассиностериоиды), фитоалексины, фитонциды, фитостерины. Изменения в синтезе этих веществ могут влиять на развитие устойчивости растений к фитопатогенам и фитофагам.

Ранее в лаборатории биотехнологии растений ФИБХ (г. Пущино) получены трансгенные растения табака, экспрессирующие ген *hmg1* из *Arabidopsis thaliana* в прямой и обратной ориентациях относительно вирусного промотора CaMV 35S. Опыты проводили на листовых дисках этих растений, выращенных на станции искусственного климата «Биотрон». Экспланты листьев заражали бактериальными и грибными патогенами с широким спектром хозяев – *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas syringae* и *Sclerotinia sclerotiorum*. Степень

поражённости дисков оценивали визуально по появлению некротических пятен и хлорозу, снижению содержания фотосинтетических пигментов и возрастанию уровня перекисного окисления липидов. Выявлено повышение устойчивости эксплантов растений со смысловой копией гена *hmg1* ко всем использованным фитопатогенам. У эксплантов растений с антисмысловой копией *hmg1* обнаружено возрастание чувствительности к этим патогенам по сравнению с эксплантами контрольных растений. В биотесте на антибактериальную активность экстракты всех трансгенных растений не оказывали ингибирующего действия на рост клеток *E. carotovora* и *Ps. syringae*. Таким образом, не выявлено связи полученной устойчивости у «смысловых» растений с накоплением в них фитонцидов.

Устойчивость к патогенам часто бывает связана с изменениями в анатомии листа. Микроскопия срезов листа показала, что толщина верхнего и нижнего эпидермиса не отличалась между вариантами. Упаковка клеток в листе растений со смысловой копией гена *hmg1* была более рыхлая. Обнаруженные изменения в анатомическом строении листьев не объясняют устойчивости к фитопатогенам в «смысловых» растениях и восприимчивости – в «антисмысловых».

Ранее нами показано увеличение количества хлорофиллов на 12–16% в листьях растений со смысловой копией гена *hmg1* по сравнению с контролем, что указывало на возрастание в них уровня цитокининов. Снижение fertильности у трансгенных растений с антисмысловой копией гена *hmg1* вероятнее всего вызвано уменьшением количества брашиностероидов. Предполагается, что изменение устойчивости трансгенных растений табака к исследуемым патогенам также может быть связано с количеством брашиностероидов, участвующих в формировании иммунитета растений, и цитокининов, замедляющих старение листа. Для подтверждения данной гипотезы проводится определение количества фитогормонов в исследуемых линиях растений. Работа выполнена при финансовой поддержке Российской фонда фундаментальных исследований (проект № 09-04-00980) и ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России», ГК № П2364. Автор выражает искреннюю благодарность за помощь в проведении работы и написании тезисов своим руководителям – к.б.н., н.с. Алексеевой В.В. и д.б.н., с.н.с. Рукавцовой Е.Б. (лаборатория биотехнологии растений, ФИБХ, г. Пущино).

**Молекулярно-биохимические основы создания  
экологически безопасных средств защиты растений  
Закина Евгения Александровна (Уфа, yarullina@bk.ru)**

Познание молекулярных механизмов формирования защитных реакций растений, индуцируемых соединениями различной природы, открывает перспективы для создания экологически безопасных иммуностимуляторов нового поколения. Процесс распознавания патогенов в растениях осуществляется с помощью сигнальных систем, которые определяют реакцию клеток на различные химические и физические воздействия. Число веществ, выполняющих функции медиаторов сигнальных систем, постоянно возрастает. Такую роль могут выполнять жасмоновая (ЖК) и салициловая (СК) кислоты, окись азота, перекись водорода и некоторые другие соединения. Эффективными элиситорами защитных реакций растений являются многие природные олигосахариды, в первую очередь структурные компоненты клеточных стенок грибов (гликан, хитин, хитозан) и растений (олигогалактурониды). Элиситорные свойства хитина проявляются в усиении синтеза фитоалексинов, в повышении активности хитиназы,  $\beta$ -глюканазы, ФАЛ, ингибиторов протеиназ, пероксидазы. С использованием ДНК-чипов у *Arabidopsis thaliana* выявлено до 60 генов, реагирующих на добавление хитоолигосахаридов (ХОС). Среди них быстрой (10–30 мин) и высокой экспрессией характеризовались гены, ответственные за синтез регуляторных белков, участвующих в транскрипции и передаче информации.

В данной работе анализировали воздействие сигнальных молекул и элиситоров (СК, ЖК и ХОС) на защитный потенциал пшеницы *T. aestivum* L. при инфицировании возбудителем септориоза *Septoria nodorum* Berk. У части 7-суточных проростков пшеницы срезали листья и помещали их во влажную камеру на фильтровальную бумагу, смоченную в растворе бензимидазола (40 мг/л). Отрезки листьев инокулировали суспензией пикноспор *S. nodorum*

из расчета 106 спор/мл. ХОС, СК и ЖК в соответствующих концентрациях (1мг/л, 0,05мМ и  $10^{-7}$ М) использовали для замачивания семян пшеницы. Через 24, 48, 72 ч после инфицирования провели анализ процессов продукции перекиси водорода, супероксидного радикала, активности оксалатоксидазы, пероксидазы, уровня экспрессии гена анионной пероксидазы в растениях.

Проведенное исследование показало, что предобработка растений пшеницы ХОС, СК и ЖК снижает степень роста и развития возбудителя септориоза в растительных тканях, усиливает продукцию активных форм кислорода, оказывает модулирующее действие на активность оксидоредуктаз, индуцирует экспрессию гена анионной пероксидазы. Способность различных соединений стимулировать образование  $H_2O_2$  в растительных тканях может быть использована для быстрого и эффективного скрининга экологически безопасных средств защиты растений. Транскрипционную активность гена анионной пероксидазы предлагается использовать в качестве чувствительного теста на устойчивость растений пшеницы к фитопатогенам.

*Работа выполнена при частичной финансовой поддержке АВЦП «Развитие научного потенциала высшей школы» №2.1.1/5676. Благодарю своего научного руководителя д.б.н. Любовь Георгиевну Ярглину за помощь и поддержку на всех этапах работы.*

#### **Скоординированные ответы генов двух групп высокомолекулярных хелаторов на избыток меди в растениях рапса**

*Иванова Елена Михайловна (Москва, ilma25@mail.ru)*

Обязательным звеном детоксикации поступающих в клетку тяжелых металлов (ТМ) является их хелатирование, важную роль в этом процессе играют высокомолекулярные лиганды – фитохелатины (PCs) и металлотионеины (MTs). PCs – это цистеин обогащенные полипептиды, ферментативно синтезируемые из глутатиона с помощью фитохелатинсинтазы (PCS). MTs – небольшие цистеин богатые белки, кодируемые обширным семейством генов. К настоящему времени данные об участии этих двух групп лигандов в детоксикации ТМ весьма противоречивы, сильно различающиеся как для разных видов растений, так и для отдельных ТМ.

В корнях и листьях растений рапса (*Brassica napus* L.), росших на среде с 50 и 150 мкМ  $CuSO_4$  (контроль – 0,25 мкМ), изучали экспрессию генов фитохелатинсинтазы *BnPCS* и двух генов металлотионеинов *BnMT1* и *BnMT2*. Содержание мРНК оценивали с помощью ОТ-ПЦР, используя в качестве внутреннего стандарта ген *18SrRNA*, к достоверным различиям относили не менее чем двукратные изменения.

Концентрация меди в корнях превысила уровень контрольных растений более чем в 2 раза уже через 3 и 6 ч на среде с 150 мкМ или 50 мкМ  $CuSO_4$ , соответственно, достигая в ходе 10 дней опыта 6-8-кратного уровня. Достоверное увеличение содержания мРНК *BnMT1* наблюдалось уже через 3 ч, а на 7-10 сутки содержание транскриптов этого гена в 5-7 раз превышало уровень контроля. Органоспецифичность и функциональная значимость *BnMT1* при воздействии избытка меди была подтверждена отсутствием его экспрессии в листьях, а также значительно более низким содержанием транскриптов гена *BnMT2* в клетках корней.

На начальных этапах роста растений рапса на среде с избытком меди аккумуляция её в листьях происходила медленнее, чем в корнях, но уже к 6 ч концентрация меди в листьях достоверно превосходила уровень растений контрольного варианта. Напротив, увеличение содержания транскриптов *BnMT2* наблюдалось лишь после 24 ч, а максимальное (2,8-кратное) превышение над контролем было достигнуто в листьях на 5 сутки. Однако, уже в течение первых часов, в условиях отсутствия экспрессии *BnMT1* и лишь небольшого увеличения содержания мРНК *BnMT2*, было установлено увеличение транскриптов гена *BnPCS*, содержание которых к 24 ч превысило в 5-7 раз уровень контроля.

Полученные данные позволяют предполагать, что в детоксикации избытка меди в растениях рапса принимают участие обе группы высокомолекулярных хелаторов – как металлотионеины, так и фитохелатины. Скоординированность экспрессии генов *BnMT1* и *BnMT2* и гена *BnPCS* проявилась в увеличении мРНК *BnPCS* на ранней фазе воздействия

меди, тогда как содержание транскриптов генов *BnMT1* и *BnMT2* достоверно увеличивалось на последующих этапах адаптации растений рапса к избытку меди в среде.

**Экстраклеточные пероксидазы *Triticum aestivum*:  
роль в метаболизме АФК при абиотическом стрессе**  
*Ишемгулова Айгуль Валерьевна (Казань, aishemgulova@mail.ru)*

Активные формы кислорода (АФК) образуются в клетках растений и животных как в нормальных условиях, так и при стрессе. В метаболизме АФК принимает участие целый ряд редокс-ферментов, в том числе пероксидазы. В растениях пероксидазы способны не только детоксцировать перекись водорода, но и образовывать АФК при стресс-индуцированном окислительном взрыве, что говорит о многообразной регуляторной роли этих ферментов в поддержании клеточного гомеостаза.

Целью настоящего исследования явилось изучение активности пероксидаз, связанных разными типами связей с клеточной стенкой, а также характеристика генов пероксидаз в корнях пшеницы. Спектр изоформ растительных пероксидаз очень широк: в геноме арабидописиса обнаружено 73 гена, а в геноме риса 138 генов. В геноме пшеницы точное количество генов пероксидаз до настоящего времени не определено. Пероксидазы клеточной стенки относятся к третьему классу пероксидаз (секреторные пероксидазы) и имеют N-терминальную сигнальную последовательность.

Обнаружено, что ионно-связанные пероксидазы корней обладают супероксид-сингтазной активностью, наряду со способностью детоксцировать перекись водорода. Экстраклеточная пероксидаза с молекулярной массой 37 кДа, активность которой стимулировалась при раневом стрессе корней более, чем в тридцать раз, была очищена и частично секвенирована (Minibaeva et al., 2009). Биоинформатический анализ белков экстраклеточных пероксидаз с использованием базы данных NCBI выявил наличие 9 белков с полной и 21 белка с частичной гомологией к секвенированному участку белка. Соответствующие гены пероксидаз содержат по 2 или 3 интрона, которые расположены строго консервативно внутри гена, но не имеют гомологий в нуклеотидных последовательностях. Наряду с традиционными инtronами (GT/AG), изучаемые гены содержат нетрадиционные (GC/AG и GA/AG) интраны. Известно, что инtron GC/AG может подвергаться сплайсингу (Baga et al., 1995), однако по инtronу GA/AG таких данных нет. Мы предполагаем, что подобная модификация гена может привести к нарушению процессинга и в результате к потере способности клеток синтезировать функционально-активный белок.

Высокая реактивность экстраклеточных пероксидаз и многообразие их генов являются ключевыми факторами регуляции редокс-ответа растительных клеток на стрессовые воздействия. Работа поддержанна грантом РФФИ № 09-04-01394.

**Возможности недеструктивного анализа пигментов растений  
с использованием портативного оптоволоконного рефлектометра**  
*Кизеев Алексей Николаевич (Анатиты, ank1999@yandex.ru)*

Пигментный аппарат растений является чувствительным индикатором их физиологического состояния. В большинстве физиолого-биохимических исследований содержание пигментов в растениях определяют в экстрактах с помощью спектрофотометрического анализа. В последнее время весьма привлекательным является возможность недеструктивного анализа пигментов по спектрам отражения интактных тканей. Группой ученых под руководством д.б.н., проф. М.Н. Мерзляка при участии зарубежных коллег была разработана общая методология анализа пигментов растений с использованием метода спектроскопии отражения. Основной задачей данной работы являлся поиск подходов к использованию этой методологии, с использованием портативного оптоволоконного рефлектометра.

Объектами исследований послужили листья растений бересклета (*Betula verrucosa*), кизильника (*Cotoneaster alaunicus*), а также хвоя голубой ели (*Picea pungens*). Образцы (общее число более 500) отбирались в течение осенне-зимнего периода 2009 г. с деревьев, растущих вблизи биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. В работе использовали портативный оптоволоконный рефлектометр модульной конструкции,

включающий источник света LS-1 (OceanOptics, США) с галогенной лампой накаливания, спектрорадиометр USB2000 (монохроматор № 3, OceanOptics, США), оптоволоконный зонд на основе разветвленного световода (OceanOptics, США) и держатель образцов собственного изготовления, обеспечивающий падение измеряющего луча на образец под углом 45° либо 90°, а также программное обеспечение OOBase32 (OceanOptics, США). Для каждого из образцов записывали спектр отражения в видимой области (400-700 нм) против стандарта из BaSO<sub>4</sub> с использованием рефлектометра вышеописанной конструкции, после чего аналитически определяли содержание хлорофиллов, каротиноидов и (в случае кизильника) антоцианов.

В результате проведенной работы был получен массив данных, содержащих информацию о вариации коэффициентов отражения в видимой области спектра и пигментного состава листьев или хвои изученных видов растений. Области спектра с максимальной чувствительностью коэффициентов отражения к содержанию хлорофиллов были найдены в дальней красной и ближней инфракрасной (700–720 нм), а также в зеленой (550–570 нм) областях. Поглощение антоцианов (плечо или полосы около 550–600 нм) обычно проявлялись на фоне значительного поглощения хлорофиллов и каротиноидов. Отмечено, что в красных листьях кизильника при минимальных значениях хлорофиллов, антоцианы накапливались в большом количестве, и практически полностью определяли низкое отражение в зеленой части спектров. Указанный метод удобен для экспресс-анализа содержания пигментов в полевых условиях. Были адаптированы спектральные индексы ChlRI (для оценки содержания хлорофиллов), ARI (для оценки содержания антоцианов), BRI (степень развития побурения при повреждении), PSRI (соотношение каротиноидов и хлорофиллов) для использования с портативным оптоволоконным рефлектометром при полевых измерениях. Тезисы доклада основаны на материалах исследований, проведенных в рамках гранта Российского фонда фундаментальных исследований «Мобильность молодых ученых» 2009 г. (№ 09-04-90753). Автор выражает глубокую признательность старшему научному сотруднику кафедры биотехнологии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова, д.б.н. А.Е. Соловченко за помощь в проведении экспериментов и обсуждении полученных результатов.

### Роль эндогенной АБК в индуцируемой салициловой кислотой экспрессии *TADHN* гена дегидрина пшеницы при засолении

Ключникова Екатерина Олеговна (Уфа, shakirova@anrb.ru)

Дегидрины принадлежат к LEA-белкам (Late Embryogenesis Abundant) – белкам позднего эмбриогенеза, накапливаемых в ходе нормального онтогенеза в зародышах семян при их обезвоживании. Индукция синтеза LEA белков, в том числе и дегидринов, наблюдается и в тканях вегетирующих растений при разнообразных вызывающих нарушение водного режима клетки стрессовых воздействиях, таких как засуха, засоление, гипотермия, что может свидетельствовать о вовлечении дегидринов в формирование защитных механизмов к перечисленным выше стрессовым факторам, в частности и к засолению. Ранее нами было выявлена чувствительность АБК-индуцируемого *TADHN* гена дегидрина пшеницы к засолению. Известно, что важная роль в предотвращении негативного действия засоления принадлежит салициловой кислоте (СК). В то же время, ключевая роль в переключении жизненных программ на стрессовые принадлежит абсцисовой кислоте (АБК). В связи с этим цель нашей работы заключалась в исследовании роли эндогенной АБК в индуцируемой натрий хлоридным засолением и СК экспрессии *TADHN* гена дегидрина в растениях пшеницы. Экспрессионную активность гена дегидрина анализировали методом ОТ ПЦР. В результате проведенных экспериментов была выявлена чувствительность *TADHN* гена дегидрина пшеницы и к засолению и к СК. Однако в подвергнутых действию хлорида натрия проростках пшеницы, уровень экспрессии исследуемого гена был намного выше по сравнению с обработанными СК. Обращает на себя внимание тот факт, что при одновременной обработке проростков СК и хлоридом натрия мы наблюдали взаимное усиление их действия, так как в этом случае уровень накопления транскриптов *TADHN* гена дегидрина существенно превышал сумму эффектов салициловой кислоты и засоления.

Предобработка проростков пшеницы эффективным ингибитором синтеза АБК флуоридоном полностью ингибировала СК-индуцируемое накопление транскриптов гена легидрина и заметно снижала вызванное одновременной обработкой 2%-м NaCl и СК усиление его экспрессии. Полученные данные указывают на ключевую роль эндогенной АБК в регуляции СК-индуцируемой экспрессии *TADHN* гена легидрина в растениях пшеницы в условиях засоления. *Работа проведена в рамках программы гранта президента РФ для финансовой поддержки ведущих научных школ (НШ-915.2008.4.).*

### **Ионообменная способность изолированных клеточных стенок по ионам никеля** **Комаринец Ольга Владимировна (Москва, Barquillo@ya.ru)**

В настоящее время уровень загрязнения окружающей среды, в том числе и тяжелыми металлами (ТМ), возрастает с каждым годом, и поэтому решение многих экологических вопросов становится не только актуально, но и необходимо для сохранения жизни на Земле. Известно, что растения не только поглощают, но и накапливают ионы металлов в тканях даже при относительно низком их содержании в почве. Именно это свойство позволяет с высокой степенью эффективности использовать растения для удаления из почвы и воды тяжелых металлов и радионуклидов. Многие ученые отмечают, что растительная клеточная стенка является компартментом, который с высокой эффективностью защищает клетку от воздействия повышенных концентраций ионов металлов в наружной среде, однако количественных данных, характеризующих адсорбционную способность клеточной стенки по ионам токсичных металлов, до настоящей работы получено не было. Цель работы состояла в количественной оценке ионообменной способности клеточных стенок по ионам никеля (SNi), изолированных из тканей растений разных видов.

Объектами исследования служили растения пшеницы, маша, нута, вики, выращенные на питательной среде Прянишникова; сведы и шпината, выращенные на питательном растворе Робинсона. Определение SNi проводили из водных растворов с концентрацией ионов никеля  $10^{-3}$  М. Величину SNi оценивали по изменению концентрации ионов в растворе после контакта с клеточной стенкой, и по элюированию иона из клеточной стенки раствором 0,1 М HCl. Показана возможность использования для определения SNi обоих методов.

Установлено, что способность клеточных стенок к адсорбции  $\text{Ni}^{+2}$  из водных растворов значительно зависит от вида растения и изменяется от 50 до 150 мкмоль никеля (от 3500 до 9000 мкг никеля) на 1 г сухой массы стенки. Показано, что способность клеточных стенок к адсорбции  $\text{Ni}^{+2}$  изменяется в ряду: злаковые  $\leq$  маревые  $\leq$  бобовые. Можно полагать, что указанная последовательность обусловлена присутствием в клеточных стенках пектиновых полимеров, содержащих неэтерифицированные карбоксильные группы полигалактуроновой кислоты (ПГК). Наши результаты показывают, что SNi и количество карбоксильных групп ПГК являются взаимозависимыми параметрами (коэффициент корреляции, равен 0,8). Таким образом, можно утверждать, что способность растительной клеточной стенки к адсорбции ионов никеля обусловлена наличием в ее полимерном матриксе карбоксильных групп ПГК. На основании проведенного исследования можно заключить, что клеточная стенка является компартментом, который в определенных условиях с высокой эффективностью защищает клетку от воздействия повышенных концентраций ионов никеля в среде. *Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 08-04-01398-а).*

### **Влияние меди на актиновый цитоскелет и жизнеспособность клеток корней сои** **Кузнецова Надежда Александровна (Москва, qwer1131@ya.ru)**

Медь является одним из незаменимых элементов, необходимых для живых организмов, однако оказывает сильное повреждающее действие, если ее концентрации превышают оптимальные. В данной работе изучались эффекты, вызываемые в клетках корней сои избытком меди.

В опыте использовали 2-х недельные растения сои (*Glycine max*, сорт Доринца), выращенные в водной культуре. Гистохимическим методом с использованием реактива Шиффа для определения малонового диальдегида, который является конечным продуктом распада липидов, было показано, что медь вызывает перекисное окисление липидов клеток

корней сои, при этом скорость образования диальдегида зависит от времени и концентрации ионов меди в среде. Нарушение целостности мембран клеток корня и потерю их жизнеспособности определяли, окрашивая препараты красителем Эванс синий, который используется как индикатор гибели клеток, поскольку он неспособен проникать в живые клетки. Потеря жизнеспособности клеток корней сои наступала после 1-2 часов и зависела от концентрации меди: при концентрации 150 мкМ CuSO<sub>4</sub> происходило явное окрашивание кончика корня (0-15мм), что свидетельствовало о гибели части клеток этой зоны. Показано, что при концентрации CuSO<sub>4</sub> 10 мкМ и времени контакта 2 часа число жизнеспособных клеток кончика корня уменьшается на 10-15%, а при концентрации 50 и 150 мкМ CuSO<sub>4</sub> – в два и пять раз соответственно.

Важную роль в адаптации растительных клеток к экстремальным условиям окружающей среды могут играть перестройки актинового цитоскелета. Нами было показано, что 3-6 часовое пребывание растений на среде, содержащей относительно небольшой избыток меди (10 или 25 мкМ CuSO<sub>4</sub>), вызывало значительное увеличение количества актина в составе цитоскелетной сети, выделенной из гомогенатов корней (осадок 13000г) и во фракции полимерного актина (осадок 100 000г). Увеличение количества актина и степени его полимеризации может свидетельствовать об увеличении интенсивности адаптационных процессов, сопряженных с работой актинового цитоскелета.

#### **Регуляция морфогенеза трансгенных проростков *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh селективным светом**

**Лапухина О.В., Литвиненко И.В., Ефимова М.В.** (Томск, *lilac\_31@sibmail.com*)

Современные технологии генной инженерии с использованием метода агробактериальной трансформации позволяют переносить в растения гены из чужеродного организма. При этом встраивание генов происходит в случайные сайты ядерного генома, и растения приобретают не только полезные признаки, но и возможные нарушения физиологии развития. С другой стороны, развитие растений регулируется внешними факторами. Например, одна из основных программ развития растений – фотоморфогенез, находится под контролем ключевого фактора внешней среды – света разного спектрального состава.

Исследования проводили на трансгенных растениях *A. thaliana* с чужеродным геном *gusA* под контролем промотора гена первичного ответа на цитокинин (*ARR5*) и родительской линии экотипа *Wassilewskija* (*Was*). Трансформированные растения отличались друг от друга степенью экспрессии конструкции *ARR5::GUS* – *ARR5low* и *ARR5high* – низкая и высокая степень экспрессии, соответственно. Несмотря на то, что промотор взят от цитокинин-зависимого гена *ARR5*, он не оказывает прямого влияния на метаболизм цитокининов, поскольку под его контролем находится структурная зона гена, кодирующего бактериальный фермент  $\beta$ -глюкуронидазу.

При изучении морфогенеза 7-дневных проростков *A. thaliana* в темноте было показано, что ростовые показатели генетически модифицированных проростков (длина гипокотиляй и площадь семядолей) были выше по сравнению с родительской линией. В ходе длительного выращивания растений (3, 6 или 16 часов ежедневного освещения зелёным (ЗС,  $\lambda_{\max} = 545$  нм) или синим светом (СС,  $\lambda_{\max} = 430$  нм)) были показаны различия ростовой реакции для генетически модифицированных и нетрансформированных линий.

Гипокотиляи трансгенных проростков оказались более чувствительны к 3-часовой экспозиции на СС и 3- и 6-часовому освещению ЗС по сравнению с родительской линией.

Ответная реакция корней в ответ на дезтиолацию проростков *Was* отсутствовала. СС ингибировал рост корней трансгенной линии *ARR5low* в равной степени вне зависимости от продолжительности действия, а эффект ЗС усиливался с увеличением продолжительности действия. Наибольшее подавление роста корневой системы *ARR5high* наблюдалось при 3-часовом освещении СС, увеличение световой экспозиции ослабляло данный эффект. ЗС ингибировал рост корней вне зависимости от продолжительности действия. Активация роста семядолей *Was* наблюдалась при 3-часовой экспозиции на СС и ЗС, аналогичная ростовая реакция семядолей трансгенных линий достигалась при увеличении периода освещения до 6 часов.

Таким образом, фотоморфогенетические реакции проростков *A. thaliana* зависели от линии и части проростка, наибольшей чувствительностью к действию СС и ЗС обладали семядоли проростков родительской линии и гипокотили генетически модифицированных проростков, а наименьшей – корневая система дикого типа.

*Работа поддержана ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы (Гос. контракт № П1369). Авторы выражают благодарность проф. J. Kieber (Ун-т Северная Каролина) за любезно предоставленные семена трансгенных линий *A. thaliana*, проф. Кузнецовой В.В. (Институт физиологии растений РАН) и проф. Карначук Р.А. (Томский государственный университет) за помощь в проведении работы.*

#### **Вклад эндогенной АБК в проявление защитного действия салициловой кислоты на проростки пшеницы при обезвоживании**

*Ласточкина О.В., Сомов К.А., Ишдалиетова Р.С. (Уфа, Oksanaibg@gmail.com)*

Салициловая кислота (СК) является эндогенным регулятором роста, выполняющим в растениях разнообразные физиологические функции. Пристальный интерес к СК связан с её способностью повышать устойчивость растений к разным по природе неблагоприятным воздействиям. Полученные нами данные о СК-индуцированном быстрым транзитном накоплении абсцисовой кислоты (АБК) в растениях пшеницы позволили предположить, что реализация защитного действия СК обусловлена ее способностью увеличивать концентрацию АБК в ходе предобработки и поддерживать ее повышенный уровень при стрессе.

Действительно, как показали наши данные, обработка СК вызывает в проростках пшеницы существенное возрастание уровня одного из ключевых осмопротекторов пролина, в регуляции синтеза которого участвует АБК. Кроме того, выявлено активное воздействие СК на состояние про- и антиоксидантной систем, связанное с параллельным обратимым накоплением активных форм кислорода и увеличением активности антиоксидантных ферментов, в частности, пероксидазы, экспрессия генов которой находится под контролем АБК. С целью выяснения вклада эндогенной АБК в развитии СК-индуцированных защитных реакций были сопоставлены эффекты СК, а также СК в смеси с эффективным ингибитором синтеза АБК флуридоном на содержание АБК, концентрацию пролина, активность пероксидазы и уровень малонового диальдегида (МДА) в проростках пшеницы при дефиците влаги.

Известно, что разнообразные стрессовые факторы среды вызывают нарушения в гормональном балансе, связанные прежде всего со стресс-индуцированным накоплением АБК. Действительно, нами обнаружено существенное накопление АБК при дефиците влаги. СК оказывала явно защитный эффект, поскольку предобработанные СК проростки характеризовались значительно меньшим (но выше контроля) уровнем вызываемого обезвоживанием содержания АБК. Совместная с СК предобработка растений флуридоном полностью ингибировала индуцируемое дефицитом влаги увеличение уровня АБК. В то же время, флуридон полностью препятствовал проявлению защитного действия СК на растения пшеницы в условиях дефицита влаги, о чем свидетельствуют данные о полном предотвращении ингибитором АБК СК-индуцируемого накопления пролина, малонового диальдегида, а также усиления ферментативной активности пероксидазы.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют в пользу ключевой роли АБК в реализации защитного действия СК на растения пшеницы при обезвоживании.

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ для ведущих научных школ (НШ-915.2008.4.).*

#### **Improvement of regeneration system *in vitro* inbred lines of sunflower Malina Alena Eduardovna (Ukraine, Kiev, malinaalona@gmail.com)**

Progress in genetic improvement of elite lines and hybrids of sunflower biotechnological methods is limited on two principal causes: failure of universal system of regeneration and low efficiency of stable transformation. In this connection search of factors which can make positive impact on realization morphogenetic potential is interest. At agrobacterial transformation watch

decrease in regeneration ability, therefore our researches is turn on increase of frequency of regeneration by means of modifying of nutrient mediums and application of ultrasound processing. As object of researches served inbred line of sunflower: 96A/3, 70A/3 and 16A/3 (selections of Odessa selection-genetic institute UAAN). Sterile seeds were set on a nutrient medium of Murasige-Skoog and cultivated for 3-4 days at temperature 25-26°C. As primary explant used the segment of the seedling consisting from ~1/2 of the bottom part of a cotyledon with the split top part of hypocotyl in the size of 1-2 mm. For a regeneration induction explants cultivated on nutrient medium MS modified by us (MSM) and MSM environment added thiosulfate of sodium (MSMT), in various concentration. Occurrence of the first shoots were plainly distinguishable on 6th-7th day cultivated on the medium for an induction of regeneration MSM. Frequency of regeneration for inbred sunflower lines 96A/3, 70A/3 and 16A/3 has made  $31.3\pm2.0\%$ ,  $20.2\pm4.6\%$  and  $13.9\pm2.0$  accordingly. We selected that regeneration was observed by path of straight organogenesis. Presence thiosulfate of sodium in a nutrient medium has led to statistically authentic increase of frequency of shoot's formation inbred lines 96A/3, 70A/3 and 16A/3 approximately in 1.3, 1.7 and 2.8 times accordingly. Various influence thiosulfate of sodium on realisation morphogenetic potential of lines authenticate about genotypical dependences of an induction shoot's formation of sunflower from this component of a nutrient medium. Studying of influence of ultrasound processing on realisation authenticate morphogenetic potential of sunflower has shown that at application of this method raises frequency of regeneration. After, the made experiments we have shown that on nutrient medium MSM containing 20 mg/l thiosulfate of sodium, and at parallel processing by ultrasound, as a whole, there was an increase in frequency of regeneration (duration of scoring for all tested lines is equal 15 second). The quantity of shoots for lines 96A/3, 70A/3 and 16A/3 at complex processing increased in 1.88, 2.41 and 3.58 times accordingly. It is possible to recommend the given system as a basis for methods of shoots after agrobacterial transformation.

*I express gratitude to my colleagues Komisarenko A.G. and Ticshcenko O.M. together with whom researches were carried out.*

#### **Нарушение полярности роста пыльцевых трубок постоянным электрическим полем** *Мамаева Анна Станиславовна (Москва, AnnetteSt@yandex.ru)*

Растущая пыльцевая трубка – одна из лучших моделей в исследованиях механизмов полярного роста. Важную роль в регуляции этих процессов играют внутренние ионные токи. В этой связи представляет интерес вопрос о влиянии на рост трубки электрических стимулов. Показано, что направление роста пыльцевых трубок *Camellia japonica* и *Agapanthus umbelatus* изменялось под воздействием постоянного электрического поля. По некоторым данным, поле может изменять характер роста пыльцевой трубки. При изучении пыльцевых трубок *Agapanthus umbelatus*, для которых характерен осциллирующий рост, под действием осциллирующего поля наблюдали нарушение полярного роста. При этом в апикальной части трубки формировались шарообразные структуры, т.е. полярный рост сменялся изодиаметрическим. Авторы связывали этот эффект с нарушением механизма контроля осцилляций. Однако можно предположить, что нарушение полярности не связано с осцилляциями.

Мы изучали воздействие постоянного электрического поля на полярный рост пыльцевых трубок *Nicotiana tabacum* L., для которых характерен не осциллирующий, а импульсный рост. Поле (7-26 В/см, от 10 до 40 мин) создавали, используя источник тока для электрофореза и платиновые электроды. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью красителя ФДА, наличие клеточной стенки, везикулярный транспорт в апексе пыльцевой трубки и компартментацию митохондрий изучали при помощи флуоресцентных красителей тинопала, FM4-64 и DiOC5(3) соответственно. В работе использовали флуоресцентный микроскоп Axioplan 2 imaging MOT (Zeiss), снабженный цифровой камерой AxioCam HRc. Анализ изображений проводили с помощью пакета программ AxioVision 4.7.

Под действием электрического поля ( $> 30$  мин) до 30% пыльцевых трубок образовывали шарообразные расширения кончика, окружённые клеточной стенкой. Такие трубки сохраняли жизнеспособность. Полярность роста после прекращения воздействия не восстанавливалась. Структурная организация апикальной части таких аномальных трубок

была существенно изменена. Влияния поля на направление роста пыльцевых трубок мы не наблюдали.

