

**Материалы
Международной конференции**

**Биология –
наука XXI века**

24 мая 2012 г.,
г. Москва
Российский экономический университет
им. Г.В. Плеханова



МОСКВА – 2012

УДК 57
ББК 28
Б63

Организаторы конференции:
Российский экономический университет им. Г.В. Плеханова
Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова

При поддержке:
Министерства образования и науки Российской Федерации
Комитета по науке и наукоемким технологиям Государственной Думы РФ

Биология – наука XXI века: Материалы Международной конференции. Москва, 24 мая
Б63 2012 г. / Ред. Р.Г. Василев. – М.: МАКС Пресс, 2012. – 1125 с.
ISBN 978-5-317-04234-9

Биология по праву считается одной из приоритетных наук наступившего столетия. Она представляет собой интегрирующую дисциплину, на которую проецируются достижения других областей знания, особенно в сфере высоких технологий. Благодаря этому открылась возможность создания принципиально новых перспективных точек роста и отраслей: персонализированная медицина, биофармацевтика, современная агробиотехнология, биоэнергетика и т.д.

Проведение конференции по данной тематике в стенах старейшего экономического вуза страны – в Российском экономическом университете им. Г.В. Плеханова – является знаковым событием. Именно биология и ее беспрецедентные научно-практические достижения на рубеже XX–XXI веков стали определяющими в научно-техническом прогрессе и экономическом развитии, причем осознание интегрирующей роли биологии как действительной базы экономического роста происходит сегодня не только в развитых странах, но и в молодых, быстро растущих государствах, сделавших ставку на инновационное развитие. Российский экономический университет им. Г.В. Плеханова вместе с лидерами биологии и биотехнологии предпринимает целенаправленные действия по организационному оформлению и поддержке биоэкономики и в нашей стране.

В данном сборнике содержатся материалы Международной конференции "Биология – наука XXI века", которая прошла 24 мая 2012 г. в Российском экономическом университете им. Г.В. Плеханова. Тематика сборника направлена на решение общих и частных вопросов биологии и биотехнологии.

Среди авторов – как известные специалисты, так и начинающие исследователи, молодые ученые. Международный уровень издания обеспечен участниками из Великобритании, США, Германии, Японии, Финляндии, Австрии, Чехии, Сербии, Вьетнама, стран СНГ и др.

Книга предназначена для специалистов, работающих в сфере биологии и смежных отраслях.

УДК 57
ББК 28

ISBN 978-5-317-04234-9

© ИАЦ, 2012

ПРЕДИСЛОВИЕ

В настоящем сборнике представлены материалы Международной конференции «Биология – наука XXI века» (Москва, 24 мая 2012 г.).

В книге собраны статьи по разным направлениям биологии: от фундаментальных исследований до прикладных работ. Видное место отводится проблемам биотехнологии как перспективной отрасли практического применения достижений современной биологии. Важно отметить, что значительная часть работ, публикуемых в сборнике, принадлежит молодым специалистам.

Статьи напечатаны в алфавитном порядке по первому автору. В отношении тематики они представляют практически полный спектр биологической науки с преобладанием ее молекулярно-биологических аспектов. При этом необходимо подчеркнуть, что научно-методический уровень публикаций довольно высок – как представленных академическими институтами, так и вузами из разных регионов страны.

В блоке работ по теоретической биологии имеется довольно значительное число исследований, решающих проблемы фундаментальной биологии или носящих методический характер.

Подавляющее число публикаций посвящено прикладным вопросам биологии применительно к медицине, сельскому хозяйству, химической и пищевой промышленности, энергетике, экологии и т.д., то есть биотехнологической отрасли. Здесь на первый план выступают работы по биомедицине и биофармацевтике, производству и переработке биоресурсов, созданию новых технологий для биоиндустрии и биоэнергетики, использованию геной инженерии в агробиотехнологии и лесном секторе, биоремедиации, утилизации органических отходов и решению других актуальных вопросов.

Вся указанная тематика работ, направленных на решение общих и частных вопросов биологии и биотехнологии, укладывается в русло стратегии, ориентированной на приоритетное развитие биоэкономики как интегральной основы использования высоких технологий для ускоренного социально-экономического роста.

В целом можно заключить, что выходящая в свет книга будет полезной для специалистов, работающих в сфере биологии и смежных специальностей.

Р.Г. ВАСИЛОВ, д.б.н., профессор,

директор НИИ биоэкономики РЭУ им. Г.В. Плеханова

АБДУЛЛАЕВ С.А.¹, ОСЛИНА Д.С.², СТРЕЛКОВА И.Ю.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, Пущино, Россия

²Федеральное Государственное унитарное предприятие Южно-Уральский институт биофизики Федерального Медико-Биологического Агентства РФ, Озерск, Россия

АНАЛИЗ МИТОНДРИАЛЬНОЙ ДНК В ПЛАЗМЕ КРОВИ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ НЕИНВАЗИВНЫЙ БИОМАРКЕР ОЦЕНКИ ЛУЧЕВОЙ РЕАКЦИИ ОРГАНИЗМА

Исследования по созданию чувствительных, быстрых и неинвазивных молекулярно-биологических маркеров ретроспективной оценки реакции организма на воздействие ионизирующих излучений (ИИ) остаются чрезвычайно актуальными. В настоящее время, несмотря на имеющиеся серьезные достижения по обеспечению радиационной безопасности, сохраняется потенциальная возможность облучения населения при случайных радиационных инцидентах или преднамеренной враждебной (в результате террористического акта) инициации таких ситуаций. Разработка чувствительных биомаркеров (или тест-систем) для персонализированной оценки лучевой реакции организма населения при чрезвычайных радиационных инцидентах является важнейшей задачей. Такие биомаркеры могут служить также инструментом для мониторинга режима радиотерапии опухолей, для проведения профилактических мер с профессионалами (включая космонавтов), занятых в условиях повышенного радиационного фона.

В данной работе исследовалось изменение содержания мутантных копий внеклеточной митохондриальной ДНК (вк-мтДНК) и отношения общей вк-мтДНК к внеклеточной ядерной ДНК (вк-ядДНК) в плазме мышей, после их облучения рентгеновскими лучами (1-5 Гр). Мутации мтДНК определяли по расщеплению CEL-I нуклеазой гетеродуплексов, получаемых путем гибридизации ПЦР-ампликонов участков мтДНК облученных и контрольных мышей. Изменение отношения вк-мтДНК/вк-ядДНК определяли методом ПЦР в реальном времени. Результаты показали, что содержание вк-мтДНК с мутациями в плазме крови облученных мышей, в течение месячного пострadiационного периода, значительно повышается, и это повышение зависит от дозы

их облучения. Увеличение содержания мутантных копий вк-мтДНК в плазме крови облученных мышей совпадают со снижением их уровня в тканях (мозг и селезенка) этих же животных. Наибольший уровень повышения мтДНК с мутациями наблюдается на 14 день после облучения. В плазме крови мышей регистрируется также повышение отношения вк-мтДНК/вк-яДНК на 8 и 14 день после их рентгеновского облучения. Полученные данные позволяют полагать, что в кровотоке облученных мышей в течение длительного пострadiационного времени поступает значительное количество вк-мтДНК, определенная часть, которой представлена мутантными копиями. Увеличение количества вк-мтДНК с мутациями в плазме облученных мышей, можно полагать, является результатом гибели клеток и селективной митофагии митохондрий, несущих поврежденные и мутантные копии ДНК. Повышенный уровень вк-мтДНК с мутациями в плазме крови после радиационного воздействия можно рассматривать как потенциальный биомаркер для оценки радиационного поражения организма и действия других генотоксических агентов.

(Работа была поддержана Программой Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» и грантом РФФИ № 08-04-00163).

АГАФОНОВА Н.В.

*Пуцинский государственный естественно-научный институт, Пуцино, Россия
Федеральное государственное учреждение науки Институт биохимии и физиологии
микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, Пуцино, Россия*

АЭРОБНЫЕ МЕТИЛОБАКТЕРИИ КАК СТИМУЛЯТОРЫ РОСТА РАСТЕНИЙ

В качестве источников углерода и энергии аэробные метиловобактерии используют метанол, метиламин, формальдегид, формиат и другие окисленные и замещенные производные метана, которые являются естественными продуктами метаболизма растений. Метиловобактерии колонизируют растения и находятся в тесной взаимосвязи с ними. Связь растений с метиловобактериями взаимовыгодна, так как метиловобактерии удаляют продукты метаболизма растений и могут стимулировать рост и развитие растений за счет продукции фитогормонов и других ростовых факторов.

Цель работы – анализ способности новых штаммов аэробных метиловобактерий стимулировать рост растений.

Объектами исследований служили 5 штаммов метиловобактерий, выделенных из филлосферы и ризосферы различных растений: *Methylobacillus arboreus* Iva ВКМВ-2590, *Delftia sp.* LP-1 DSM 24446, *Methylobacterium extorquens* G10, *Methylophilus flavus* Ship ВКМВ-2547, *Methylopila musalis* MUSA ВКМВ-2646.

Нами установлено, что все исследуемые штаммы синтезируют фитогормоны-ауксины – индолпроизводные из триптофана (5-17 мкг/мл культуральной жидкости). Гиббереллиновая активность выявлена у штаммов Iva и G10. Методами ТСХ и ВЭЖХ обнаружены вещества, совпадающие по *Rf* со стандартом гиббереллиновой кислоты (GA_3). Концентрация активного вещества, близкого по времени удержания при ВЭЖХ с GA_3 , составила до $25 \cdot 10^{-3}$ мкг/л культуральной жидкости. Кроме того, исследуемые штаммы метиловобактерий закисляют среду, образуя муравьиную кислоту, которая может растворять минеральные фосфаты почвы, переводя их в доступную для растений форму.

Выделенные из культуральной жидкости метиловобактерий гиббереллинподобные вещества использовали в биотестах на рост гипокотилей салата Берлинского (*Latuca sativa* sv *Берлинский*). Образцами веществ из штаммов Iva и G-10 обрабатывали стерильные семена салата. Выявлено, что высота ростков салата при обработке составила около 5 см (соответствует положительному контролю – обработка гиббереллиновой кислотой), в то время как необработанные семена имели высоту порядка 2,5-3,0 см.

Также показано положительное влияние колонизации штаммами метиловобактерий гороха (*Pisum sativum*). При инокулировании стерильных семян гороха метиловобактериями уже на 6 сутки наблюдалась разница в росте колонизированных метилотрофами (опытных) и контрольных стерильных проростков гороха. На 10 сутки длина стебля опытных растений была больше в 2-5 раз, масса зеленой части – в 1,9-3,0 раза, масса корневой системы – в 1,9-3,8 раза.

Таким образом, исследованные штаммы метиловобактерий синтезируют фитогормоны, улучшают фосфорное питание растений, оказывают положительное влияние на их рост и перспективны для разработки новых препаратов-стимуляторов роста растений.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 10-04-00808 и ГК 14.740.11.0111.

АЗАРЕНОК А.А.¹, ЗЕНИН В.В.², ЛЮБЛИНСКАЯ О.Г.², ЖИЛИНСКАЯ И.Н.¹

¹ФГБУ НИИ гриппа Минздрава России, Санкт - Петербург, Россия

²Институт цитологии РАН, Санкт - Петербург, Россия

ДИСФУНКЦИЯ ЭНДОТЕЛИЯ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ПОВЕРХНОСТНЫХ БЕЛКОВ ВИРУСОВ ГРИППА ТИПА А

Цель. Исследование механизмов дисфункции эндотелия кровеносных сосудов человека при воздействии поверхностных белков вируса гриппа.

Материалы и методы. Культура клеток эндотелия человека EAhy926, любезно предоставлена доктором Корой Джен Эйджел из Отдела патологии университета Северной Каролины. Поверхностные белки вируса гриппа типа А (А/Санкт-Петербург/2/2009 (H1N1pdm), А/Брисбейн/10/2007 (H3N2), А/кураца/Курган/5/05 NS1-81/5:3) – гемагглютинин (НА) и нейраминидаза(НА)– были получены методом ионно–обменной хроматографии на установке БиоРад. Дисфункцию эндотелиальных клеток (EAhy926) оценивали по количеству клеток в состоянии некроза и апоптоза с помощью проточного цитометра на приборе Epics XL (Beckman Coulter, США), снабженный аргоновым лазером с длиной волны 488 нм. Для определения количества клеток в состоянии некроза и апоптоза использовали FITC AnnexinV kit 1 (BD Biosciences, США). Эндотелиальные клетки окрашивали аннексином V согласно инструкции производителя.

Результаты. Установлено, что вирус гриппа способен репродуцироваться в эндотелии как *in vitro* , так и *in vivo* и вызывать гибель клеток путем апоптоза или некроза. Ранее было показано, что вирусные белки ответственны за клинические реакции, характерные для гриппозной инфекции. В связи с этим представляло интерес изучение способности вирусных белков вызывать дисфункцию клеток эндотелия. В настоящем исследовании представлены данные о развитии апоптоза эндотелиальных клеток при воздействии поверхностного белка вируса гриппа – нейраминидазы и о гибели клеток эндотелия при воздействии другого поверхностного белка - гемагглютинина.

Показано, что гемагглютинин вируса гриппа не вызывает апоптоз эндотелия, что соответствует имеющимся данным в литературе. Однако, в концентрации 50мкг/мл через 4 часа после воздействия наблюдалась гибель клеток(на 7% больше, чем в контроле). По мере увеличения времени экспозиции НА, процент гибнущих клеток увеличивался и к 10

часам достигал -10% . Интересно отметить, что количество мертвых клеток после воздействия НА вируса А/Санкт-Петербург/2/2009(H1N1pdm) было в два раза больше, чем после воздействия НА вирусов А/Брисбейн/10/2007 (H3N2) и А/кураца/Курган/5/05 NS1-81/5:3. Это позволяет говорить о большей токсичности для клеток эндотелия данного гемагглютинина. Механизм подобного явления требует дальнейших исследований.

Воздействие нейраминидазы на клетки эндотелия, в концентрации 10 мкг/мл в течении 2 часов, вызывало экспозицию фосфатидилсерина и дальнейшую гибель клеток путем апоптоза. Количество аннексин положительных клеток через 4 часа после воздействия увеличивалось вдвое по сравнению с контролем. Воздействие НА в течении 8 часов на клетки эндотелия приводило к уменьшению аннексин положительных клеток, а в течении 10 часов - снижению их до уровня контроля.

Заключение. Таким образом, оба поверхностных белка вируса гриппа вызывали гибель эндотелиальных клеток, но пути, по которым развивался этот процесс, различны. Также обращает на себя внимание тот факт, что нейраминидаза вызывала изменения в эндотелии в концентрации в пять раз меньшей, чем гемагглютинин, что позволяет говорить о ее большей функциональной активности в этих процессах. Полученные данные указывают на новый аспект патогенеза гриппозной инфекции, который требует внимания при изучении причин возникновения сосудистых заболеваний, обусловленных дисфункцией эндотелия.

АЗАРКОВИЧ М.И.¹, НАЗАРЕНКО Л.В.², КАПИТОНОВА Ю.В.²

¹*Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН, Москва, Россия*

²*ГБОУ ВПО Московский городской педагогический университет, Москва, Россия*

ОСОБЕННОСТИ ПРОРАСТАНИЯ РЕКАЛЬЦИТРАНТНЫХ СЕМЯН

Семена представляют собой уникальное образование. Они одновременно являются и органом целого растения, и носителями новой генерации. Покидая материнское растение, семена функционируют как самостоятельные единицы и служат сохранению видового разнообразия высших растений.

Вполне жизнеспособное семя может не прорасти, поэтому необходимо определить, что же такое способность к прорастанию. Наиболее широко используемым критерием видимого прорастания является момент наклеивания семян, когда зародышевый корешок пробивает семенные покровы и появляется на поверхности семени.

Все воздействия, регулирующие процесс прорастания, называют факторами прорастания. Необходимо различать две формы приостановки роста зародыша. Приостановку роста, вызванную неблагоприятными условиями окружающей среды, называют вынужденным покоем, а приостановку роста, обусловленную активным эндогенным ингибированием, - органическим покоем.

Семена, находящиеся в состоянии вынужденного покоя, быстро прорастают под действием неспецифических факторов, активирующих пусковые механизмы, таких, как достаточная влажность и благоприятная температура. Семена, находящиеся в состоянии органического покоя, не прорастают даже в условиях, которые благоприятны для роста. Эти семена требуют от окружающей среды специфического стимула, который не действует постоянно, а лишь запускает процесс прорастания. К факторам, вызывающим выход из такого типа покоя, относят и стратификацию.

В связи с этим изучали природу покоя семян, на примере рекальцитрантных семян *Каштана конского*, которые не только не переносят высыхания, но и обладают глубоким физиологическим покоем. Для этого исследовали влияние экзогенного АБК, экстракта семядолей и семенной кожуры на рост изолированных осей, при их культивировании *in vitro*.

Полученные результаты подтвердили отсутствие собственного покоя у изолированных осей семян каштана конского. Было также показано ингибирующее действие экзогенной АБК на способность к росту изолированных осей в начале стратификации, и полное прекращение ингибирующего действия АБК в конце стратификации.

Особый интерес представляют данные о действии экстракта семенной кожуры и экстракта семядолей. Экстракт собственной семенной кожуры и экстракт кожуры проклюнувшихся семян на рост изолированных осей извлеченных на разных сроках стратификации никак не влияет. Однако наблюдается явное замедление в росте при

выращивании осей на экстракте кожуры свежесобранных семян до стратификации и уже на проклюнувшиеся семена.

Вытяжки из семядолей заметно тормозили рост изолированных осей, как свежесобранных, так и стратифицируемых семян. В ходе холодной стратификации ингибирующее действие семядолей снимается, и инициация прорастания может быть связана с прекращением синтеза определенных белков в семядолях.

В целом, зародышевые оси, изолированные из семян Каштана конского в начале стратификации, более чувствительны к испытанным воздействиям, чем в конце, что может свидетельствовать об их различном физиологическом состоянии.

Таким образом, исследование ростовой активности изолированных осей, выявило сложный характер взаимодействия между частями семени. Вероятно, что покой семян обусловлен влиянием семядолей, нежели - семенной кожурой.

АЗНАБАЕВА Л.М.

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН

ГОУ ВПО «Оренбургская государственная медицинская академия», Оренбург, Россия

ВЛИЯНИЕ СУББАКТЕРИОСТАТИЧЕСКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ АНТИМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ПЕРСИСТЕНТНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ СТАФИЛОКОККОВ

Знания о модификации биологических свойств микроорганизмов под действием тех или иных биологически активных препаратов могут помочь в изучение механизмов изменчивости бактерий, что имеет общебиологическое (сохранение биоразнообразия) и медицинское значение (поиск препаратов направленно действующих на возбудителя заболевания с сохранением в биотопе нормальной микрофлоры). Известно, что малые концентрации антибиотиков вызывают существенные изменения в морфологии и биохимии бактерий, влияя на их вирулентность и персистенцию (Бухарин О.В., 1996).