Можно предположить, что нарушение организации апикального компартмента пыльцевой трубы и индукция перехода к изодиаметрическому росту обусловлены действием электрического поля на ионные токи, существующие в пыльцевой трубке.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант №08-04-00746-а). Благодарю за поддержку научного руководителя Наталью Павловну Матвееву и коллег Брейгину Марию, Лазареву Екатерину и Смирнову Анну.*

#### **Содержание антиоксидантов в растениях Куршской косы**

**Масленников Павел Владимирович** (Калининград, *pashamaslennikov@mail.ru*)

Исследования, выполненные в разных странах в последние десятилетия, подтверждают, что одной из основных причин патологических изменений в человеческом организме, приводящих к преждевременному старению и развитию многих болезней, в том числе самых опасных, таких как сердечно-сосудистые и онкологические заболевания, является избыточное содержание в биологических жидкостях свободных кислородных радикалов (супероксид-анион, гидроксильный радикал, пергидроксильный радикал и др.). Вредное воздействие свободных радикалов в случае оксидантного стресса можно уменьшить за счет регулярного употребления определенных пищевых продуктов и напитков, лекарственных препаратов, биологически активных добавок (БАД), обладающих антиоксидантной активностью. Наиболее перспективными источниками этих антиоксидантов считаются растения, особенно дикорастущие. Создание банка данных по содержанию антиоксидантов в растениях – первостепенная задача в решении проблемы оксидантного стресса. Для подобных исследований большой интерес представляют растения – доминанты флоры дюн и других экологических сообществ Куршской косы, чье биологическое разнообразие обусловлено типом почв и особенностями рельефа и климата. Анализировался эндогенный уровень антоцианов, каротиноидов в листьях 11 видов растений, произрастающих на наветренной и подветренной сторонах авандюны. Оценивалась суммарная антиоксидантная активность (АОА) растительного материала. Исследовалось содержание антиоксидантов в листьях травянистых (12 видов) и древесных форм растений (21 вид), собранных в зоне пальве. Таким образом, выявлены группы растений с различным содержанием антоцианов, каротиноидов и водорастворимых антиоксидантов в растительных тканях. Максимальное содержание антиоксидантов в листьях растений отмечено: антоцианов – в листьях паслена сладко-горького, марьянника дубравного и бузины черной; АОА – в листьях крушины ломкой, дуба черешчатого, хвое ели колючей; каротиноидов – в листьях марьянника дубравного и клена остролистного. Показана положительная корреляционная зависимость между содержанием антоцианов и уровнем каротиноидов, отрицательная корреляционная зависимость между содержанием антоцианов и АОА в листьях растений прибрежного дюнного комплекса и зоны пальве (44 вида). Для травянистых растений и растений бузины черной, ольхи клейкой, крушины ломкой, дуба черешчатого, калины обыкновенной и осины показана отрицательная корреляционная связь между АОА и содержанием каротиноидов. Полученные данные по содержанию биологически активных соединений в исследуемых растениях Куршской косы являются комплексным показателем антиоксидантного качества растительного сырья и могут быть успешно использованы для его стандартизации.

#### **Действие селективного света на рост суспензионной культуры *Artemisia annua* L.**

**Песек Сергей Владимирович** (Томск, *taoekk@gmail.com*)

Полынь однолетняя (*Artemisia annua* L.) издавно использовалась в китайской медицине для лечения малярии. Действующими веществами этого растения являются сесквитерпеновый лактон артемизинин и его производные. Недавние исследования показали, что артемизинин и его производные также способны проявлять противовирусный, противопухолевый и противоописторхозные эффекты. В настоящее время главное производство артемизинина для фармакологического использования осуществляется путем

извлечения и очистки из интродуцированных растений. Однако их продуктивность во многом зависит от условий произрастания. Таким образом, необходимо либо увеличить выход артемизинина в растениях, либо использовать технологию культуры клеток и тканей. Преимущества, предоставляемые этой технологией позволяют предположить то, что культивируемые клетки *Artemisia annua* L. могут быть прекрасным источником получения артемизинина и его производных, пригодных для использования в медицинской промышленности. Существенным ограничением в создании высокорентабельных технологий является недостаточность фундаментальных знаний о регуляции уровня биологически-активных веществ в растительной клетке. Одним из важнейших природных факторов регуляции продукционного процесса растений является свет, действие которого проявляется через активацию специфических фоторецепторов (фитохромов, криптохромов и других).

В связи со всем вышеизложенным, нами были поставлены задачи получить супензционную культуру *Artemisia annua* L., а также изучить влияние селективного света на ростовые параметры этой культуры. Была получена супензационная культура полыни однолетней. Исследовались кинетические характеристики роста этой культуры, выращиваемой на среде с содержанием фитогормонов НУК и БАП. Установлено, что на девятые сутки культивирования супензационной культуры происходит удвоение количества клеток. Максимальных размеров клетки также достигали на девятые сутки. Исследовалось влияние селективного красного и синего света на ростовые параметры этой культуры. Световой поток был выровнен по падающим квантам на уровне  $80 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ . Значимых отличий в размерах клеток, выращиваемых на селективном красном и синем свету обнаружено не было. Максимальных значений индекса роста, а также накопления сухой биомассы были получены у супензационной культуры, выращиваемой на синем свете.

Таким образом установлено, что синий свет достоверно стимулировал рост супензационной культуры полыни однолетней, в то время, как красный свет не оказывал влияния на ростовые параметры.

Работа была выполнена в рамках гранта РФФИ, гранта ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» и программы «У.М.Н.И.К.» Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере. Выражают благодарность научному руководителю, д.б.н. Карначук Р.А. за помощь в работе, доценту Головацкой И.Ф. за проведенные измерения интенсивности освещения а также сотрудникам кафедры физиологии растений и биотехнологии.

#### **Влияние формы минерального азота на морфологию корневой системы**

**Сидоренко Екатерина Сергеевна** (Москва, [kleo80@yandex.ru](mailto:kleo80@yandex.ru))

В настоящее время в научной литературе широко обсуждается вопрос о регуляторных свойствах нитрата. Показано участие этого иона в индукции многих генов N и С обменов, а также в процессах формирования корневой системы. Морфогенетическая роль нитрата представляет большой интерес и требует детального изучения. В данной работе исследовали влияние нитрата на рост боковых корней.

В качестве объектов были выбраны кукуруза (*Zea mays* L.) с. «Катарина», томат (*Lycopersicon esculentum* Mill.) с.«Ямал» и цветная капуста (*Brassica oleracea* L.) с. «Snowball». Растения кукурузы выращивали в водной культуре на 1/2 среды Принищникова с различными источниками азота:  $KNO_3$  ( $NO_3$ -вариант),  $(NH_4)_2SO_4$  ( $NH_4$ -вариант), а также без азота ( $0_N$ -вариант). Измерение длин главного (ГК) и боковых корней (БК) производили у проростков в возрасте 5-10 дней один раз в сутки. Число БК подсчитывали на участке 15 мм в базальной зоне корня. 6-дн. проростки  $NH_4$ - и  $0_N$ -вар. с видимыми невооруженным глазом зачатками БК в течение 4 ч экспонировали на раствор  $KNO_3$ , после чего корни промывали и помещали в питательные растворы с прежним составом. Растения томатов и цветной капусты выращивали в течение 14 дней на агаризованных средах, содержащих  $CaSO_4$ , с  $KNO_3$ ,  $(NH_4)_2SO_4$  или без азота, а также с  $KNO_3$  и АБК.

Число БК в базальной части ГК кукурузы не зависело от формы и наличия азота в питательной среде. У растений двух других видов в  $NH_4$ -вар. число БК было меньше по сравнению с  $NO_3$ - и  $O_N$ -вар., особенно у томатов. Для  $NO_3$ -вар. было характерно удлинение ГК и БК по сравнению с  $NH_4$ -вар. у растений всех исследованных видов. Однако для томатов и цветной капусты отсутствие азота в среде явилось еще более сильным фактором, стимулирующим рост корней. После кратковременной экспозиции на  $NO_3^-$  у кукурузы  $NH_4$ -вар. наблюдали четырехкратное увеличение скорости роста БК по сравнению с контрольными растениями, причем величины прироста БК в апикальной и базальной зонах корня были сравнимы, что не было свойственно для БК разных зон у контрольных растений. Для исследования природы стимулирующего действия нитрата был проведен эксперимент с заменой  $NO_3^-$  на  $Cl^-$  в среде выращивания. Установлено, что стимулирующий эффект хлорида на рост БК был незначительным. Можно предположить, что индукция роста БК обусловлена не осмотическими свойствами нитрата.

АБК являлась антагонистом нитрата по действию на рост корней. При добавлении АБК в среду выращивания у томатов и цветной капусты наблюдали снижение скорости роста ГК и БК, а также уменьшение числа БК по сравнению с  $NO_3$ -вар. Степень подавления роста корней зависела от концентрации АБК и вида растения. Обсуждается роль нитрата в активации апикальной меристемы БК.

**Модификация пероксидазной активности в процессе дезиоляции  
проростков пшеницы *Triticum aestivum* L.**  
**Томилин Михаил Вадимович** (Бор, Tom0990@yandex.ru)

Пероксидаза (ПО) – один из важных ферментов «двойного назначения», вовлечённых как в процесс генерации, так и детоксикации активных форм кислорода (АФК). Полифункциональность данного фермента позволяет предполагать его активное участие в контроле уровня АФК и, как следствие, процессов роста, механизмов формирования реакции растений на действие экологических факторов, ведущий из которых – свет. Цель настоящей работы – исследовать динамику активности пероксидаз в побегах и корнях проростков пшеницы при смене светового режима.

Опытными объектами служили этиолированные проростки яровой пшеницы сорта «Московская 35» (водная культура), которые в возрасте 5-6 дней переносили под люминесцентные лампы (освещенность 10 000 Люкс). Общую пероксидазную (ПО) и НАДН-ПО активности растворимых (цитозольных) фракций, выделенных из побегов и корней проростков пшеницы, определяли через 5, 10, 15, 30 и 60 мин экспонирования проростков на свету. Ферментативную активность оценивали спектрофотометрически: общую (субстрат-4,4'-диаминодифенил;  $\epsilon_{590}=39 \text{ ММ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ), НАДН-ПО (субстрат-НАДН,  $\epsilon_{340}=4,23 \text{ ММ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ). Активность фермента выражали в ммоль субстрата·мг ГСБ<sup>-1</sup>·мин<sup>-1</sup>. Концентрацию гемсодержащего белка (ГСБ) в пробах определяли спектрофотометрически (403 нм).

Кратковременное действие света (5-60 мин) на проростки пшеницы вызывало изменение уровня ГСБ. Интересно, что этот эффект был неоднозначным: в побегах свет снижал содержание ПО белка в 1,5 раза при 30 мин воздействии; в корнях, по отношению к контролю, индуцировал почти двукратное увеличение. Таким образом, в процессе дезиоляции проростка происходят органоспецифические изменения в белковом спектре: возрастание доли пероксидазного белка в корнях и снижение в побегах. Уровень общей ПО активности у наземных органов этиолированных проростков, в сравнении с корнями, был в 12,5 раза меньше, специфической НАДН-ПО активности в 3,9 раза выше. В процессе дезиоляции выявлено светозависимое снижение общей ПО и нарастание оксидазной активности фермента (НАДН-ПО), как в побегах, так и в корнях проростков пшеницы. Следовательно, кратковременное действие света может вызывать переключение с пероксидазной на оксидазную активность, смещающая тем самым баланс в пероксидазной ферментной системе в сторону её прооксидантной функции. Последнее особенно характерно для побегов исследуемых проростков пшеницы. Таким образом, в процессе дезиоляции в клетке, за счёт изменений в пероксидазной системе, может происходить нарастание

генерации АФК в виде свободных радикалов. Мы полагаем, что это один из возможных механизмов участия пероксидаз в адаптации растений к изменяющимся условиям внешней среды.

**Перспектива использования индолил-3-уксусной кислоты для ускорения роста и развития *Hibiscus esculentus* L. и *Hibiscus manihot* L. на юго-востоке Украины**

**Третьякова Елена Юрьевна** (Украина, Донецк, helen\_tretyakova@ukr.net)

Продовольственная проблема постоянно предусматривает обогащение ассортимента пищевых растений и повышение их продуктивности, адаптационной способности. К таким малораспространённым растениям с высокой пищевой, лекарственной, технической ценностью, которые заслуживают широкого введения в практику на юго-востоке Украины относятся: *Hibiscus esculentus* L., и *Hibiscus manihot* L. *H. esculentus*, или гибискус съедобный, бамия, окра – однолетнее травянистое тропическое растение из семейства Malvaceae, популярное у народов Индии, Малой Азии, Центральной Америки, овощная культура *H. manihot* или аибика, солнечный гибискус – многолетнее (в культуре однолетнее) травянистое растение из семейства Malvaceae представляет собой комплексно используемую культуру в Египте, странах тропической Азии. Бамия и аибика представляют интерес как новые высокобелковые культуры на юго-востоке Украины, очень ценный диетический продукт. Так как, *H. esculentus*, *H. manihot* характеризуются длительным вегетативным периодом развития, поэтому возникает необходимость ускорения прорастания семян, роста и развития растений с помощью биологически активных веществ. Целью нашей работы было изучение особенностей всхожести, роста и развития *H. esculentus*, *H. manihot* под влиянием предпосевной обработки семян индолил-3-уксусной кислотой (ИУК), определение оптимальной концентрации ИУК для предпосевной обработки семян бамии и аибики. В ходе исследований была определена оптимальная концентрация ИУК для обработки семян *H. esculentus*, *H. manihot* – 10 мг / л при 2-х часовой экспозиции. Установили, что при обработке семян бамии, аибики растворами ИУК оптимальной концентрации повышалась энергия прорастания и всхожесть семян, увеличивалась длина корня, скорость роста корня. Полученные данные по влиянию ИУК на семена *H. esculentus*, *H. manihot* в лабораторных опытах были взяты за основу при проведении полевых исследований. В результате проведенных исследований, установлено, что предпосевная обработка семян *H. esculentus*, *H. manihot* растворами оптимальной концентрации индолил-3-уксусной кислоты способствует ускорению прорастания семян, переходу растений от одной фазы развития к следующей, увеличению морфометрических параметров растений разных возрастных состояний (высоты растений, диаметра стебля, длины корня, количества боковых корней), по сравнению с контролем. Было установлено, что предпосевная обработка семян *H. esculentus*, *H. manihot* растворами ИУК оптимальной концентрации способствует ускорению прорастания семян, роста и развития растений, что необходимо в связи с их длительной вегетацией в условиях интродукции на юго-востоке Украины.

**Спектр фенотипов растений ячменя, сформированных на базе мутации *chlorina* 3613**

**Тютерева Елена Владимировна** (Санкт-Петербург, tuterlena@mail.ru)

Мутанты ячменя *chlorina*, характеризуются полным отсутствием хлорофилла *b* в составе пигментного комплекса хлоропластов и, в связи с этим, жёлто-зелёной окраской надземных частей. До сих пор считалось, что это – единственный фенотип, который может формироваться у растений с мутацией типа *chlorina*.

Нами получен спектр из трёх устойчивых фертильных фенотипов растений на базе мутации *chlorina* 3613 (мутант ячменя линии *f2* с жёстко заблокированным синтезом Хл *b*), которые различаются множеством морфотипических, физиологических и биохимических характеристик разных частей растения.

Растения ячменя *chlorina* 3613 с первым (исходным) фенотипом вегетируют и воспроизводятся в течение десятков лет в условиях открытого грунта и моновидового посева, полностью соответствуя описаниям растений линии *f2* в литературе

(Sagromsky, 1974; Leverenz et al., 1992). Внешне растения этого фенотипа соответствуют своей маркировке: «*chlorina*» – жёлто-зелёные.

Второй фенотип был получен нами созданием для растений глубоко пониженного уровня инсоляции (40% от полной) на семь суток в момент вступления растений первого (исходного) фенотипа в фазу цветения. Фенотип сменился за семь дней. Он, как и первый, не имеет Хл *b*, но отличается светло-зелёным цветом надземных частей, в несколько раз большими размерами листьев и стеблей, вдвое более высокой зерновой продуктивностью. Полученный фенотип, названный нами «светло-зелёный», устойчиво сохраняется вплоть до завершения онтогенеза (длительность которого на 10-15 суток превышает таковую у растений жёлто-зелёного фенотипа).

Третий фенотип был получен нами выращиванием растений из семян от растений второго фенотипа без экспериментальных воздействий. По размерам, зерновой продуктивности и длительности онтогенеза он соответствует светло-зелёному фенотипу, но значительно отличается сине-зелёным цветом листьев и наличием в составе набора пигментов Хл *b*. Этот фенотип, названный нами «сине-зелёный», принципиально не изменяется на протяжении всего онтогенеза.

Сине-зелёный фенотип более всего внешне похож на фенотип ячменя суп *Donaria* (родительская форма мутанта *chlorina* 3613), но отличается менее выраженной синевой листьев и архитектоникой особи. Спектральные характеристики комплексов ССКII суп *Donaria* совпадают с характеристиками этих комплексов у растений сине-зелёного (третьего) фенотипа, но резко отличаются от таковых у растений жёлто-зелёного (исходного) фенотипа.

В популяциях экспериментальных растений трёх полученных фенотипов различие изученных характеристик в пределах каждого фенотипа несопоставимо меньше, чем между фенотипами.

### В синезелёных водорослях (*Synechocystis* sp. РСС 6803)

обнаружены АБК-связывающие белки

Шевченко Галина Васильевна (Москва, [tuzhuben@mail.ru](mailto:tuzhuben@mail.ru))

Согласно современным представлениям, хлоропласты произошли от древних фотосинтезирующих цианобактерий. Так как наибольшее влияние из фитогормонов на развитие хлоропластов оказывают цитокинины и абсцизовая кислота (АБК), возникает вопрос, не участвуют ли фитогормоны в регуляции физиологических процессов не только в пластидах, но и в цианобактериях. Несмотря на большой прогресс в изучении механизма действия абсцизовой кислоты, отсутствуют какие-либо данные о влиянии АБК на цианобактерии и абсолютно не исследуется вопрос об эволюции сигналинга АБК. В связи с этим задача работы заключалась в выяснении возможности существования в цианобактериях отдельных компонентов регуляторной системы абсцизовой кислоты. АБК-связывающие белки (АСБ) выделяли из растворимой фракции лизированных клеток цианобактерий, используя многоступенчатый процесс, включающий аффинную хроматографию на сефарозе с иммобилизированной АБК и последующее разделение с помощью одномерного электрофореза. Идентификация гормон-связывающих белков проводилась методом иммуноблотинга с помощью полученных нами и очищенных антидиотипических антител (АТа-и) к АБК, которые фактически являются антителами к рецептору гормона. Белки, связывающиеся с АТа-и, не взаимодействуют с преиммунными АТ и АТ, полученными к АБК, что говорит о высокой специфичности взаимодействия. Результаты показали, что антитела взаимодействовали с полипептидами, имеющими молекулярные массы 23, 50, 60 и 67 кДа, что доказывает АБК-связывающие свойства этих полипептидов. Среди белков, элюированных с АБК-сефарозной колонки, идентифицируются два полипептида с молекулярными массами 73 кДа и 23 кДа связывающиеся с поликлональными антителами к фрагменту белка С1Р2.1 люпина желтого, экспрессия гена которого контролируется АБК. Функциональная активность АСБ была исследована по методу, применяемому ранее для характеристики транскрипционной активности цитокинин-связывающих белков различных растительных объектов в разработанной нами

транскрипционной системе на основе *Synechocystis* sp. PCC 6803. При проведении опыта использовали в качестве транскрипционной системы растворимую фракцию лизата цианобактерий, содержащую ДНК, РНК-полимеразу и необходимые факторы транскрипции. Непосредственное добавление абсцисовой кислоты в концентрации  $10^{-6}$  М в реакционную среду существенно активировало тотальную транскрипцию. АБК-связывающие белки, выделенные с помощью АБК-сепарозы, также повышали активность синтеза РНК. При совместном действии АСБ и абсцисовой кислоты эффект был несколько большим, чем в присутствии только АСБ. Это позволяет предположить, что АСБ являются транскрипционными факторами, участвующими в регуляции транскрипции генома *Synechocystis* sp. PCC. Представленные результаты подтверждают предположение о том, что гормональная система, хотя бы частично, была передана высшим растениям от предшественников хлоропластов – цианобактерий.

## ПОДСЕКЦИЯ «ФИЗИОЛОГИЯ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ»

### Влияние потребления этанола и последующего иммобилизационного стресса в период раннего органогенеза на физиологическое состояние беременных самок крыс и исход беременности

Аверина Ольга Александровна (Москва, olga.helgabat@gmail.com)

Проблема женского алкоголизма, тесно связанная со стрессогенными воздействиями разной этиологии, приобрела мировой масштаб как с социальной, так и с медицинской точки зрения. Исследования различных последствий стресса и алкоголизма особенно актуальны для беременных женщин, поскольку оба фактора способны повлиять на их физиологическое состояние и исход беременности. Специальный интерес представляет анализ последствий таких воздействий в период раннего органогенеза, который относится к одному из наиболее реактивных периодов беременности.

В нашей лаборатории было показано, что неизбежаемое потребление 15% этанола беспородными беременными самками крыс в течение первых 10 дней беременности приводило к статистически значимому уменьшению потребления жидкости и к замедлению прибавки веса ( $p<0,05$ ). Последующий иммобилизационный стресс (животных помещали в пластиковые пеналы на 6 часов), вызванный на 10 день беременности сразу после окончания потребления этанола, также уменьшал прибавку веса, однако эффект оказался статистически незначимым ( $p>0,05$ ). Сочетание потребления этанола с последующим иммобилизационным стрессом приводило к устраниению данного эффекта: прибавка веса не отличалась от контрольных значений. На исход беременности (количество потомства и мертворожденных крысят) исследуемые воздействия не повлияли.

### Изучение люминесценции *Harmothoe imbricata*

Антопольский С.Л., Марченкова А.А., Малышев А.В. (Москва, liartar@gmail.com)

Вид *Harmothoe imbricata* относится к классу Polychaeta типа Annelida. *H. imbricata* – это многощетинковый червь, состоящий из 36-39 сегментов. С дорсальной стороны тела червя покрыто 15 парами специфических чешуек – элитр. Еще в 1950-х годах было показано, что элитры *H. imbricata* при определенных условиях способны люминесцировать. Вероятно, в естественных условиях элитры выполняют оборонительную функцию: червь отбрасывает их при нападении хищника для отвлечения его внимания. Механизм свечения остается невыясненным, однако, известно, что триггером является приток кальция и деполяризация мембранны, которые каким-то образом связаны с продукцией супероксид радикала.

Данная работа была выполнена на Беломорской биологической станции имени Н.А. Перцова. Цель исследования – изучение интенсивности люминесценции и динамики её затухания в элитрах *H. imbricata* в зависимости от состава омывающего раствора. Измерение интенсивности и динамики затухания свечения производилось с поверхности одиночной, отделённой от тела червя элитры при помощи люминометра TRIATHLER 425-004 фирмы Hidex.

Нами были получены следующие результаты. Кривая затухания люминесценции в морской воде носит экспоненциальный характер и состоит из 2-х фаз: быстрой (5-10 сек) и медленной. В дистиллированной воде пик люминесценции отсрочен, интенсивность люминесценции снижена. Показано, что увеличение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в омывающем растворе в 5 раз приводит к достоверному увеличению интенсивности люминесценции, но не влияет на скорость затухания свечения. Увеличение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в 10 раз снижает интенсивность люминесценции (на 30%) и замедляет затухание – возможно, из-за значительного изменения ионной силы или кальциевой перегрузки фотогенных клеток. В растворе нифедипина (блокатора  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа) и в бескальциевом растворе доля несветящихся элитр составила 70%. Однако 30% элитр светилось (характер свечения оставался неизменным по отношению к контролю). Факт наличия люминесценции в растворе блокатора, бескальциевом растворе и в дистиллированной воде может быть связан с рекупированием  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо или наличием механизма запуска люминесценции отличного от кальциевого. В растворах, лишенных ионов  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Mg}^{2+}$ ,

интенсивность пика люминесценции снижается в 10 раз. Отсутствие ионов  $Mg^{2+}$  и  $K^{+}$  в растворе не оказывает никакого влияния на динамику затухания люминесценции. Отсутствие ионов  $Na^{+}$  замедляет затухание быстрой фазы, а также увеличивает интенсивность свечения медленной фазы.

Таким образом, нами было показано, что интенсивность и динамика люминесценции зависит от содержания ионов  $Ca^{2+}$  в омывающем растворе, однако люминесценция наблюдается и в отсутствии внешнего источника  $Ca^{2+}$ .

**Влияние структурных аналогов АВП(6-9) – Ac-L-MPRG и Ac-D-SPRG –  
на депрессивные составляющие поведения белых крыс**  
**Белякова Александра Сергеевна (Москва, alixletter@yandex.ru)**

Известно, что аргинин-вазопрессин (АВП) распадается в организме на несколько линейных фрагментов, включающих в себя с 4-го по 9-ый аминокислотные остатки. Эти метаболиты обладают нейротропной активностью, которая не уступает, а зачастую и превосходит активность целой молекулы АВП. По данным, полученным ранее в нашей лаборатории, наибольшим нейротропным эффектом обладает фрагмент АВП(6-9) – Cys6-Pro7-Arg8-Gly9-NH<sub>2</sub>. На основании анализа, проведенного проф. В.П.Голубовичем, были синтезированы тетрапептиды с заменой Cys6 на L-Met и D-Ser – Ac-L-MPRG и Ac-D-SPRG.

Работа проводилась на половозрелых самцах неподвижных белых крыс массой 220-250 г. Препарат вводили интраназально в объеме 1 мкг/10 г массы тела дозах: Ac-L-MPRG – 10,0 мкг/кг за 5 минут до начала тестирования, Ac-D-SPRG 10,0 мкг/кг, 1,0 мкг/кг, 0,1 мкг/кг и 0,01 мкг/кг за 5 и за 30 минут до начала тестирования. Контрольным животным вводили эквивалентный объем растворителя (дистиллированной воды).

Ac-L-MPRG обладал выраженным антидепрессантным действием. В teste «принудительное плавание» введение Ac-L-MPRG оказывало влияние практически на все исследуемые показатели. Было зарегистрировано достоверное увеличение как продолжительности первого периода активного плавания, так и суммарного времени активного плавания; увеличение суммарного времени и средней продолжительности периода пассивного плавания; суммарное время иммобилизации и количество её периодов снижалось.

Ac-D-SPRG также оказывал ярко выраженное антидепрессантное действие. При введении препарата за 5 минут до начала тестирования наблюдалось увеличение суммарного времени активного и пассивного плавания, уменьшение суммарного времени иммобилизации среднего времени периода иммобилизации. Количество периодов активного плавания было увеличено. Следует отметить, что действие тетрапептида выражено значительно сильнее при использовании дозы 1,0 мкг/кг.

Введение препарата за 30 минут до начала тестирования оказывало влияние практически на все регистрируемые показатели. При этом антидепрессантная активность препарата в данном случае возрастила с увеличением дозы.

Таким образом, аналоги АВП(6-9) с заменой аминокислотного остатка в 4-ом положении – Ac-L-MPRG и Ac-D-SPRG – обладают ярко выраженной антидепрессантной активностью при их интраназальном введении. Дальнейшее их изучение может способствовать созданию новых пептидных препаратов с заданным физиологическим действием, обладающих такими неоспоримыми преимуществами, как простота введения и быстрое достижение желаемого эффекта.

**Влияния этанола на констрикторные ответы изолированной хвостовой артерии крысы**  
**Болеева Г.С., Шарапова О.Н. (Элиста, gil8388@yandex.ru)**

Острая этаноловая интоксикация сопровождается снижением артериального давления (АД), что может быть обусловлено влиянием этанола как на центральные, так и на периферические механизмы регуляции гемодинамики. Целью данной работы было исследовать влияние этанола на механизмы симпатической нейропередачи в кровеносных сосудах. В экспериментах использовали самцов белых неподвижных крыс с массой тела

250-300 г. Были поставлены три задачи: (1) оценить изменение АД при введении наркотической дозы этанола (4,5 мл/кг, в/б); (2) измерить концентрацию этанола в крови в период наиболее выраженного снижения АД; (3) исследовать влияние этой концентрации этанола на констрикторные ответы изолированной хвостовой артерии при раздражении интрамуральных симпатических нервов и при активации постсинаптических  $\alpha_1$ -адренорецепторов фенилэфрином (ФЭ).

АД регистрировали у бодрствующих крыс через катетер в бедренной артерии. В течение 1-2 минут после введения этанола крысы засыпали. При этом наблюдалось быстрое снижение уровня систолического АД (от  $134 \pm 5,1$  до  $91 \pm 6,2$  мм рт.ст.), и диастолического АД (от  $98 \pm 4,9$  до  $63 \pm 5,0$  мм рт.ст.). АД оставалось низким в течение 1,5-2 ч, затем постепенно восстанавливалось. Длительность сна под действием этанола составила  $273 \pm 17$  мин.

Через 20 и 60 мин после введения этанола брали пробы крови из катетера для измерения концентрации этанола алкинитритным методом. Концентрация этанола в крови через 20 мин составила  $4,87 \pm 0,75$  мг/мл, а через 60 мин –  $3,84 \pm 0,20$  мг/мл.

Объектом для исследования эффектов этанола на механизмы симпатической нейропередачи служила хвостовая артерия крысы. Артерию выделяли из тела крысы и перфузировали в режиме постоянного потока, о её сопротивлении судили величине перфузионного давления (ПД). Интрамуральные нервы раздражали импульсами тока (амплитуда – 200-300 мА, длительность – 0,2 мс) с частотой 2, 5 и 10 Гц.

При раздражении нервов наблюдалось увеличение ПД, при частоте 10 Гц оно составило  $63 \pm 5,5$  мм рт.ст. Действие ФЭ также приводило к увеличению ПД, при концентрации 2,5 мкМ ПД увеличивалось на  $122 \pm 15,1$  мм рт.ст. Для исследования эффектов этанола его добавляли в перфузионный раствор в концентрации 4,5 мл/л. Спустя 20 минут проводили серию раздражений нервов, а затем исследовали реактивность сосуда на ФЭ. В присутствии этанола реакции артерии на раздражение нервов и ФЭ не отличались от реакций в контроле.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что этанол в концентрации, которая соответствует его концентрации в крови крыс в состоянии этанолового наркоза, не оказывает выраженного влияния на пре- и постсинаптические механизмы симпатической передачи в артериальных сосудах мышечного типа. Это позволяет полагать, что падение артериального давления во время этанолового наркоза не связано с прямым влиянием этанола на кровеносные сосуды, по-видимому, здесь активируются центральные механизмы регуляции.

#### **Роль дигидропиридин-чувствительных кальциевых каналов первого окончания в регуляции квантовой секреции ацетилхолина**

*Васин Александр Львович (Казань, vasal2005@yandex.ru)*

В нервно-мышечном синапсе теплокровных вход ионов кальция через пресинаптические потенциал-зависимые кальциевые каналы, чувствительные к агатоксину и некоторым формам конотоксинов и относящиеся к Р/Q типу, запускает процесс секреции квантов нейромедиатора ацетилхолина, обеспечивая синаптическую передачу возбуждения. Однако в синапсах незрелых и генетически модифицированных животных, у которых отсутствует этот тип кальциевых каналов или снижена их активность, наблюдается включение в секреторный процесс других типов каналов. Полученные недавно данные о действии дигидропиридинов на процесс выделения квантов ацетилхолина позволяют выдвинуть гипотезу о способности дигидропиридин-чувствительных кальциевых каналов (L-типа) принимать участие в модуляции экзоцитоза везикул из нервных окончаний. В связи с этим целью данного исследования было изучение влияния блокатора потенциал-зависимых кальциевых каналов L-типа нитрендипина на квантовую секрецию в периферическом синапсе мыши. Основная характеристика, описывающая секрецию нейромедиатора, это квантовый состав, т.е. количество квантов медиатора, выделившихся в ответ на нервный импульс. Однако и временные параметры освобождения квантов также являются важным показателем состояния аппарата экзоцитоза, и наряду с квантовым составом определяют эффективность синаптической передачи. В данном исследовании в условиях сниженного до 0,5 и 0,3 ммоль/л внеклеточного содержания ионов кальция с помощью экстраклеточной

регистрации одноквантовых токов концевой пластиинки анализировались количество квантов ацетилхолина, выделяемых при разных режимах стимуляции двигательного нерва, и истинные синаптические задержки – временные интервалы, с которыми освобождались отдельные кванты медиатора после развития пресинаптического спайка. Анализ гистограмм распределения задержек одноквантовых ответов показал, что при редкой частоте стимуляции (0,5 Гц) большая часть квантов, составляющая в исходных условиях до  $82,1 \pm 1,5\%$  от общего количества квантов, выделялась практически синхронно в пределах 3 мс после пресинаптического спайка, а остальная часть квантов ( $17,9 \pm 3,5\%$ ) выделялась с большими значениями задержек (до 50 мс), и составляла асинхронную фазу секреции квантов. При повышении частоты стимуляции до 15 Гц возрастал квантовый состав, и до 23% увеличивалось число квантов в асинхронной фазе секреции. Добавление нитрендипина (10 мкмоль/л) не влияло на квантовый состав при частоте стимуляции 0,5 Гц, но уменьшало прирост асинхронного освобождения квантов при ее повышении до 15 Гц. В условиях предварительной блокады калиевых каналов 4-аминопиридином, при концентрации ионов кальция 0,3 ммоль/л, нитрендипин снижал квантовый состав и уменьшал асинхронную фазу секреции квантов медиатора, что свидетельствует об участии L-типа кальциевых каналов в модуляции интенсивности и кинетики вызванной секреции квантов ацетилхолина.

*Поддержано грантами «Ведущая научная школа», РФФИ 08-04-00923, РФФИ 09-04-01280, Грант президента РФ МК-2704.2009.4. Выражаю искреннюю благодарность моему научному руководителю Бухараевой Э.А. и моему коллеге Самигуллину Д.В. за помощь в проведении исследования.*

#### **Характер сдвигов показателей периферической крови при комплексном воздействии вибрации и электромагнитных волн крайне высоких частот**

*Геворкян Эмма Сергеевна (Армения, Ереван, esgevorkyan@yahoo.com)*

На современном этапе научно-технического прогресса изучение влияния вибрации на организм биологических объектов приобрело важное эколого-гигиеническое значение. Разнообразные нарушения, возникающие в организме при воздействии вибрации приводят к изменению активности окислительно-восстановительных процессов, играющих важную роль в процессе обеспечения резистентности организма. В связи с этим важное значение приобретает поиск средств повышения резистентности организма и нивелирования сдвигов, формирующихся при вибрации. В последние годы, наряду с фармакологическими средствами, для лечения различных заболеваний используются электромагнитные излучения (ЭМИ) низкой интенсивности. Согласно литературным данным ЭМИ повышают иммунорезистентность, изменяют активность ферментативных процессов в патологических очагах организма. Целью данной работы являлось изучение особенностей развития регенеративных процессов в системе крови в динамике комплексного воздействия вибрации и ЭМИ. Исследования проведены на кроликах в условиях хронического эксперимента (30 дней). Вибрация осуществлялась на вибростенде ЭВ-1 (по 2 часа в день), после чего животные 60 минут с расстояния 40 см подвергались воздействию ЭМИ миллиметрового диапазона (частотой 53,5 ГГц). Источником излучения служил генератор ГЧ-141. В норме и динамике комплексного воздействия вибрации и облучения исследовалось количество эритроцитов, лейкоцитов, Нв, цветной показатель, лейкоцитарная формула. Кровь бралась из краевой вены уха кролика. Исследования показали, что на 10 день комплексного воздействия вибрации и ЭМИ наблюдается умеренно нормохромное понижение количества эритроцитов и Нв и увеличение числа ретикулоцитов и лейкоцитов. В лейкоцитарной формуле повышается количество нейтрофилов, лимфоцитов и эозинофилов. Начиная с 20 дня в картине периферической крови наблюдался гипохромный сдвиг, количество эритроцитов увеличивалось до 94%, а Нв-84%. Последнее было обусловлено повышением абсолютного и относительного количества ретикулоцитов, которое сохранялось во все последующие дни исследований. В указанный срок количество лейкоцитов достигало своей максимальной величины. К 30 дню исследований количество эритроцитов и Нв также достигало пределов физиологической нормы. Подобные сдвиги показателей периферической

крови являются, по всей вероятности, отражением компенсаторной реакции костного мозга и свидетельствуют об активации симпатических механизмов регуляции кроветворения. Следует отметить, что в мазках крови наблюдалось большое количество плазменных клеток, что также свидетельствует в пользу вышеизложенного. Таким образом, под воздействием ЭМИ регуляторные механизмы системы крови подвергаются ряду адаптивных изменений, направленных на активацию регенеративных процессов и мобилизацию защитных механизмов против стресс-фактора, в данном случае – вибрации.

**Эффекты антител к кальций-связывающему белку S100  
и предшественнику синтеза серотонина 5-окситриптофана  
на выработку условного оборонительного рефлекса у виноградной улитки**  
*Дерябина Ирина Борисовна (Казань, ira-kan@yandex.ru)*

Известно, что в долговременных формах пластиности важную роль играют ионы кальция, они участвуют в регуляции разнообразных нейрональных процессов, что обусловлено их специфическими физико-химическими характеристиками, благодаря которым они являются наиболее универсальными внутриклеточными посредниками.

При формировании условного оборонительного рефлекса (УОР), в качестве условного стимула использовались постукивания по раковине (2 раза), которые в норме не вызывали оборонительной реакции закрытия пневмостома улитки. Безусловным стимулом служило вдувание струи воздуха в отверстие легочной полости, что вызывало у животных безусловную оборонительную реакцию закрытия пневмостома. Интервалы между предъявлением условного и безусловного стимулов не превышали 1 с. В эксперименте фиксировалось закрытие пневмостома в ответ на условный стимул. Результатом такого обучения является полное закрытие пневмостома в ответ на условный стимул, что отмечалось как положительная реакция. Ежедневно предъяляли по 60 сочетаний стимулов с интервалом 2-4 мин. В данной работе животным ежедневно перед началом формирования УОР (за 30 минут) получали инъекцию раствора антител к кальций-связывающему белку S100 (LAT-S100 – разведение 10-12). Другой группе ежедневно за 7 минут до начала процедуры формирования УОР вводился метаболический предшественник серотонина 5-HTP в дозе 10 мг/кг веса, растворенный в 0,1 мл ФР. Животные следующей группы получали ежедневно инъекции и LAT-S100 и 5-HTP за 30 и 7 минут до процедуры выработки УОР соответственно. Контрольной группе, производили укол физиологического раствора.

Полученные нами результаты показывают, что при формировании УОР эффект антител к S100 не наблюдался, так как достоверных различий между группами, которым ежедневно перед формированием УОР вводился LAT-S100 и LAT-S100+5-HTP и контрольной группы, инъецированной физиологическим раствором не было. А улитки, инъецированные 5-HTP, обучаются быстрее улиток контрольной группы, инъецированной физиологическим раствором.

**Изменение показателей крови при нарушениях мозгового кровообращения  
и методы лечения**  
*Захарова Ольга Анатольевна (Нижний Новгород, olbel86@yandex.ru)*

Ишемия головного мозга, возникающая вследствие снижения мозгового кровотока и дефицита кислорода и глюкозы, является наиболее распространенной причиной нарушения его функций. Данная патология связана с нарушением мозгового кровообращения. Одной из главных составляющих этой системы является кровь, ее реологические и биохимические характеристики.

Микроциркуляторное состояние крови во многом зависит от электрофоретической подвижности эритроцитов (ЭФПЭ). Нами методом микроэлектрофореза была исследована электрофоретическая подвижность эритроцитов и лейкоцитарная формула крови крыс до и через 60 дней после проведения операции по созданию искусственной ишемии головного мозга. В работе было исследовано 2 модели гипоксического воздействия. В первом случае тотальную ишемию головного мозга вызывали путем одномоментной окклюзии обеих сонных артерий, а во втором производили клипирование средней мозговой артерии.

После гипоксического воздействия крысам вводили дельтаран (1 группа), пиракитам и кавинтон (2 группа), пирацетам, кавинтон и цитофлавин (3 группа), части животных терапевтических мероприятий не производили (4 группа – контрольная).

В результате проведенных исследований было установлено, что повышенная ЭФПЭ в группе (контрольные животные) по сравнению с интактными ( $p < 0,05$ ) восстанавливалась после применения в качестве терапевтических мероприятий дельтарана, до уровня интактных животных в обеих моделях альтерации. В меньшей степени была выявлена эффективность при использовании пирацетама + кавинтона, а так же пирацетама + кавинтона + цитофлавина.

Анализируя лейкоцитарную формулу крови, следует отметить, что состояние животных в контрольной группе соответствует показателям стресса (число лимфоцитов ниже уровня нормы – до 50%). При всех проводимых терапевтических процедурах животные переходят в состояние активации организма (число лимфоцитов находится в верхней половине зоны нормы 60–70%). На основании полученных результатов следует заключить, что применение изученных фармакологических воздействий на альтерированных животных улучшает характеристики крови. Это может являться одним из механизмов восстановления нарушенного мозгового кровообращения при окклюзии мозговых артерий. При этом измерение ЭФПЭ и лейкоцитарной формулы крови позволяет оценить эффективность фармакотерапии в отношении восстановления гомеостаза не только крови, но и всего организма.

**Влияние N-концевого фрагмента ноцицептина на поведение  
лабораторных крыс разного пола и возраста при однократном введении  
Иванова Екатерина Алексеевна (Москва, katya.kilgor@gmail.com)**

Ноцицептин – гептадекапептид, являющийся эндогенным лигандом нетипичного опиоидного рецептора ORL-1. Как и опиоидные пептиды, он вызывает пресинаптическое торможение нейронов. В то же время многократно показано, что ноцицептин, не связываясь с классическими опиоидными рецепторами, способен блокировать эффекты морфина, в первую очередь, его действие на болевую чувствительность. При введении ноцицептина взрослым грызунам наблюдается ряд изменений поведения, в том числе снижение двигательной активности и тревожности. Судя по литературным данным, в зависимости от дозы, вида и линии животных, а также других факторов эффект может изменяться (вплоть до смены направленности). Так, при введении *i.c.v.* в дозах 0,1-3 нмоль ноцицептин снижает тревожность самцов крыс линии Wistar в тестах с ярким светом. В то же время интракраниальное введение аналогичных количеств (до 1 нмоль) самцам крыс линии Long-Evans увеличивает степень связанной со светом тревожности. Известно о связанных с половыми гормонами различиях изменений болевой чувствительности у самцов и самок крыс при интракраниальном введении ноцицептина.

В нашей работе впервые исследовалось действие N-концевого фрагмента ноцицептина Phe-Gly-Gly-Phe-NH<sub>2</sub> на поведение животных при системном введении. Пептид в дозе 5 мг/кг инъецировали беспородным белым крысам разного возраста (половозрелые старше 90 дней и детёныши 28 дней) и пола. Спонтанное поведение животных и уровень локомоторной активности тестировали с помощью установки «открытое поле с норками». В эксперименте в качестве стрессогенного фактора использовали яркий свет. Как выяснилось в результате тестирования, тетрапептид изменяет двигательную активность и уровень тревожности. Изменения имеют разную направленность в зависимости от пола и возраста животных. У взрослых самок существенных различий между контролем и опытом не обнаружено. У взрослых самцов, а также у самок в возрасте 28 дней пробег, число стоек и число выходов в центр арены в опытной группе оказались увеличены, что позволяет сделать вывод о повышении у них двигательной активности и снижении тревожности. У самцов в возрасте 28 дней, напротив, указанные параметры в опытной группе оказались уменьшены. Число заглядываний в «норки» (показатель исследовательского поведения) при введении препарата существенно не изменилось во всех экспериментальных группах. Все обнаруженные эффекты пептида проявлялись сильнее при выключении яркого света.

Таким образом, показано, что эффект системного введения препарата может менять направленность в зависимости от пола и возраста подопытных животных, что характерно для действия многих регуляторных пептидов. Такое неоднозначное влияние может быть связано с особенностями созревания ноцицептивной и опиоидной медиаторных систем ЦНС, а также различиями в плотности рецепторов в различных областях мозга и гормональном статусе самцов и самок.

**Гистоморфологическое исследование повреждения и динамики заживления мягких тканей полости рта в ходе фракционного лазерного фототермолиза в экспериментах на животных**

*Карабут М.М., Киселева Е.Б. (Нижний Новгород, maria.karabut@gmail.com)*

Метод фракционного лазерного фототермолиза, направленный на улучшение регенерации биоткани, заключается в создании изолированных несоприкасающихся тепловых микроранок, окруженных зонами жизнеспособной ткани. Основываясь на опыте применения фракционного метода для омоложения кожи, предполагается получить аналогичную восстановительную реакцию мягких тканей полости рта.

Использовался диодный лазер на длине волны 980 нм, генерирующий излучение мощностью 18 Вт с продолжительностью единичного импульса 150 и 250 мс. Каждая колонка создавалась при контакте сапфирового наконечника диаметром 400 мкм с тканью. Эксперименты проводились на 5 новозеландских кроликах. Лазерные колонки наносились рядами (по 2-3 колонки) на слизистую верхней и нижней челюсти в области резцов. Кролики выводились из эксперимента на 1-38 день с момента нанесения колонок. Биопсийный материал, взятый из области колонок, окрашивался гематоксилином – эозином, по Ван-гизону, на лактатдегидрогеназу и пикросриусом красным.

Гистологические исследования зоны лазерного повреждения при режиме 150 мс показали, что: сразу после повреждения в зоне колонки обнаруживаются деструкция эпителия, полная дезактивация ферментов и признаки слабой (или умеренной) коагуляции коллагена, в то время как полной дезорганизации коллагена не происходит; через сутки развивается выраженное реактивное воспаление, которое усугубляет дезорганизацию поврежденного коллагена, приводя к полной потере им поляризационных свойств; на 5 сутки формируется новый эпителий с высокой базально-клеточной активностью и высокой плотностью молодых клеток во всем пласте, в соединительной ткани фиксируется высокая активность фибробластов, участвующих в формировании новых тонкостенных сосудов и продуцирующих молодой коллаген; к 12 дню молодой эпителий достигает исходной высоты, новый коллаген обладает всеми уровнями структурной организации (это подтверждается наличием у него поляризационных свойств), но его ориентация в подэпителиальном слое не имеет горизонтальной упорядоченности, фиксируется избыточное количество новых кровеносных сосудов и признаки реактивного отека ткани; к 30 дню структура ткани полностью восстанавливается, признаков рубцевания не выявлено, при этом в эпителии устойчиво обнаруживаются признаки паракератоза.

Гистологические исследования зоны лазерного повреждения при режиме 250 мс показали, что принципиально сроки его заживления те же, что и при 150 мс, однако как степень повреждения ткани (признаки коагуляции эпителия и дезорганизации коллагена), так и выраженность признаков заживления (количество фибробластов, вновь образованных сосудов, нового коллагена) при режиме 250 мс выражены более значительно. Кроме того, заживление эпителия при режиме 250 мс характеризуется устойчивым развитием не только паракератоза, но и акантоза, что позволяет считать этот режим излучения менее оптимальным.

*Авторы выражают признательность д.м.н. профессору Гладковой Н.Д. за помощь в организации и проведении исследований и в написании тезисов.*

**Роль торакального и абдоминального компонентов в реакции системы дыхания  
на изолированные специфический и условно-рефлекторный раздражители**  
*Кондакова Марина Сергеевна (Тверь, kondakova-m@mail.ru)*

Вентиляция легких осуществляется за счет сокращения межреберных мышц и диафрагмы. В связи с этим принято выделять торакальный и абдоминальный компоненты аппарата дыхания. Целью нашего исследования было изучить особенности поведения системы дыхания человека при специфической гуморально-рефлекторной и условно-рефлекторной стимуляции.

В исследовании приняли участие 6 женщин 18-22 лет, привычных к условиям эксперимента. В положении сидя посредством компьютерного безмасочного пневмографа регистрировались объемные и временные параметры дыхания, их торакальные и абдоминальные составляющие. Осуществлялся контроль оксигенации артериальной крови и концентрации углекислого газа в альвеолярном воздухе. В качестве индифферентного сигнального раздражителя использовался метроном с частотой 168 уд./мин. Было проведено 8 серий исследования. В 1-й серии дыхательные параметры регистрировались при дыхании воздухом под метроном, во 2-й – при возвратном дыхании до увеличения концентрации углекислоты в альвеолярном воздухе на 2,5%, или снижения оксигенации артериальной крови до 80%, без сигнального раздражителя. Данный уровень гиперкапнии вызывал значительную вентиляторную реакцию и хорошо переносился испытуемыми. В 3–7 сериях дыхательные параметры регистрировались при возвратном дыхании под метроном (тренировки по выработке условного рефлекса). Ежедневно проводилось по две серии исследования (с перерывом 1,5 часа). В 8 серии дыхательные параметры регистрировались при дыхании воздухом под метроном (контроль формирования условного рефлекса).

Анализ параметров дыхания показал, что влияние условного раздражителя (метроном) на специфическую вентиляторную реакцию проявляется уже в процессе формирования условного рефлекса. Так систематическое сочетание действия условного и специфического гуморально-рефлекторного (гиперкапния с гипоксией) раздражителей приводит к увеличению вклада торакального компонента в вентиляторную реакцию на специфический стимул. После систематического сочетанного воздействия исходно индифферентного и специфического гуморально-рефлекторного стимула выявлена гипервентиляционная реакция в ответ на неподкрепленный условный раздражитель. Это свидетельствует о формировании временной связи между корковым центром условного раздражителя и корковым представительством безусловного рефлекса. Вентиляторная реакция системы дыхания на условный раздражитель проявляется в приросте минутного объема вентиляции легких за счет увеличения глубины дыхания при неизменной частоте. Условно-рефлекторная вентиляторная реакция системы дыхания протекает в два этапа. На 1 мин действия условного раздражителя наблюдается прирост вентиляции легких исключительно за счет торакального компонента. Затем, на фоне гипокапнии, происходит снижение вентиляции легких за счет абдоминального компонента. Это свидетельствует о большей подверженности межреберной мускулатуры кортикалным, а диафрагмы – стволовым регуляторным влияниям.

**Влияние агонистов и антагонистов серотониновых рецепторов  
на сократительную активность сердечной мышцы *Helix pomatia***  
*Корнева Елена Сергеевна (Москва, Goldlen@mail.ru)*

Хорошо известно, что для сердца улитки мощным активатором сокращения является серотонин (5-гидрокситриптамин – 5HT). Серотониновые рецепторы улитки не изучены. У млекопитающих известно 7 подтипов 5HTR. Шесть из них сопряжены с белками Gi/o (5HT1R, 5HT5R), Gq/11 (5HT2R) и Gs (5HT4R, 5HT6R и 5HT7R). 5HT3R являются катионными каналами.

Цель работы – выявление 5-HT рецепторов ответственных за регуляцию сократимости сердечной мышцы *Helix pomatia*. Исследования проводились на Кропотовской биологической станции, по методике позволяющей регистрировать изменение сократительной активности изолированного желудочка сердца виноградной улитки

(Соломонова и соавт., 2007). Для идентификации 5HTR в сердце *H.romatia* были использованы лиганда разных подтипов 5HTR млекопитающих.

В ходе эксперимента наблюдали положительный инотропный эффект в ответ на воздействие селективного агониста 5-HT1A рецепторов – 8-OH-DPAT. L 694,247 – агонист 5-HT1D – вызывал дозозависимое увеличение амплитуды сокращений сердца улитки. Воздействие SCH 23390 – агониста 5-HT1C – также приводило к дозозависимое увеличению амплитуды сокращений. Блокаторы 5HT2-рецепторов кетансерин, миансерин не подавляли действие серотонина. Сократимость сердца *H.romatia* усиливается агонистом 5HT3R – соединением 5HTQ – и подавляется антагонистом 5HT3R – закопридом. При исследовании действия агониста активирующих аденилаткиназу рецепторов 5HT4R RS 67506 на сократительную активность сердца моллюска под действием серотонина, можно наблюдать резкое потенцирование серотонинового эффекта.

Выводы: полученные данные свидетельствуют, что в активацию сократимости сердца *H.romatia* вовлечены не менее трёх разных подтипов рецепторов 5HT: 5HT1R, 5HT3R и 5HT4R. Мы предполагаем, что 5HT активирует вход ионов  $Ca^{2+}$  в мышечные клетки сердца улитки через сопряженные с 5HT3R катионные каналы, а активация 5HT4R, сопряженных с Gs-белком и АЦ, приводит к увеличению активности этих каналов. Работа поддержанна грантами РФФИ № 08-04-01466 и SCOPES №IB 74A0-110940. Автор выражает благодарность за помощь в подготовке тезисов д.б.н., проф. П.В. Аводонину.

### **Характер образования антител к стероидным гормонам у женщин с привычным невынашиванием беременности**

**Красильникова Ксения Сергеевна** (Кемерово, krasilka-ks@mail.ru)

Самопроизвольный выкидыш, заканчивающийся гибелью плода на разных сроках беременности, является одной из наиболее сложных и актуальных проблем гинекологии. В случаях, когда самопроизвольный выкидыш повторяется более 2 раз подряд, говорят о привычном невынашивании беременности (ПНБ). До недавнего времени среди причин невынашивания часто фигурировала неясная этиология выкидыша. Сейчас немаловажную роль при этом стали уделять аутоиммунным факторам. В этой связи особый интерес представляют аутоантитела к стероидным гормонам, эстрадиолу и прогестерону, обеспечивающим нормальное течение беременности. Известно, что прогестерон играет важную роль в процессах имплантации эмбриона, контролирует в течение беременности нормальный тонус матки, адаптирует шейку матки к родам. Под влиянием эстрадиола во время беременности матка увеличивается в объеме, в ней растет число кровеносных сосудов и повышается кровоток.

Поэтому целью настоящей работы было изучение особенностей образования антител классов А и G к прогестерону и эстрадиолу у женщин с привычным невынашиванием беременности.

В исследовании принимали участие 78 женщин с привычным невынашиванием беременности, в анамнезе которых было 2 и более выкидышей (опытная группа). Группу сравнения составили 62 женщины с физиологическим течением беременности (контроль). Все женщины находились на II триместре беременности, средний возраст в обеих группах составил  $26,7 \pm 0,5$  лет. Состояние здоровья оценивалось на основе медицинских карт. Антитела к стероидным гормонам определяли методом неконкурентного ИФА, разработанного в Институте экологии человека СО РАН. Статистическую обработку данных проводили при помощи непараметрического U-критерия Манн-Утни ( $p < 0,05$ ).

В результате исследования были выявлено, что уровень антител класса А к эстрадиолу в группе с ПНБ был в полтора раза достоверно ниже, чем в группе сравнения ( $p = 0,0002$ ). А уровень антител этого же класса к прогестерону в контрольной группе был статистически достоверно выше в 1,6 раз, чем в группе с ПНБ ( $p = 0,002$ ). Уровень антител класса G к эстрадиолу у женщин с ПНБ отличался незначительно от такового показателя в группе сравнения. Однако, уровень антител этого же класса к прогестерону был в 1,5 раза ниже в группе с ПНБ по сравнению с контрольной группой ( $p = 0,007$ ).

Таким образом, в результате нашего исследования были выявлены достоверные различия в характере образования антител к стероидным гормонам у женщин с репродуктивными потерями. Низкий уровень антител к эстрадиолу и прогестерону у женщин с ПНБ может быть связан с низким уровнем самих стероидных гормонов и как результат с развитием репродуктивной патологии.

### **Трансплантация генетически модифицированных клеток мононуклеарной фракции пуповинной крови человека трансгенным G93A мышам**

*Кудряшова Неждана Владимировна (Казань, nkudryashova@gmail.com)*

При нейродегенеративных заболеваниях происходит гибель нейронов, дегенерация аксонов, нарушение коммуникаций в нейронных сетях и контролируемых ими функций. Для предотвращения вторичной дегенерации и поддержания роста нервных волокон одним из перспективных подходов служит применение клеточных технологий, основанных на трансплантации стволовых клеток. Возможности клеточной терапии в ЦНС интенсивно исследуют для лечения нейродегенеративных заболеваний. Признанной экспериментальной моделью нейродегенерации считают модель бокового амиотрофического склероза. Трансплантация мононуклеарных клеток крови пуповины человека трансгенным G93A мышам продлевала их жизнь, а терапевтический эффект зависел от количества трансплантированных клеток. Для повышения эффективности трансплантации активно исследуют возможности применения генетически модифицированных стволовых клеток с целью доставки в область повреждения нервной ткани факторов, поддерживающих выживание нейронов и рост нервных отростков.

Цель нашего исследования заключалась в изучении терапевтического эффекта трансплантации генетически модифицированных стволовых клеток мышам с фенотипом бокового амиотрофического склероза.

Клонирование генов GDNF и EGFP в экспрессионные плазмидные вектора. В качестве трансплантируемых клеток были использованы клетки мононуклеарной фракции пуповинной крови человека, характеризующиеся низкой аллореактивностью. Для трансфекции выделенных клеток плазмидой pBud-EGFP-GDNF был выбран метод электропорации. В качестве модели бокового амиотрофического склероза в работе использовались трансгенные мыши G93A. Трансплантацию клеток пуповинной крови выполняли путём инъекции в ретроорбитальное пространство асимптоматичных трансгенных мышей G93A 1x106 генетически модифицированных клеток. Через 2 и 4 недели был проведен забор печени. Иммуногистохимический анализ был проведен на срезах печени, фиксированной в парафин.

В ходе проведения ПЦР установлено достоверное увеличение экспрессии клонированных терапевтических генов EGFP и GDNF.

В ходе иммуногистохимического анализа печени мышей мы обнаружили, что иммунопозитивные трансплантированные человеческие клетки, генетически модифицированные двухкассетной плазмидной конструкцией pBud-EGFP-GDNF, мигрировали в зоны нейродегенерации. Наблюдали, трансплантированные клетки как среди перисинусоидальных клеток, так и среди других клеточных типов печени в паренхиме печени и перипортально. *Тезисы доклады основаны на материалах исследований, проведенных в рамках федеральной целевой программы (грант №2007-2-1.2-06-01-098, №2009-1.1-143-065-056). Автор выражает признательность доценту, к.б.н. Ризванову А.А., профессору, д.м.н. Исламову Р.Р. за помощь в исследовательской работе.*

### **Определение содержания тайтина в т.soleus крысы в течение восстановительного периода после гравитационной разгрузки**

*Кузнецов Михаил Владимирович (Казань, mixonPRO@gmail.com)*

Пребывание в условиях моделированной микрогравитации приводит к динамическим структурно-функциональным изменениям скелетных позио-тонических мышц испытуемых животных. Согласно ранним исследованиям, количество эластичного белка тайтина

в m.soleus, формирующего третий тип нитей в саркомерах поперечно-полосатых мышц позвоночных, уменьшается в условиях гравитационной разгрузки.

Целью работы являлось определение количества тайтина в m.soleus крысы в условиях 1 часового восстановительного периода после 7-ми суточной гравитационной разгрузки. Исследования проводились на 30-ти нелинейных лабораторных крысах массой 180-200 г..

Для создания гравитационной разгрузки использовалась модель Morey-Holton Y.R. et al. (2002). Для электрофоретических и иммунологических анализов тайтина, были взяты образцы m.soleus. Данные иммуноблотинга с использованием моноклональных антител к тайтину 9D10 подтвердили соответствие N2A-изоформе тайтина и его протеолитическому фрагменту тайтину 2 – (T2). Известно, что полное восстановление m.soleus млекопитающих происходит через 7-14 суток после пребывания в условиях микрогравитации. Между тем, в литературе отсутствуют данные об изменениях, наблюдаемых в первые часы послезагрузочной реадаптации. Исследование содержания тайтина в m.soleus крысы в течение 1 часового восстановительного периода после 7-ми суточной гравитационной разгрузки, показали, что подобная опорная нагрузка привела к снижению на 30% ( $p<0,05$ ) содержания интактной N2A-изоформы тайтина. При этом наблюдалось и уменьшение (1,5-2 раза) содержания белка T2, что также может свидетельствовать о более выраженной деструкции тайтина в m.soleus крыс в период послезагрузочной реадаптации.

Таким образом результаты нашего исследования указывают на необходимость «щадящего» (мягкого) восстановительного режима для млекопитающих в первые часы (а возможно и дни) после пребывания в условиях гравитационной разгрузки. Полученные данные могут стать новым инструментом в разработке эффективных методов восстановления двигательных функций при целом ряде патологических состояний (парезы, плегии, миопатии, и т.д.), а также в условиях изменяющейся гравитационной среды (гипо- и гипергравитация). Автор глубоко признателен своему научному руководителю доценту кафедры физиологии человека и животных Казанского государственного университета, к.б.н. Балтиной Т.В. и всему коллективу лаборатории управления движением.

### **Влияние тетрапептида Tug-Pro-Phe-Phe-NH<sub>2</sub> (эндоморфина-2) на поведение детёныш белых крыс при хроническом введении**

*Малышев Антон Викторович (Москва, malyshev89@gmail.com)*

Для эндогенного тетрапептида эндоморфина-2 показано высокоаффинное связывание с мю-опиоидными рецепторами и способность воздействовать на поведение экспериментальных животных. При центральном введении он влияет на исследовательские и оборонительные реакции, изменяет свойства кратковременной и долговременной памяти, а также способность к обучению, оказывает антидепрессантное и анксиолитическое действие. Исходя из возможностей клинического применения эндоморфина-2, представляется актуальным изучить последствия его периферических инъекций. В наших экспериментах эндоморфин-2 вводили детёнышам белых крыс с 1 по 14 день жизни в дозе 1 мг/кг (внутрибрюшно). Оценивалось воздействие препарата на способность животных к обучению с положительным подкреплением (тест «сложный лабиринт»), выработку моторного навыка (тест «Rota-rod»), двигательную и исследовательскую активность («открытое поле со сменой освещенности»), а также уровень тревожности («темная-светлая камера»). При использовании теста «темная-светлая камера» (возраст 36 дней) показано увеличение тревожности животных, получавших инъекции тетрапептида. Данное заключение основано на достоверно сниженном времени, которое крысята опытной группы проводят в светлом отсеке камеры ( $p<0,05$ ). В возрасте 42 дня в «открытом поле» в опытной группе были достоверно увеличены суммарный пробег и число обследованных норок на 2-й минуте наблюдений, а также снижено число затягиваний ( $p<0,05$ ), что в целом свидетельствует о повышении двигательной и исследовательской активности. При тестировании в «сложном лабиринте» (возраст 43-48 дней) в 1-й день обучения у крыс опытной группы было достоверно снижено суммарное (по 5-ти посадкам) время выполнения реакции нахождения подкрепления ( $p<0,05$ ) и количество ошибок в 1-ю посадку ( $p<0,01$ ). Следовательно, животные, получавшие эндоморфин-2, легче и эффективнее решали пространственный

задачу, причем у них, как и в «открытом поле», был повышен уровень исследовательской активности. Тест «Rota-rod» использовался дважды: на 28-й и 50-й день жизни. В возрасте 28 дней значимые различия между контролем и опытом отсутствовали. При повторном тестировании среднее время удержания на стержне в опытной группе оказалось больше, чем в контроле ( $p<0,05$ ), а также в сравнении с показателями при первом тестировании ( $p=0,06$ ). Это говорит об улучшении координации и выносливости животных, получавших тетрапептид, а также об их более высокой способности к выработке навыка удержания на вращающемся стержне. Таким образом, эндоморфин-2 при хроническом введении в дозе 1 мг/кг (1-14 дни жизни) оказывает отставленное действие на поведение экспериментальных животных; большинство из зарегистрированных эффектов можно расценивать как адаптивно благоприятные, что свидетельствует о перспективности дальнейших исследований физиологической активности эндогенных пептидов группы эндоморфинов.

**Субпопуляции клеток тимуса, экспрессирующих иммунные протеасомы в онтогенезе крыс**  
*Маслова Елена Викторовна (Москва, evmaslova@mail.ru)*

Иммунные протеасомы, в отличие от остальных протеолитических систем клетки, с наибольшей эффективностью генерируют пептидные фрагменты, способные встраиваться в молекулы главного комплекса гистосовместимости класса I для их представления Т лимфоцитам. В центральном лимфоидном органе – тимусе – иммунные протеасомы ответственны за отрицательную селекцию тимоцитов. Механизмы представления аутоантигенов в тимусе до настоящего времени мало изучены. Ранее с помощью Вестерн-блоттинга было установлено, что иммунные протеасомы начинают экспрессироваться в тимусе еще в эмбриогенезе. Целью настоящей работы явилось выявление типов клеток, экспрессирующих иммунные протеасомы в тимусе в перинатальном периоде развития крыс.

Распределение иммунных протеасом в клетках тимуса анализировали с помощью иммуногистохимии и проточной цитометрии у крыс Wistar с 21-го эмбрионального дня по 30-й постнатальный день. В качестве маркеров дендритных клеток использовали антитела к OX-62, эпителиальных клеток – антитела к кератинам 10, 18 и 19, тимоцитов – антитела к CD90, макрофагов и нейтрофилов – антитела к CD68. Двойное иммунофлуоресцентное мечение показало, что большинство эпителиальных и дендритных клеток в кортикальной и медуллярной зонах тимуса экспрессируют иммунные протеасомы на протяжении всего изученного периода развития. Иммунные протеасомы были выявлены также в макрофагах тимуса.

Функция иммунных протеасом генерировать аутоантигенные олигопептиды для последующего их представления Т-лимфоцитам в тимусе, по-видимому, не единственная. Согласно данным, полученным с помощью проточной цитометрии, подавляющее большинство тимоцитов также экспрессируют иммунные субъединицы протеасом LMP2 и LMP7. Присутствие иммунных протеасом в тимоцитах в перинатальном онтогенезе позволяет предположить, что наряду с представлением антигенных эпитопов иммунные протеасомы в тимусе также могут выполнять и другие важные функции, например, участвовать в образовании биологически активных пептидов.

Таким образом, все типы антиген-представляющих клеток тимуса экспрессируют иммунные протеасомы еще до рождения. Полученные результаты свидетельствуют о том, что становление процесса отрицательной селекции в тимусе крыс, зависимое от активности иммунных протеасом, может происходить уже в пренатальном онтогенезе.

*Работа выполнена при поддержке РФФИ, проект 08-04-00276.*

**Взаимодействие дендритных клеток и цитотрофобласта – роль в сохранении плода**  
*Матвеичев А.В., Цатуров М.Э., Ломунова М.А., Талаева М.В., Зачиенко И.Е.,  
Бабайкина О.Н. (Нижний Новгород, alex\_norton@mail.ru)*

Согласно современным представлениям иммунная система человека распознает любой объект, несущий признаки генетической чужеродности, как мишень для уничтожения. Однако, сохранение матерью во время беременности плода, несущего чужие гены, унаследованные от отца, является уникальным иммунологическим феноменом, механизмы

которого полностью не поняты до сих пор. Одним из механизмов его реализации является сдвиг продукции цитокинов при беременности, в результате чего наиболее опасные для плода клеточные формы иммунных реакций подавляются без существенного ущерба для общего уровня защиты организма. Данная работа посвящена исследованию роли наиболее активных антигенпрезентирующих клеток иммунной системы – дендритных клеток (ДК) в реализации механизмов, обеспечивающих толерантность иммунной системы матери и плода. Исследования проводили в экспериментальных моделях фето-плацентарного микроокружения *in vitro*. Клетки трофобласта (ТР) выделялись из образцов плаценты со сроком гестации 5-11 недель с помощью трипсинации и разделения суспензии на градиенте перколя. ДК получали из моноцитов крови здоровых беременных женщин культивированием с рекомбинантными интерлейкином-4 и гранулоцитарно-макрофагальным колиниестимулирующим фактором в течение 6 суток. Часть ДК созревала в присутствии ТР. На 7 сутки ДК активировали с помощью липополисахарида *S. typhi*. Оценивали фенотип ДК – цитофлюорометрически, и функциональные свойства – в смешанной культуре лимфоцитов. Культуры ДК, росшие с ТР (ДК-ТР), содержали большое количество вытянутых веретенообразных клеток, в отличие от ДК, росших без ТР, что свидетельствует об изменении адгезивных свойств ДК под действием ТР. В культурах ДК-ТР была снижена экспрессия молекул HLA-DR и процент клеток, несущих её, тогда как экспрессия моноцитарного маркёра CD14 была повышена. ДК, росшие как без ТР, так и в его присутствии, одинаково эффективно стимулировали пролиферацию аллогоенных лимфоцитов и не обладали способностью индуцировать продукцию интерлейкина-4 в краткосрочной смешанной культуре. В то же время созревание ДК в присутствии ТР подавляло их способность стимулировать продукцию интерферона- $\gamma$  – ключевого цитокина, управляющего наиболее опасными для плода клеточными формами иммунных реакций. В результате продукция интерферона в смешанных культурах, стимулированных ДК-ТР, падала в 2,88 раза по сравнению с культурами, стимулированными ДК, созревавшими без ТР. Т-лимфоциты, стимулированные ДК-ТР, сохраняют экспрессию CD62L, что ограничивает маршрут их рециркуляции и возможность участия в конфликте матери и плода. Таким образом показано, что ДК участвуют в формировании цитокинового сдвига беременности и изменении миграции Т-клеток. Полученные данные открывают возможность поиска новых средств для лечения патологий беременности. Работа поддержана РФФИ, проекты 07-04-00244, 10-04-00304-а. Авторы выражают благодарность научному руководителю работы, заведующему лабораторией клеточной иммунологии Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии Талаеву Владимиру Юрьевичу – без него данная работа не состоялась бы никогда.