Целью исследования явилось изучение действие суббактериостатических концентраций антибиотиков на частоту и уровень экспрессии ведущего фактора персистенции стафилококков – антилизозимную активность.

В качестве биологически активных веществ были выбраны официальные препараты антибиотиков группы аминопенициллина (ампициллин) и цефалоспорина 3-го поколения (цефтриаксон). Объектом исследований явились 44 штамма микроорганизмов рода *Staphylococcus* из коллекции ИКВС УрО РАН. Среди изученных микроорганизмов 29 штаммов принадлежали к виду *S.aureus*, 10 штаммов – *S.epidermidis*, 5 штаммов - *S.haemolyticus*. Все изученные микроорганизмы характеризовались наличием антилизоцимной активности: у штаммов *S.epidermidis* АЛА составила $2,3 \pm 0,4$ мкг/мл, у штаммов *S.haemolyticus* АЛА составила $3,6 \pm 0,4$ мкг/мл, у штаммов золотистого стафилококка – $3,8 \pm 0,4$ мкг/мл. Установлено, что суббактериостатические концентрации для штаммов коагулазоотрицательных стафилококков составляли: для ампициллина - 250 мкг/мл, для цефтриаксона – 125 мкг/мл; для штаммов золотистого стафилококка: для ампициллина – 125 мкг/мл, для цефтриаксона – 125 мкг/мл.

В результате проведенных исследований установлено, что ампициллин и цефтриаксон оказывали разнонаправленное действие на уровень антилизоцимной активности. Выявлено, что препарат полусинтетических аминопенициллинов в 1,4 раза чаще оказывал стимулирующее действие на продукцию микроорганизмами фактора персистенции (АЛА), чем цефалоспорин 3-го поколения ($p < 0,05$).

Наиболее выраженные изменения наблюдались у штаммов золотистого стафилококка под действием ампициллина. Отмечалось повышение уровня АЛА фактора у патогена в 1,3 раза ($p < 0,05$). Воздействие изучаемых антибиотиков на выраженность АЛА условно-патогенных стафилококков было незначительным. Наблюдалось незначительное снижение уровня АЛА (на 0,3-0,5 мкг/мл) по сравнению с контрольными значениями.

Оба препарата относятся к обширному классу β -лактамовых антибиотиков, мишенью действия является пенициллинсвязывающие белки бактерий, которые выполняют роль ферментов на завершающем этапе синтеза пептидогликана – биополимера, являющегося основой клеточной стенки бактерий. Блокирование синтеза пептидогликана приводит к гибели микроорганизма. Суббактериостатические концентрации позволяют оценить влияние антибиотиков непосредственно на экспрессию секретируемых факторов патогенности. Таким образом, исключается влияние на уровень свойства, связанный с изменением ростовых показателей.

Установлено, что β -лактамы антибиотики в суббактериостатических концентрациях стимулировали продукцию АЛА фактора, что может привести к персистенции (длительному переживанию) патогена в биотопе и формированию носительства. Полученные результаты описывают один из возможных механизмов, приводящих к бактерионосительству патогенных микроорганизмов и формированию среди представителей условно-патогенной флоры возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний.

АКИМКИН Т.М.¹, ТАТИКОЛОВ А.С.¹, ЯРМОЛЮК С.М.²

¹*Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, РФ*

²*Институт молекулярной биологии и генетики НАНУ, Киев, Украина*

НЕКОВАЛЕНТНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПОЛИМЕТИНОВОГО КРАСИТЕЛЯ CYAN2 С ДНК, ХОНДРОИТИН-4-СУЛЬФАТОМ И ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТОЙ: СПЕКТРАЛЬНО-ФЛУОРЕСЦЕНТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

В настоящей работе с помощью спектрально-флуоресцентных измерений изучается нековалентное взаимодействие полиметинового красителя 3,3',9-триметилтиакарбоцианина (Cyan2) с распространенными в биологических системах биополимерами: ДНК и двумя структурно сходными гликозаминагликанами – хондроитин-4-сульфатом (Х4С) и гиалуроновой кислотой (ГК) - в водном растворе при различных условиях. Полиметиновые красители обладают способностью изменять свои спектрально-флуоресцентные характеристики в зависимости от молекулярного окружения, например, в присутствии биомакромолекул, что представляется перспективным с точки зрения поиска и разработки спектрально-флуоресцентных зондов.

Для изучения взаимодействия красителя с ДНК проводились совместные измерения спектров поглощения и флуоресценции красителя в широком диапазоне концентраций ДНК. При увеличении концентрации ДНК в системе Cyan2-биополимер наблюдались изменения (падение, батохромный сдвиг и последующий рост) полосы поглощения красителя и рост квантового выхода флуоресценции (максимальный $\Phi_f = 0.15 \pm 0.02$), происходившие вследствие образования комплексов краситель-ДНК. Рост квантового

выхода флуоресценции красителя при увеличении концентрации ДНК в растворе был смоделирован математически. Эффективная константа связывания и число связывания Cyан2 с ДНК были получены из аппроксимации экспериментальных значений модельной кривой роста интенсивности флуоресценции.

Другой тип взаимодействия наблюдался в системе краситель–ГК. По мере увеличения концентрации ГК происходило появление коротковолновых полос в спектре поглощения и рост их интенсивности вследствие образования Н-агрегатов Cyан2 (упорядоченных агрегатов молекул красителя) на молекулах ГК. С помощью разложения спектра поглощения на гауссовы компоненты была прослежена динамика изменения интенсивности отдельных полос поглощения агрегатов по мере роста концентрации ГК. Для этих агрегатов определено число агрегации $n = 3$. Была обнаружена зависимость интенсивности агрегирования красителя от рН среды и ионной силы раствора. Рост Φ_f при данном взаимодействии отсутствует.

В системе Cyан2–Х4С в водном растворе (в отсутствие буфера) был обнаружен смешанный тип взаимодействия красителя с биополимером. Вплоть до соотношения концентраций Cyан2 и Х4С (выраженной в концентрации мономеров) $\approx 1:1$ наблюдалось образование Н-агрегатов также, как и в случае взаимодействия с ГК. При дальнейшем увеличении концентрации биополимера наблюдались изменения спектрально-флуоресцентных характеристик системы Cyан2–Х4С, описанные для взаимодействия данного красителя с ДНК, а именно, батохромный сдвиг и рост интенсивности полосы поглощения мономера красителя, а также увеличение Φ_f системы, достигая значения ≈ 0.7 . В системе Cyан2–Х4С в буферных растворах Н-агрегаты красителя не образуются, но наблюдается рост Φ_f . Также была обнаружена зависимость Φ_f Cyан2, связанного с Х4С, от рН среды. Так, при рН 4.5 и 9.0 $\Phi_f \approx 0.7$ (примерно в 350 раз больше по сравнению с чистым красителем), а при рН 7.0 $\Phi_f \approx 0.2$. С помощью математического моделирования роста Φ_f красителя в присутствии Х4С произведена оценка числа и константы связывания красителя с биополимером при различных рН среды.

Основываясь на полученных результатах, мы предложили краситель Cyан2 в качестве спектрального зонда для обнаружения ГК и спектрально-флуоресцентного зонда для обнаружения Х4С и ДНК в биологических системах.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ

АКИМОВ А.Г.

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук,
Санкт-Петербург, Россия*

СТРАТЕГИИ АНАЛИЗА СЛОЖНЫХ КОММУНИКАЦИОННЫХ СИГНАЛОВ НЕЙРОНАМИ СЛУХОВОГО ЦЕНТРА СРЕДНЕГО МОЗГА ДОМОВОЙ МЫШИ

Выполнено электрофизиологическое картирование нейронального представительства акустического коммуникационного сигнала раннего онтогенеза доменной мыши (*Mus musculus*) в двух структурных образованиях задних холмов: популяциях нейронов центрального и дорсомедиального ядер. В соответствии с избранным методическим подходом произведено тестирование возбудительных и тормозных частотных рецептивных полей и регистрация ответов 108 нейронов центрального ядра, вызванных гнездовым криком дискомфорта мышат «wriggling call», его отдельными частотными компонентами (любыми двумя из трех основных гармоник попарно либо каждой из трех в отдельности) и двенадцатью моделями. Модели были образованы тремя тональными составляющими, две из которых соответствовали первой и третьей основным гармоникам крика, а частота центральной составляющей последовательно изменялась от величины первой гармоники до третьей с шагом по частоте 0.126 октавы.

Анализ полученных результатов показал, что популяция нейронов центрального ядра задних холмов, участвующих в кодировании крика дискомфорта мышат «wriggling call», крайне гетерогенна по своим реакциям на компоненты и модели крика. Эффективность двух- и трехкомпонентных моделей, оцененная по величине суммарного ответа всей популяции нейронов, превышала эффективность однотоновых стимулов, частота которых соответствовала гармоникам естественного крика. Трехкомпонентные модели «wriggling call», частотные составляющие которых, также как и в естественном крике, попадали в три неперекрывающиеся критические полосы слуха мыши, имели преимущество по величине ответов по сравнению с моделями, компоненты которых были локализованы в двух неперекрывающихся полосах. Области возбуждения и торможения нейронов, полученные стандартными методами однотоновой и двухтоновой парадигм,

лишь отчасти отражали распределение возбуждательных и тормозных входов в частотных рецептивных полях нейронов. Третью часть выборки (32%) составили впервые обнаруженные нами в центральном ядре заднего холма комбинационно-чувствительные нейроны. В ответах этих нейронов зарегистрирована реакция облегчения при воздействии «wriggling call» и его моделей. Особенность реакций более трети нейронов (41.2%) была связана с появлением выраженного “-off” компонента в их ответах на естественный крик и его аналоги.