**Сопоставление противоизвестных эффектов пептида PGP  
и его модификаций RPGP и PGPR на стрессорной модели язвообразования**  
*Махмадалиева С.А., Мерчиева С.А. (Москва, kopylovagn@list.ru)*

Пептид PGP относится к семейству глипролинов и обладает широким спектром физиологической активности. Одним из наиболее выраженных свойств этого пептида является его способность предотвращать и корректировать ряд постстрессорных нарушений в организме. Как показали предшествующие исследования, предварительное введение PGP (внутрибрюшинно, перорально и интраназально) существенно уменьшает вызванные различными видами стресса повреждения слизистой оболочки желудка (СОЖ), нарушения в системе лимфо- и кровообращения брыжейки, активацию тучных клеток, а также ослабляет вызываемые стрессом нарушения поведенческой активности.

Целью данной работы было сопоставление эффективности протекторных эффектов PGP и его модифицированных форм RPGP и PGPR в отношении постстрессорных повреждений СОЖ. Опыты проводили на крысах-самцах линии Вистар весом 200-250 г. В качестве стрессорного воздействия использовали 30-минутное неизбежаемое плавание. Через 1 час после стресса под бинокулярным микроскопом оценивали степень повреждения СОЖ как суммарную площадь эрозий в  $\text{мм}^2$ . Пептиды вводили внутрибрюшинно за 1 час до действия стрессора в дозе 3,7 мкмоль/кг; животным контрольной группе вводили физиологический

раствор в том же объёме. В предшествующих работах пептид PGP в эквимолярной концентрации уменьшал степень постстрессорного повреждения СОЖ в среднем на 50%.

Присоединение аргинина как к N-, так и к C-концу пептида значительно увеличило эффективность его противоязвенного действия. Так RPGP снижал степень повреждений СОЖ на 70%, а PGPR – на 86%. Итак, модификация пептида PGP за счёт присоединения аргинина существенно усиливает его защитное действие в отношении стрессогенного язвообразования. *Выражаем благодарность нашим научным руководителям проф. Галине Ефимовне Самониной и доценту Галине Николаевне Копыловой.*

### **Plasticity of vestibulo-hypothalamic connections**

**Melkumyan Karine Vaganoynva** (Armenia, Yerevan, karine.melkumyan@gmail.com)

Hypothalamus is mostly responsible for functional regulation of human vegetative reactions and in conditions of native high stimulation of vestibular system (e.g. in transport, construction, road-building, during use of weight loss facilities, electric mixers etc.) some vegetative reactions are appeared (sickness, giddiness, retching etc.). It is astounding, that till now the plasticity of vestibulo-hypothalamic functional connections is not enough investigated. Particularly there is no information about changes in these connections' plasticity under vibration. It is obvious, that the deflections of vestibulo-hypothalamic functional connections are assuredly mostly responsible for functional changes in vegetative reactions. The aim of our study is to investigate this problem, since it has very important role for treatment of vestibular disease.

Electrophysiological investigations were carried out to examine the responses of hypothalamic paraventricular (PVN) and supraoptic (SON) nuclei to high-frequency electrical stimulation (100Hz, 1sec.) of ipsilateral inferior vestibular nucleus (IVN) in anesthetized albino rats. The impulse activity of PVN (from 93 cells) and SON neurons (from 110 cells) was registered before, during and after stimulation of IVN. Analysis of impulse activity was made on-line by the program on bases of the histograms: peri event time, interimpulse intervals, cumulative, frequent and of those averaging. Non-reactive neurons did not participate in further study. The stimulation of ipsilateral IVN inhibited the SON neurons activity with both tetanic – 7,8% and posttetanic – 72,6% depressive effects. Excitatory posttetanic potentiation was noted in the rest neurons of SON – 19,6%. Analysis of PVN neuronal responses also showed inhibitory action of IVN stimulation 61,5%. But tetanic depression was not recorded in this group, moreover, tetanic potentiation (5,4%) and quite a number posttetanic potentiation (33,1%) were noted. Results testify about the presence of inferior vestibulo-hypothalamic projections, which have basically inhibitory character for both PV and SO nuclei, although there are also some excitatory connections. The results are discussed.

*Благодарю за оказанную помощь мою научную руководительнице Сирануш Минасовну, а также Сусанну Грачевну за добрые и полезные советы.*

### **Влияние коротких глипролинов с присоединенным к N- и C -концам аминокислотными остатками на устойчивость слизистой оболочки желудка к действию этанола**

**Мерчиева Светлана Анатольевна** (Элиста, svetlanamerchieva@yandex.ru)

Глипролины, эндогенные регуляторные пептиды, образуются в организме в процессе синтеза и распада коллагена, эластина, энтеростатина и других белков соединительной ткани. Присоединение к N- и C-концам глипролинов аминокислотных остатков аргинина или лейцина приводит к образованию модифицированных глипролинов. Высказано предположение, что модифицированные пептиды могут изменять устойчивость конечной молекулы к действию протеаз, дополнять, усиливать и/или изменять физиологические эффекты исходного глипролина.

Целью настоящей работы было изучение возможности протекторных противоязвенных эффектов коротких модифицированных глипролинов, образованных путем присоединения к N- или C-концам трипептида Pro-Gly-Pro или его метаболитов Pro-Gly и Gly-Pro аминокислотного остатка аргинина (R) или лейцина (L) на этаноловой модели язвообразования у крыс.

Эксперименты проводили на беспородных крысах самцах массой 200-250 г. Исследовали противоязвенные эффекты следующих модифицированных глипролинов с присоединёнными: а) к N-концу- RPGP, RGP, LPGP.б) к C-концу – PGPR, PGPL, GPR и PGR. Глипролины были синтезированы в Институте молекулярной генетики РАН.

У крыс, не получавшим пищи в течение 18 часов, внутрижелудочным введением 96%-го этанола (1мл/200 г веса) вызывали повреждения слизистой оболочки желудка (СОЖ). Исследуемые модифицированные глипролины вводили в дозе 3,7 мкмоль/кг внутрибрюшинно в объёме 0,5 мл на 200 г массы животного за 1 час до начала действия этанола. Контрольные животные получали соответствующий объём физиологического раствора. Площадь повреждений желудков оценивали с помощью бинокулярной лупы в  $\text{мм}^2$ . Статистическую обработку результатов проводили с использованием LSD-теста из пакета компьютерных программ STATISTICA. Различия в результатах считались значимыми при  $p<0,05$ .

Этаноловые повреждения представляли собой обширные ленточные геморрагии.

Результаты показали, что у контрольных животных, получавших физиологический раствор за 1 час до введения этанола, площадь повреждения составила в среднем  $47,8 \text{ мм}^2$ . Предварительное введение большинства изученных глипролинов, за исключением PGPL и GPR, достоверно уменьшали площадь повреждения. Наибольшее достоверное уменьшение площади повреждения вызывали PGPR, PGR, RPGP и RGP. Средняя площадь повреждения СОЖ соответственно была равна  $14,4; 13,2; 12,2$  и  $22,5 \text{ мм}^2$  ( $P<0,0001$ ).

Таким образом, полученные результаты показали, что не только обычные, но и некоторые модифицированные глипролины, обладают значительными противоязвенными свойствами в отношении этаноловых повреждений СОЖ, ультерогенез которых в основном обусловлен периферическими механизмами.

**Изменения физиологических и биохимических показателей,  
характеризующих процессы мышечного утомления и восстановления,  
протекающих под действием физических нагрузок высокой интенсивности**  
**Минигалин Алексей Дмитриевич (Санкт-Петербург, *wolverine.surgut@mail.ru*)**

Механизмы, лежащие в основе утомления скелетной мышцы под действием физической нагрузки (ФН), во многом остаются неизученными. Цель работы состояла в исследовании динамики физиологических и биохимических маркеров мышечного утомления (на примере *M. rectus femoris*). В эксперименте участвовали 10 физически здоровых мужчин 20-23 лет. В процессе ФН испытуемые, сидя на тренажере, разгибали ноги в коленях, поднимая груз заданной массы максимальное количество раз. Величина груза составила 40, 35, 30, 25, 20, 15 и 10 кг в каждом подходе соответственно. Запись электромиограммы (ЭМГ), миотонограммы и взятие периферической крови проводили до ФН, а также сразу, через 1 ч, 1, 3, 6-7 и 9-10 суток после ФН. Измеряли содержание лейкоцитов, а в сыворотке крови определяли активность креатинкиназы (КК) и концентрацию лактата. Сразу после ФН выявили увеличение концентрации лактата, снижение амплитуды ЭМГ и небольшой миогенный лейкоцитоз. По истечении 1 суток амплитуда ЭМГ возросла (фаза суперкомпенсации), и произошло снижение содержания лейкоцитов в крови, которое предшествовало пику болевых ощущений, развившемуся в течение 2 суток. На 3 сутки значительно возросла активность КК (маркер повреждения мышцы), тогда как амплитуда ЭМГ в это время снизилась. К 9-10 суткам происходила нормализация этих показателей. После ФН уменьшался тонус напряжения (ТН) и увеличивался тонус расслабления (ТР) мышцы. При этом дельта (разница между ТН и ТР) уменьшается в 2,3 раза, что подтверждает утомление мышцы.

Полученные данные показывают, что ФН вызывает фазовые изменения электрической активности мышцы, которые, по-видимому, сопряжены как с закислением цитоплазмы под действием ФН, так и с развивающимся далее каскадом реакций повреждения мышечной ткани.

## **Активность адренорецепторов и холинорецепторов артериальных сосудов**

**в различные сроки адаптации к холоду**

**Мирюк Михаил Николаевич (Москва, mikhail.miruk@gmail.com)**

Адаптация организма к низким температурам является одним из основных факторов выживания. Действие холода на организмы происходит как на Земле, так и в Космическом пространстве при полетах в космических кораблях. Поэтому, изучение механизмов холодовой адаптации и действие холода на рецепторы артерий позволяет заранее предвидеть и регулировать эти процессы. В работе проведен анализ альфа-1-, бета-2-, альфа-2-адренореактивности и М-холинореактивности артериальных сосудов кожно-мышечной области и тонкого кишечника после однократного охлаждения, 5-и, 10-и, 30-и дневной холодовой адаптации при  $t=(-)10^{\circ}\text{C}$  по 6 часов ежедневно. В различные сроки действия низких температур адаптация к холоду осуществляется за счет различного изменения как чувствительности, так и количества активных  $\alpha 1$ - и  $\alpha 2$ -адренорецепторов в артериальных сосудах кожно-мышечной области и регионе тонкого кишечника. В различные периоды холодовой адаптации действие медиаторов симпатической системы норадреналина и адреналина на артериальные сосуды кожно-мышечной области и тонкого кишечника различно. При адаптации к холоду увеличивается бета-2-адренореактивность артериальных сосудов как в кожно-мышечной области, так и в тонком кишечнике за счет увеличения количества активных рецепторов во все исследуемые сроки действия холода. В 1-й и 5-и день адаптации к холоду М-холинореактивность артериальных сосудов увеличена больше в регионе тонкого кишечника за счет большей чувствительности рецепторов по сравнению с кожно-мышечной областью; на 10-й и 30-й день холодовой адаптации реактивность уже больше в кожно-мышечной области за счет большего увеличения как чувствительности. Так и количества активных М-холинорецепторов по сравнению с регионом тонкого кишечника.

## **Влияние сероводорода на экзоцитоз синаптических везикул**

**в двигательном нервном окончании диафрагмы мыши**

**Митрухина О.Б., Шафигуллин М.У. (Казань, mitrohellga@gmail.com)**

Сероводород ( $\text{H}_2\text{S}$ ), наряду с оксидом азота и монооксидом углерода, относится к активно изучаемому в последнее время классу газообразных посредников. Ранее известный только своим токсичным действием,  $\text{H}_2\text{S}$  теперь изучается как эндогенный модулятор деятельности внутренних органов и нервной системы.

Модуляция синаптической передачи является одним из актуальных направлений в электрофизиологии, а в основе пресинаптических форм пластичности лежит изменение динамики процессов экзо- и эндоцитоза везикул. О роли  $\text{H}_2\text{S}$  в кругообороте везикул в нервном окончании практически ничего не известно, поэтому цель нашего исследования – выявить эффекты сероводорода на процессы экзоцитоза синаптических везикул в двигательном нервном окончании диафрагмы мыши.

В качестве донора сероводорода использовали гидросульфид натрия  $\text{NaHS}$ , который диссоциирует в растворе с образованием  $\text{H}_2\text{S}$ . Для выявления динамики экзоцитоза нервное окончание предварительно загружали флуоресцентным красителем FM1-43 (он обратимо связывается с мембраной и в результате эндоцитоза оказывается внутри везикул) по следующей схеме: в раствор добавляли краситель, 1 мин. стимулировали нерв с частотой 50 Гц, через 10 мин. начинали отмывку (30 мин в контроле и 20 мин с последующим добавлением  $\text{NaHS}$  200 $\mu\text{M}$  в течение 10 мин). Для предотвращения сокращения мышцы в раствор добавляли d-тубокуарин, после чего препарат повторно стимулировали с частотой 50 Гц, анализируя снижение интенсивности флуоресценции (“выгрузка” красителя из нервной терминали).

В контроле интенсивность свечения нервной терминали снижается двухфазно: сначала быстро – до  $78,05\pm4,91\%$  через 60 сек, затем более медленно –  $50,59\pm5,11\%$  к 5 мин и  $25,46\pm3,48\%$  ( $n=5$ ,  $p<0,05$ ) через 20 мин. При добавлении  $\text{NaHS}$  в быстрой фазе существенных различий в интенсивности свечения нет – до  $82,95\pm6,29\%$  через 60 сек, но во второй фазе замедление выгрузки красителя значительно:  $72,77\pm8,01\%$  к 5 мин и  $53,88\pm7,63\%$  ( $n=4$ ,  $p<0,05$ ) через 20 мин.

Согласно литературным данным, быстрая фаза отражает работу везикул пула, немедленно готового к высвобождению, медленная фаза – работу везикул рециклирующего и резервного пула. Таким образом, замедление выгрузки красителя может быть связано с усилением рециклизации везикул, при этом, синаптические везикулы, повторно участвующие в процессе экзоцитоза, уже не содержат краситель и поэтому не вносят вклад в изменение интенсивности свечения. *Работа поддержана грантами РНП 2.1.1/786 и НШ – 3368.2008.4*

#### **Динамика изменения экспрессии кальциевых каналов ретикулума и плазматической мембранны в процессе дифференцировки скелетных миобластов в миотубулы**

**Муслихов Эльдар Рамильевич** (Москва, eldr-87@mail.ru)

Ранее считалось, что в скелетных мышцах повышение уровня цитоплазматического кальция происходит только при активации потенциалуправляемых каналов L-типа и рианодиновых рецепторов (RyR). Однако не так давно в скелетных мышечных клетках были выявлены сигнальные системы, характерные для электроневозбудимых клеток, – каналы ретикулума, активируемые инозитолтрифосфатом (IP<sub>3</sub>-рецепторы), кальциевые каналы плазматической мембрани семейства TRP (TRPC1 и TRPV2), а также каналы Orai1 (Авдонин и др., 2008). Целью данной работы было оценить изменения данных потенциалнезависимых систем обмена ионов Ca<sup>2+</sup> в процессе дифференцировки миобластов и их значимость в зрелых многоядерных клетках скелетной мускулатуры.

Исследования проводили на культуре клеток линии C2C12 (скелетные миобlastы, полученные из бедра задней конечности мыши, коллекция ATCC). Дифференцировку вызывали заменой среды культивирования (DMEM), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, на среду, содержащую 4% лошадиной сыворотки. Измерения уровней экспрессии белков исследуемых каналов проводились на четырех этапах дифференцировки при помощи метода количественной полимеразной цепной реакции. Также проводились измерения кинетики поступления в цитоплазму ионов Ca<sup>2+</sup> в ответ на действие АТФ в дифференцирующихся миотубулах и недифференцированных миобластах при помощи кальциевого зонда (FLUO-4).

Было показано, что количество мРНК всех трёх типов рецепторов IP<sub>3</sub>, а также каналов TRPC1 и TRPV2 в процессе дифференцировки миобластов и формирования миотубул заметно возрастает. Нормировка проводилась по отношению к мРНК эндогенного контроля β-актина (эндогенный контроль). С повышением уровня экспрессии IP<sub>3</sub>-рецепторов, возможно, связано увеличение амплитуды кальциевого сигнала дифференцирующихся миотубул в ответ на АТФ в сравнении с реакцией миобластов, а повышение экспрессии каналов TRPC1 и TRPV2, по-видимому, обуславливает увеличение продолжительности в миотубулах кальциевого сигнала, обусловленного током Ca<sup>2+</sup> через плазматическую мембрану. Таким образом, повышение экспрессии указывает на возрастание участия исследуемых систем в развивающейся скелетной мускулатуре и подтверждает их физиологическую значимость в поперечнополосатой мускулатуре.

*Работа поддержана грантами РФФИ № 08-04-01466 и SCOPES №IB 74A0-110940.*

#### **Влияние химической деафферентации на митральные клетки обонятельной луковицы крысы**

**Невзорова Марина Николаевна** (Ярославль, tnevzorova@yandex.ru)

Митральные клетки – наиболее крупные нейроциты обонятельных луковиц – являются вторыми нейронами обонятельного анализатора. Исследования, направленные на ограничение афферентной стимуляции, позволяют установить ее роль в регуляции развития компонентов сенсорных систем.

Цель проведенного исследования заключалась в сопоставлении постнатального развития митральных клеток обонятельных луковиц интактных и деафферентированных крыс. Сравнивались морфометрические характеристики митральных клеток обонятельных луковиц интактной и деафферентированной белой крысы в первые полгода жизни. Заливка объекта исследования в парафин осуществлялась по стандартной методике. Поперечные срезы обонятельных луковиц окрашивались тионином по Нисслю. Деафферентация

осуществлялась однократным подкожным введением крысятам на вторые сутки жизни раствора капсацина в расчете 100 мг/кг.

У новорожденных интактных крыс митральные клетки располагаются в одноименном слое обонятельных луковиц в 2-4 ряда, у взрослых – преимущественно в 1 ряд. Плотность расположения нейроцитов и общее количество митральных клеток на срезе обонятельной луковицы с возрастом уменьшается. Так у новорожденных на срезе обонятельной луковицы насчитывается  $796\pm38$  клеток, а у шестимесячных животных –  $364\pm12$ . Площадь сечения митральной клетки, составляющая у новорожденных  $108\pm6$  мкм<sup>2</sup>, в течение первого месяца жизни увеличивается почти вдвое – до  $210\pm11$  мкм<sup>2</sup>, а затем вновь уменьшается, достигая у полугодовалых животных  $157\pm9$  мкм<sup>2</sup>. Одновременно с увеличением площади сечения нейроцитов, меняется их форма. Форм-фактор митральных клеток увеличивается в течение первого месяца жизни животных от  $0,47\pm0,02$  до  $0,74\pm0,02$ . В первое полугодие жизни крыс уменьшается ядерно-цитоплазматическое отношение и количество ядрышек митральных клеток, что отражает изменение интенсивности белкового синтеза этих нейроцитов.

Химическая деафферентация капсацином вызывала патологические изменения митральных клеток обонятельной луковицы крысы. В обонятельных луковицах экспериментальных животных выявлялись гипохромные митральные нейроны, у которых отмечался периферический хроматолиз, а также «сморщеные» гиперхромные клетки с гиперхроматозом или пикнозом ядра. Были отмечены клетки с периферическим положением ядра и безъядерные. Площадь перикарионов митральных нейронов в условиях деафферентации уменьшалась в течение 6 месяцев до 31%. Уменьшение количества митральных клеток на поперечном срезе обонятельной луковицы деафферентированных крыс отмечалось во все изученные сроки и у двухмесячных животных достигало 49%.

Таким образом, химическая деафферентация вызывает патологические изменения митральных клеток обонятельных луковиц крысы, уменьшение площади их перикарионов и уменьшение плотности митральных клеток. У шестимесячных крыс, достигших половой зрелости, восстановление всех морфометрических показателей митральных клеток животных не происходит.

#### **Ультраструктурные изменения в слизистой оболочке желудка при введении меланина на фоне экспериментальной гипергастринемии**

**Полякова Анастасия Андреевна** (Украина, Киев, *Anastation18@bigmir.net*)

Онкологические заболевания желудка среди причин смертности после рака легких, поэтому проблема профилактики передраковых состояний желудочно-кишечного тракта является чрезвычайно актуальной. В последнее время получены данные о различных фармако-терапевтических эффектах меланина при лечении заболеваний различного генеза, свидетельствующие о его полифункциональности.

Целью нашего исследования была оценка анти-канцерогенной активности меланина в условиях экспериментальной гипергастринемии, вызванной у крыс ежедневным введением омепразола. Для эксперимента использовали взрослых самцов крыс Wistar. Омепразол и меланин животным вводили интраперитонеально ежедневно в течение 28 суток. Реакцию слизистой оболочки желудка оценивали на основании электронно-микроскопического анализа.

Отмечено, что ширина слизистой оболочки желудка достоверно увеличивается в ходе развития гипергастринемии, тогда как введение меланина уменьшает этот эффект. Ультраструктурные изменения наблюдались во всех слоях слизистой оболочки: эпителии, собственном и мышечном слое. В эпителиальном слое большая часть клеток поддается метаплазии и приобретает признаки ороговевания. Клетки часто теряют свою специфичность, становятся однотипными. В клетках уменьшенное количество органелл, а в цитоплазме накапливаются продукты аномального обмена веществ, в результате чего клетки приобретают электронно-плотный вид. Они отделяются одна от другой, уменьшаются в размерах, формируют на поверхности микровыrostы и инвагинации разной глубины; приобретают признаки, характерные для клеток, которые погибают путем апоптоза.

Введение крысам меланина на фоне гипергастринемии предупреждает развитие описанных выше ультраструктурных изменений в слизистой оболочке желудка. Поверхностные эпителиоциты преимущественно имеют типичное для них в норме строение – содержат митохондрии, каналы зернистой эндоплазматической сети, комплекс Гольджи, многочисленные рибосомы, полисомы, секреторные гранулы. Эпителиоциты формируют, как правило, сплошной пласт, достаточно плотно прилегая друг к другу. Вместе с тем, встречаются эпителиоциты с большим ядром, мембранны которого образует инвагинации и микроядышками, которые были присущи для слизистой оболочки крыс после введения омепразолу и указывают на анаплазию.

Следует отметить, что в цитоплазме эпителиоцитов этой группы не наблюдаются тонофиламенты и гранулы кератогиалина. Не было в этом отделе желудка и роговых чешуек. Все это свидетельствует о том, что меланин предупреждает перерождение эпителия, который выстеляет фундальный отдел желудка крыс, в ороговевающий.

Полученные данные указывают на выраженный стабилизирующий эффект меланина в условиях развития экспериментальной гипергастринемии, что демонстрирует его антиканцерогенные свойства относительно развития рака желудка.

### **Исследование роли активных форм кислорода в сокращении сосудов при деполяризации гладкой мышцы**

*Путинцева Е.В., Мочалов С.В. (Москва, e.putintseva@yandex.ru)*

Как известно, повышенная концентрация KCl во внешнем растворе вызывает деполяризацию мембранны гладкомышечных клеток сосудов, вход в клетку  $Ca^{2+}$  по каналам L-типа, что приводит к запуску  $Ca^{2+}$ -зависимого сокращения. Позднее было показано, что KCl-деполяризация может приводить к активации Rho-киназы (RhoK), как предполагалось, вследствие увеличения внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$ . Однако нами было выяснено, что у новорожденных крыс (в возрасте 1-2 нед.) активация RhoK при деполяризации происходит без изменения внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$ .

В связи с этим наблюдением встал вопрос о прочих механизмах активации RhoK при деполяризации гладкой мышцы сосудов. Недавно появились данные об активации RhoK под действием активных форм кислорода (АФК). Мы предположили, что АФК могут принимать участие и в активации RhoK при деполяризации гладкой мышцы. Целью данной работы было изучить роль АФК в активации RhoK при деполяризации гладкой мышцы у новорожденных крыс. Для снижения уровня АФК в тканях нами было использовано селен-органическое соединение эбселен, обладающее пероксидазоподобным эффектом.

В качестве объекта исследования была выбрана подкожная артерия крысы (a.safena) – ветвь бедренной артерии, приносящая кровь к плюсне и стопе. Данная артерия относится к сосудам мышечного типа, под действием различных стимулов она способна значительно изменять свой просвет и тем самым регулировать кровоснабжение дистальных отделов задней конечности.

Для эксперимента были выбраны крысы в возрасте 14 дней (масса тела 23-28 г). Сокращение сосудов исследовали в изометрическом режиме с помощью системы wire myograph. Исследовали изменение силы сокращения при постепенном повышении концентрации  $Ca^{2+}$  в окружающем растворе от 0 до 3 мМ. В каждом опыте такие измерения проводили при физиологической концентрации  $K^{+}$  в растворе (5 мМ KCl), при  $K^{+}$ -деполяризации (42 мМ KCl), а также при совместном действии деполяризации и эбселена в концентрации  $10^{-5}$  и  $3 \cdot 10^{-5}$  М.

Нами были получены следующие результаты. Сила сокращения препарата в растворе с 42 мМ KCl была значительно выше, чем растворе с 5 мМ KCl. Действие эбселена в концентрации  $10^{-5}$  М приводило к снижению силы сокращения при действии раствора с 42 мМ KCl (на 15,4–23,9 %). Концентрация эбселена  $3 \cdot 10^{-5}$  М вызывала ещё большее снижение силы сократительного ответа (на 62,7–87,2 %).

Полученные данные позволяют заключить, что действие эбселена приводит к снижению силы сокращения сосудов новорожденных крыс при деполяризации гладкой мышцы. Этот эффект, вероятно, обусловлен антиоксидантными свойствами данного вещества, т.е.

снижением уровня АФК в клетках. Можно предположить, что в присутствии эбслена устраняется активирующее влияние АФК на RhoK, следствием чего является уменьшение сократительного ответа гладкой мышцы сосуда при деполяризации.

### **Влияние интраназального введения Pro-Gly-Pro на стрессорное язвообразование у белых крыс**

*Сангаджиева Анна Джангронва (Москва, sanganna@mail.ru)*

Глипролины – семейство регуляторных пептидов, включающее как простейшие пролин- и глициноводержащие ди- и трипептиды (PGP, GP, PG), так и более сложные глипролины. Эти пептиды обладают широким кругом биологической активности: нейропротекторным и противовоспалительным эффектами, влияют на гомеостаз слизистой оболочки желудка (СОЖ), снижают дегрануляцию тучных клеток и влияют на систему гемостаза. Pro-Gly-Pro (PGP) – один из представителей глипролинов, показывающий высокий лечебный и протекторный противоязвенный эффект в отношении СОЖ при внутрижелудочном (в/ж) или внутрибрюшинном (в/б) введении.

Целью данной работы – изучение протекторных эффектов PGP на стрессорной модели язвообразования еще при одном способе введения трипептида – интраназальном (и/н).

Эксперименты проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 250-300 г. За 18 ч до опыта животных лишали пищи и воды. Стress вызывали плаванием в «холодной воде» при температуре 20°C в течение 30 минут. Предварительно животным опытной группы за час до проведения эксперимента интраназально вводили PGP в дозе 3,7 мкм/кг в объеме 10 мкл/250 г, контрольной группе – физиологический раствор в том же объеме. Эвтаназию проводили через 2,5 часа после стресса. Всего было проведено 4 опыта. Статистическую обработку результатов проводили при помощи теста ANOVA компьютерной программы STATISTICA, с использованием параметрического LSD-теста.

У контрольных животных стресс вызывал повреждения СОЖ, площадь которых в среднем равна 0,7 мм<sup>2</sup> (n=17). Предварительное введение трипептида PGP значительно уменьшало площадь повреждения, которая в среднем была равна 0,27 мм<sup>2</sup> (n=15).

Проведенная работа показала, что и при интраназальном введении PGP проявляет протекторный противоязвенный эффект в отношении стрессорных повреждений СОЖ, величина которого превышает 60%. Сопоставление полученных нами данных и сведений литературы показало идентичность величины протекторных эффектов PGP при в/б, в/ж и и/н введениях на стрессорной модели язвообразования.

### **Модификация спонтанной и ФГА-индуцированной бластной трансформации лимфоцитов блокаторами Na<sup>+</sup>- и Ca<sup>2+</sup>-каналов *in vitro***

*Соколовская А.А., Вишневская Ю.А. (Белоруссия, Минск, leonaparty@bk.ru)*

Бласттрансформация лимфоцитов – ключевое событие афферентного звена специфического иммунного ответа и в значительной степени регулируется активностью ионных каналов и соответствующим обменом ионов. Целью данной работы являлось исследование особенностей протекания процессов спонтанной и митоген-индуцированной бласттрансформации лимфоцитов здоровых доноров *in vitro* в присутствии препаратов, модулирующих нарушение поступления в клетки ионов Na<sup>+</sup> и Ca<sup>2+</sup>.

Выделение лимфоцитов проводили путем разделения лейковзвеси на градиенте плотности фиколл-верографина. Для постановки реакции проводили культивирование лимфоцитов в полной питательной среде на основе RPMI-1640 в стерильных чашках Петри в течение 72 часов. В качестве митогена использовали фитогемагглютинин (ФГА) в концентрации 15 мкг/мл. Учет результатов производился микроскопически при увеличении 100× в иммерсионной системе. Для моделирования нарушений поступления ионов Ca<sup>2+</sup> применяли препарат верапамила в концентрациях 0,025–25 мкг/мл; ионов Na<sup>+</sup> – препарат лидокаин в концентрациях 2–2000 мкг/мл. Достоверность различий полученных экспериментальных показателей определялась по *t*-тесту Стьюдента.

Было показано, что лидокаин достоверно снижал уровень спонтанной и ФГА-индуцированной бласттрансформации лимфоцитов *in vitro* (p<0,05) при концентрации

препарата 2000 мкг/мл и 200 мкг/мл. Достоверность прямой положительной сильной связи уровня бластных клеток в присутствии препарата с уровнем их исходной активации ( $p<0,05$ ) установлена в присутствии лидокаина в концентрации 2 мкг/мл, для ФГА-индуцированной бласттрансформации – в концентрациях препарата 2000 мкг/мл и 200 мкг/мл. Следовательно, чем выше уровень исходной активации клеток в момент воздействия препарата, тем эффект лидокаина выражен слабее. Таким образом, ионы  $\text{Na}^+$  влияют только на ранние этапы передачи сигнала и  $\text{Na}^+$ -управляемыми являются ранние гены. Внесение в питательную среду верапамила приводило к достоверному снижению ( $p<0,05$ ) уровня спонтанной и ФГА-индуцированной бласттрансформации лимфоцитов при концентрациях препарата 25 мкг/мл и 2,5 мкг/мл. В терапевтических (2,5 мкг/мл) и низких дозах (0,25 и 0,025 мкг/мл) верапамила отсутствовали достоверные ( $p>0,1$ ) связи уровня бластных клеток в присутствии препарата с уровнем их исходной активации. Установлено отсутствие достоверной связи уровня бластных клеток в присутствии верапамила в высоких (25 мкг/мл) и терапевтических дозах с контролем (уровнем индуцированной бласттрансформации). Это свидетельствует о менее значимой роли  $\text{Ca}^{2+}$  на ранних стадиях бластной трансформации и о его более позднем вовлечении в регуляцию транскрипции генов, ответственных за превращение в бласты. Зависимость эффектов, оказываемых препаратами, от исходного уровня активации клеток выражена лучше для спонтанной бласттрансформации лимфоцитов человека *in vitro* и носит однонаправленный характер.

### **Влияние постоянного магнитного поля на двигательную активность сперматозоидов** *Страшнова Агния Львовна (Москва, aglayakonkova@mail.ru)*

Сперматозоиды, помещенные в постоянное магнитное, поле приобретают определенную ориентацию относительно направления магнитных линий (Emura R., et al., 2001, 2003). Однако остается неизвестным, влияет ли постоянное магнитное поле на двигательную активность и выживаемость сперматозоидов *in vitro*. Последнее стало целью нашего исследования.

Двигательную активность замороженных и оттаянных сперматозоидов быка в естественном магнитном поле и в постоянном магнитном поле, сильно превышающем напряженность планетарного магнитного поля, регистрировали при помощи анализатора изображений АТ-05 (ЗАО фирма «БМК-ИНВЕСТ»). Магнитное поле создавали помещением измерительной ячейки прибора между двумя магнитами напряженностью 2000 эрстед, разнесенных на расстояние 6 см. В качестве инкубационных сред мы использовали глюкозо-цитратный раствор (40 mM цитрата натрия, 222 mM глюкозы) и две солевые среды, созданные на основе раствора Тироде, с одинаковым ионным составом. Первая солевая среда содержит в качестве энергетического субстрата глюкозу, вторая – лактат и пируват.

В глюкозо-цитратной среде и солевой среде, содержащей лактат и пируват, постоянное магнитное поле существенно подавляет двигательную активность сперматозоидов. В солевой среде, содержащей глюкозу, внесение сперматозоидов в поле постоянных магнитов не приводит к значимым изменениям их активности и выживаемости.

В последние годы академиком А.Л. Бучаченко сформулированы новые представления о механизме работы ряда Mg-зависимых фосфорилирующих ферментов (фосфокреатин-киназы, АТФ-сингтетазы и фосфоглицераткиназы). Ключевым моментом этих реакций является образование первичной ион-радикальной пары между ионом магния и фосфатом. Участие в образовании радикальной пары магнитного (обладающего ядерно-магнитным спином) изотопа  $^{25}\text{Mg}$  приводит к синглет-триплетной спиновой конверсии. Это событие открывает дополнительный триплетный канал фосфорилирования, что вдвое повышает выход аденоинтрифосфата. Эффект воздействия магнитного изотопа магния возрастает в постоянном магнитном поле (Бучаченко, 2007).

В этой связи, мы заменили в составе инкубационной среды соль природного магния на соль изотопа  $^{25}\text{Mg}$ . Вопреки нашим ожиданиям эта замена приводит к некоторому снижению двигательной активности сперматозоидов. В магнитном поле активность сперматозоидов изменялась таким же образом, как в средах, содержащих  $^{24}\text{Mg}$ , но на более низком уровне.

Таким образом, реакции живой системы (в данном случае, сперматозоидов быка) достаточно трудно однозначно оценить, опираясь даже на самые современные физико-химические представления.

**Влияние неспецифического опиоидного антагониста налоксона на выраженность материнских реакций у нерожавших самок белых крыс**  
*Танаева Ксения Кирилловна (Москва, ksetan@mail.ru)*

Формирование материнских реакций опосредуется, в первую очередь, эндокринными изменениями при беременности, родах и лактации, а также обонятельными, тактильными и звуковыми стимулами, поступающими от новорожденного потомства. Однако большинство родительских реакций в экспериментальных условиях может быть вызвано и у ни разу не рожавших самок путём сенситизации – регулярного предъявления им донорских детёнышей.

В нашей работе исследовано влияние неселективного антагониста опиоидных рецепторов налоксона, вводимого нерожавшим самкам, на выраженность материнских реакций. Недельная сенситизация проводилась в течение часа два раза в сутки. Для этого в клетку, аналогичную домашней, помещали самку вместе с тремя донорскими детёнышами, возраст которых составлял от 3 до 8 дней. Регистрацию материнского поведения проводили в течение 6 дней после окончания сенситизации в «открытом поле» при красном и ярком свете. В центр арены помещали чашку Петри с тремя донорскими детёнышами (также в возрасте 3-8 дней). С 1 по 3 дни наблюдений всем самкам инъецировали физиологический раствор. С 4 по 6 дни эксперимента крысам опытных групп вводился налоксон в дозах 1,0 либо 10 мг/кг внутрибрюшинно за 20 мин до тестирования. Самки контрольной группы получали эквивалентные объёмы растворителя (1 мл/кг).

Показано, что реакции сенситизированных крыс до введения налоксона (1-3 дни) были весьма сходны с типичным поведением рожавших самок. Они подходили к детёнышам, обнюхивали и вылизывали их, однако у нерожавших самок полностью отсутствовали переносы новорожденных из чашки Петри на периферию арены «открытого поля». При сравнении показателей материнского поведения сенситизированных самок контрольной группы и группы с введением налоксона в дозе 1 мг/кг достоверных различий не выявлено. Увеличение дозы препарата до 10 мг/кг привело к достоверному увеличению латентного периода подхода к детёнышам и снижению общего количества подходов к ним. Следовательно, в этом случае налоксон ослабил проявления родительской заботы.

Известно, что при введении рожавшим самкам в дозах 5 мг/кг внутрибрюшинно и 1 мг/кг интраназально налоксон вызывает значимое усиление материнских реакций. Дозы 1 мг/кг внутрибрюшинно и 0,2 мг/кг интраназально неэффективны. Вместе с тем, при увеличении дозы до 5 мг/кг (интраназальное введение) эффект антагониста меняет направленность. Полученные нами результаты имеют наибольшую степень сходства именно с этой серией экспериментов и ещё раз подтверждают способность налоксона в больших дозах проявлять свойства опиоидного агониста, действуя на материнское поведение аналогично морфину и бета-казоморфинам. Выявленные эффекты могут также объясняться особенностями функционирования лимбических структур мозга нерожавших самок (в сравнении с рожавшими и лактирующими). *Работа поддержанна грантом РФФИ 08-04-01386а.*

**Уровень мРНК кальпастина в клетках спинного мозга крыс с экспериментальным аллергическим энцефаломиелитом связан с тяжестью заболевания**  
*Терентьева Лариса Юрьевна (Санкт-Петербург, wolk-ne@bk.ru)*

Экспериментальный аллергический энцефаломиелит (ЭАЭ) – это модель аутоиммунного нейродегенеративного заболевания человека – рассеянного склероза. Представляемая работа выполнена на лабораторных крысах Вистар (Рапполово). Индукция ЭАЭ у крыс производилась однократной инокуляцией энцефалитогенной смеси (100 мг гомогената гомологичного спинного мозга, 0,2 мл полного адьюванта Фрейнда (ПАФ) и 0,2 физиологического раствора на одно животное). В эксперименте присутствовали две контрольные группы (интактные животные и животные, которым вводился ПАФ). Тяжесть заболевания оценивалась по наличию симптомов (мышечной слабости, парезов, параличей)

с помощью оригинальной балльной шкалы, на основе которой вычилялся клинический индекс. Введение энцефалитогенной смеси приводило к развитию различных формmonoфазного ЭАЭ. Выявлялись животные с легким течением заболевания, со средней тяжестью, с тяжелым течением, с крайне тяжелым течением (с летальным исходом). У животных с различными формами ЭАЭ извлекались селезёнка и спинной мозг; производился анализ уровня мРНК кальпастатина с целью выявления связи между этим показателем и тяжестью течения ЭАЭ. Для анализа использовались методы выделения тотальной РНК и ОТ-ПЦР. Особенность крыс Вистар отвечать на введение энцефалитогенной смеси развитием различных форм ЭАЭ в одном эксперименте, как мы полагаем, отражает их генетическую разнородность, подтверждая роль генетических факторов в предрасположенности к аутоиммунным заболеваниям, и позволяет исследовать молекулярные процессы, сопряжённые с тяжестью развития патологии данного типа. Так, представляет интерес исследование статуса  $Ca^{2+}$ -зависимой кальпаниновой системы внутриклеточных протеаз в условиях развития ЭАЭ. При развитии аутоиммунных нейродегенеративных заболеваний у людей и при индукции модельных заболеваний, в том числе ЭАЭ, у лабораторных животных, происходят нарушения гомеостаза кальция, что приводит к гиперактивации кальпаниновой системы. Данные процессы вызывают нарушение регуляции многих внутриклеточных процессов. Поэтому важно изучение уровня мРНК кальпастатина, единственного известного эндогенного ингибитора кальпанинов. Анализ в клетках селезенки крыс с различной тяжестью течения ЭАЭ показал, что на пике заболевания уровень мРНК кальпастатина не отличался от базового. У животных с бессимптомной и лёгкой формами течения заболеваний в клетках поясничного и грудного отделов спинного мозга уровень мРНК кальпастатина увеличился. Таким образом, можно сделать вывод о том, что на пике заболевания уровень мРНК кальпастатина в клетках селезёнки не зависит от формы ЭАЭ; в клетках спинного мозга уровень мРНК кальпастатина связан с тяжестью ЭАЭ. Кроме этого нами было обнаружено, что у 3-х из 25 интактных крыс уровень мРНК кальпастатина в клетках спинного мозга был значительно ниже, чем у остальных. Мы полагаем, что именно у таких животных развиваются тяжелые формы ЭАЭ.

**Исследование возможного противоязвенного действия пептида ацетил-PGP  
на этаноловой, стрессорной и ацетатной моделях язвообразования**

*Труфанова Алина Валерьевна (Москва, trallin@mail.ru)*

Глипролины, объединенные в новое семейство регуляторных пептидов, привлекают интерес многих исследователей, так как являются перспективными лекарственными препаратами, имеющими естественное происхождение и минимальные побочные эффекты. Так, для многих пептидов данного ряда показано высокое протекторное и лечебное противоязвенное действие на различных моделях ульцерогенеза слизистой оболочки желудка (СОЖ). Наибольшая активность в этом отношении была выявлена для пептидов PGP и GPGPGP. Антиульцерогенные эффекты глипролинов могут быть связаны с подавлением секреции соляной кислоты и увеличением бикарбонатной секреции в желудке, стабилизацией тучных клеток и нормализацией кровотока. Кроме того, PGP и ацетил-PGP (Ac-PGP) обладают хемоатрактантными свойствами для нейтрофилов, являясь важными агентами хемотаксиса при различных повреждениях тканей и действуя через CXС-рецепторы цитокинов. Теоретически, данный эффект также может играть не последнюю роль в опосредовании противоязвенного действия глипролинов. В связи с этим, была поставлена задача изучить возможную антиульцерогенную активность пептида Ac-PGP.

Исследование антиульцерогенных свойств Ac-PGP проводили на трех моделях язвообразования: этаноловой и стрессорной – для выяснения протекторного действия и ацетатной – для изучения лечебных свойств глипролина. Пептид вводили внутрижелудочно в дозе 3,7 мкмоль/кг, то есть в концентрации, обладающей наибольшим терапевтическим эффектом при язвообразовании для PGP.

В результате было показано, что Ac-PGP не обладает противоязвенными свойствами на всех изученных моделях язвообразования, при этом на этаноловой модели пептид показал даже тенденцию к усилению ульцерогенеза. В отличие от Ac-PGP, PGP, также обладающий

хемоаттрактантной активностью, на этих же моделях показал наиболее высокие среди изученного глипролинового ряда пептидов протекторный и лечебный противовазенный эффекты, что позволяет предположить минимальный вклад, или даже его отсутствие, хемоаттрактантных свойств глипролинов в их антиульцерогенное действие. Помимо этого, важным моментом является тот факт, что PGP в СОЖ метаболизируется до GP и PG, которые обладают собственными гастропротекторными свойствами, тогда как деградация Ac-PGP пока не изучена. В связи с показанным нами отсутствием противовазенной активности, можно предположить, что деградация Ac-PGP проходит по пути отличному от деградации PGP.

Таким образом, можно заключить, что хемоаттрактантное действие глипролинов не является основным механизмом, обеспечивающим противовазенные эффекты данных пептидов; кроме того, GP и PG, скорее всего, не образуются при возможной деградации Ac-PGP в СОЖ. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 09-04-00669. Выражая благодарность моему научному руководителю проф., д.б.н. Самониной Галине Ефимовне.

**Гемодинамические эффекты при передозировке нового нейропротектора – синтетического пептидного фрагмента аполипопротеина Е «COG1410»**  
*Туховская Елена Александровна (Пущино, lenoktuk@rambler.ru)*

Пептид COG1410 является фрагментом рецептор-связывающего домена аполипопротеина Е (ApoE). В исследовании на мышевой модели черепно-мозговой травмы пептид COG1410 оказывал нейропротекторный эффект в дозе 0,6 мг/кг. Однако, известно, что большие количества ApoE способствуют экспрессии индуциальной NO-синтазы (iNOS). Этот факт позволяет предположить, что пептид COG1410, обладающий всеми свойствами апобелка, связанными с ApoE-рецепторным взаимодействием, будет стимулировать iNOS и синтез оксида азота (NO). Имеются данные о том, что индукция iNOS в гладкомышечных клетках может быть связана с миграцией ApoE в стени сосудов из сосудистого русла. Целью нашей работы стало изучить влияние пептида COG1410 в разных дозах на гемодинамические параметры мышей. Наиболее подходящим методом для долговременного и детального изучения функций сердечно-сосудистой системы (ССС) является долговременная радиотелеметрическая регистрация параметров гемодинамики. Использовали самцов мышей линии CD-1 возрастом 8-10 недель и массой 40-50 г. Мышам были имплантированы датчики для измерения артериального давления. Животным однократную вводили пептид COG1410 в хвостовую вену в дозах 0,6 мг/кг, 1,8 мг/кг и 6 мг/кг. Параметры гемодинамики регистрировали в течение двух суток до и двух суток после инъекции с помощью радиотелеметрической системы сбора и анализа физиологических сигналов Data Science, Inc. COG1410, введенный в дозах 0,6 мг/кг и 1,8 мг/кг, не оказывал выраженного влияния на ССС. В дозе 6 мг/кг пептид вызывал выраженное снижение среднего артериального давления (САД) и частоты сердечных сокращений (ЧСС). Максимум снижения САД ( $-63\pm3\%$ ) наблюдался на 20-й минуте после введения. Понижение САД длилось 4 часа. ЧСС при этой дозе также понижалась, начиная со 2-ой минуты, и на протяжении 2-х часов оставалась пониженной. Максимум падения ЧСС приходился на 20-ю минуту ( $-47\pm8\%$ ). Продолжительную гипотензию и брадикардию, отмеченные при введении мышам COG1410 в дозе 6 мг/кг, следует расценивать как одно из проявлений токсического действия пептида на ССС. Следует отметить, что доза пептида, при которой проявились его гемодинамические эффекты, превосходит терапевтическую дозу в 10 раз. COG1410 в большой дозе, вероятно, взаимодействовал с ApoE-рецепторами сердца и сосудов, вовлекая их в острый и исследования позволяют прогнозировать побочное действие пептида COG1410 на сердечно-сосудистую систему при передозировке.

**Особенности угнетающего действия перекиси водорода  
на неквантовую секрецию ацетилхолина в нервно-мышечных синапсах  
новорожденных крыс**

**Узинская К.В., Шакирзянова А.В., Науменко Н.В. (Казань, xtu.uzinskaya@gmail.com)**

Активные формы кислорода (АФК) участвуют в ряде физиологических, а также патологических процессов в организме. Но механизмы, реализующие эффекты АФК до сих пор остаются не изученными до конца. Известно, что механизмы функционирования антиоксидантной системы в процессе онтогенеза изменяются. Перекись водорода ( $H_2O_2$ ) является наиболее стабильной и долгоживущей АФК, синтезируемой эндогенно. В связи с этим, целью нашей работы было исследовать действие  $H_2O_2$  на неквантовую секрецию ацетилхолина (АХ) в нервно-мышечном синапсе новорожденных крыс.

Эксперименты проводились на нервно-мышечных препаратах диафрагмы новорожденных крыс в возрасте 3-6 дней с использованием стандартной микроэлектродной техники. Для количественного определения неквантового выхода АХ была использована методика регистрации Н-эффекта.

Нами было показано, что  $H_2O_2$  в своей максимально эффективной концентрации (5мкМ) почти полностью угнетала неквантовую секрецию у новорожденных животных. Тогда как у взрослых вызывала снижение Н-эффекта на 60%. В присутствии антиоксиданта N-ацилцистеина (NAC, 1 мкМ)  $H_2O_2$  не проявляла своего действия, и Н-эффект в данном случае не отличался от контрольных значений.

Ранее нами было показано, что в процесс регуляции интенсивности неквантовой секреции у взрослых крыс вовлечена протеинкиназа С (ПКС). Для проверки участия этого фермента в угнетающем действии  $H_2O_2$  у новорожденных крыс мы использовали активатор ПКС 4- $\alpha$ -phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (0,5 мкМ). Оказалось, что в данных условиях  $H_2O_2$  не способна угнетать неквантовую секрецию АХ. Таким образом, можно заключить, что эффект  $H_2O_2$  на неквантовую секрецию в развивающихся синапсах также опосредован ПКС.

Наши данные свидетельствуют о том, что у новорожденных крыс, в отличие от взрослых животных,  $H_2O_2$  полностью блокирует неквантовое выделение медиатора. Это свидетельствует о более высокой чувствительности данного вида секреции АХ к угнетающему действию АФК в незрелых синапсах. Причем, действие АФК здесь, также как и во взрослых синапсах, связано с влиянием на ПКС первого окончания.

*Работа поддержана грантами РФФИ, Президента РФ.*

**Эффекты сероводорода на сократимость миокарда лягушки  
в условиях блокирования АТФ-зависимых калиевых каналов**

**Хаердинов Н.Н., Ахметшина Д.Р. (Казань, Xaeridinov@yandex.ru)**

Сероводород ( $H_2S$ ) относят к новому классу газообразных посредников наряду с оксидом азота и моноксидом углерода. Эндогенно  $H_2S$  синтезируется из L-цистеина пиридоксаль-5-фосфат-зависимыми ферментами – цистатионин  $\beta$ -синтазой и цистатионин  $\gamma$ -лиазой, экспрессирующимися практически во всех тканях. Одним из основных механизмов действия  $H_2S$  в кровеносных сосудах является активация АТФ-зависимых К (КАТФ) каналов. Открытие КАТФ-каналов приводит к гиперполяризации мембранны, что в свою очередь может приводить к ингибиции потенциалзависимых кальциевых каналов и расслаблению гладкомышечных клеток сосудов. Целью работы было исследования роли КАТФ-каналов в эффектах  $H_2S$  на сократимость миокарда лягушки *Rana ridibunda*.

Эксперименты по регистрации сократимости полоски желудочка проводились на установке PowerLab с использованием тензодатчика чувствительностью 0-50 г. Мышечное волокно длиной 4-6 мм и диаметром 1 мм препарировалось из желудочка сердца лягушки. Изолированную полоску вертикально погружали в резервуар с рабочим объемом 20 мл, заполненным раствором Рингера для холоднокровных животных (pH 7,3-7,4). Препарат стимулировали электрическими импульсами с частотой 0,1 Гц через два серебряных электрода, длительность стимула составляла 5 мс, амплитуда 10 В. Регистрировали сократительный ответ полоски миокарда с помощью программы Chart, анализировали

амплитуду сокращения, полученные результаты обрабатывали с помощью стандартных методов. В качестве донора  $\text{H}_2\text{S}$  использовали гидросульфид натрия (NaHS).

Аппликация NaHS приводило к снижению силы сокращения полоски миокарда сердца лягушки. Эффект NaHS был обратимым и доза-зависимым. В концентрации 100 мкМ происходило снижение амплитуды сокращения до  $92,5\pm1,21\%$  к 3 мин аппликации и до  $75,86\pm1,66\%$  по отношению к контролю ( $n=15$ ,  $p<0,05$ ) к 15 мин аппликации. Блокатор КАТФ-каналов глибенкламид в концентрации 50 мкМ не вызывал изменения силы сокращения полоски миокарда ( $n=15$ ,  $p>0,05$ ), что свидетельствует о незначительной роли данного типа каналов в регуляции сократимости миокарда в нормальных условиях. Однако, эффект NaHS на фоне действия изменился: происходило повышение амплитуды сокращения до  $110,17\pm2,59\%$  ( $n=9$ ,  $p<0,05$ ) по отношению к контролю к 3 мин аппликации, затем сила сокращения угнеталась и достигала  $76,62\pm0,866\%$  ( $n=9$ ,  $p<0,05$ ), что не отличалось от эффекта NaHS в контроле. Можно предположить множественность мишеней действия  $\text{H}_2\text{S}$  на миокард лягушки. В условиях блокирования КАТФ-каналов выявляется двухфазность эффекта NaHS: положительный интропный эффект вначале аппликации, сопровождающийся снижением силы сокращения. По-видимому, активация КАТФ-каналов  $\text{H}_2\text{S}$  не играет ведущей роли в механизме его действия на миокард лягушки.

*Работа поддержанна грантами РНП № 2.1.1/786, РФФИ 09-04-00748.*

#### **Участие внутриклеточных кальциевых депо в регуляции синхронного и асинхронного вызванного освобождения квантов ацетилхолина**

**Хузакметова Венера Фаритовна** (Казань, [venerik87@mail.ru](mailto:venerik87@mail.ru))

Во время ритмической активности, характерной для работы синаптического контакта в условиях *in vivo*, наблюдаются изменения процесса освобождения квантов медиатора. При сниженном уровне вероятности освобождения квантов ритмическая стимуляция вызывает увеличение числа синхронно освобождаемых квантов (квантовый состав) в ответ на нервный стимул и возрастание асинхронного освобождения. Эти явления объясняются теорией «остаточного» кальция, который накапливается в нервном окончании в ходе ритмической стимуляции нерва. Однако существование в пресинаптической области кальциевых депо, которые могут регулировать внутриклеточное содержание ионов кальция при участии рианодиновых рецепторов, ставит вопрос об их роли в модуляции вызванного освобождения ацетилхолина. Целью данного исследования было изучение влияния блокирования рианодиновых рецепторов с помощью рианодина и специфического агента TMB-8 (изменяющего интенсивность работы внутриклеточных кальциевых депо) на уровень синхронного и асинхронного освобождения квантов ацетилхолина в нервно-мышечном синапсе мыши. С помощью экстраклеточной микроэлектродной регистрации измеряли истинные синаптические задержки одноквантовых токов концевой пластиинки в условиях сниженной до 0,5 ммоль/л концентрации ионов кальция при ритмической стимуляции с разной частотой (от 0,5 до 15 Гц). При этом сопоставляли количество квантов, освобождаемых в течение первых 3 мс после развития пресинаптического тока действия, т.е. представляющих синхронную фазу секреции, и количество квантов, задержки которых имели значения в диапазоне от 3 до 50 мс, формирующих асинхронную фазу секреции. Рианодин, в концентрации 3 мкмоль/л, блокирующей рианодиновые рецепторы, вызывал снижение количества квантов синхронной и асинхронной фаз секреции, однако выраженность этого снижения была разной. Число квантов, освобождаемых в синхронную фазу при редкой частоте стимуляции (0,5 Гц) снизилось на 29,2%, тогда как в асинхронную фазу на 51,5%. Аналогичный эффект имел TMB-8 (25 мкмоль/л), снижая синхронное освобождение на 33,1% и асинхронное на 49,2%. При повышении частоты стимуляции двигательного нерва до 15 Гц наблюдалось возрастание как синхронного, так и асинхронного освобождения квантов медиатора: в исходных условиях синхронное освобождение увеличивалось на 18%, а асинхронное на 39%. Под действием рианодина и TMB-8 при частоте стимуляции 15 Гц синхронное освобождение уменьшалось на 16,7% и 9,1%, соответственно, тогда как асинхронное на 41,1% и 52,7%. Полученные данные свидетельствуют о том, что кальций, выходящий из внутриклеточных кальциевых депо,

принимает участие в обеспечении возрастания уровня синхронной и асинхронной секреции квантов медиатора при ритмической стимуляции двигательного нерва. При этом зависимость асинхронной секреции от активности кальциевых депо более выражена, чем для синхронного выделения квантов медиатора. Поддержано грантами «Ведущая научная школа», РФФИ – 08-04-00923, РФФИ- 09-04-01280, грант президента РФ МК – 2704.2009.4.

### **Опиоидный нейропептид $\beta$ -эндорфин увеличивает уровень внутриклеточного $\text{Ca}^{2+}$ у ранних эмбрионов мыши**

**Чернов Александр Сергеевич** (*Луцино, с.х.е.р.н.о.у@rambler.ru*)

В раннем эмбриогенезе млекопитающих ионы  $\text{Ca}^{2+}$  имеют большое значение, оказывая влияние на процессы дробления и дифференцировки. Изменение  $[\text{Ca}^{2+}]$  в клетке может быть обусловлено воздействием различных внешних факторов, в том числе гормональных. Одним из таких факторов может быть опиоидный нейропептид  $\beta$ -эндорфин. Ранее нами было показано, что  $\beta$ -эндорфин оказывает стимулирующее действие на развитие ранних эмбрионов *in vitro*, повышает жизнеспособность, снижает количество аномально развитых бластоцитов. Установлено, что гормон стимулирует развитие 2- и 8-клеточных эмбрионов мыши через неопиоидные рецепторы. Известно, что  $\beta$ -эндорфин может взаимодействовать как с опиоидными, так и с неопиоидными рецепторами (не чувствительными к блокатору опиоидных рецепторов налоксону). Причем взаимодействие с опиоидными рецепторами происходит при участии инозитолфосфатного цикла с быстрым (в течение 100-600 сек) выбросом  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо. Пути передачи внутриклеточного сигнала в клетку через неопиоидные рецепторы  $\beta$ -эндорфина в настоящее время не изучены. Поэтому, в данной работе было проведено исследование действия  $\beta$ -эндорфина на изменение уровня внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  у ранних эмбрионов мыши.

Объектом исследования были 2- и 8-клеточные эмбрионы мыши. Измерения внутриклеточного уровня  $\text{Ca}^{2+}$  проводили с помощью флуоресцентного красителя Fluo-3 AM в концентрации 2  $\mu\text{M}$ , с использованием двухволнового микрофлуориметра «Радикал ДМФ-2». Флуоресценция эмбрионов возбуждалась при длине волны 488нм.

В ходе проделанной работы установили, что добавление  $\beta$ -эндорфина ( $10^{-7}\text{M}$ ) приводило к увеличению уровня внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  в 1,5-2 раза по сравнению с начальным уровнем. Причем увеличение происходило быстро, в течение 1,5-2 минут после добавления  $\beta$ -эндорфина, а затем наблюдался спад до начальных значений. Показатели уровня внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  в контроле оставались неизменными на протяжении всего времени исследования. Полученные результаты совпадают с литературными данными, и позволяют предположить, что  $\beta$ -эндорфин связываясь с опиоидными рецепторами на мемbrane эмбрионов, активирует выброс  $\text{Ca}^{2+}$  через инозитолфосфатный путь. При добавлении  $\beta$ -эндорфина вместе с налоксоном также наблюдали увеличение уровня внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  в 1,5-2 раза. Однако это изменение происходило плавно, в течение 15-20 минут после добавления  $\beta$ -эндорфина, а затем вновь возвращалось к начальному уровню.

Таким образом,  $\beta$ -эндорфин, вызывая увеличение уровня внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ , стимулирует раннее развитие эмбрионов. Это воздействие осуществляется как через опиоидные, так и через неопиоидные рецепторы  $\beta$ -эндорфина. Однако механизм действия через неопиоидные рецепторы до конца не ясен. Поэтому представляется интересным в дальнейшем продолжить изучение внутриклеточной сигнализации  $\beta$ -эндорфина.

### **Влияние даларгина и его структурного аналога на стрессобусловленный сосудистый тонус у крыс линии Wistar**

**Шабалина И.А., Курицын С.Н.** (*Архангельск, ira\_sh@mail.ru*)

Целью работы была оценка влияния неселективных агонистов  $\mu$ - и  $\delta$ -опиатных рецепторов на сосудистый тонус в условиях иммобилизационного стресса. Тонус сосудов оценивали методом ревазографии, используя показатели периферического тонуса сосудов (индекс периферического сопротивления, индекс эластичности)

На модели стрессорной вазоконстрикции было выявлено, что протективный эффект неселективного агониста  $\mu$ - и  $\delta$ -опиатных рецепторов даларгина и его структурного аналога

(H-Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg-NHEt) на стрессобусловленный рост периферического сосудистого тонуса имеет дозозависимый характер.

Использование даларгина и его структурного аналога в дозе, в которой они не проникают через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), приводит к снижению стрессобусловленной вазоконстрикции. Причём, увеличение дозы с 10 мкг/кг до 100 мкг/кг ведёт к усилению протективного эффекта. Нарастание дозы пептидов до 1000 мкг/кг (в данной дозе даларгин и его структурный аналог оказывают не только периферический, но и центральный эффект, так как проникают через ГЭБ) приводит к усилению стрессобусловленной вазоконстрикции. Такое «ускользание» протективного эффекта при превышении оптимальной дозы пептидов характерно для опиоидных пептидов.

Полученные данные свидетельствуют об участии периферических опиатных рецепторов в регуляции сосудистого тонуса при остром стрессе. Оптимальной дозой, в которой проявляется протективный эффект даларгина и его структурного аналога на стрессобусловленную вазоконстрицию, можно считать дозу 100 мкг/кг.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №08-04-98817. Авторы выражают благодарность за помощь в подготовке материалов д.б.н., проф. Н.А.Бебяковой.*

#### **АФК – зависимый путь пуринергического контроля процесса передачи возбуждения в нервно-мышечном синапсе лягушки: роль НАДФ(Н) оксидазы**

*Шаймуратов Р.И., Гиниатуллин А.Р. (Казань, sulla80@mail.ru)*

Двигательные нервные окончания (НО) содержат большое количество везикул, заполненных молекулами нейромедиатора. Эти везикулы вовлечены в процессы экзо- и эндоцитоза формирующие так называемый везикулярный цикл, который за счет рециклирования синаптических везикул, обеспечивает сохранение высокого уровня секреции медиатора при высокочастотной активности синапса. Аденозинтрифосфорная кислота (АТФ) является широко распространенным ко-медиатором, высвобождаемым в ходе экзоцитоза вместе с основным медиатором (ацетилхолин – в периферических синапсах) в синаптическую щель, и опосредовано через специфические пуриновые рецепторы (P2Y и P2X семейства) регулирует процесс передачи возбуждения по механизму обратной отрицательной связи.

Ранее, нами было показано что в области нервно-мышечного синапса эффект экзогенной АТФ, выраженный в угнетении секреции медиатора и опосредованный метаботропными P2Y рецепторами, может реализовываться не только путем активации PKC, PLC, PLA<sub>2</sub> и эффектом на кальциевые каналы НО, но и через образование эндогенных активных форм кислорода (АФК), в частности перекиси водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Целью данного исследования стало выяснение возможной причастности одного из основных источников эндогенных АФК в клетке мембрана-связанной НАДФ(Н) оксидазы к реализации эффекта АТФ. Эксперименты проводились в осенне-зимний период на изолированных нервно-мышечных препаратах портняжных мышц лягушек (*Rana ridibunda*) фиксированных в стеклянной ванночке с постоянной перфузии стандартным раствором Рингера (pH 7,2-7,4; 20-23°C) для холоднокровных. Для регистрации токов концевой пластинки (ТКП) при раздражении двигательного нерва (0,05Гц) применяли метод двух-электродной фиксации мембранных потенциала мышечных волокон с использованием стеклянных микроЗлектродов. Ранее нами было показано, что аппликация АТФ (100мкМ/л) приводит к угнетению секреции медиатора, проявляющемуся в обратном снижении амплитуды ТКП. Причем этот эффект имеет пресинаптическую природу. Для решения задачи исследования, мы использовали два различных по характеру действия ингибитора НАДФ(Н) оксидазы аминоэтил-бензенсульфонилфлорид (AEBSF) и дифенилен йодониум (DPI). Предварительная инкубация препаратов в растворе содержащим или AEBSF или DPI приводила к существенному ослаблению эффекта АТФ. Так амплитуда ТКП к пятнадцатой минуте аппликации АТФ составляла 85±3% (n=6; p<0,05) и 88±4% (n=5; p<0,05) с предварительной инкубацией в растворе содержащим AEBSF (1000мкМ/л) или DPI (1мкМ/л) соответственно. Тогда как в контроле амплитуда ТКП при действии АТФ снижалась до 66±3% (p<0,05; Mann-Whitney test). С учетом ранее полученных нами данных можно предположить,

что одним из звеньев сигнального каскада активируемого метаботропными Р2Y рецепторами нервного окончания является НАДФ(Н) оксидаза (как источник эндогенных АФК), активность которой может определяться РКС нервного окончания.

*Работа поддержана грантами РФФИ № 08-04-00203 и НШ № 3368.2008.4.*

**Влияние цитокинов воспаления на миграцию и дифференцировку нейронов, синтезирующих гонадотропин-рилизинг гормон, в онтогенезе млекопитающих**

*Шарова Виктория Сергеевна (Москва, sarovav@mail.ru)*

Характерной особенностью нейронов, синтезирующих гонадотропин-рилизинг гормон (ГРГ), является их небольшая численность (800-2000), диффузное расположение в гипоталамусе и внемозговое онтогенетическое происхождение. У позвоночных животных большая часть ГРГ-нейронов образуется в пренатальный период из эпителия обонятельных плавод и затем мигрирует в передний мозг. Наряду с основной репродуктивной функцией ГРГ контролирует становление и функционирование иммунной системы. В свою очередь, иммунная система оказывает регуляторное влияние на развитие нейроэндокринной системы. Известно, что бактериальный эндотоксин липополисахарид (ЛПС) индуцирует синтез провоспалительных цитокинов в иммунной системе матери, а также в различных органах плода, которые оказывают влияние на его развитие. Целью данной работы являлось изучение влияния ЛПС *E.coli* на миграцию ГРГ-нейронов в онтогенезе крыс и оценка наличия лейкемия ингибирующего фактора (ЛИФ) у мышей.

Исследования проводили на крысах Wistar и мышах линии BALB/c с датированной беременностью. Была подобрана оптимальная доза ЛПС, при введении которой эмбриональная смертность составляла 25-35%. ЛПС вводили внутрибрюшинно крысам в дозе 18 мкг/кг на 12 сут беременности и мышам в дозе 0,12 мкг/г на 8,5 сут беременности. Контрольной группе животных вводили 0,9% раствор NaCl по той же схеме. ГРГ-нейроны выявляли у 17 и 19 сут плодов крыс (Э17, Э19) при помощи иммуногистохимии и подсчитывали их количество в трех различных областях миграции: назальной, в области обонятельных луковиц и переднем мозгу. Согласно полученным данным, у контрольных животных основная часть ГРГ-нейронов располагалась в переднем мозгу, кроме того, они обнаруживались в назальной области и области обонятельных луковиц. После введения ЛПС количество ГРГ-нейронов на Э17 в переднем мозгу снижалось на 50%, на Э19 – на 30%, тогда как в назальной области на Э17 и Э19 их количество увеличилось на 40%, а в области обонятельных луковиц на Э17 увеличилось на 20%, на Э19 практически не менялось. Были зафиксированы достоверные различия между группами на Э17 и Э19. У животных опытной группы было отмечено одиночное расположение нейронов в переднем мозгу, в то время как в ростральных отделах ГРГ-нейроны располагались группами по 3-4.

Таким образом, ЛПС, введенный беременным самкам крыс, подавляет миграцию ГРГ-нейронов в передний мозг у плодов на 17- и 19 сут эмбрионального развития. Наблюдаемые эффекты могут быть опосредованы провоспалительными цитокинами, уровень которых значительно увеличивается после введения ЛПС. Основным медиатором, влияющим на миграцию и функционирование ГРГ-нейронов, является ЛИФ, который был найден в назальной области у плодов мышей.

## ПОДСЕКЦИЯ «ЦИТОЛОГИЯ»

### Роль микротрубочек в упорядоченном распределении эндоплазматического ретикулума в клетках меристемы корня пшеницы *Triticum aestivum* L.