Выполненное впервые картирование частотных рецептивных полей 48 нейронов дорсомедиального ядра выявило большую долю редких в центральном ядре мультипиковых комплексных нейронов и широко настроенных V-образных нейронов. Реакции популяции нейронов дорсомедиального ядра на крик дискомфорта мышат, его отдельные частотные компоненты и гармоническую модель отличались малой избирательностью и большими латентными периодами ответов (более 20 мс). Выявленная кратность характеристических частот исследованных комплексных нейронов формантам коммуникационных сигналов мышей звукового диапазона, т.е. частотам в области 3 – 5 кГц подтверждает предположение об участии дорсомедиального ядра в обработке видоспецифических коммуникационных сигналов звукового диапазона частот.

Таким образом, выполненный анализ позволяет отметить несколько стратегий кодирования сложных коммуникационных сигналов нейронами с различной функциональной специализацией. Среди них - параллельная обработка гармонических компонентов сигналов в различных частотных каналах и выделение определенных частотных характеристик сигналов комбинационно-чувствительными и комплексными нейронами. Одним из механизмов частотной обработки многокомпонентных сигналов на уровне популяции нейронов центрального ядра является, по-видимому, механизм критических полос.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 09-04-00656).

АКИМОВ М.Г., БОБРОВ М.Ю., ГРЕЦКАЯ Н.М., БЕЗУГЛОВ В.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН), Москва, Россия

НЕЙРОЛИПИНЫ – ОСНОВА СОЗДАНИЯ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ БОРЬБЫ С НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Нейродегенеративные заболевания различной природы – большая группа неизлечимых на сегодняшний день болезней, в основе которых лежит гибель нейронов различных областей головного мозга с последующей утратой функции данной области – потерей памяти, способности передвигаться и др. Ключевыми механизмами, за счет которых происходит гибель нейронов, являются энергетический коллапс и неспецифическое повреждение компонентов клетки активными формами кислорода и азота. В свою очередь, отказ системы генерации АТФ клетки может происходить вследствие так называемой эксайтотоксичности, когда избыточный вход кальция приводит к разрушению митохондрий, и за счет гипоксии. Дополнительным повреждающим фактором является развитие воспалительного процесса в зоне поражения. Множественность причин и факторов, определяющих развитие и течение нейродегенеративных заболеваний, затрудняет создание эффективных лекарственных средств и требует разработки новых подходов к дизайну активного компонента.

Предлагаемый нами подход основывается на представлении, что в сильносвязанной системе, которой является живой организм, многофакторные процессы с помощью полифункциональных соединений могут регулироваться более успешно и более безопасно, чем с помощью монофункциональных веществ узконаправленного действия. Последние, в результате чрезмерного воздействия только на одну выделенную цепочку передачи сигнала, могут порождать сильные и нежелательные побочные эффекты за счёт ответной реакции информационной сети организма. Напротив, полифункциональные соединения, способные взаимодействовать с различными звеньями информационной сети, вызывают меньше побочных эффектов и, как правило, активируют дополнительные механизмы

организма, противостоящие патологическому процессу. Для достижения указанного результата структура создаваемого полифункционального соединения должна содержать фрагменты эндогенных биорегуляторов, участвующих в реализации этих механизмов. Перспективным классом таких биорегуляторов являются нейрוליпины – эндогенные амидные и эфирные производные жирных кислот разной степени ненасыщенности (олеиновой, арахидоновой, докозагексаеновой), взаимодействующие с белками каннабиноидно-ванилоидной системы организма. Структуры природных и синтетических нейрוליпинов содержат остатки таких биологически активных соединений, как дофамин, серотонин и его производные, серин, гамма-аминомасляная кислота, глицин, гистамин, холин и др. Кроме того, вместо арахидоновой кислоты в состав родственных нейрוליпинам соединений могут входить простагландины (продукты циклооксигеназной трансформации арахидоновой кислоты).

Согласно результатам наших исследований и данным литературы, действие данных веществ на различные компоненты нейродегенеративной патологии может варьировать и включает в себя следующие эффекты:

- повышение выживания нейронов вплоть до контрольного уровня в условиях эксайтотоксичности – производные дофамина;
- повышение выживания нейронов в условиях гипоксии (показано на переживающих культурах клеток, на переживающих срезах головного мозга и *in vivo* в модели индуцированной фокальной ишемии);
- антиоксидантное действие, в том числе, в условиях окислительного стресса – производные дофамина и серотонина;
- восстановление локомоторной активности у крыс в острой модели болезни Паркинсона – производные дофамина;
- увеличение локального кровотока в головном мозге без влияния на системное артериальное давление – производные ГАМК;
- индукция апоптоза в культурах раковых клеток различного происхождения (глиома, лимфобластома) – производные дофамина;
- переключение воспаления в стадию резольвинга (завершение и ликвидация воспаления) – производные дофамина.

Таким образом, полифункциональные соединения, построенные на основе нейролипидов, способны воздействовать практически на каждое звено разных стадий нейродегенеративного процесса и являются перспективными для разработки новых лекарственных препаратов для профилактической и поддерживающей терапии, а также как средство скорой помощи для снижения или предотвращения повреждений от кратковременного воздействия поражающих факторов. Работа частично поддержана грантом РФФИ (проект 12-04-00608).

АЛАДИН Д.Ю., СЕВОСТЬЯНОВ С.М., ДЁМИН Д.В., ДЕЕВА Н.Ф., ИЛЬИНА А.А.

Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пушкино, Россия

ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛЕВИЦЫ ТОНКОЙ *AGROSTIS TENUS* ДЛЯ ФИТОРЕМЕДИАЦИИ ПОЧВ ЗАГРЯЗНЁННЫХ ПОЛИХЛОРИРОВАННЫМИ БИФЕНИЛАМИ

Фитодеградация основана на возможности растений осуществлять ферментативную деградацию органических токсикантов. Несомненно, микроорганизмы первыми атакуют трудно поддающиеся фитодеградации структуры токсикантов. Ризодеградация служит чем-то вроде щита, предохраняющего растение от избыточного количества токсикантов, находящихся в почве. Корни активно выделяют экссудаты, которые создают окружение в зоне корневой системы и в случае необходимости меняют рН среды, обеспечивая оптимальные условия для размножения ризосферной микрофлоры и осуществляют деградацию органических субстратов, находящихся в почве, в более низкомолекулярные и легкоусвояемые растениями соединения.

В связи с этим целью наших исследований стало изучение накопления и деструкции ПХБ растениями.

Эксперимент проводился в лабораторных условиях с полевицей тонкой *Agrostis tenuis*. Опыт проводился на незагрязнённой аллювиальной лугово-дерновой почве (контроль) и загрязнённой аллювиальной луговой почве с уровнем загрязнения ПХБ более 600 ПДК. Главной целью для нас было выявить возможность накопления и деструкции ПХБ данным видом. После появления всходов почву во всех вариантах засыпали

отмытым речным песком для исключения испарения влаги и ПХБ с поверхности. Образцы почвы и растений из опытных вариантов были проанализированы на содержание в них ПХБ.

На первом этапе наблюдений высота опытных растений была на 26% выше, чем контрольных. К концу эксперимента высота растений в опыте с ПХБ была на 25% ниже, чем в контрольных вариантах

Таким образом, в начале наличие хлорорганических соединений в почве стимулирует рост растений. По истечении определенного промежутка времени происходит угнетение данного вида и отставание его в развитии по сравнению с контролем.

Данный вывод подтверждается различиями в весе надземной и подземной массы растений по вариантам опыта. Выкопанные растения взвешивали отдельно корни и зеленую массу. Зеленую массу затем просушивали и также взвешивали. Эта разница составила 36%. Разница в весе высушенных растений полевицы между контролем и опытом составила 48%.

Полученные данные показывают, что накопление ПХБ корнями данных видов растений примерно в 100 раз превышает накопление зеленой массой.

Соотношение легких (3-4 атома хлора) и тяжелых (5 – 8 атомов хлора) гомологов ПХБ для полевицы: в зеленой массе легкие фракции составляют 46,4%, в корнях 67,6%. Преобладание в корневой системе легких фракций ПХБ вполне объяснимо: это наиболее мобильные, относительно растворимые соединения с наименьшей массой, которые из почвенных растворов поглощаются растением в первую очередь. Поэтому относительно исходной почвы, в которой сумма данных конгенов составляет 51,6%, в корнях растений их на 16% больше. В надземной части данных видов растений отмечается пониженное накопление легких гомологических групп как относительно корней, так и почвы. Таким образом, зеленая надземная масса накапливает тяжелые, наиболее токсичные фракции ПХБ. Остаточное количество ПХБ в почве после выращивания полевицы составило 25511,85 мкг/кг, или 70,4% от исходного содержания.

При незначительном накоплении ПХБ растениями снижение уровня загрязнения почв составило от 30 до 70%, что может быть объяснено процессами ризодеградации, протекающими в почве под действием корневой системы растений. Корни, при помощи

экссудативных ферментов полностью или частично деградируют токсичные соединения в области корневой системы до их проникновения в растения. Кроме того, выделяя экссудаты, они создают оптимальные условия для размножения ризосферной микрофлоры, которая так же осуществляет деградацию токсикантов.