Ван Вэньчжу (Москва, wangwenzhu@yandex.ru)

Локализация внутриклеточных органелл меняется в течение клеточного цикла, и на каждой стадии расположение органелл в цитоплазме неслучайное. Однако до настоящего времени неизвестно, каким образом поддерживается структурно-функциональная компартментализация цитоплазмы. Целью работы было изучение связи между распределением эндоплазматического ретикулума (ЭПР) и системами микротрубочек в клетках корня пшеницы *Triticum aestivum* L. на разных стадиях клеточного цикла. Для этого были поставлены следующие задачи: 1) изучить локализацию микротрубочек и ЭПР в одних и тех же клетках на разных стадиях клеточного цикла; 2) исследовать распределение ЭПР после разборки микротрубочек колхицином. Для решения этих задач был использован метод иммуноцитохимического выявления микротрубочек с помощью антител к тубулину и ЭПР с помощью антител к белку-маркеру ЭПР. Показано, что на стадии интерфазы ЭПР в клетках диффузно распределяется в цитоплазме, и образует плотные скопления, расположенные вокруг ядра. В конце G2 периода, ЭПР образует полярные скопления, которые колокализуются с полярными шапочками профазного веретена. В профазе, прометафазе и метафазе скопления ЭПР выявляется над веретеном. Во время анафазы ЭПР локализуется над веретеном и в интерзональной области между расходящимися хромосомами. В ранней телофазе ЭПР располагается в зоне фрагмопласта и на периферии веретена, а в поздней телофазе равномерно между и вокруг дочерних ядер. Таким образом, мы не установили прямой пространственной связи между микротрубочками и ЭПР, но распределение ЭПР менялось в зависимости от фазы клеточного цикла. Длительная обработка колхицином вызывает разрушение микротрубочек в интерфазных и митотических клетках. В этих условиях происходит сборка немикротрубочных тубулиновых структур, которые представляют собой разные типы паракристаллических тяжей. В клетках на стадии интерфазы ЭПР диффузно распределяется цитоплазме и скапливается вокруг ядра в виде кластеров. В профазе, прометафазе и К-метафазе митотическое веретено отсутствует. В таких клетках ЭПР локализуется вокруг сгруппированных хромосом, однако, его распределение может варьировать. В одних клетках ЭПР образует неравномерные кластеры, а в других клетках располагается в виде полярных скоплений, которые имитируют форму веретена. На стадии К-тeloфазы ЭПР также локализуется вокруг хромосом и ядер, и его распределение может быть как диффузным, так и в виде кластеров. Таким образом, в ходе клеточного цикла изменение организации системы микротрубочек совпадает с перераспределением ЭПР; разрушение микротрубочек и формирование немикротрубочных тубулиновых тяжей не вызывает изменений в локализации и распределении ЭПР по сравнению с контролем. Можно предположить, что зависимая от стадий клеточного цикла упорядоченная локализация и перераспределение ЭПР зависит от другого компонента цитоскелета – актиновых микрофиламентов.

### Митохондриом кардиомиоцитов левого желудочка сердца крыс при моделировании эффектов космического полёта

Вареник Евгения Николаевна (Москва, evdiva@rambler.ru)

На организм человека (или животного) в космическом полёте могут оказывать влияние три основные группы факторов. Однако, как неоднократно показано ранее, именно невесомость является основным фактором, вызывающим при космическом полёте развитие специфических изменений в организме человека и животных. Поэтому основными профилактическими мероприятиями, проводящими в полёте являются мероприятия, направленные на противодействие адаптации к невесомости. В полёте биоспутника «Космос-936» впервые были получены данные о том, что искусственная гравитация, создаваемая с помощью бортовой центрифуги, может предупредить многие неблагоприятные эффекты невесомости, в том числе на структуру сердца. Однако

морфометрических данных получено не было. Поэтому интересным представляется детальное изучение ультраструктуры кардиомиоцитов (КМЦ) при действии искусственной силы тяжести.

В данной работе представлены данные о структуре митохондриона КМЦ при моделировании эффектов невесомости и действии гипергравитации.

В эксперименте были использованы самцы крыс линии Вистар. Для моделирования некоторых эффектов невесомости использовали антиортостатическое взвешивание, а для создания гипергравитации – центрифугу (2G). Изучены 5 групп животных: «контроль» (1) – интактные животные; 2 – крыс на 1 час в день в течение 19 сут помещали в пеналы, но не подвергали никаким воздействиям; 3 – круглосуточное антиортостатическое взвешивание в течение 24 сут; 4 – ежедневное вращение на центрифуге (крыс, помещённых в пеналы) по 1 ч в течение 19 сут; 5 – взвешивание, такое же как 3 группы, но при этом на 1 ч в день (начиная с 4-суток) крыс снимали и подвергали вращению на центрифуге.

Постановка эксперимента осуществлялась на базе ГНЦ РФ – ИМБП под руководством ведущего научного сотрудника, к.м.н. Краснова И.Б. Анализ ультраструктуры КМЦ левого желудочка сердца крыс проводился методом трансмиссионной электронной микроскопии. Осуществлялся подсчёт количества межмитохондриальных контактов (ММК), как динамичный и универсальный показатель общего состояния митохондриона КМЦ. Проверка достоверности отличий от контрольных значений проводилась в программе STATISTICA при помощи непараметрического U-теста Манна-Уитни.

Ультраструктура митохондрий (МТХ) во всех изученных группах схожа. При этом морфометрический анализ количества ММК, приходящихся на 100 МТХ, показал, что этот параметр меняется неодинаково в 3 зонах клетки в разных опытных группах. В межфибрillярной зоне КМЦ увеличивается число ММК по сравнению с группой «контроль» в группах 4 и 5, в остальных группах данный параметр остаётся без изменения. В субсарколеммальной околососудистой зоне увеличивается число ММК в группах 2, 3, 4 по сравнению с интактными животными, а в группе 5 не изменяется. В околоядерной зоне количество ММК возрастает в группах 2, 4, 5, но не меняется в группе 3. Таким образом, реакция митохондриона КМЦ на комплексное действие эффектов невесомости и гипергравитации является качественно иной, чем реакция КМЦ на каждое из этих воздействий.

#### **Реакция культивируемых нормальных и трансформированных клеток кожи человека на действие растительных факторов роста**

**Вильданова Мария Сергеевна (Москва, vch41048@mail.ru)**

Жасмоновая (ЖК) и абсцизовая кислоты (АБК) – факторы роста растений, которые часто называют растительными гормонами. ЖК участвует в ответе растений на повреждение и внедрение патогена. ЖК и ее производные (жасмонаты) в некоторых экспериментальных системах проявляют противоопухолевую активность в отношении клеток животных, однако механизмы этого влияния не известны. АБК участвует в регуляции процессов перехода растений в состояние покоя, но практически ничего не известно о том, какое действие АБК оказывает на клетки животных. В связи с этим, целью исследования было изучение реакции нормальных и трансформированных клеток человека на действие данных растительных гормонов. В качестве объектов исследования использовались культивируемые клетки человека линий A431 (эпидермальная карцинома) и HaCat (нормальные кератиноциты). С помощью МТТ-теста было показано, что в одних и тех же диапазонах концентраций ЖК цитотоксична как для трансформированных клеток линии A431, так и для нетрансформированных клеток линии HaCat, а АБК цитотоксична только для A431. В частности, при концентрации 2мМ ЖК вызывала гибель 30% клеточной популяции в обеих линиях. Эта же концентрация АБК вызывала гибель 25% клеток линии A431, в то время как для клеток линии HaCat стимуляции клеточной гибели не наблюдалось. Мы провели анализ клеточных структур, на которые, как на потенциальные мишени, может быть направлена цитотоксическая активность ЖК и АБК при данной концентрации. Иммуноцитохимическое и приживленное окрашивание, а также электронно-

микроскопическое исследование показали, что ЖК вызывает гипертрофию элементов вакуолярной системы в обоих типах клеток. При этом наблюдается расширение диктиосом аппарата Гольджи, возрастание числа вторичных лизосом и аутофагосом. АБК вызывает резкое увеличение протяженности диктиосом аппарата Гольджи и возрастание числа вторичных лизосом и аутофагосом в трансформированных клетках. Кроме этого, только в клетках линии A431, АБК индуцировала изменения состояния митохондрий и актинового цитоскелета. Реакция митохондрий проявлялась в нарушении целостности наружной мембраны, а реакция актинового цитоскелета проявлялась в появлении скоплений актина в области межклеточных контактов. В клетках линии HaCat, АБК вызывала появление гигантских аутофагосом и большого числа кавеол. Сопоставление реакции нормальных и трансформированных клеток человека на действие разнонаправленных растительных гормонов показало, что в определенных концентрациях ЖК является цитотоксичной по отношению к обеим клеточным линиям, тогда как АБК цитотоксична только для трансформированных клеток. В этих условиях одной из мишенией воздействия является вакуолярная система клеток. Вместе с тем, для АБК только в клетках A431 есть и другие мишени воздействия – актиновый цитоскелет и митохондрии.

*Работа поддержанна РФФИ № 08-04-00750-а, НШ 1861.2003.4*

### **Электронно-микроскопический анализ кожи шпорцевой лягушки**

*(Xenopus laevis Daudin) в период метаморфоза*

*Виноградская Ирина Сергеевна (Москва, irina\_www@mail.ru)*

В предыдущих исследованиях, проведенных нами на личинках бесхвостой амфибии – шпорцевой лягушке (*Xenopus laevis Daudin*), было показано, что по мере приближения личинок к метаморфозному климаксу происходит нарушение динамики физиологических реакций дермальных меланофоров покровов, которое, как показал гистологический анализ, сопровождается начинающимися перестройками в покровах амфибий. Для более глубокого и детального анализа мы использовали метод электронно-микроскопического анализа покровов в разные периоды метаморфоза. Проведенный анализ позволил выявить значительные ультраструктурные изменения покровов, затрагивающие все слои кожи: эпидермис, базальную мембрану, коллаген и, конечно, дерму. Клетки эпидермиса соединены в основном десмосомальными контактами, однако, могут встречаться и плотные. В клетках поверхностного слоя эпидермиса идет активная секреция, о чем свидетельствует большое количество пиноцитарных пузырьков под мембранный клетки, кроме того, поверхностный слой клеток образует большое количество микроворсинок. Коллаген, лежащий под базальной мембраной, имеет плотную упаковку. Дермальные меланофоры локализованы строго под слоем коллагена. На стадиях прометаморфоза и метаморфозного климакса в эпидермисе сохраняются десмосомальные контакты, однако, отмечена способность к образованию выростов клетками не только поверхностного слоя, но и более глубоких слоев эпидермиса, выступающих в увеличенное межклеточное пространство, что обуславливает заметное разрыхление толщи эпидермальных клеток. Кроме того, в поверхностном слое этих эпидермальных клеток выявлено большое количество пиноцитарных пузырьков, секреторных гранул, что свидетельствует об интенсивной секреторной активности данных клеток. Значительные изменения обнаружены нами в структуре коллагена – наблюдается сильное разрыхление коллагена по сравнению с преметаморфозом. В толще коллагена нами были выявлены как единичные клетки, так и отдельные части клеток, содержащие коллагенсированные участки. Это свидетельствует о миграции клеток сквозь коллаген. Значительные изменения претерпевает и сама дерма в период метаморфозного климакса. В дерме отмечено большое количество коллагенсированных отростков дермальных клеток, в том числе и меланофоров, причем пигментные клетки, в отличие от преметаморфоза, располагаются в более глубоком слое дермы, а не строго под коллагеном. Интересным оказался тот факт, что на данном этапе в самих дермальных меланофорах и в отдельных коллагенсированных участках клеток мы отметили большое количество премеланосом. Это свидетельствует как о возможном возобновлении синтеза меланина в самих дермальных меланофорах, так и о появлении

дермальных меланофоров *de novo* в дерме в период метаморфозного климакса. Таким образом, можно заключить, что формирование новой структурно-функциональной единицы кожи в период метаморфоза сопровождается не только серьезными перестройками клеточного пласта, но и появлением новых клеток *de novo*.

#### **Тубулогенез клеток амниотической жидкости в коллагеновом геле**

**Давыдова Дарья Александровна** (Москва, davydovad@gmail.com)

Амниотическая жидкость содержит гетерогенную популяцию клеток, в которой присутствуют стволовые клетки, обладающие высоким пролиферативным потенциалом и способные дифференцироваться *in vitro* в производные трех зародышевых листков. Обычно эти клетки культивируют на пластике. В то же время значительный интерес представляет культивирование в трехмерном матриксе, поскольку это дает возможность изучать поведение клеток в условиях, приближенных к условиям в организме. Целью нашей работы было изучение поведения клеток в трехмерном коллагеновом геле и оценка их морфогенетического потенциала.

При культивировании на пластике клетки, выделенные из амниотической жидкости человека сохраняют высокий пролиферативный потенциал по меньшей мере до 18-20 пассажей. Популяция характеризуется экспрессией маркеров мезенхимного (CD73, CD90, CD105), нейрального ( $\beta$ 3-tubulin, Nestin) и эпителиального (кератин 19, p63) типов дифференцировки. Кроме того, в клетках выявляются некоторые из маркеров плuriпотентности (*Oct4*, *Nanog*). В коллагеновом геле в течение первых 5 сут клетки амниотической жидкости, в отличие от мезенхимных стволовых клеток и фибробластов, сохраняют округлую форму, при этом контракции геля не происходит. В это время клетки формируют в геле цисты и тубулярные структуры. Формирование таких структур характерно для кератиноцитов кожи и эндотелиальных клеток. Иммуногистохимический анализ показал, что клетки амниотической жидкости на пластике экспрессируют спектр цитокератинов, среди которых кератин 19, кератин 18, кератин 7. В коллагеновом геле экспрессия цитокератинов сохраняется только в одиночных клетках, в то время как в большинстве трубочек клетки не окрашиваются антителами к этим промежуточным филаментам, при этом в них появляется экспрессия эндотелиального маркера CD31. В то же время, экспрессия другого маркера зрелых эндотелиальных клеток – фактора фон Виллебранда – не выявляется. Возможно, это свидетельствует о том, что культивирования в трёхмерном матриксе недостаточно для дифференцировки амниотических клеток в эндотелиоциты и в культуральную среду необходимо добавлять специфические ростовые факторы.

Полученные данные свидетельствуют о том, что клетки амниотической жидкости обладают выраженным морфогенетическим потенциалом. Культивирование в трехмерном коллагеновом геле может способствовать детерминации клеток в эндотелиальном направлении.

#### **Воздействие митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 на процесс заживления кожных ран**

**Демьяненко И.А., Федоров А.В.** (Москва, ilya871@rambler.ru)

Исследования последних лет показывают, что в тканях раневой области происходит интенсивное образование активных форм кислорода (АФК), выполняющих как бактерицидную, так и регуляторную функции, однако повышенное образование АФК в области повреждения считают одной из возможных причин нарушения заживления ран при старении, а также при таком заболевании как диабет. В связи с этим актуальными являются исследования воздействия антиоксидантов, предотвращающих отрицательное действие АФК, на процесс репарации тканей после повреждения с целью разработки новых способов лечения ран, особенно хронических.

В работе исследовано воздействие антиоксиданта SkQ1 [10-(6'-пластохинонил)децилтрифенилfosфония], избирательно нейтрализующего образование АФК митохондриями, на процесс заживления ран. Проведены 3 независимых эксперимента на крысах и мышах. Животным под наркозом наносили резаную полнослойную кожную рану

на спине в межлопаточной области. В первом эксперименте белым беспородным крысам (170-200 г) ежесуточно после операции под кожу вокруг ран инъецировали 50 мкл 200 нМ раствора SkQ1 в 0,9% NaCl. Во втором эксперименте крысам линии Sprague-Dawley (450-520 г) на раны накладывали плёночное покрытие на основе хитозана и поливинилового спирта, содержащее 0,019 мкг SkQ1/г плёнки. Третий эксперимент проведен на старых мышах (28 месяцев) линии Balb/C. Животные с 3-месячного возраста до окончания эксперимента получали SkQ1 ежедневно с питьевой водой (25 нмоль/кг веса в сут). Для анализа процессов репарации тканей в области ран проводили макроскопическое (измерение площади ран на фотоизображениях), гистологическое и иммуногистохимическое исследования. Статистический анализ полученных численных данных проводили, используя непараметрический U-критерий Манна-Уитни.

Показано, что введение SkQ1 под кожу вокруг полнослойной кожной раны у крыс вызывает более чем двукратное достоверное ( $p<0,05$ ) уменьшение нейтрофильной инфильтрации области повреждения на 1 сут и трёхкратное достоверное ( $p<0,05$ ) увеличение числа миофибробластов в грануляционной ткани на 5 сут после нанесения раны. При введении SkQ1 в составе плёночных раневых покрытий наблюдалось заметное уменьшение площади раны в течение всех фаз раневого процесса. Статистически значимое уменьшение площади раны по сравнению с контролем ( $p<0,05$ ) было обнаружено на 4 и 7 сут эксперимента. В опытах на старых мышах показано, что долговременный (25 мес) приём SkQ1 с питьевой водой вызывал ускоренное сокращение площади ран, уменьшение продолжительности острой фазы воспаления, а также ускорение эпителизации и новообразования соединительной ткани дермы. При этом темпы заживления ран у старых мышей, получавших SkQ1, и молодых контрольных животных были сходными. Полученные данные свидетельствуют о перспективности применения митохондриально-направленных антиоксидантов в терапии длительно незаживающих ран. Работа выполнена при финансовой поддержке ООО Митотехнологии МГУ имени М.В.Ломоносова.

#### **Определение степени морфологической деструкции печени крыс при острой циркуляторной гипоксии**

**Иванская Наталья Николаевна** (Ульяновск, naivanskaya@yandex.ru)

При циркуляторной гипоксии нарушения кровоснабжения приводят к изменению функции и структуры клеток и тканей. Для выявления степени повреждения органа в зависимости от времени и дозы воздействия недостаточно дать его гистологическую характеристику. Отдельные участки органа в разной степени подвержены деструкции, а местами возможна нормальная гистологическая картина. Проблему решает метод интегральной оценки степени морфологической деструкции ткани (А.В. Муратов, 2001).

Световой микроскопией исследовали окрашенную гематоксилином ткань печени крыс через 3, 7 и 24 часа после острой кровопотери объемами 1,5% и 0,75% от массы тела (модель острой циркуляторной гипоксии по Sapirstein). На каждом микропрепарate учитывали 100 точек. Интегральное значение морфологических изменений в каждом случае оценивали показателем информативности, который является произведением веса фактора во всей рассматриваемой совокупности факторов (коэффициент А) на значение конкретной характеристики фактора (признак В). В качестве морфологических факторов рассматривали изменения: зернистая дистрофия, гидропическая дистрофия, баллонная дистрофия, некроз, внутри- и внеклеточный холестаз, расширение синусоидов, расширение центральных вен, расширение желчных протоков, наличие в синусоидах стаза. За условную единицу выраженности показателей принята величина 1 балл. Коэффициент А указывает на значение этого фактора во всей рассматриваемой совокупности факторов: 1 балл – морфологически обратимые изменения; 2 балла – изменения, приводящие к структурной перестройке ткани печени без угрозы для жизни; 3 балла – необратимые изменения с угрозой для жизни.

Для определения значений характеристик факторов (признак В) принята 7-балльная шкала: 0 баллов – нет морфологических изменений, 1 балл – локальные изменения, 2 балла – мелкоочаговые изменения локализуются в одной из зон печеночных долек; 3 балла – крупноочаговые изменения локализуются в одной из зон печеночных долек; 4 балла –

мелкоочаговые изменения локализуются как в перипортальных зонах печеночных долек, так и в центролобулярных зонах печеночных долек; 5 баллов – изменения носят крупноочаговый характер как в перипортальных зонах печеночных долек, так и в центролобулярных зонах печеночных долек; 6 баллов – изменениям подвержена полностью одна из зон печеночных долек паренхимы; 7 баллов – диффузные патоморфологические изменения в паренхиме всей печеночной должи.

По данному методу экспериментально получено, что через 3 часа после кровопотери объемами и 0,75% и 1,5% степень повреждения печени средняя. Через 7 часов она остается средней при 1,5% объеме потери крови, а при 0,75% становится легкой. Спустя 24 часа после кровопотери степень повреждения становится легкой при объеме кровопотери 1,5%, а при объеме 0,75% ткань печени восстанавливается до нормы.

#### **Действие хлорпромазина на организацию мембран в дроблении водных животных**

*Ивашикин Евгений Геннадьевич (Москва, veliger@ya.ru)*

В дроблении многоклеточных животных цитокинез начинается с инвагинации плазматической мембранны в зоне формирования борозды. Этот процесс сопровождается активным эндоцитозом на участках плазмалеммы, непосредственно прилегающих к месту прохождения борозды. Для исследования процессов эндоцитоза широко используется фармакологическое ингибирирование. Одним из веществ, оказывающих подавляющее действие на процесс эндоцитоза считается хлорпромазин. Хлорпромазин (аминазин) принадлежит к группе фенотиазинов и является ингибитором ряда клеточных рецепторов. Кроме того, многие физиологические эффекты хлорпромазина определяются его катионными амфи菲尔ными свойствами и являются результатом непосредственного связывания с холин-богатыми участками клеточных мембран (т.н. «липидными плотиками»). Целью данной работы является описание ранее не известных эффектов действия хлорпромазина на организацию мембран в дроблении водных животных. В качестве объектов исследования были выбраны ранние зародыши пресноводного моллюска большого прудовика (*Lymnaea stagnalis*), а также двух видов костистых рыб: данио (*Brachydanio rario*) и вьюна (*Misgurnus fossilis*).

У большого прудовика на стадиях 8-24 бластомеров, морулы и бластулы инкубация в 10-100 мкМ растворе хлорпромазина вызывала округление бластомеров, уменьшение площади контактной поверхности клеток и последующее распадение зародыша на отдельные клетки. У вьюна на стадиях 4-64 бластомеров инкубация в хлорпромазине приводила к интенсивному сокращению поверхности мембранны бластомеров и втячиванию бластодиска в объем желточного мешка, в результате чего происходил его разрыв. У данио подобный эффект отмечен не был. Мы наблюдали нарушение цитокинеза и образование синцитиальных структур, что соответствует описанному в литературе. Так как известно, что хлорпромазин является флуорофором, было проведено исследование зародышей с помощью флуоресцентного и конфокального микроскопов. Непосредственно после начала инкубации флуоресценция локализовалась пятнами на поверхности мембран. Через 5 минут мы наблюдали наличие сферических светящихся гранул, сосредоточенных на поверхности или непосредственно под поверхностью клеточной мембранны. Через 30 мин количество светящихся гранул существенно возрастало, они рассредотачивались по всему объему клетки. Электронно-микроскопическое исследование зародышей показало, что происходит интенсификация образования эндосомарных везикул сразу после помещения в хлорпромазин, а через 30 минут значительно изменяется состав везикул кортикального слоя бластомеров.

Таким образом, мы показали, что хлорпромазин может являться не только блокатором, но и агонистом процесса эндоцитоза. Существенное различие в действии этого катионного амфи菲尔ного вещества на организацию мембран у разных животных, вероятнее всего, связано с принципиальной разницей в липидном составе мембран дробящихся бластомеров.

*Автор выражает признательность д.б.н. Воронежской Елене Евгеньевне за неоценимую помощь в работе и подготовке тезисов, а также профессору Балатонского лимнологического института (Тихань, Венгрия) Каролю Элекешу за методическую поддержку. Работа была поддержана грантом РФФИ №09-04-01326.*

## **Цитогенетические показатели сосны обыкновенной, заражённой сосновой корневой губкой**

**Игнатова Ирина Викторовна** (Воронеж, [irina777.84@list.ru](mailto:irina777.84@list.ru))

Сосновая корневая губка (*Fomes annousis* (Fr.)) – один из наиболее распространенных возбудителей заболевания сосны. Он способствует морфоанатомическим и физиологическим нарушениям и приводит к гибели дерева. Для раннего выявления болезни важно знать не только изменения на организменном уровне, но и нарушения, протекающие на уровне клетки. Изучение цитогенетических характеристик больных деревьев является актуальным направлением, поскольку в имеющейся литературе отсутствуют данные подобного рода исследованиях. В качестве территории исследования послужил Хоперский государственный заповедник, в котором заболевание сосны корневой губкой имеет достаточной устойчивый характер. В лабораторных условиях выращены проростки, из апикальной меристемы которых изготовлены препараты по методике Буториной (Butorina, Evstratov, 1996). На препаратах учитывали митотическую активность; ядрышковую активность; долю и спектр нарушений митоза; микроядерный тест. Полученные данные обработаны с помощью статистической программы Stadia.

Обнаружено, что у семенного потомства деревьев, поражённых корневой губкой, наблюдается достоверное увеличение малоядрышковых клеток (клетки с 1 и 2 ядрышками ( $p<0,01$  и  $p<0,05$ ) и уменьшение многоядрышковых клеток (клетки с 5 ( $p<0,01$ ), 6 ( $p<0,01$ ) и 7 ( $p<0,01$ ) ядрышками в ядре). Это позволяет предполагать снижение синтетических процессов у инфицированных деревьев. В единичных случаях в апикальной меристеме проростков деревьев сосны выявлены микроядра (как следствие отставаний хромосом и протекания многополосных митозов) ( $0,002\pm0,002\%$  у больных деревьев, и  $0,01\pm0,005\%$  у здоровых деревьев). Присутствие остаточного ядрышка свидетельствует об увеличении активности рибосомальных цистронов. По нашим данным, частота их встречаемости у деревьев сосны, пораженных губкой, вдвое выше, чем для здоровых деревьев ( $6,3\pm2,5\%$  и  $3\pm0,8\%$  соответственно).

Таким образом, проведенное исследование показывает, что инфицированные корневой губкой деревья сосны обыкновенной испытывают снижение синтетических процессов, что было выявлено ранее у проростков сосны, развивавшихся в присутствии фактора облучения (Сенькович, 2007). Изменения ядрышковых характеристик могут рассматриваться как первичные изменения генома и пролиферативной системы на функциональном уровне, еще до структурных перестроек (Калаев, 2009).

## **Структурно-метаболические особенности лимфоцитов и нейтрофилов у больных хроническим лимфолейкозом в зависимости от стадии заболевания**

**Коростылева Ксения Александровна** (Красноярск, [kksua@rambler.ru](mailto:kksua@rambler.ru))

В последние годы наблюдается тенденция к увеличению случаев заболеваний хроническим лимфолейкозом и рост числа госпитализаций по данному поводу. Одним из факторов, обусловливающих развитие онкологического заболевания, является снижение реактивности иммунной системы. С одной стороны, иммунодефицитное состояние определяет развитие злокачественной опухоли. С другой стороны, сама опухоль индуцирует развитие иммунной супрессии. Несмотря на ряд проведенных исследований, многое в патогенезе хронического лимфолейкоза (ХЛЛ) остается неизученным: недостаточно полно исследованы механизмы иммунной реактивности, особенности иммунного статуса, состояние параметров нейтрофильных гранулоцитов в зависимости от стадии ХЛЛ.

Целью нашего исследования являлось изучение особенностей клеточного и гуморального звеньев иммунитета у больных ХЛЛ в зависимости от стадии заболевания. Всего под наблюдением находилось 57 больных ХЛЛ, в качестве контроля обследовано 125 здоровых. Группы исследования сопоставимы по полу и возрасту. Популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов крови оценивали с помощью метода непрямой иммунофлюоресценции с использованием моноклональных антител к CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, HLA-DR. Вычисляли иммунорегуляторный индекс, лейко-Т-клеточный, лейко-В-клеточный индекс и индекс активации Т-лимфоцитов. Концентрация иммуноглобулинов класса A, M и G в сыворотке определяли иммуноферментным методом. Оценка клеточного и

гуморального иммунитета проводилась при поступлении больных до начала патогенетического лечения. Для оценки параметров респираторного взрыва нейтрофилов использовали метод спонтанной и индуцированной зимозаном хемилуминесценции цельной крови. Описание выборки производили при помощи стат. методов, достоверность оценивали по критерию Манна-Уитни.

В ходе исследования выявлены изменения иммунного статуса, оказывающие значительную роль не только в появлении, но и в прогрессировании заболевания. У больных ХЛЛ в развернутую стадию состояние иммунной системы характеризуется повышением содержания Т-, В-лимфоцитов и НК-клеток. Особенностью терминальной стадии является развивающийся комбинированный иммунодефицит с поражением Т- и В-систем иммунитета. А также больные ХЛЛ имеют более низкие параметры респираторного взрыва нейтрофилов, относительно контроля.

### **Лейкоцитарный состав органов иммунной системы байкальского омуля** *Кутырев Иван Александрович (Улан-Удэ, sankaar@mail.ru)*

В последние три десятилетия морепродукты превратились в один из наиболее быстро растущих пищевых ресурсов во всем мире. Однако параллельно отмечается увеличение случаев инфекционных заболеваний среди рыб, наносящих серьезный урон рыбоводной промышленности. В связи с этим актуальными являются исследования защитных реакций организма рыб. Байкальский омуль *Coregonus migratorius* Georgi, 1775 является эндемиком озера Байкал и одним из основных промысловых видов. Наши исследованиями впервые установлены особенности лейкоцитарного состава органов иммунной системы байкальского омуля в природных условиях.

В головном отделе почки байкальского омуля были дифференцированы следующие клетки лейкоцитарного ряда: бластные формы клеток, промиелоциты, гранулоциты нейтрофильного (миелоидные, метамиелоидные, палочкоядерные и сегментоядерные формы) и базофильного (миелоидные и метамиелоидные формы) рядов, агранулоциты лимфоидного (пролимфоциты и лимфоциты) и моноцитарного (моноblastы, моноциты) рядов. Наличие большого числа малодифференцированных форм лейкоцитов в пронефросе байкальского омуля свидетельствует об активном участии этого органа в гемопоэзе. Лейкоцитарный состав головной почки носит лимфоидный характер, поскольку лимфоциты составляют 80% от общего числа лейкоцитов.

В тулowiщном отделе почки байкальского омуля были дифференцированы те же клетки лейкоцитарного ряда, что и в головном отделе, за исключением базофилов. По сравнению с пронефросом, в мезонефрое содержится меньше бластных форм (в 1,4 раза), промиелоцитов (в 1,9 раза) и нейтрофилов (в 1,8 раза). Соответственно, доля лимфоцитов в мезонефрое больше, чем в пронефрое, в 1,1 раза. Главным образом, увеличивается число зрелых лимфоцитов (в 1,7 раза). Сниженное содержание малодифференцированных форм клеток свидетельствует о том, что тулowiщный отдел почки байкальского омуля играет меньшую роль в гемо- и иммунопоэзе.

По нашим данным, селезёнка байкальского омуля принимает активное участие в гемопоэзе, в частности, в гранулоцитопоэзе. Так, бластных форм в селезёнке содержится в 1,4 раза больше, чем в головном отделе почки, гранулоцитов в целом – в 1,3 раза, нейтрофилов в целом – в 1,7 раза, нейтрофильных миелоцитов – в 5,1 раза, нейтрофильных метамиелоцитов – в 2,5 раза. С другой стороны, пролимфоцитов в селезёнке содержится меньше, чем в тулowiщном отделе почки в 1,2 раза, а зрелых лимфоцитов – больше в 1,8 раза. Следовательно, лимфопоэз проходит в селезёнке в меньшей степени, чем в пронефрое.

*Автор выражает благодарность профессорам Н.М. Пронину (ИОЭБ СО РАН) и С.В. Прониной (БГУ). Работа выполнена по проекту VI.43.1. РАН при поддержке гранта РФФИ № 08-04-98035.*

**Ядерный белковый матрикс определяет специфическое строение политеческих хромосом из слюнных желез *Chironomus plumosus***

**Макаров Максим Сергеевич** (mcsimmc@yandex.ru)

Ядерный белковый матрикс (ЯБМ) – остаточная структура, выявляемая при обработке интерфазных ядер детергентами, растворами NaCl высокой концентрации и нуклеазами, которая повторяет общую морфологию ядра и включает в себя периферическую ламины, остаточное ядрышко и внутреннюю гранулярно-фибриллярную сеть. Негистоновые белки ЯБМ определяют строение и локализацию интрафазных хромосом, неразличимых в обычных ядрах.

Существует особый тип интерфазных ядер, внутри которых содержатся гигантские политеческие хромосомы. Политеческие хромосомы представляют собой поперечно исчерченные структуры, образованные многократно удвоенными сестринскими хроматидами, поэтому они очень хорошо различимы даже на небольшом увеличении.

Было показано, что в случае предварительной стабилизации негистоновых белков 2 mM CuCl<sub>2</sub> тело политеческой хромосомы сохраняет свою морфологическую целостность и дисковый рисунок даже после удаления всех гистонов и ДНК. ЯБМ политеческих хромосом можно наблюдать как под световым, так и под электронным микроскопом; при этом в ядре не выявляется никаких межхроматиновых фибриллярно-гранулярных структур за исключением периферической ламины.

Методом иммуноцитохимии удалось выявить в составе ЯБМ политеческих хромосом мажорные негистоновые белки (токоизомеразу Ia и SMC 1) и РНК-компоненты. Кроме того, в гигантских ядрах личинок ранних стадий наблюдается включение BrDU, показывающее участки синтеза ДНК, которые также связаны с ЯБМ политеческих хромосом. Таким образом, ЯБМ гигантских ядер *Chironomus plumosus* обладает всеми свойствами ЯБМ обычных интерфазных ядер и при этом определяет специфическую структуру политеческих хромосомы.

**Диагностическая роль патологий митоза при раке молочной железы**  
**Малиновская Юлия Викторовна** (Белоруссия, Минск, jul-ia@list.ru)

Нарушение нормального течения митоза – патологический митоз – ведет к различным нарушениям хромосомного аппарата клеток и неравномерному распределению генетического материала между дочерними ядрами. Это один из основных механизмов возникновения анеуплоидии и нарастания генетической гетерогенности клеточных популяций. Клеточный полиморфизм, который можно наблюдать при микроскопическом изучении клеток злокачественных опухолей представляет собой прямое следствие патологии митоза. Это в первую очередь образование гигантских ядер и микроядер, многоядерных клеток, гипер- или гипохромия вследствие разного количества в них ДНК и изменения структуры хроматина, наличий патологий митоза.

Оценка молекулярно-генетического и цитогенетического статуса клеток рака молочной железы, а также оценка их общей геномной нестабильности может внести существенный вклад в понимание особенностей генеза этой патологии и роли в этом процессе факторов мутационного давления антропогенного происхождения.

Целью исследования явилось изучение цитогенетического статуса клеток рака молочной железы у женщин. Объект исследований – мазки-отпечатки опухолевой ткани женщин с инвазивным раком молочной железы. Препараторы готовили по стандартной методике и окрашивали красителем Романовского-Гимзы, проводилась гистологическая верификация диагноза с определением гистологической формы рака и степени злокачественности. Анализ проводили с помощью микроскопа «Axioplan» (увеличение  $\times 1500$ ). В каждом препарате анализировали не менее 1000 клеток, подсчитывались клетки с нормальными и патологическими митозами и микроядрами, результаты выражали в процентах и обрабатывали с помощью программ пакета «Statistica 6.0» с использованием параметрической и непараметрической статистики.

При анализе препаратов тканей молочной железы нами были обнаружены следующие патологии митоза: анафазные мосты, отставание в метафазе, пульверизация хромосом, 3-

групповые митозы, многополюсные митозы, моноцентрические митозы, асимметричные митозы, К-митозы. Также как показатель общей нестабильности генома, в анализе учитывались клетки с микроядрами.

В результате проведенных нами исследований была выявлена устойчивая корреляционная зависимость между степенью агрессивности опухоли и следующими цитогенетическими параметрами: количество клеток с 1 микроядром ( $p<0,05$ ), количество клеток с 2 микроядрами ( $p<0,05$ ), общее количество микроядер ( $p<0,05$ ), количество клеток с микроядрами ( $p<0,05$ ); частота анафазных мостов ( $p<0,001$ ), трехгрупповых метафаз ( $p<0,001$ ), а также общего количества патологических митозов ( $p<0,05$ ).

Таким образом, суммируя изложенное выше, можно констатировать, что уровень микроядер в тканях опухоли может служить экспресс-критерием степени злокачественности опухоли. Кроме того, полученные нами данные еще раз заостряют проблему возможной роли мутационного давления в отношении рака молочной железы.

Выражаем благодарность научному руководителю д.б.н., профессору Мельнову С.Б.

#### **Трансплантационные эффекты активированных клеток Сертоли взрослых животных** *Малолина Е.А., Кулебин А.Ю. (Москва, kate-malolina@mail.ru)*

Было принято считать, что у половозрелых несезонно размножающихся млекопитающих высокодифференцированные клетки Сертоли (КС) неспособны к пролиферации. Однако экспериментальные исследования последних лет показали, что в ответ на воздействия или при помещении КС в условия *in vitro* эти клетки вновь начинают делиться и/или возобновляют экспрессию маркеров, характерных для неонатальных недифференцированных КС (нКС). Эти данные позволяют предположить, что стимулированные КС взрослых животных могут обладать таким же регенерационным потенциалом, как и нКС. Целью нашего исследования является проверка этого предположения.

Выполнены трансплантационные эксперименты, в которых в качестве реципиентов использовались мыши-гибриды CBA×C57Bl/6, а доноров – трансгенные мыши линии ROSA26, несущие ген *E. coli LacZ*. Семенники реципиентов опустошали от собственных половых клеток и КС с помощью внутрибрюшинного введения бусульфана и, через 1 мес. после этого, раствора соли кадмия непосредственно внутри семенных канальцев. Через 2 нед в такие семенники трансплантировали суспензии клеток, выделенных из семенников доноров. В 1 эксперименте донорам за 1,5 мес. до трансплантации был сделан билатеральный крипроторхизм. Во 2 эксперименте КС мышей-доноров культивировали в течение 10 сут при 37°C, а затем инъецировали в семенники реципиентов. В качестве отрицательного контроля трансплантировали суспензии клеток семенников взрослых интактных мышей, положительного – 2-суточных мышат. Через 2 мес. после трансплантации семенники извлекали и выявляли в них клетки доноров по активности продукта трансгена *LacZ*.

В отрицательном контроле только в 1 из 6 семенников было найдено несколько небольших колоний клеток донора, состоящих из находящихся на базальной мемbrane канальцев сперматогониев и КС. В положительном контроле во всех семенниках присутствовали обширные колонии клеток донора. Это были КС, находящиеся в канальцах реципиента или образующие в интерстиции структуры, подобные неонатальным семенным канальцам, в которых иногда находились сперматогонии. В 1 эксперименте в 3 из 5 гонад были обнаружены колонии клеток донора, количество которых было сравнимо с их числом в положительном контроле. КС донора располагались в виде скоплений в интерстиции и в канальцах, в некоторых из них начинался донорский сперматогенный процесс. Во 2 эксперименте в 2 из 5 семенников выявлены клетки донора, но их было меньше, чем в 1 эксперименте. Виды состоящие из КС донора маленькие «канальцы» в просветах канальцев реципиента, другие КС донора располагались на базальной мемbrane канальцев или формировали канальцеподобные структуры в интерстиции.

Таким образом, мы показали, что зрелые стимулированные КС взрослых животных обладают регенерационным потенциалом, сходным с нКС, что, возможно, связано с переходом КС к пролиферации и изменениями характера экспрессии генов, активность которых определяет степень зрелости этих клеток.

**Поведение клеток пигментного эпителия глаза взрослого человека  
в условиях культивирования**

**Милюшина Любовь Александровна (Москва, milyushina@rambler.ru)**

Пигментный эпителий (РПЭ) глаза позвоночных представлен монослоем пигментированных гексагональных клеток, которые обладают высокой функциональной и фенотипической пластичностью *in vivo* и *in vitro*. Однако способность к трансдифференцировке в нейральную сетчатку наблюдается лишь у низших животных, в то время как у птиц и млекопитающих она представлена только на ранних стадиях развития. Относительно недавно у взрослых крыс были выделены клетки РПЭ обладающие высоким пластическим потенциалом, что может косвенно указывать на возможность сохранения в РПЭ глаза взрослого человека клеток с подобными свойствами. Поэтому целью нашей работы являлось исследование способности клеток РПЭ глаза взрослого человека к дифференцировке по нейральному пути в разных культуральных условиях.

В средах содержащих 1% или 10% сыворотки (FBS), не зависимо от присутствия факторов (FGF и EGF) и дополнительных добавок (N2), клетки формировали адгезивные культуры, в которых были выявлены клетки эпителиальной и фибробластоподобной морфологии. В этих условиях часть клеток дедифференцировались. Эти клетки постепенно теряли эпителиальную морфологию, маркеры собственной дифференцировки (пигментацию, белки RPE65 и CRALBP), в них появлялась экспрессия маркеров малодифференцированных клеток (Pax6, Oct4, Nanog) и маркеров нейральной дифференцировки (нейтин,  $\beta$ 3-тубулин). В средах с факторами наблюдалась мультипотентная дифференцировка, наряду с нейрональными был обнаружен маркер глиальных клеток GFAP. Однако не все клетки были подвергнуты полной дедифференцировке, часть сохраняла свою эпителиальность в течение длительного периода культивирования. Но удаление из культуры уже дедифференцированных фибробластоподобных клеток стимулировало дальнейшую дедифференцировку эпителиальных клеток.

При переводе культур в среду без сыворотки, но в присутствии FGF, EGF и N2, происходило полное открепление клеток от подложки, где дальнейшее развитие культуры продолжалось в виде свободноплавающих сфер. Сферические агрегаты были представлены малодифференцированными Pax6 и нетин позитивными клетками. После стимуляции дифференцировки в культуре наблюдали многочисленные нетин,  $\beta$ 3-тубулин, GFAP позитивные фибробластоподобные клетки, а так же обнаруживали единичные рековерин окрашенные, которые до этого не выявлялись.

В работе нами было показано, что РПЭ глаза взрослого человека проявляет тенденцию к дифференцировке в нервные клетки независимо от состава используемой среды, однако проявление мультипотентности зависит от наличия специфических факторов в среде культивирования. При этом РПЭ содержит несколько субпопуляций клеток, которые отличаются по способности к пластическим изменениям и ответом на наружные стимулы *in vitro*. Работа поддерживается грантом РФФИ 08.04.00081 и Контрактом Федерального агентства по науке и инновациям № 02.512.12.2008

**Исследование поведения трансплантированных ММСК в составе эксплантата  
сетчатки глаза, подвергшегося повреждению лазерным излучением**

**Сергеев Сергей Александрович (Москва, embryossa@gmail.com)**

Современные представления о поведении трансплантированных стволовых клеток в нейрональных структурах при травме отводят решающую роль регуляторным факторам, выделяемым гибнущими клетками. Однако данное представление базируется на исследованиях целого организма, что не позволяет детально рассмотреть динамику морфологических изменений трансплантированных клеток, не дает возможности проследить за судьбой отдельных клеток в реальном времени. В противоположность исследованиям *in vivo*, трансплантация клеток *in vitro* в экспланационную культуру лишена этих недостатков.

В качестве модели нами была выбрана сетчатка глаза новорожденных крыс Wistar. Культивирование проводили в стандартных условиях в среде DMEM/F12 с FGF и EGF, 7% FCS. На 7-е сутки эксплантаты повреждали лазером Zilos-tk по квадрату со стороной 100

мкм, и трансплантировали мезенхимные стромальные клетки костного мозга (ММСК). ММСК выделяли из красного костного мозга большеберцовых костей GFP+ мышей, выращивали в клональной плотности или в культуре висячих капель для получения агрегатов и трансплантировали стеклянным микрокапилляром в концентрации 300-300000 клеток в 0,2 мкл.

Было показано, что решающим для успешной миграции трансплантата к области повреждения является время, прошедшее после травмы. Так через сутки ММСК распространялись преимущественно диффузно, в то время как при инъекции сразу после травмы наблюдалась направленная миграция 70% трансплантированных ММСК в область повреждения эксплантата. На 2-е сутки ММСК утрачивали способность к быстрому перемещению, выпуская длинные нейритоподобные отростки и приобретая морфологию bipolarных нейронов под действием нового клеточного окружения эксплантата сетчатки. Было показано, что концентрация трансплантированных ММСК так же оказывает сильное влияние на интенсивность их миграции, которая значительно увеличивается с возрастанием плотности клеток в суспензии для инъекции. Отмечено распространение трансплантированных ММСК преимущественно по клеточным элементам сетчатки глаза и практически полное отсутствие живых клеток на поверхности культуральной чашки. Пришедшие в область травмы клетки сохраняли свою жизнеспособность на протяжении более 30 суток. Но на протяжении всего времени эксперимента экспрессия характерных маркеров дифференцировки нервных клеток, трансплантированными ММСК так и не была выявлена.

Таким образом, удалось детально проследить судьбу клеток при трансплантации, показать решающую роль клеточного окружения для направленной дифференцировки и миграции трансплантата, показать временную и пространственную зависимость эффективности миграции клеток в область повреждения, оценить минимальное количество клеток, способное мигрировать на большие расстояния в область травмы.

### **Закономерности развития клеточных и тканевых нейротрансплантатов**

*Сухинич Кирилл Константинович (Москва, transpl@hotmail.com)*

Проблема регенерации в ЦНС мlekопитающих и, в особенности, у человека является одной из центральных в нейробиологии. Причиной тому служат тяжелые последствия при заболеваниях и травмах головного и спинного мозга. Коррекция патологических состояний мозга является одной из главнейших задач, которая стоит сегодня перед нейробиологами. Нейротрансплантация эмбриональной нервной ткани рассматривается в качестве одного из перспективных подходов в решении поставленной задачи. Однако на сегодняшний день остается не ясным, какой материал (клеточные суспензии, полученные путем диссоциации тканей эмбрионального мозга, или фрагменты эмбриональной нервной ткани) является наиболее предпочтительным для нейротрансплантации. Поэтому целью данного исследования было проведение сравнительного анализа приживления и развития клеточных и тканевых аллогрантрансплантатов эмбриональной нервной ткани мозга мышей 14-ти дневного развития, в клетках которых экспрессируется белок GFP.

Методика проведения эксперимента была следующая: фрагмент либо клеточную суспензию неокортекса эмбриона мыши 14-ти дневного развития трансплантировали в стриатум взрослого животного. Фиксация животных выполнялась через 7 и 30 суток после трансплантации. Мозг извлекали и резали на микротоме с замораживающим столиком. Затем проводили иммуногистохимическое окрашивание антителами против GFAP, NeuN, PCNA, Tyrosine Hydroxylase.

Через 7 и 30 суток у экспериментальных животных были обнаружены трансплантаты по флуоресценции GFP. Тканевые трансплантаты, как правило, имели четкие границы, в отличие от клеточных. На 30 сутки происходит заметное увеличение размеров тканевых трансплантатов, тогда как изменения размеров клеточных трансплантатов менее выражены. Наблюдалась миграция единичных клеток из трансплантатов в стриатум и кору. Наиболее обширная миграция в обоих случаях была обнаружена вдоль нервных волокон мозолистого тела. Вокруг клеточных и тканевых трансплантатов выявлялась глиальная реакция, снижающаяся на 30 сутки, что было обнаружено при окраске на GFAP, однако вокруг

клеточного трансплантата глиальная реакция была выражена слабее. Наблюдалось снижение пролиферативной активности на 30 сутки, что было выявлено с помощью антител против PCNA – маркера пролиферирующих клеток. На 30 сутки после трансплантации были обнаружены дифференцированные нейроны по окраске антителами против NeuN. Глиальная дифференцировка клеток трансплантатов наблюдалась как на 7, так и на 30 сутки после операции в обоих случаях. Также было обнаружено врастание волокон и миграция астроцитов реципиента в трансплантат.

Таким образом, как тканевые, так и клеточные трансплантаты способны переживать не менее 30 суток без отторжения, при этом клетки в них дифференцируются в нейроны и глию. Однако, тканевые трансплантаты демонстрируют большую способность к росту. Это, по-видимому, связано с более длительным сохранением эмбрионального микроокружения в тканевых трансплантатах в сравнении с трансплантатами диссоциированных клеток. Автор выражает признательность с.н.с. Подгорному О.В. за помощь в подготовке данной работы.

### **Электронно-микроскопическое исследование нейроглиальных контактов в рецепторе растяжения рака**

**Федоренко Ю.П., федоренко А.Г. (Ростов-на-Дону, forever277@mail.ru)**

Исследование нейроглиальных взаимодействий – одна из центральных проблем нейробиологии. Мы изучали ультраструктуру нейроглиальных контактов в рецепторе растяжения речного рака (РРР), состоящем из всего одного сенсорного нейрона и окружающих глиальных клеток (ГК). После изоляции рецептора растяжения и стабильной импульсации с частотой около 6-10 Гц препараты фиксировали глутаральдегидом, обрабатывали OsO<sub>4</sub> и уранилатом и заключали в эпон. Ультратонкие срезы готовили на ультрамикротоме Leica EM UC6 и исследовали на электронном микроскопе Теслаи Spirit 12. Важным аспектом нейроглиальных взаимодействий является межклеточный транспорт веществ между нейроном и ГК. Он, вероятно, двухсторонний: из глии в нейрон и из нейрона в глию. Глиальная оболочка РРР состоит из 10-30 слоев. Глиальные отростки плотно прилегают к нейрону, так, что расстояние между их мембранами не более 10-15 нм. Это облегчает диффузионный обмен между нейроном и ГК, но ограничивает сообщение нейрона с внешней средой. Особенностью механорецепторных нейронов является мощный слой микротрубочек, протягивающийся от дендритов к аксону. Он отделяет перикарион нейрона от плазмалеммы и затрудняет пузырьковый транспорт в/из ГК. Выпячивания цитоплазмы ГК в нейрон повышают прочность связывания глии с нейроном и облегчают перенос веществ из глии в нейрон. Они позволяют переносимым веществам преодолеть фибриллярный слой и достичь перикариона. В формировании инвагинаций участвуют триады: «подповерхностные уплощенные цистерны – цистерны эндоплазматического ретикулума – митохондрии». Уплощенные цистерны остаются связанными с изогнутым участком клеточной мембрани после формирования инвагинации. От инвагинаций могут отрываться пузырьки, ограниченные двумя мембранами. Они захватываются цитоплазмой нейрона. Так большие массы цитоплазмы ГК переносятся в нейрона. Также наблюдается транспорт аутофагосом, содержащих обломки органелл и даже целые органеллы, из нейрона наружу. Другая предполагаемая транспортная система – трубчатые решетки. Как правило, они располагаются в отдаленных глиальных слоях и не контактируют с нейроном. Возможно, в рецепторе растяжения трубчатые решетки транспортируют поперек глиальных слоев ионы K<sup>+</sup> и другие метаболиты. Таким образом, транспорт веществ из ГК в нейроне осуществляется с помощью диффузии, инвагинаций и связанных с ними триад: «подповерхностные цистерны – свободные пузырьки – митохондрии». Перенос больших участков цитоплазмы глиальных клеток может происходить путем захвата внедрившихся в нейрон глиальных отростков. В межглиальном транспорте, вероятно, участвуют особые структуры - трубчатые решетки. Перенос участков цитоплазмы нейрона в глию может происходить в результате формирования аутофагосом.

*Работа поддержана грантами РФФИ № 09-04-01322 и Минобрнауки РФ № 2.1.1/6185.*

**Механизмы взаимодействия мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток с клетками почечных канальцев в условиях совместного культивирования**  
**Хряпенкова Татьяна Геннадьевна (Москва, tenella@list.ru)**

Способы взаимодействия различных клеток между собой всегда интересовали учёных. А в связи с широким применением в последние годы клеточной регенеративной терапии этот интерес многократно возрос. В настоящее время заместительную клеточную терапию применяют при самых различных патологических состояниях. Для понимания механизмов клеточной терапии необходимо исследование на клеточном уровне контактных и дистанционных взаимодействий клеток организма реципиента с трансплантированными клетками.

Целью данной работы было исследование механизмов взаимодействия мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) с культивируемыми клетками почечных канальцев крыс.

Обнаружено, что между ММСК и клетками почки происходит образование межклеточных контактов, посредством которых клетки могут обмениваться внутриклеточным содержимым. При цитометрическом исследовании клеток, нагруженных Mitotracker, на разных сроках сокультивирования было обнаружено, что уже через 3 часа уменьшается интенсивность флуоресценции (ИФ) в нагруженной популяции и соответственное увеличение ИФ изначально неокрашенных клеток. Эта тенденция продолжала развиваться к 24 часам; к 48 часам сокультивирования пики обеих популяций практически сливались. Таким образом, ММСК передают окрашенные Mitotracker митохондрии в клетки почки. Аналогично исследовался обмен цитоплазматическим содержимым и мембранными компонентами. Было обнаружено, что сразу после смешивания в культуре выделяются две популяции с разной ИФ Calcein или DiO: неокрашенные клетки почки попадают в популяцию с низкой ИФ, а клетки, несущие зонд – в пик с высокой. При сокультивировании происходит уменьшение обеих начальных популяций и появление большого числа клеток с промежуточными значениями ИФ. В случае с Calcein через 6 часов доля таких клеток составляла 19,4%, через 24 часа – 32%, а через 48 часов – более 38% всей культуры. При окрашивании мембранных липидов DiO через 6 часов доля таких клеток составляла 14,7%, а через 24 часа и 48 часов – около 45% всей культуры. Мы считаем, что увеличение числа клеток со средней ИФ, то есть транспорт флуоресцентных зондов, отражает перенос компонентов цитоплазмы или мембран из ММСК в неокрашенные клетки почки.

Можно сделать вывод, что в смешанной культуре образуются межклеточные контакты, способные осуществлять транспорт митохондрий и различных цитоплазматических и мембранных компонентов.

*Работа поддержана грантами РФФИ № 08-04-01667 and 09-04-13663-офи\_ц. Хочу поблагодарить руководителя лаборатории структуры и функций митохондрий НИИ ФХБ им. А.Н.Белозерского и научного руководителя – Зорова Дмитрия Борисовича; научного руководителя Плотникова Егора Юрьевича; а также всех сотрудников нашей лаборатории.*

**Исследование морфологических особенностей стабильных и нестабильных атеросклеротических поражений сонных артерий в сопоставлении с УЗДГ обследованием, неврологическим статусом пациента в анамнезе и цитокиновым профилем плазмы**  
**Шишкина В.С., Каширина С.В. (Москва, shishkinavalya@mail.ru)**

Острые клинические проявления сердечнососудистых заболеваний связаны с развитием нестабильных (склонных к разрывам) атеросклеротических поражений стенок магистральных артерий. Разрыв нестабильной каротидной бляшки может привести к острому нарушению мозгового кровообращения (ОНМК), транзиторной ишемической атаке (ТИА) и в итоге к инсульту. В связи с этим важна возможность точного диагностирования нестабильности бляшки неинвазивными методами. Целью этого исследования стало сопоставление структурно-морфологических изменений атеросклеротических бляшек сонных артерий с данными УЗДГ обследования и с данными цитокинового профиля плазмы.

В работе использовали 35 биопсий сонных артерий, полученных у пациентов в результате операции каротидной эндартерэктомии. Срезы окрашивали гематоксилином-эозином, по Ван-Гизону, орсеином, альциановым синим. Результаты окрашивания оценивали полуколичественно, морфометрические измерения проводили в программе ImageJ. Биопсийный материал был разделен на 2 группы по наличию признаков нестабильности в атеросклеротических бляшках: 1 группа – склонные к разрывам, нестабильные бляшки (n=25), 2 группа – стабильные фиброзные бляшки (n=10). Результаты гистологического исследования сопоставляли с данными УЗДГ, неврологическим статусом пациентов в анамнезе и цитокиновым профилем плазмы (IL-1b, IL-10).

Бляшки 1ой группы относились к VI типу (23 случая) и единичные случаи к Vb и Vc типам. Поражения 2-ой группы подразделялись на IV (2 случая), Va (2 случая), Vb (1 случай), Vc (1 случай) и VI (4 случая) типы. Частота наличия ОНМК и/или ТИА в анамнезе в группах больных с нестабильными и стабильными каротидными атеросклеротическими бляшками достоверно отличалась и составляло 56% и 10% соответственно. По данным УЗДГ сонных артерий в обеих группах чаще встречались гетерогенные бляшки, однако нарушения целостности покрышки обнаруживались чаще в 1-ой группе ( $p<0,05$ ). Статистический анализ цитокинового профиля не выявил достоверно значимых отличий между группами, это возможно означает, что для диагностирования нестабильных бляшек нужно использовать более широкий спектр цитокинов. Гликозаминогликаны (ГАГ) в прослойках фиброзной ткани в 1-ой группе чаще присутствовали в малом количестве, а во 2-ой группе ГАГ было достоверно больше ( $p<0,05$ ). В стабильных бляшках достоверно чаще встречались организованные соединительной тканью более глубоко лежащие некротические ядра. Во 2-ой группе большинство ядер бляшек богаты эластином, а в 1-ой эластина в ядрах было немного. Небольшие отложения колей кальция в медиальном слое были обнаружены только в 1-ой группе ( $p<0,05$ ).

Проведенное гистоморфометрическое исследование показало, что у больных со стабильными бляшками ниже риск развития ОНМК и/или ТИА. Также из полученных данных следует, что для нестабильных бляшек характерна сильная выраженность дегенеративных изменений внеклеточного матрикса, затрагивающих не только интиму, но и медию. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ-ОФИц №08-04-13753.

#### **Анализ стволовых свойств клеток нейробластомы N18**

**в сравнении с нейральными стволовыми клетками**

**Шумская Валерия Сергеевна (Москва, shumskaja.valerya@yandex.ru)**

Одна из теорий онкогенеза связана с тем, что в основе многих раковых опухолей лежат стволовые клетки. Теория раковых стволовых клеток предполагает, что оставшаяся в организме стволовая опухолевая клетка устойчива к традиционным методам лечения и способна вновь запустить патологический процесс. Считается, что для эффективной борьбы с некоторыми формами рака необходимо уничтожить стволовые клетки, составляющие небольшой процент от общего числа клеток опухоли. Это, как правило, наименее зрелые клетки данной ткани, которые могут быть выявлены по маркёрам для стволовых клеток.

В нашей работе мы использовали клетки мышиной нейробластомы N18, которые широко используются для исследования факторов для стимуляции нейральной дифференцировки.

Целью нашей работы было провести иммуногистохимический анализ N18 в норме и при стимуляции дифференцировки и сравнить с культурами нейральных стволовых клеток. Были использованы антитела к маркёрам стволовых клеток и нейральной дифференцировки. Результаты исследования культуры N18 показали, что в ней можно выделить: биполяры, веретеновидные и полиплоидные клетки, незначительная часть которых экспрессирует нестин и  $\beta$ -тубулинIII. Это означает, что изначально в культуре уже присутствуют клетки со стволовым потенциалом (нестин) и с нейрональной дифференцировкой (тубулин). Далее было показано, что помимо нестина некоторые клетки экспрессируют CD133 (маркёр стволовости).

В связи с тем, что стволовые клетки обладают механизмом множественной лекарственной устойчивости, благодаря которому многие повреждающие вещества выталкиваются из ядра

и цитоплазмы, мы использовали окрашивание живых клеток флуоресцентным красителем Hoechst33342. В результате удалось выявить отдельные клетки со стволовыми свойствами на стадии цитокинеза после асимметричного митоза.

Нейральные стволовые клетки в культуре растут в бессывороточной среде, образуя плотные округлые агрегаты – нейросфера. Мы показали, что клетки нейробластомы N18, растущие в аналогичной бессывороточной среде, открепляются от подложки и свободно плавают в суспензии, активно пролиферируя, но, не образуя сфер, характерных для нейральных стволовых клеток. Мы предполагаем, что клетки N18 не обладают свойственной для нейральных стволовых клеток адгезивной способностью и, поэтому, остаются неагрегированными. Это подтверждает данные, что не все линии нейробластомы способны образовывать сферы, даже если часть клеток обладает потенциалом стволовых клеток.

После проделанной работы мы пришли к выводу, что линия нейробластомы N18 не может быть использована для изучения нейрональной дифференцировки, поскольку в ней изначально присутствуют нейробласти. Линия N18 содержит стволовые клетки, которые, вероятно, и лежат в основе данной опухоли. Дальнейшие исследования этих клеток и их взаимодействия с нейральными стволовыми клетками дают большие перспективы, которые могут стать решающими в поисках противораковых терапий.

## ПОДСЕКЦИЯ «ЭКОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ»

### Естественное возобновление на участках пройденных несплошной рубкой в сосняках Восточного Прибайкалья

Аверина Ирина Сергеевна (Красноярск, [Lesshoz@rambler.ru](mailto:Lesshoz@rambler.ru))

Рациональное ведение лесного хозяйства в лесах Восточного Прибайкалья возможно только на основе комплексного изучения лесов, факторов среды, определяющих их рост и развитие, выявления закономерностей лесовосстановительных процессов, смен древесных пород и других исследований. Поэтому изучение и реальная оценка состояния и перспектив естественного возобновления имеет большое научное и производственное значение при планировании и осуществлении лесохозяйственных мероприятий.

Изучение естественного возобновления проводилось под пологом сосновых древостоев и на участках несплошных рубок разных лет давности в одинаковых лесорастительных условиях.

Сосновые насаждения в районе исследований характеризуются смешанными по составу древостоями V класса возраста, средней полнотой 0,7, IV классом бонитета и с запасом стволовой древесины 249 м<sup>3</sup>/га. Под пологом древостоев естественное возобновление представлено чистым по составу подростом сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в количестве 2657 шт./га. Подрост разновозрастный, со средним возрастом 11 лет и высотой 1,1 м, по площади распределен неравномерно. Естественное возобновление на участках пройденных рубкой представлено чистым по составу подростом сосны обыкновенной со средним возрастом 9 лет и высотой 0,8 м, в количестве 3049 шт./га.

Встречаемость подроста сосны на участках, пройденных рубкой, на 11% выше, нежели под пологом леса. Обилие подроста под пологом леса ниже на 10%, чем на участках, пройденных рубкой. Количество подроста сосны на участках пройденных рубкой на 25% выше. Средний текущий прирост в высоту за последние 3 года у подроста средней и крупной высотных групп в 1,3 раза выше, чем у подроста под пологом не тронутых рубкой древостоев.

Исследованиями установлено, что естественное возобновление идет преимущественно сосной обыкновенной. Подрост сосны разновозрастный, здоровой и ослабленной категории состояния, что говорит о хорошей сохранности во время рубки, выживаемости и возобновляемости после нее. Возобновление после несплошных рубок идет успешнее, нежели под пологом древостоев, в основном за счет подроста последующих генераций на минерализованных участках. Автор выражает благодарность научному руководителю с.н.с. лаборатории лесоведения И.Л СОРАН, к.с.-х.н. Иванову В.В.

### Состояние популяций *Epipactis artrorubens* (Hoffm.) Bess. и *Goodyera repens* (L.) R. Br. на территории национального парка «Куршская коса» Ашуркова Любава Дмитриевна (Москва, [aves07@mail.ru](mailto:aves07@mail.ru))

НП «Куршская коса» расположен на северо-западе Калининградской области, в Зеленоградском районе, вплотную примыкая к городу Зеленоградск. Территория НП подвержена интенсивному антропогенному воздействию, особенно в летнее время, поскольку коса является излюбленным местом отдыха населения. В связи с этим остро стоит проблема охраны растительных сообществ и отдельных видов. К особо уязвимым видам растений относятся и представители сем. Орхидные ввиду особенностей их биологии. Нами рассматриваются два вида этого семейства: *Epipactis artrorubens* (Hoffm.) Bess. и *Goodyera repens* (L.) R. Br. *E. artrorubens* на территории НП встречается на морских дюнах, а также в сосняках. Всего мы исследовали 10 ценопопуляций этого вида. Из них лишь 3 ценопопуляции имеют полноценный онтогенетический спектр, в остальных же отсутствуют ювенильные особи, что говорит о затруднениях в воспроизведстве ценопопуляций. Причиной этому может быть как антропогенный фактор – ювенильные особи особо чувствительны к вытаптыванию, а срывание соцветий на букеты препятствует семенному размножению, так и естественные причины – одна из ценопопуляций, расположенная на вершине дюны, находилась в угнетенном состоянии: многие особи были

почти полностью засыпаны песком, соцветия высохли. Однако, несмотря на это, судьба популяции *E. artrorubens* в НП не вызывает опасений, поскольку этот вид распространен практически по всей территории НП, и популяции его многочисленны. *G. repens* была нами обнаружена в двух местообитаниях: елово-сосновом лесу и березово-сосновом с елью. Обе ценопопуляции многочисленны (92 и 80 особей), имеют полноценный онтогенетический спектр, в обеих ценопопуляциях доля генеративных особей очень невелика (3 и 7 особей соответственно), что говорит о преимущественной роли вегетативного размножения над семенными. Состояние этих двух ценопопуляций и популяции вида в целом на территории НП не вызывает опасений, однако требуются дальнейшие исследования, направленные на обнаружение мест произрастания вида и их изучения.

### **Вертикальная структура альпийских сообществ Тебердинского заповедника** **Богатырев Василий Александрович** (*Череповец, Vasilb@inbox.ru*)

Цель работы – изучить вертикальную структуру альпийских сообществ 4-х типов в естественных условиях. Работа выполнена на территории Тебердинского заповедника в альпийском поясе на горе Малая Хатипара. Мы сравнивали высоту растений по видам в разных сообществах и оценивали сопряженность между встречами разных видов в локальных точках. Для этого с помощью модернизированного прибора Леви мы определяли касание надземными частями растений металлических игл и отмечали, на какой высоте произошло касание. Подобные исследования в альпийских сообществах Кавказа ранее не проводились. Исследования проведены в следующих сообществах:

- Альпийская лишайниковая пустоша (АЛП) – полидоминантное низкопродуктивное сообщество (отмечено 43 вида сосудистых растений);
- Пестроовсянцевый луг (ПЛ) – продуктивное сообщество с доминированием плотнодерновинных злаков *Festuca varia* и *Nardus stricta* (отмечено 43 вида);
- Гераниево-копечниковый луг (ГКЛ) – наиболее продуктивное сообщество (доминанты *Geranium gymnocaulon* и *Hedysarum caucasicum*) (всего отмечено 43 вида);
- Альпийский ковер (АК) – низкопродуктивное сообщество с небольшим видовым богатством (отмечено 26 видов).

Анализировали только данные по сосудистым растениям, имеющим больше 10 касаний (1% выборки). Анализируя полученные данные по высоте растений в сообществах, можно сделать следующие выводы:

- На гераниево-копечниковых лугах на фоне остальных растений в верхнем ярусе резко выделяются три доминанты: *Hedysarum caucasicum*, *Pulsatilla aurea* и *Geranium gymnocaulon*, а *Campanula tridentata* образует нижний ярус;
- Альпийские пустоши характеризуются равномерным распределением растений по высоте, четких доминантов и ярусов выделить нельзя;
- На альпийских коврах доминантами верхнего яруса являются *Hyalopoa pontica* и *Carex atrata*, в нижнем ярусе четко выделяется *Minuartia aizooides*;
- На пестроовсянцевых лугах четким доминантом верхнего яруса является *Festuca varia*, субдоминантами *Bromopsis variegata* и *Anthoxanthum odoratum*.

Получив результаты по расположению растений в сообществе по высоте, мы проверили гипотезу о сопряженности отдельных видов друг с другом. Значимые коэффициенты сопряженности отмечены для ряда видов растений ГКЛ и ПЛ. Определив знак сопряженности, мы условно разделили виды на:

- условно тяготеющие друг к другу – на ГКЛ *Matricaria caucasica* и *Scorzonera cana*, *Senecio kolenatianus* и *Pulsatilla aurea*, а на ПЛ *Nardus stricta* и *Veronica gentianoides*, *Nardus stricta* и *Sibbaldia procumbens*, *Phleum alpinum* и *Anthoxanthum odoratum*;
- избегающие совместного произрастания: на ГКЛ *Phleum alpinum* и *Nardus stricta*, *Carex atrata* и *Nardus stricta*.

Выражаю благодарность В.Г. Онипченко, за возможность работать на научном стационаре и чуткое руководство исследованием, помочь в сборе материалов и ценные советы.