АЛДАРОВ К.Г.¹, МОРОЗОВА О.В.^{1,2}, БАХВАЛОВА В.Н.²,
ГРИЩЕЧКИН А.Е.², КЛИНОВ Д.В.¹, ХАСИН А.А.¹

¹ *Институт физико-химической медицины ФМБА, Москва, Россия*

² *ФГБУ Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздравсоцразвития РФ,
Москва, Россия*

АНАЛИЗ СООТВЕТСТВИЯ ВАКЦИННЫХ ШТАММОВ СОВРЕМЕННЫМ ИЗОЛЯТАМ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

Для профилактики клещевого энцефалита (КЭ) в России разрешены 6 типов вакцин, полученных инаktivацией формалином вируса КЭ (ВКЭ) из первичных культур фибробластов куриных эмбрионов. Вакцины отечественного производства основаны на дальневосточных штаммах ВКЭ, а зарубежного производства – на европейских штаммах, что не соответствует доминирующему в большинстве эндемичных областей России и ближнего зарубежья сибирскому генетическому типу ВКЭ. Цель работы состояла в сравнительном анализе концентраций антигенов, вирионов и частиц адьюванта, а также иммуногенности и защитных свойств инаktivированных вакцин от современных штаммов ВКЭ.

Вакцины против КЭ "Энцеvир" ("Микроген", г. Томск), ФСМЕ-Иммун ("Baxter", Австрия) и "Энцеvур взрослый" ("Novartis", Германия) анализировали методом атомно-силовой микроскопии с использованием микроскопа «NT-MDT» (Интегра прима) и просвечивающей электронной микроскопии с применением микроскопа «Libra 120» (Carl Zeiss). Размеры свободных индивидуальных вирионов сферической формы с диаметром приблизительно 60-70 нм совпадали для разных вакцинных штаммов, относящихся к разным генетическим типам ВКЭ, и при использовании различных микроскопических методов. Однако их концентрации существенно отличались от минимальных 10^5

вирионов/мкл в составе вакцин «Энцеви́р» (Томск) и «Энце́пур» (Германия) до максимальных 10^9 вирионов/мкл в вакцине «ФСМЕ-Иммун» (Австрия).

Помимо инактивированных вирионов, вакцины против КЭ содержат 1 мг гидроксида алюминия в качестве адъюванта в 0,5 мл вакцины. Действие соединений алюминия обусловлено их способностью удерживать и накапливать антиген для длительной презентации иммунной системе (эффект «депо») с образованием мелких гранул, в которых они задерживаются вместе с адсорбированным антигеном. Самые большие частицы гидроксида алюминия обнаружены в вакцине «Энцеви́р» (Томск) со средним размером по горизонтали около 1 мкм и высотой 350 нм, наиболее крупные достигали диаметра 2 мкм и высоты - 1,2 мкм. В составе вакцины «ФСМЕ-Иммун» (Австрия) наблюдали большой разброс размеров частиц гидроксида алюминия от наиболее распространенных 100-150 нм до 250-300 нм, которые способны агрегировать между собой, формируя скопления диаметром 3-5 мкм и высотой 300-400 нм. Частицы адъюванта в вакцине «Энце́пур» (Германия) также образовывали агрегаты с размерами по горизонтали 2-5 мкм и по высоте 200-300 нм, которые были меньше по сравнению с австрийской вакциной. Необходимо отметить, что поверхности адъюванта были покрыты сплошным слоем вирусных частиц для образцов томской и австрийской вакцин и лишь отдельными вирионами у немецкой вакцины. Результаты электронной микроскопии для томской и австрийской вакцин не противоречили данным атомно-силовой микроскопии.

Известно, что содержание антигенов ВКЭ в российских вакцинах – 4,5 мкг/дозу, в вакцине ФСМЕ-Иммун – 2,0-3,5 мкг/дозу, в вакцине Энцепур – 1,5 мкг (Воробьева, 2002). Среди побочных эффектов вакцин отмечают повышение температуры выше 38°C и лихорадку у $>1\%$ детей и неврологические осложнения у взрослых. Снижение дозы антигенов ВКЭ в западноевропейских вакцинах снижает риск развития осложнений, большинство из которых обусловлены способностью инактивированных вирусных частиц индуцировать экспрессию генов фактора некроза опухолей α и интерлейкина IL-1 β . Массовые осложнения у детей после иммунизации вакциной «Энцеви́р» (Томск) летом 2010 г. привели к запрету этой детской вакцины на территории Российской Федерации.

Подкожная 3-разовая иммунизация мышей 4 инактивированными вакцинами против КЭ индуцировала антитела к ВКЭ сибирского типа с титрами в иммуноферментном анализе в диапазоне 1:200 - 1:1600. При этом титры в реакции

торможения гемагглютинации для штаммов ВКЭ Айна (номер доступа в GenBank (AF091006) (1:20 – 1:80) и 2689 (JQ693478) (подобного штамму Заусаев) (0-1:320) отличались для одинаковых сывороток иммунизированных мышей и были меньше соответствующих титров для гомологичных сочетаний штаммов вакцины и для РТГА. Наиболее высокий уровень защиты мышей BALB/c обеспечивала вакцина «Энцефир» (Томск): минимальная иммунизирующая доза (МИД₅₀), защищающая 50% мышей составила менее 0,0016 мл. МИД₅₀ московской и австрийской вакцин находились в допустимом интервале 0,001-0,017 мл. Несмотря на наличие нейтрализующих антител с титрами 1:10-1:100, защитный эффект немецкой вакцины при разведениях 1:32-1:320 отсутствовал, что приводило к полной гибели иммунизированных мышей при заражении 100 ЛД 50 ВКЭ штамма 2689.

АЛЕКСАНДРОВА О.И.^{1,2}, ЮДИНЦЕВА Н.М.², ЛЮБУНЬ Г.П.¹, ПУЧИНЬЯН Д.М.^{1,3},
ПЕТРОВА Н.В.¹, ВИДЯШЕВА И.В.³, ХМЕЛЬНИЦКАЯ Е.А.¹

¹*Саратовский государственный университет имени Н.Г.Чернышевского, Саратов, Россия*

²*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

³*Саратовский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии,
Саратов, Россия*

НЕТКАНЫЙ МАТЕРИАЛ ИЗ НАНОВОЛОКОНХИТОЗАНА В КАЧЕСТВЕ МАТРИЦЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ КЛЕТОК

Одной из актуальных проблем медицины является эффективное восстановление структуры и функций поврежденных органов и тканей. Использование биомедицинских технологий - перспективное направление для решения этой проблемы.

Трансплантация клеточных продуктов осуществляется с помощью различных методов. Один из методов - использование для трансплантации клеток биосовместимых носителей-матриксестественного и искусственного происхождения. К данным матриксам предъявляется ряд требований: нетоксичность, биodeградируемость, механическая прочность, способность клеток к пролиферации и дифференцировке на их поверхности.

Такой носитель с клетками представляет собой тканеинженерную конструкцию (графт) – эквивалент ткани. В качестве клеточного материала для создания искусственных органов применяют культуры клеток, входящих в состав регенерируемой ткани или являющихся их предшественниками.

Таким образом, целью настоящей работы была оценка функционального состояния различных типов клеток, культивируемых на нетканом материале из биополимерных нановолокон хитозана, полученном методом электроформования. В качестве контроля использовали клетки, культивируемые в стандартных условиях. Объектом исследования явились кератиноциты и фибробласты кожи человека, хондроциты и стромальные клетки костного мозга (СККМ) крысы.

Оценку состояния клеток, культивируемых на данном материале, проводили с помощью инвертируемого микроскопа. Кроме того, характер организации актинового цитоскелета, свидетельствующий о степени сродства клеток к материалу, оценивали с помощью метода иммунофлуоресценции.

Проведенные исследования показали, что все типы исследуемых клеток быстро адгезировали на поверхность матрицы. При культивировании на данном субстрате наблюдали пролиферативную активность клеток сопоставимую с контролем. Кроме того, выявленный характер организации актинового цитоскелета у клеток всех типов свидетельствовал о высокой степени их сродства к материалу.

Таким образом, данный материал можно использовать для культивирования кератиноцитов и фибробластов кожи человека, хондроцитов и СККМ крысы. Кроме того, представляется перспективным исследование материала из биополимерных нановолокон хитозана, полученного методом электроформования, для культивирования СККМ и хондроцитов человека и последующего использования для клинических целей.

АЛЕКСЕЕВА В.В.¹, ЕРМОШИН А.А.², СИНЕНКО О.С.²,

РУКАВЦОВА Е.Б.¹, БУРЬЯНОВ Я.И.¹

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

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

МОДИФИКАЦИЯ БИОСИНТЕЗА ИЗОПРЕНОИДОВ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ СТРЕССТОЛЕРАНТНОСТИ У ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА

Растения постоянно сталкиваются с неблагоприятными факторами окружающей среды как биотической, так и абиотической природы. Для защиты от них у растений выработаны различные приспособления на физиологическом, морфологическом и метаболическом уровнях. Эффективное выращивание большинства растений в условиях агрокультуры основано на потенциальной продуктивности растений, а также на их способности адаптироваться и противостоять различным стрессовым ситуациям. В связи с этим актуальной задачей современной биотехнологии растений является создание сортов и линий растений, обеспечивающих высокий урожай в неблагоприятных условиях среды. Одним из современных подходов в решении этой задачи является использование метаболической инженерии.

Защита и выживание растений в условиях окружающей среды в значительной степени обусловлены их биохимической адаптацией. Соединения вторичного метаболизма играют в этом главную роль, при этом большое значение принадлежит изопреноидным соединениям. В цитоплазме растений протекает ацетатно-мевалонатный путь биосинтеза изопреноидов. Через него в растениях синтезируются стерины (компоненты мембран), сесквитерпены (фитоалексины), brassinosteroids (фитогормоны и адаптогены), изопреноидные части некоторых сложных молекул (цитокенинов, пренилированных белков, пренилхинонов). Ключевым этапом, лимитирующим синтез этих соединений, является образование мевалоновой кислоты. Реакция катализируется ферментом 3-окси-3-метилглутарил-КоА редуктазой, который кодируется геном *hmg1*.