## **О стратегии сохранения редких и исчезающих видов водных растений в Амурской области**

**Болотова Яна Владимировна** (Благовещенск, [yabolotova@mail.ru](mailto:yabolotova@mail.ru))

Выявление, изучение и сохранение видового разнообразия флоры является актуальной задачей для любого региона. Вопрос об охране генофонда гидрофильной флоры в отечественной природоохранной тематике был поставлен в конце XX века. Условия жизни гидрофитов определяются многими экологическими факторами, которые в той или иной степени лимитируют их развитие. Изменение одного из условий влечет за собой нарушение всего комплекса экологических факторов и может явиться причиной вымирания вида.

Особенность водной флоры региона заключается в том, что в ее составе много видов, родов и семейств, тесно связанных своим происхождением с Восточной и Юго-Восточной Азией (*Cabombaceae*, *Trapellaceae*, *Nelumbonaceae* и др.). На территории исследования проходит северная граница распространения многих видов, поэтому растения находятся в уязвимом состоянии.

По результатам наших исследований (2006-2009 гг.) для повышения эффективности сохранения представителей водной флоры Амурской области намечены пути сохранения их генофонда. К ним относятся:

1) Проведение широкого и целенаправленного поиска новых местонахождений редких и исчезающих видов. Осуществление контроля над состоянием каждой известной популяции, изучение факторов, влияющих на их динамику. Мониторинг популяций вблизи населенных пунктов, регламентация режима посещения озер населением, полный запрет на сбор отдельных видов водных растений.

2) Регламентация отдельных видов природопользования, оказывающих негативное воздействие на состояние среды обитания сосудистых водных растений (строительство ГЭС, водохранилищ и др.).

3) Обязательное включение ряда видов в Красную книгу Амурской области.

4) Организация системы особо охраняемых природных территорий различного ранга, направленных на охрану редких и исчезающих видов водных растений и их ценозов.

5) Усиление мероприятий по реинтродукции и интродукции видов в подходящие по условиям водоемы или культивирование в искусственных. Организация на территории Амурского филиала Ботанического сада-института ДВО РАН (АФ БСИ ДВО РАН) экспозиционных резерватов с участием водных растений местной флоры.

6) Развитие эколого-просветительской работы об охраняемых объектах водной флоры со школьниками и студентами биологических факультетов ВУЗов на базе АФ БСИ ДВО РАН.

## **Степень деструкции растительных сообществ экосистем пасторального типа**

**Буждыган Оксана Ярославна** (Украина, Черновцы, [oksana\\_buz@rambler.ru](mailto:oksana_buz@rambler.ru))

Процесс синантропизации растительных сообществ несет негативные последствия для дальнейшего развития экосистем из-за уменьшения биологической продуктивности растительного покрова, усиления роли сорных растений, обеднения генофонда аборигенных видов, уничтожения региональной флоры. Из-за значительного количества антропогенно-трансформированных территорий в Украине (80%) изучение синантропной флоры приобретает особое значение.

Целью работы было исследование степени деструкции экосистем пасторального типа различных физико-географических зон Черновицкой области (Западная Украина). Растительные образцы отбирали из элементарных участков площадью 100 м<sup>2</sup> для каждой из 31 исследуемых пасторальных экосистем. Выделяли синантропные виды по В.В. Протопоповой (1973). Анализ степени деструкции растительных сообществ исследуемых пасторальных экосистем по уровню их синантропизации осуществляли по методу А.А. Куземко (2002), при котором показатель степени деструкции растительного сообщества определяли как соотношение суммарного проективного покрытия синантропных видов в фитоценозе к общему проективному покрытию всех видов растений в сообществе умноженное на 100. Критическим уровнем степени деструкции пасторального фитоценоза считали тот, который составлял менее 75% от среднего значения данного показателя, соответственно для каждой из физико-географических зон.

Всего в пределах Черновицкой области в экосистемах пасторального типа обнаружено 179 видов растений, 80 из которых являются синантропными. В равнинной зоне Черновицкой области степень деструкции растительных сообществ исследуемых пастбищ колеблется в пределах 48-96, в предгорной зоне – в пределах 45-72, а в горной – в пределах 25-65. Усредненные значения степени деструкции фитоценоза для пастбищ равнинной зоны составляет  $73\pm1,2$ , для пастбищ предгорной зоны –  $55\pm0,8$ , и для пастбищ горной зоны –  $47\pm1,1$ . В результате исследований, как в равнинной, так и в предгорной зонах Черновицкой области выявлено 83% пасторальных экосистем с критическим уровнем степени деструкции. В горной зоне данный показатель составляет 71%.

Проведенное исследование показало, что 45% растений в экосистемах пасторального типа Черновицкой области (Западная Украина) являются синантропными, а степень деструкции растительных сообществ исследуемых экосистем является критически высоким, что свидетельствует о необходимости экологически правильного менеджмента данных пастбищ.

#### **Фитоценотическая роль *Angelica sylvestris* L. в луговых фитоценозах**

**Варганова И.В., Гузова Т.А. (Санкт-Петербург, varganova\_irina@mail.ru)**

Объектом исследования данной работы был выбран широко распространенный на северо-западе России крупнотравный вид дудник лесной *Angelica sylvestris*, семейство Зонтичные. Целью данной работы стало выявление фитоценотической роли вида *Angelica sylvestris* в луговых фитоценозах.

Нами были исследованы два луговых фитоценоза имеющие разную степень антропогенной нагрузки. Один из исследованных фитоценозов располагается в окрестностях поселка Дибуны Курортного района города Санкт-Петербурга, подвергается периодическим нарушениям из-за пожаров и испытывает высокую антропогенную нагрузку. Второй исследованный фитоценоз приурочен к территории Нижне-Свирского заповедника Лодейнопольского района Ленинградской области, напротив, не испытывает антропогенного влияния. Специальный заповедный режим был установлен здесь в 1980 году.

Для оценки роли *A. sylvestris* нами закладывались учетные площадки размером 0,1 м.кв. от центра растений в трех направлениях. На пробных площадках учитывалось общее проективное покрытие, проективное покрытие травяно-кустарничкового и мохово-лишайникового ярусов, проективное покрытие *A. sylvestris* и других видов, проективное покрытие опада, ветоши, высота травостоя, толщина подстилки. Всего была описана 351 учетная площадка. Определение особенностей светового режима под пологом дудника и зоны, не находящейся под влиянием *A. sylvestris*, проводилось через определение сквозистости травяного полога.

Было показано, что в изученных сообществах *A. sylvestris* проявляет эдификаторные свойства, в зоне воздействия дудника снижается освещенность и изменяются проективные покрытия ряда видов. Виды, имеющие разные типы жизненных стратегий, отличаются реакцией на увеличение обилия дудника: виолентные виды, такие как *Filipendula ulmaria*, *Deschampsia caespitosa*, *Alopecurus pratensis*, *Anthriscus sylvestris*, снижают свое проективное покрытие; виды, чаще проявляющие патиентность (*Ranunculus repens*, *Galium uliginosum*, *Geranium palustre*, *Molinia coerulea*, *Lysimachia vulgaris*), не изменяют проективного покрытия. В нарушенных сообществах с высокой антропогенной нагрузкой в состав растительных группировок с дудником включаются рудеральные виды: *Rubus idaeus*, *Elytrigia repens*, *Artemisia vulgaris*. На эти виды показано отрицательное влияние *A. sylvestris*.

#### **Фитоценотический анализ растительных сообществ пригорода г.Гомеля**

**Грищенко Мария Викторовна (Белоруссия, Гомель, m\_arii@mail.ru)**

Значительные площади пойменных лугов пригорода г. Гомеля связаны с поймой р. Сож. Они используются как пастбища и сенокосы и испытывают высокий уровень рекреационной нагрузки. Таким образом, оценка состояния луговой растительности является весьма актуальной не только в теоретическом, но и практическом отношении.

Основной целью исследований является выявление ценотического разнообразия луговой растительности и её классифицирование.

Материалы для работы собирались в 2006–2008 гг. Объектом исследования выступает растительность пойменных лугов реки Сож и Ипуть.

Для изучения растительности применялся метод пробных площадей (10×10 м). Классификация растительности луговых экосистем выполнена в соответствии с принципами и методами эколого-флористической классификации Браун-Бланке.

За весь период исследования пойменных экосистем было описано 135 видов растений, относящихся к 98 родам и к 35 семействам. Пойменные луга обладают сравнительно высоким видовым составом, с преобладанием семейств сложноцветных, злаковых и гвоздичных. Семейство сложноцветных включает наибольшее количество видов и имеет широкую экологическую амплитуду. Все большее значение имеет семейство злаковых, которое вытесняет семейство бобовых в связи с увеличением хозяйственной деятельности человека на этой территории.

Вся изученная растительность была классифицирована. Было выделено 4 класса, 5 порядков, 7 союзов и 21 ассоциация. Самым многочисленным классом явился класс Molinio-Arrhenatheretea R.Tx. 1937 ем. R.Tx. 1970. Он характеризует луговую растительность, формирующуюся на месте широколиственных лесов на достаточно богатых незасоленных почвах. Этот класс включает влажные луга на минеральных почвах (порядок Molinietalia W.Koch 1926) и остепненные луга (порядок Galietalia veri Mirkin et Naumova 1986). Так же был выделен еще один класс, характеризующий луговую растительность. Это класс Sedo-Sclerantheticae Br.-Bl. 1955. Он включает в себя травяные сообщества на слаборазвитых песчаных почвах. Так как изучаемые луга испытывают антропогенное влияние, то там были встречены синантропные растения. Они представлены классами Bidentetea tripartitae R.Tx., Lohm. et Prsg. in R.Tx. 1950 и Artemisieta vulgaris Lohm., Prsg. et Tx. in Tx. 1950. Класс Bidentetea tripartitae R.Tx., Lohm. et Prsg. in R.Tx. 1950 характеризует синантропные сообщества с преобладанием однолетних видов нарушенных переувлажненных местообитаний. А класс Artemisieta vulgaris Lohm., Prsg. et Tx. in Tx. 1950 включает рудеральные сообщества высокорослых двулетних и многолетних видов.

В результате самым типичным пойменным лугом оказался луг в пойме реки Сож. Для него было характерна растительность класса Molinio-Arrhenatheretea R.Tx. 1937 ем. R.Tx. 1970. А луг в пойме реки Ипуть подвержен большей антропогенной нагрузке, в связи с чем появляется большое количество синантропных видов растений. Таким образом, с увеличением нагрузки все меньшее число естественных луговых видов способно произрастать на данных лугах.

### Преобразование растительности суходольных лугов под влиянием ольхи серой (*Alnus incana* (L.) Moench)

Гузова Т.А., Варганова И.В. (Санкт-Петербург, [Tanguz4@rambler.ru](mailto:Tanguz4@rambler.ru))

Данные исследования проводились в июле 2008-2009 гг. на суходольных лугах в окрестностях урочища Лахта (Нижне-Свирский государственный заповедник, Ленинградская область). Эти луговые сообщества характеризуются преобладанием тимофеевки луговой (*Phleum pratensis* L.), мятылика лугового (*Poa pratensis* L.) и пырея (*Elytrigia repens* (L.) Nevskii). Заметную роль в покрове также играют крупнотравные виды – дудник (*Angelica sylvestris* L.), купырь (*Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm.) и таволга (*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim), определяющие в целом облик фитоценоза. В связи с введением заповедного режима более 20 лет назад, сенокошение и выпас на лугах был прекращен, и теперь они активно застают бересой, осиной, ольхой серой, ивой. Такие процессы формирования древесных сообществ сопровождаются изменением биотопических условий, при этом преобразуются режимы увлажнения, освещения, почвенного плодородия, что приводит к кардинальным изменениям – смене типов растительности. Цель данной работы – изучение роли ольхи серой (*Alnus incana*) в изменении растительности ранее косимых суходольных лугов. В результате застания луга ольхой серой изменяются условия биотопа: с увеличением возраста, сомкнутости и плотности древостоя существенно снижается освещенность (до 1% под пологом древостоя, относительно 100% на лугу); снижается температура и увеличивается влажность на всех уровнях (воздух, над подстилкой),

в подстилке, в почве); возрастает мощность подстилки (под пологом ольхи она в среднем в 2,5 раза больше, чем на лугу), происходит накопление листового опада. Вследствие изменения биотопических условий наблюдается подавление развития травяной растительности. По данным корреляционного и дисперсионного анализов общее проективное покрытие снижается ( $r=-0,82$ ,  $\eta^2=0,82$ ). Особенно негативно влияет ольха на гелиофитные виды луговых фитоценозов. Сциофитным видам, произрастающим в сумрачных темнохвойных лесах, ольха благоприятствует. В целом, для 70% видов, произрастающих на лугу, обнаружено достоверное отрицательное влияние ольхи, 10% видов характерных для лесов демонстрируют положительную связь с ольхой. Зеленые мхи и виды лугового крупнотравья демонстрируют максимальное обилие на границе луга и ольховой синузии, за счет снижения обилия злаков, уменьшается плотность луговой дернины.

На основе проведенных исследований мы делаем вывод, что дальнейшее беспрепятственное зарастание луговых фитоценозов мелколиственными древесными породами, в частности ольхой серой, может привести к исчезновению луговой растительности на территории Нижне-Свирского государственного заповедника.

**Микромозаичная организация растительного покрова  
темнохвойных высокотравных лесов Печоро-Ильчского заповедника**  
**Запрудина Мария Вадимовна (Москва, zaprudinam@mail.ru)**

В течение длительного времени в лесных экосистемах в результате жизни и смерти деревьев формируется неоднородный микрорельеф, элементы которого (микросайты) включают: участки под кронами и пристволовые зоны деревьев разных видов и разных этапов развития, участки между кронами деревьев, стволы упавших деревьев (валежины), пни-сломы, ямы и бугры ветровально-почвенных комплексов (ВПК) разных стадий преобразования.

Изучение микромозаичной структуры проведено в 2007-2009 гг. в верховых р. Печоры в пихто-ельниках с кедром высокотравных. Для характеристики растительных микрогруппировок описано около 300 площадок  $0,5\text{м} \times 0,5\text{м}$ . На пробной площади  $50\text{м} \times 50\text{м}$  вычислена доля микросайтов всех типов, для каждого из которых не менее чем в трехкратной повторности определена абсолютно сухая фитомасса ассимилирующих и неассимилирующих органов сосудистых растений и мхов ( $g/0,25\text{ кв.м.}$ ).

В исследуемых сообществах отмечено 69 видов сосудистых растений и около 50 видов мхов. В основном травяно-кустарничковый покров сложен boreальными видами растений, среди которых по числу видов преобладают летнезеленые травы. Их доля на микросайтах разных типов составляет от 52% до 80%. Несмотря на то, что изучаемые сообщества относятся к boreальным, значительную роль в эколого-ценотической структуре травяно-кустарничкового покрова играют виды неморальной группы, маркирующие более южные, гемибoreальные леса (до 19%).

Большинство видов растений может произрасти на микросайтах разных типов. При этом отличия между растительными микрогруппировками достигаются, в основном, за счет разной встречаемости видов. Наибольшее разнообразие видов растений отмечено на межкроновых участках и в западинах ветровально-почвенных комплексов, наименьшее – в пристволовых зонах деревьев. В ходе микросукцессий на элементах ВПК формируются сходные с межкроновыми участками растительные микрогруппировки.

Наибольшую площадь в сообществе занимают межкроновые (45%) и подкроновые области (49%). На этих участках создается соответственно 60% и 36% фитомассы травяно-кустарничкового и мохового ярусов сообщества. Максимальные значения фитомассы напочвенного покрова характерны для межкроновых участков (до 985  $g/\text{кв.м.}$ ). Основными продуктентами на этих участках являются сосудистые растения, накапливающие значительную массу органического вещества в подземных органах. Более половины фитомассы приходится на долю видов, составляющих группу высокотравья. Остальные микросайты занимают 6% площади сообщества. Их вклад в фитомассу сообщества невелик.

Наиболее полный набор микросайтов в высокотравных лесах определяет максимальную мозаичность сообщества. Преобладание наиболее продуктивных межкроновых участков и

высокие значения фитомассы ежегодно отмирающих однолетних ассилирующих частей растений (до 96%) свидетельствует о высоком уровне функциональной организации сообществ этого типа.

**Использование травосмесей на основе вермикулита  
для рекультивации загрязненных территорий**  
**Кременецкая Марина Вячеславовна (Петрозаводск, ol-ma@list.ru)**

Высокая чувствительность северных экосистем к антропогенным нагрузкам приводит к необходимости разработки технологии формирования высокостойчивого растительного покрова на урбанизированных территориях. В 2004-2009 гг. были разработаны два инновационных гидропонных способа ускоренного создания высококачественных газонов – культурфитоценозов: с использованием готового к укладке коврового травяно-дернового покрытия и прямой посев семян в почвозаменитель, нанесенный на поверхность озеленяемого участка. Эти методы показали высокую эффективность при создании растительного покрова на техногенно нарушенных территориях с участием нефтепродуктов в Карелии и Мурманской области. В обоих способах в качестве субстрата-почвозаменителя используется природный минерал вермикулит. Готовый высококачественный, устойчивый к неблагоприятным факторам газон был получен в короткие сроки (7-21 день). Состав травосмесей определяется устойчивостью видов к биогенным и климатическим факторам. В литературе широко обсуждается защитная роль флавоноидов.

Цель работы – определение содержания суммы флавоноидов как защитных пигментов при выращивании растений в экстремальных местообитаниях. Исследования проводились в камеральных условиях, где было выделено три участка: контрольный (песок), песчано-мазутный и песчано-мазутный с 1 см вермикулитовой подложкой. Для работы выбраны злаковые растения (райграс пастищный, овсяница красная, тимофеевка луговая, кострец безостый). В работе был использован спектрофотометрический метод количественного измерения флавоноидов по хлориду алюминия. В работе показано, что наличие мазута в субстрате отрицательно сказывается на синтезе флавоноидов в надземной части исследуемых видов. Наиболее устойчивым к неблагоприятному прямому воздействию мазута оказалась тимофеевка луговая – содержание флавоноидов уменьшилось на 31%, в овсянице красной на 43%, а в райграсе пастищном на 59% по сравнению с контролем. Использование вермикулитовой подложки для формирования травостоя привело к увеличению синтеза флавоноидов у костреца безостого и тимофеевки луговой (соответственно в 2,8 и 5,5 раз больше контроля). Положительный ответ отмечен и на райграсе пастищном и овсянице красной.

Таким образом, использование вермикулита в качестве подложки для ускоренного формирования высокостойчивого культурфитоценоза из костреца безостого, тимофеевки луговой, райграса пастищного и овсяницы красной инновационным методом прямого посева способствует инициации синтеза природных флавоноидов в их надземной части, повышая тем самым устойчивость трав к отрицательному воздействию углеводородов на нефтезагрязненных территориях. Наиболее устойчивыми видами в условиях загрязнения мазутом являются тимофеевка луговая и кострец безостый. *Выражаю благодарность моим научным руководителям: к.б.н. Ивановой Л.А. и д.б.н. Марковской Е.Ф.*

**Накопление Cu, Zn, Cd в листьях берёзы повислой (*Betula pendula* Roth.)  
в условиях отвалов Кумертауского буруогольного разреза Республики Башкортостан**  
**Радостева Эльза Рауфовна (Уфа, elza\_85.85@mail.ru)**

Исследования проводились на отвалах Кумертауского буруогольного разреза (КБР) Республики Башкортостан. Экспериментально установлена сезонная динамика содержания Cu, Zn и Cd в листьях берёзы повислой (*Betula pendula* Roth.) на загрязненных и фоновых участках (15 км от отвала). Содержание Cu (мг/кг) в ассимиляционных органах берёзы возрастает в течение вегетационного сезона (июнь, июль, август) в условиях отвала и контроля соответственно: 2,03 (2,60) > 3,72 (2,86) > 5,63 (3,02). Дефицит, оптимум и избыток Cu в растениях составляет соответственно 2–5, 6–30 и 31–100 мг/кг сухого вещества.

В условиях техногенеза и фона в листьях исследуемой породы наблюдается дефицит микроэлемента в течение вегетации. В течение сезонной динамики содержание Zn в листьях непрерывно уменьшается. Такой ход сезонной динамики металла в листьях объясняется тем, что весной происходит приток элемента к растущим органам, в это время их содержание в листьях увеличивается. Последующее снижение концентрации происходит в результате эффекта «разбавления» клеточного вещества за счет увеличения биомассы листьев, а затем при транспорте цинка в другие органы растения. Растения способны легко извлекать Cd из воздушных источников, особенно его концентрация высока в загрязненных районах. Содержание металла в ассимиляционных органах изучаемой породы выше фонового, равного 0,05–0,085 мг/кг для растений. В условиях отвалов концентрация Cd в ионе и в июле увеличивается незначительно, а значительное увеличение наблюдается к концу вегетации в стареющих листьях. В условиях контроля количество элемента колеблется в пределах 0,11–0,19 мг/кг. По-видимому, значительное содержание металла в листьях береск на отвалах и в условиях контроля вызывает непосредственное осаждение из атмосферы золы после сжигания углей в топках ТЭЦ, которая является основным источником атмосферного загрязнения г. Кумертау.

Таким образом, установлено, что содержание Cu и Cd в листьях береск в условиях промышленных отвалов КБР выше, чем в условиях контроля. Cu в ассимиляционных органах береск содержится ниже оптимальных уровней, а Cd накапливается в листьях выше фоновых значений, как в условиях техногенеза, так и условного контроля. В течение вегетации в листьях наблюдается интенсивное снижение содержания Zn в условиях промышленных отвалов и нарастание содержания металла к концу вегетации на фоновых территориях. Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (№ 08-04-97017) и гранта по Программе фундаментальных исследований Президиума РАН «Биологическое разнообразие».

**Распространение и сырьевая продуктивность *Thalictrum simplex* L.  
в растительных сообществах горно-лесной зоны Южного Урала**  
Самойлова Лилия Юлаевна (Уфа, [lilasam@list.ru](mailto:lilasam@list.ru))

Вид *Thalictrum simplex* L. – один из перспективных источников изохинолиновых алкалоидов, обладающих болеутоляющей, противовоспалительной, гипотензивной и противопухолевой активностью, на основе которых уже получены или находятся в стадии разработки высокоеффективные медицинские препараты. Для разработки стратегии неистощительного ресурсного использования этого вида необходим анализ его распространения и продуктивности в растительных сообществах регионов, где будет проводиться ресурсное использование. Цель работы – анализ распространения, сырьевой продуктивности и выявление перспективных местообитаний для заготовок *T. simplex* в горно-лесной зоне Южного Урала. Для анализа распространения изучаемого вида использовалась база данных по флористическому составу растительных сообществ, описанных в системе эколого-флористической классификации по методу Браун-Бланке. В горно-лесной зоне Южного Урала *T. simplex* встречается в составе травяного яруса растительных сообществ 43 ассоциаций, относящихся к 13 союзам 9 порядкам 5 классам луговой, степной и лесной растительности. Вид широко распространен в луговых сообществах полин (союз *Polygonion krascheninnikovii*), в оステпенных разнотравно-злаковых (союз *Trifolion montanii*) и сырьих (союз *Calthion*) лугах. Он часто встречается в разреженных сухих дубо-липовых (союз *Lathyro-Quercion roboris*) и мезофитных светлых сосново-березовых (союз *Trollio europaea-Pinion sylvestris*) лесах. Василистник простой встречается, также, в некоторых степных сообществах, которые не имеют в горно-лесной зоне большого распространения. В степных сообществах он обычно представлен формой *T. simplex* var. *galioides*. Большая продуктивность надземной части растений *T. simplex* выявлена в лесных разнотравных лугах союза *Polygonion krascheninnikovii*. Так, в сообществах ассоциации *Festuco grypicolae-Polygonetum krascheninnikovii* продуктивность надземной части этого вида составляет 2,4–6,1 ц/га в сухом весе, в сообществах ассоциации *Polygonetum krascheninnikovii* – 2,6–5,3 ц/га, а в сообществах

ассоциации *Artemisio armeniacae-Festucetum pratensis* – 2,0-4,5 ц/га. Большая продуктивность у этого вида (2,2-7,6 ц/га) выявлена также в оstepненных разнотравно-злаковых лугах ассоциации *Gladiolo imbricati-Alopecuretum pratensis* союза *Trifolion montani*.

Таким образом, наиболее перспективными для заготовки данного вида в горно-лесной зоне Южного Урала являются сообщества лесных полян и оstepненных лугов. Окончательное заключение о перспективности заготовки *T. simplex* в конкретных типах растительных сообществ можно будет сделать после проведения анализов содержания алкалоидов в образцах растений этого вида, собранных с учетом эколого-ценотических различий местообитаний. Автор выражает благодарность доценту, д.б.н. Федорову Н.И. за помощь в подготовке тезисов.

**Динамика растительного покрова и экологические условия  
времени формирования пойменного болота в горном массиве Ергаки  
Тареких Александра Юрьевна (Красноярск, alexandra\_tau\_u@mail.ru)**

Болота представляют собой систему взаимосвязанных биогеоценозов, формирующихся в условиях обильного увлажнения. Флора болот уникальна, неоднородна по происхождению и отличается большим разнообразием жизненных форм и экогенетических групп. Кроме того, характерным отличием является болотный тип почвообразования – торфообразование, в результате которого образуется торф различного ботанического состава.

Изучение торфяных отложений с помощью ботанического анализа, заключающегося в установлении видовой принадлежности остатков слагающих торф, позволяет проследить состав и временные смены растительных сообществ, произраставших на болоте. А знание экологических особенностей каждого вида дает возможность восстановить характер и динамику условий времени торфонакопления.

Объект исследования – торфяные отложения поймы р. Малая Буйба (горный массив «Ергаки», Западный Саян) общей мощностью 1,0 м. Современный растительный покров исследуемого болота представлен разнотравно-осоково-сфагновым фитоценозом.

Метод исследования – ботанический анализ торфа, на основе результатов которого с использованием экологической шкалы дана оценка условий увлажнения, отображающая динамику увлажнения болотного массива за время его формирования.

По результатам ботанического анализа отложений установлено, что на начальных стадиях формирования болота в составе фитоценоза доминирующее положение принадлежало тростнику, количество которого постепенно сокращалось. Происходило увеличение доли осок с доминированием *Carex altaica* (Gorodk.) V.Krecz., в меньшем количестве встречались *C. cespitosa* L., Stokes., *C. vesicaria*, L., *C. globularis*, L., *C. lasiocarpa*, Ehrh. Затем, при болотном увлажнении, соответствующем 94-96 ступени шкалы, была развита осоково-моховая ассоциация, что нашло отражение в строении торфяной толщи (в интервале глубин 0,48-0,66 м наблюдается чередование тонких прослоев осоково-мохового, осоково-гипнового, мохового, осокового торфа). С глубины 0,48 м и выше в составе волокна торфа сокращается доля мхов, доминирующее положение занимают осоки, а именно, осока алтайская, количество остатков которой в интервале глубин 0,48-0,08 м достигает 85-95%. Начиная с глубины 0,12 м отмечены остатки сфагновых мхов, осоки двудомной, коры березы карликовой, ивы. С 0,08 м и до поверхности фиксируется сокращение осок, доминирующее положение занимают мезотрофные сфагновые мхи.

Выводы: 1) за время развития болота наблюдалась следующая смена растительных сообществ: тростниково → тростниково-осоковое → осоковое → осоково-моховое → осоковое → осоково-сфагновое → мезотрофное сфагновое сообщество; 2) на начальных этапах формирования болота, растения произрастили при более богатом водно-минеральном питании (соответствует 95-96 ступени увлажнения), с глубины 0,5 м происходило уменьшение обводненности (в среднем до 92-93) и сокращение доли грунтового питания.

**Особенности строения поглощающих корней хвойных в условиях полиметаллического типа загрязнения окружающей среды (Стерлитамакский промышленный центр, Россия)**

**Фаизова Лена Ихсановна** (Елец, faizka@mail.ru)

Исследования проводились в Стерлитамакском промышленном центре, который относится к зоне с высоким уровнем загрязнения воздуха, тип промышленного загрязнения окружающей среды – преобладающий полиметаллический.

Целью работы было изучение реакции поглощающих корней сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) и лиственницы Сукачева (*Larix sukaczewii* Dyl.) на техногенное загрязнение природных экосистем.

Анализ строения поглощающих корней сосны в условиях Стерлитамакского промышленного центра показал, что в условиях загрязнения наблюдается увеличение общего диаметра микоризного окончания по сравнению с контролем на 30%. Отмечены различия значений среднего диаметра центрального цилиндра в условиях полиметаллического загрязнения и относительного контроля (40%).

Рассмотрев результат соотношения среднего значения диаметра центрального цилиндра к среднему диаметру корневого окончания, в условиях полиметаллического загрязнения и относительного контроля, получили различные значения в зависимости от условий среды. В условиях загрязнения отмечается увеличение значения этого соотношения на 35%.

Изучение особенностей строения поглощающих корней лиственницы в условиях Стерлитамакского промышленного центра показало, что средний диаметр всасывающих окончаний и средний диаметр центрального цилиндра в условиях полиметаллического загрязнения изменяются в сторону увеличения: на 35% различается значение среднего общего диаметра корня, и на 40% – центрального цилиндра. Анализируя значения отношения среднего диаметра центрального цилиндра к среднему диаметру общего корневого окончания в условиях загрязнения и относительного контроля можно сказать, что не наблюдается больших различий этих показателей в пробах, отобранных из разных условий (5%). Доля микоризованных корней в условиях полиметаллического загрязнения сосны составляет 80%, а в контроле – 60%. В условиях полиметаллического загрязнения Стерлитамакского промышленного центра повышается доля аномальных корней по сравнению с контролем у изученного вида. Наблюдается увеличение общего диаметра всасывающих корней и диаметра центрального цилиндра в условиях техногенеза. Данные изменения рассматриваются как адаптивные реакции, направленные на обеспечение устойчивого роста и развития данных видов в условиях промышленного загрязнения.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (№ 08-04-97017) и гранта по Программе фундаментальных исследований Президиума РАН «Биологическое разнообразие».

**Видовой состав и продуктивность растительных сообществ на засоленных почвах в Республике Калмыкии**

**Чапанов Санал Александрович** (Элиста, sanaki\_1202@mail.ru)

В течение 2008-2009 гг. изучены видовой состав и продуктивность растительных сообществ на засоленных почвах. Петросимониевые (*Petrosimonia brachiata*) сообщества на луговых солонцах занимают пространства засоленных низин. Список цветковых растений включает 19 видов. Наиболее представительными из 9 семейств являются *Chenopodiaceae* (7 видов), *Poaceae* (6 видов), *Asteraceae* и *Brassicaceae* (по 3 вида). Общее проективное покрытие травостоя (ОПП) – 50-60%. Участие в проективном покрытии травостоя других, сопутствующих доминанту, видов незначительно. В сообществах отмечены единичные экземпляры *Leymus ramosus*, *Elytrigia repens*, *Eremopyrum triticeum*, *E. orientale*, *Poa bulbosa*, *Anabasis aphylla*, *Limonium gmelinii*, *Artemisia pauciflora*, *A. austriaca*, *A. santonica*. Средняя продуктивность петросимониевых сообществ в фазу цветения – плодоношения *Petrosimonia brachiata* составила за годы наблюдений  $7,6 \pm 0,5$  ц/га воздушно-сухой массы.

Сарсазановые (*Halocnemum strobilaceum*) сообщества на солончаках приурочены к низинам и окраинам соленых озер. Увлажнение за счет натечных и грунтовых вод. Список цветковых растений включает 18 видов, относящихся к 7 семействам, наиболее

представительными из которых являются Chenopodiaceae (7 видов) и Poaceae (5 видов). ОПП травостоя – 40-45%. Участие в проективном покрытии травостоя других видов семейства Chenopodiaceae достигает 5-8%, они представлены однолетними видами: *Salsola australis*, *Atriplex tatarica*, *Bassia sedoides*, *Ceratocarpus arenarius*, *Suaeda prostrata*. Злаки представлены *Puccinellia distans*, *Eremopyrum triticeum*, *E. orientale*, *Anisantha tectorum*, *Eragrostis minor*. Из других семейств в сообществах отмечены единичные экземпляры *Lepidium perfoliatum*, *Lappula squarrosa*, *Artemisia santonica*. Средняя продуктивность сарсазановых сообществ составила за годы наблюдений  $14,2\pm0,8$  ц/га воздушно-сухой массы.

Биоргуновые (*Anabasis salsa*) на солончаках распространены преимущественно в восточной части республики. Список цветковых растений включает 17 видов, относящихся к пяти семействам, среди последних наиболее представительными являются Chenopodiaceae (8 видов), Poaceae (4 вида). ОПП травостоя 35-40%. Сопутствующие доминанту виды сем. Chenopodiaceae представлены одним многолетним видом *Anabasis aphylla* и однолетними: *Petrosimonia brachiata*, *Bassia sedoides*, *Suaeda prostrata*, *Ceratocarpus arenarius*. Весной активно развиваются эфемеры *Lepidium perfoliatum*, *L. ruderale*, *Ceratocephala testiculata*, *Eremopyrum triticeum*, *E. orientale*, *Alyssum turkestanicum*. Средняя продуктивность биоргуновых сообществ составила за годы наблюдений  $6,2\pm0,3$  ц/га воздушно-сухой массы.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Подсекция «Антропология»	3
Подсекция «Биофизика, биоинженерия и нанобиотехнологии»	15
Подсекция «Биохимия»	41
Подсекция «Ботаника (высшие растения)»	70
Подсекция «Генетика»	80
Подсекция «Гидробиология и общая экология»	95
Подсекция «Зоология беспозвоночных»	116
Подсекция «Зоология позвоночных»	132
Подсекция «Инновации в биологии»	145
Подсекция «Микология и альгология»	150
Подсекция «Микробиология»	160
Подсекция «Молекулярная биология»	195
Подсекция «Нейрофизиология и физиология ВНД»	214
Подсекция «Физиология растений»	246
Подсекция «Физиология человека и животных»	266
Подсекция «Цитология»	295
Подсекция «Экология растений»	311