Нами получены трансгенные растения табака сорта Самсун, экспрессирующие гетерологичный ген *hmg1* из *Arabidopsis thaliana* под контролем конститутивного промотора CaMV 35SS (*hmg1*-растения). Модификация биосинтеза изопреноидов в этих растениях, как мы предполагаем, позволит повысить их устойчивость к стрессорам различной природы. Спектрофотометрический анализ суммарного содержания стериннов в неомыляемом остатке экстрактов листьев полученных трансгенных линий табака выявил их возрастание по сравнению с контролем. Предполагаемое нами увеличение содержания свободных и связанных форм стериннов в мембране и изменение состава мембранных стериннов способно повлиять на её жесткость и текучесть, уменьшить её проницаемость для токсичных агентов. Кроме того, при увеличении уровня изопреноидов, участвующих в пренилировании белков, возможны перестройки в составе заякоренных мембранных белков. Немаловажное значение имеет ожидаемое нами повышение уровня brassinosteroidов, играющих важную роль в качестве адаптогенов растений, и цитокининов, участвующих в гормональной регуляции антистрессовых программ клетки. В результате оксидативного стресса, вызванного действием параквата на листья *hmg1*-растений, показано повышение синтеза минорных сесквитерпенов. Наблюдаемое увеличение сесквитерпенов, возможно являющихся антиоксидантами благодаря наличию в них системы сопряженных двойных связей, может повысить способность растительных клеток к обезвреживанию образующихся в результате стресса активных форм кислорода. Кроме того, большое значение имеет участие сесквитерпенов в качестве фитоалексинов и фитонцидов растений. Эксперименты по обработке высечек листьев трансгенных растений паракватом и ионами меди обнаружили возрастание толерантности *hmg1*-растений к этим стрессорам. Повышение устойчивости *hmg1*-растений к биотическому стрессу показано в экспериментах с фитопатогеном *Pseudomonas syringae*. Также выявлены фенотипические эффекты при воздействии других фитопатогенных бактерий (*Erwinia carotovora*) и грибов (*Sclerotinia sclerotiorum*) на листовые экспланты изучаемых растений, свидетельствующие о неспецифической повышенной устойчивости растений с геном *hmg1* к биотическому стрессу в сравнении с контролем. В настоящее время продолжается изучение особенностей фотосинтеза, дыхания и накопления АФК (супероксид радикала и перекиси водорода), в трансгенных линиях во время действия указанных стрессоров.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (контракт №14.740.11.1032).

АЛЕКСЕЕВА О.М.

Институт Биохимической физики РАН им. Н.М. Эммануэля, Москва, Россия

ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ ФЕНОЗАНА НА КЛЕТОЧНЫЕ И СУБКЛЕТОЧНЫЕ ОБЪЕКТЫ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Адаптоген и антиоксидант пространственно затрудненный фенол - фенозан и его производные: гибридные антиоксиданты ИХФАНЫ, а также коричная кислота тестировались на объектах животного происхождения разного уровня организации. Определялось воздействие, как на структурные параметры модельных препаратов липосом, сформированных из индивидуального нейтрального фосфолипида с насыщенными жирнокислотными остатками димиристоилфосфатидилхолина (ДМФХ), растворимого белка - сывороточного альбумина (БСА) и мембранных белков клеточных оболочек – тений эритроцитов, так и на функциональные свойства целых клеток – эритроцитов и клеток асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ). Измерения проводили в широком диапазоне концентраций (10^{-21} – 10^{-3} М), для определения концентрационных границ применения веществ без деструкции свойств объекта воздействия.

Фенозан (β -(4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилфенил) пропионовая кислота) был синтезирован в Институте химической физики АН СССР при 5-летнем партнерском сотрудничестве с Московским нефтеперерабатывающим заводом. Это отражено в названии вещества «фенозан», что означает «фенолы завода и Академии наук». Препарат создавался для стабилизации полимеров. Фенозан - белый кристаллический порошок; температура плавления 85°C . растворяется в ацетоне, бензоле, толуоле, диэтиловом эфире, гептане; не растворяется в воде. Фенозан калия растворяется в воде. Фенозан нетоксичен. Он относится к числу неокрашивающих стабилизаторов. Фенозан и его модификации являются неокрашивающими термостабилизаторами для полиолефинов и других полимерных материалов. Дозировка 0,1-1%. В Институте химической физики АН СССР при тестировании фенозана калия на биологических объектах было обнаружено

благоприятное воздействие, как антиоксиданта на биомембраны, клетки и даже на организм животных. Впоследствии работами Никифорова Г.А. были синтезированы производные фенозана ИХФАНы. Это сложноэфирные производные (метилокса) (3,5 дитрет бутил -4-гидроксифенилпропановой кислоты) и этаноламина (коламина), замещенного алкильными заместителями с разной длиной цепи 8; 10; 12; 16 углеродных атомов: N,N-диметил-N-октиламиноэтилового эфира β -(3',5'-дитрет.бутил-4'-гидроксифенил) пропановой кислоты бромида (ИХФАН-10-С-8), N,N-диметил-N-дециламиноэтилового эфира β -(3',5'-дитрет.бутил-4'-гидроксифенил) пропановой кислоты бромида (ИХФАН-10-С-10), N,N-диметил-N-додециламиноэтилового эфира β -(3',5'-дитрет.бутил-4'-гидроксифенил) пропановой кислоты бромида (ИХФАН-10-С-12), N,N-диметил-N-гексадециламиноэтилового эфира β -(3',5'-дитрет.бутил-4'-гидроксифенил) пропановой кислоты бромида (ИХФАН-10-С-16). Антиоксидантные свойства ИХФАН усилены по сравнению с фенозаном. Кроме того, ИХФАН усиливают резистентность биомембран к различным воздействиям, структурно укрепляя их в результате встраивания ацильных остатков в бислои. Коричная кислота — (β -фенилакриловая кислота, бензилиденуксусная кислота) и ее модификации является метаболитом фенозана при попадании его в организм животного.

В результате проведенных в настоящей работе исследований было выяснено, что тестируемые вещества в наших исследованиях проявили свойства веществ, которые, как в больших концентрациях (10^{-4} - 10^{-6} М), так и в малых (10^{-13} - 10^{-14} М) и сверхмалых (10^{-17} - 10^{-18} М), способны вызывать у объекта регистрируемые изменения. Эксперименты проводились с лабильными, легко меняющими конформацию молекулами БСА. Для альбуминов известно быстрое изменение конформации за счет специфического строения молекул: перемежающиеся мотивы жестких альфа-спиралей и бета-складчатых структур с подвижными петлями. В результате спектральных исследований при измерении тушения триптофановой флуоресценции было установлено, что большие концентрации всех исследуемых значительно тушат флуоресценцию, разрыхляя структуру молекулы БСА. Малые концентрации ИХФАН защищают флуоресценцию от тушения водой в прямой зависимости от длины ацильного остатка в молекуле ИХФАН. Т.е вектор воздействия на объект зависит, как от природы, так и от концентрации БАВ. В мембранах тений эритроцитов фенозан и ИХФАН-10 в больших концентрациях перестраивали

белковые микродомены. Микродомены же ДМФХ не только подвергались деструкции в присутствии ИХФАН, но даже образовывалась собственная фаза микродоменов ИХФАН-С16. Было обнаружено, что фенозан по сравнению с ИХФАН-10 оказывает значительно более мягкое воздействие, как на мембрану, так и на целую клетку. Обнаружено бимодальное влияние (большие и сверхмалые концентрации) ИХФАН-10 на Ca^{2+} -зависимый выход K^+ из эритроцитов, и незначительное - фенозана. В АКЭ ИХФАН, фенозан и коричная кислота (в средних концентрациях) угнетали Ca^{2+} -сигнализацию.

АЛЕНЬКИНА С.А., НИКИТИНА В.Е.

Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия

ВЛИЯНИЕ ЛЕКТИНОВ АЗОСПИРИЛЛ НА МЕТАБОЛИЗМ КОРНЕЙ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ

Изучение фиксации атмосферного азота микроорганизмами предполагает исследование многих процессов, происходящих в биологической системе взаимодействия микроорганизмов с растениями. Это процессы, протекающие внутри бактериальной клетки, а также закономерности взаимодействия азотфиксирующих микроорганизмов, находящихся в прикорневой зоне с корнями высшего растения. При изучении взаимоотношения партнеров на разных уровнях организации живой материи существенная роль отводится такому типу взаимодействия, как обратимое избирательное связывание белков с углеводами, или лектиновому взаимодействию. В последние годы значительно возрос интерес к лектинам бактерий, играющим важную роль как в биологии микроорганизмов, так и во взаимоотношениях микро- и макропартнеров. В ассоциации «пшеница-*Azospirillum*» большой интерес представляют бактериальные лектины. Ранее с поверхности клеток *A. brasilense* Sp7 был выделен и охарактеризован фукозоспецифичный лектин. Был получен мутантный штамм, лектин которого отличался от лектина родительского штамма антигенными свойствами. Было показано, что лектины в различной степени участвуют в адгезии, прикреплении бактерий на корнях растений, влияют на

метаболизм растительной клетки - стимулируют прорастание семян, проявляют по отношению к растительной клетке митогенную и ферментмодифицирующую активности.

Одной из важнейших составляющих ответа растений на воздействие биогенных и абиогенных факторов (стрессоров) является накопление в клетках и тканях определенных метаболитов (активные формы кислорода, циклический аденозинмонофосфат, ионы кальция, оксид азота (NO) и др.). Многие из них являются ключевыми интермедиатами соответствующих сигнальных систем. Для корней проростков пшеницы бактерии рода *Azospirillum*, а следовательно и лектины являются биогенными факторами.

Проведенные исследования показали, что лектины *A. brasilense* Sp7 и Sp7.2.3 способны снижать количество цАМФ в корнях проростков пшеницы Саратовская 29 благодаря ингибирующему влиянию лектинов на аденилатциклазу. Добавление ионов кальция (1мМ CaCl₂) в среду инкубации лектинов с корнями приводило к резкому повышению содержания цАМФ, связанному с изменением взаимодействия лектинов с рецептором, следствием чего является активирование аденилатциклазы.

Лектины родительского и мутантного штаммов способны стимулировать быстрое образование перекиси водорода, связанное с повышением активности оксалатоксидазы и пероксидазы корней проростков пшеницы, но преимущественным и наиболее быстро индуцируемым путем образования перекиси является окисление щавелевой кислоты оксалатоксидазой.

Показано, что лектины родительского и мутантного штаммов вызывают два пика индукции синтеза оксида азота в корнях проростков пшеницы, происходящей через 3 и 26 ч совместной инкубации. Показано, что лектины в одинаковой степени усиливают синтез цитруллина в растительной клетке после 3-х часов воздействия, что свидетельствует о том, что лектины азоспирилл активируют продукцию оксида азота посредством NO-сигнальной системы растений.

Лектин *A. brasilense* Sp7 вызывал индукцию синтеза диацилглицерина (ДАГ) в корнях проростков в концентрации 40 мкг/мл через 40 мин совместной инкубации, в отличие от лектина мутантного штамма, который не проявлял индуктивной активности. При внесении в среду инкубации корней с лектинами кальция в виде CaCl₂ (1мМ) происходило усиление эффекта, оказываемого лектином родительского штамма и индукция образования ДАГ лектином мутантного штамма.

Результаты показали, что лектины мутантного и родительского штаммов обладают различной регулирующей активностью, несмотря на то, что имеют одинаковую углеводную специфичность. Обнаруженные эффекты, видимо, связано с конформационными различиями молекул лектинов и как следствие, различным взаимодействием с поверхностью растительной клетки.

Полученные данные свидетельствуют о способности лектинов азоспирилл выступать в качестве индукторов адаптационных процессов корней проростков пшеницы и важными для понимания механизмов взаимодействия микроорганизмов с корнями растений.

АЛЬДЕКЕЕВА А.С.^{1,2}, КОРНЕВА Н.А.², КЛЮЕВА Н.З.²

¹ УРАН Институт Физиологии им. И.П.Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБУН Институт Аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург, Россия

ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ мРНК NAP-22 В ПОЧКАХ У СПОНТАННО-ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ КРЫС (ЛИНИЯ SHR) И ИХ НОРМОТЕНЗИВНОГО КОНТРОЛЯ (ЛИНИЯ WKY) ПОД ВЛИЯНИЕМ СОЛЕВОЙ НАГРУЗКИ

Белок NAP-22 обнаруживается в различных органах при различных патологических состояниях, включая онкологические заболевания, сердечно-сосудистые нарушения и заболевания почек. Артериальная гипертензия (АГ), окончательно формирующаяся у крыс SHR после 8 недель, является главной причиной гипертензивной нефропатии и почечной недостаточности.

У таких крыс избыточное потребление соли оказывает неблагоприятное воздействие на сердечно-сосудистую систему, независимо от уровня артериального давления. При этом наблюдается резкое ухудшение функции почек, нарушению почечной гемодинамики, клубочковой динамики. В этом случае в развитии гипертензии основную роль играют задержка натрия и последующее увеличение объема внеклеточной жидкости.

Мы исследовали экспрессию мРНК NAP-22 у крыс SHR, для которых характерны генетически детерминированные нарушения обмена кальция в клетке, в сочетании с

длительной солевой нагрузкой, изменяющей фильтрационно-абсорбционную функцию почек. В качестве контроля использовали крыс WKY, у которых при достаточном поступлении экзогенного кальция не наблюдается повышенного артериального давления. У всех животных до начала действия солевой нагрузки и после нее измеряли артериальное давление (АД) манжеточным методом.

У крыс со спонтанной гипертензией уровень мРНК NAP-22 в почках исходно был достоверно выше, чем у крыс WKY. При солевой нагрузке у всех гипертензивных животных он достоверно снижался, при том, что уровень АД у них практически не изменялся.

У крыс WKY исходно уровень мРНК NAP-22 был ниже, и солевая нагрузка также снижала этот показатель, вплоть до полного исчезновения у некоторых животных. Одновременно у них наблюдалось повышение артериального давления до уровня средней гипертензии.

Видимо, у крыс WKY, в отличие от крыс SHR, имеющих низко-рениновую форму артериальной гипертензии, в почках имеются компенсаторные механизмы, защищающие клетки канальцев от повреждающего действия нарушений абсорбционно-фильтрационных процессов, которые могут привести к апоптозу, с развитием которого связана экспрессия белка NAP-22. У них также более эффективно функционирует система натрий-калиевой и натрий-кальциевой АТФ-аз и другие механизмы компенсации перегрузки цитозоля канальцевого эпителия натрием и кальцием.

В то же время солевая нагрузка запускала действие альдостерон-ренин-ангиотензиновой системы, результатом чего и был подъем артериального давления, которое через некоторое время возвращалось к норме.

Следовательно, у крыс SHR при солевой нагрузке более страдали внутриклеточные механизмы почечных структур, а у крыс WKY – системные механизмы регуляции артериального давления. Это следует учитывать при рассмотрении диетарных ограничений для разных форм артериальной гипертензии. Чем больше участие в патогенезе конкретной формы АГ генетически детерминированных нарушений клеточных механизмов, тем тяжелее последствия для организма повышения уровня поступления в организм ионов натрия, с одной стороны, и снижения поступления ионов кальция, с другой.

АМАГЗАЕВА Г.Н, ДАНИЛОВ М.Б, БАЖЕНОВА Б.А.

Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления,

Улан-Удэ, Россия

ОПТИМИЗАЦИЯ РЕЦЕПТУРЫ БЕЛКОВО-УГЛЕВОДНО-ЖИРОВОЙ КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ МЯСОПРОДУКТОВ

В настоящее время белково-углеводно-жировой композиции (БУЖК) нашли широкое применение в рецептурах мясных, молочных, кондитерских, масложировых продуктов. Использование таких систем в производстве колбасных изделий приобретает актуальность в связи с возможностью обеспечения максимального выхода продукта, повышения пищевой ценности и товарных показателей продукции.

Белково-углеводно-жировой композиции представляют собой многокомпонентные сложные дисперсные системы, свойства которых определяются, прежде всего, функциональными свойствами, характером взаимодействия и структурной совместимостью основных компонентов – белков, жиров и углеводов.

Целью работы явилась оптимизация состава белково-углеводно-жировой композиции с мукой из проросших зерен овса на основе математической модели. Критериями оптимальности служили соотношения белок:жир, белок:влага и водосвязывающая способность белково-жировой системы.

Анализ данных показывает, что мука из проросших зерен овса, как крахмалосодержащий компонент в рецептуре белково-углеводно-жировой композиции, содержит достаточно большое количество сахаров, белков и жиров. Кроме крахмала и сахаров в овсяной муке содержится значительное количество функциональных полисахаридов: целлюлоз, β -глюкана, гемицеллюлозы и пектина.

Для проведения расчета рецептур эмульсий была составлена экономико-математическая модель. Исходными данными служили содержание белка, жира, влаги, углеводов, а также водосвязывающая способность и соотношение белка к жиру.

Условия оптимального состава белково-жировой композиции в математической модели описывались в виде системы неравенств, в которые были введены следующие обозначения:

x_1 – фосфат;

x_2 – соевый белковый изолят;

x_3 – растительное масло + внутренний жир;

x_4 – вода;

x_5 – мука из проросших зерен овса;

При составлении математической модели рецептурной задачи учитывались химический состав композиции, значения соотношений белок:жир и белок:вода, функционально-технологические свойства компонентов. Выходная информация представляла количественное соотношение всех компонентов и оптимальные значения свойств композиции.

Комплексная модель рецептуры белково-углеводно-жировой композиции представлена следующей системой неравенств:

$$1. 8,0 \leq 92 x_2 + 37,9 x_3 + 11 x_5 \leq 11,0$$

$$2. 40,0 \leq 0,38 x_2 + 99,9 x_3 + 5 x_5 \leq 45,0$$

$$3. 40,0 \leq 5 x_2 + 0,1 x_3 + 100 x_4 + 10 x_5 \leq 45,0$$

$$4. 0,5 \leq 1,8 x_2 + 2,1 x_3 + 1,2 x_5 \leq 3,0$$

$$5. 4,0 \leq 1,1 x_2 + 60 x_5 \leq 10,0$$

$$6. 80,0 \leq 300 x_2 + 100 x_5 \leq 100$$

$$7. 4,0 \leq 242,1 x_2 + 2,2 x_5 \leq 5,0$$

Для упрощения неравенств были введены обозначения:

$$x = x_i / 100, \text{ где } i = 1 \div 5$$

В результате чего получили следующее условие получения единицы продукции:

$$x_1 + x_2 + x_3 + x_4 + x_5 = 1,0$$

Функции цели для белково-жировой композиции будут иметь следующий вид:

$$F_{ц1} (\text{белок:влага}) = 18,4 x_2 + 0,1 x_5 \Rightarrow \max$$

$$F_{ц2} (\text{стабильность}) = 87,8 x_2 + 92,8 x_5 \Rightarrow \max$$

При решении математической модели с помощью компьютерной программы получен оптимальный вариант: мука из зерен проросшего овса – 8,2 %; изолят соевого белка – 10,1%; подсолнечное масло + топленый внутренний жир яка – 39,4%; фосфаты – 1,6%; вода - 40,7%.

После составления оптимального варианта БУЖК были проведены исследования его функционально-технологических свойств. Результаты показали, что белково-

углеводно-жировая композиция обладает высокими водо- и жирудерживающими способностями. Новые белково-жировые композиции обогащены компонентами муки из проросших зерен овса.

Таким образом, в результате оптимизации состава белково-жировой композиции с мукой из проросших зерен овса на основе математической модели получен вариант, который обладает высокими функционально-технологическими показателями.

АМАХИН Д.В., ПОПОВ В.А., ВЕСЕЛКИН Н.П.

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук,
Санкт-Петербург, Россия*

ОСОБЕННОСТИ СУММАЦИИ ГАМК- И ГЛУТАМАТ-ОПОСРЕДОВАННЫХ МЕМБРАННЫХ ИОННЫХ ТОКОВ В НЕЙРОНАХ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ

В изолированных нейронах префронтальной коры головного мозга крысы методом пэтч-кламп в конфигурации «целая клетка» в условиях фиксации мембранного потенциала были исследованы особенности суммации ионных токов, вызываемых аппликациями нейромедиаторов ГАМК и глутамата.

Для регистрации ионных токов с помощью метода пэтч-кламп использовалось два различных пипеточных раствора: раствор на основе хлорида цезия и раствор на основе фторида цезия. Чувствительности нейронов к ГАМК и к глутамату отличаются при регистрации с использованием разных пипеточных растворов. Для ГАМК-опосредованных токов, концентрация половинного эффекта (EC50) ниже при регистрации с пипеточным раствором на основе хлорида цезия (0.048 ± 0.011 мМ (n=5) и 0.331 ± 0.087 мМ (n=5), для растворов на основе хлорида и фторида цезия, соответственно). Для глутамат-опосредованных токов, наоборот, EC50 ниже при регистрации с раствором на основе фторида цезия (1.072 ± 0.087 мМ (n=5) и 0.273 ± 0.068 мМ (n=6), для хлорида и фторида цезия, соответственно).

Для исследования особенностей суммации ионных токов производились совместные аппликации ГАМК и глутамата. Ответы также регистрировались с применением двух различных пипеточных растворов. При регистрации с применением раствора на основе хлорида цезия, пиковая амплитуда тока, вызванного совместной аппликацией ГАМК (200 мкМ) и глутамата (200 мкМ), совпадала с пиковой амплитудой тока, вызванного аппликацией одной только ГАМК (-0.543 ± 0.062 нА (n=5) и -0.551 ± 0.072 нА (n=5), соответственно). Но по мере десенситизации ответов расхождение увеличивалось, и через 15 секунд от начала аппликации наблюдалось полное отсутствие окклюзии (отношение амплитуды ответа на совместную аппликацию ГАМК и глутамата к сумме ответов на отдельные аппликации этих веществ составляло 1.002 ± 0.029 (n=3)).

В случае применения пипеточного раствора на основе фторида цезия, ответ на совместную аппликацию глутамата (200 мкМ) и ГАМК (200 мкМ) практически совпадал с арифметической суммой индивидуальных ответов (отношение амплитуды ответа на совместную аппликацию к арифметической сумме индивидуальных ответов составляло 0.977 ± 0.022 (n=5)). Но при действии этих нейромедиаторов в насыщающих концентрациях (5 мМ), регистрируемый ответ на совместную аппликацию был достоверно меньше, чем ответ на аппликацию только ГАМК. Амплитуда токов, вызванных аппликацией ГАМК (5 мМ) составляла -2.754 ± 0.456 нА (n=8), тогда как совместная аппликация ГАМК (5 мМ) и глутамата (5 мМ) приводила к возникновению тока с амплитудой -2.355 ± 0.392 нА (n=8).

Полученные предварительные результаты подчеркивают важность учета состава пипеточного раствора при проведении исследований методом пэтч-кламп и позволяют предположить наличие молекулярного механизма взаимодействия между ГАМК_A- и ионотропными глутаматными рецепторами (АМПА и кайнатными). По-видимому, присутствие ионов фтора внутри клетки снижает возможность реализации данного механизма.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 11-04-00868 и программы Президиума РАН «Механизмы физиологических функций».

АМЕЛЯКИНА М.В., РИМАРЕВА Л.В., СТЕПАНОВ В.И., ИВАНОВ В.В.

Всероссийский научно-исследовательский институт Пищевой Биотехнологии

Россельхозакадемии, Москва, Россия

ВЛИЯНИЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ НА СВОЙСТВА ЗЕРНОВОГО СУСЛА В КОМПЛЕКСНОЙ ТЕХНОЛОГИИ СПИРТОВОГО ПРОИЗВОДСТВА

Известно, что одной из задач спиртового производства является интенсификация процесса брожения. Применение амилолитических ферментов способствует интенсивному гидролизу крахмала, но не обеспечивает дрожжи в полной мере азотистым питанием, которое необходимо для их нормального развития и протекания стабильного процесса брожения. Воздействие протеаз на белковые вещества зернового сусла повышает эффективность его гидролиза, обогащает среду легкоусвояемыми аминокислотами и углеводами, что способствует повышению физиологической активности дрожжевых клеток, интенсификации процесса брожения и увеличению выхода целевого продукта.

С целью проверки влияния протеаз на эффективность разделения концентрированного зернового сусла и на его динамическую вязкость провели исследования с различными режимными параметрами.

В работе применялись бактериальная и грибная протеазы: источник бактериальной протеазы - Максазим NP (1000 ед ПС/г), грибной протеазы – GC 106 (500 ед/г). В качестве контрольного варианта использовали зерновое сусло с концентрацией растворимых сухих веществ 33%, приготовленное по одностадийной экструзионно–гидролитической технологии и осахаренное амилолитическими ферментами. В опытных вариантах на стадии осахаривания добавляли источник бактериальной протеазы (БПС), концентрация которого варьировала от 0,05 до 0,5 ед ПС/г сырья. В дальнейшем сусло разделяли центрифугированием на твердую (осадок) и жидкую фракцию (осветленное сусло). Осветленное сусло дополнительно обрабатывали грибной протеазой (ГПС), чтобы повысить степень деструкции белковых веществ.

При увеличении дозировки бактериальной протеазы (БПС) происходит накопление растворимого белка и аминного азота в сусле, что указывает на расщепление белковых веществ сусла с образованием пептидов с различной молекулярной массой. Однако увеличение дозировки в 3 раза с 0,05 ед. до 0,15 ед. ПС/г сырья не приводит к

существенному увеличению концентрации растворимого белка и пептидов в сусле, следовательно, достаточно 0,15 ед.ПС/г сырья бактериальной протеазы.

Внесение грибной протеазы (0,25 ед ПС/г сырья) в осветленное сусло позволило повысить концентрацию аминного азота почти в 2 раза. По-видимому, это связано с наличием в составе грибного протеолитического комплекса активных пептидаз, катализирующих расщепление белка и пептидов до аминокислот. Таким образом, обработка осветленного сусла грибной протеазой позволяет обеспечить дрожжи азотистым питанием.

На следующем этапе исследовали влияние протеаз на вязкость осахаренного сусла и эффективность его разделения на твердую и жидкую фракции. В опытном варианте на стадии осахаривания был добавлен источник бактериальной протеазы (БПС) из расчета 0,15 ед ПС/г сырья.

Присутствие протеазы в цельном зерновом сусле при его центрифугировании обеспечивает повышение количества отделяемого осветленного сусла на 44%.

Кроме того, внесение бактериальной протеазы в зерновое сусло с концентрацией растворимых сухих веществ 33% оказывало некоторое влияние и на реологические свойства сусла: его вязкость снижалось на 11 %.

С внесением бактериальной протеазы в цельное зерновое сусло, при разделении его на фракции, содержание растворимых сухих веществ в осадках практически не изменилось. Однако уже после первой промывки осадка содержание РСВ снизилось и составило 29%, в то время как в осадке из сусла, не обработанном протеазой, содержание РСВ было на уровне 36%. Снижение содержания РСВ в осадке свидетельствует о том, что в осветленное сусло по предлагаемой технологии переходит более 70% растворимых сухих веществ, представляющих собой, в основном, сбраживаемые углеводы и белковые вещества, необходимые для жизнедеятельности дрожжей.

Таким образом, полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что использование протеолитических ферментов для обработки цельного сусла позволяет снизить его вязкость на 11 % и увеличить эффективность отделения осветленного сусла на 44 %, обеспечить снижение содержания растворимых сухих веществ в твердом осадке с 85 % до 29%, получать осветленное сусло, обогащенное растворимыми углеводами и белковыми веществами.

АМИРХАНОВ Р.Н.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,

Новосибирск, Россия

Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

**РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ИММОБИЛИЗАЦИИ
ПЕПТИДНО-НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ НА НАНОЧАСТИЦЫ ДИОКСИДА
ТИТАНА И КОЛЛОИДНОГО ЗОЛОТА**

Антисмысловые олигонуклеотиды (АОН) являются перспективными препаратами для молекулярной диагностики и терапии различных вирусных и раковых заболеваний, связанных с изменением уровня экспрессии определенных генов в клетке. В большинстве способов доставки АОН в живые клетки, доступность АОН к нуклеиновым кислотам (НК) мишеням ограничена возникновением эндосомных компартментов. Последние образуются в процессе эндоцитоза, т.е. процесса захвата внешнего материала (в данном случае модифицированного АОН) клеткой, осуществляемого путём появления мембранных везикул.

Альтернативный способ проникновения АОН в клетки осуществляется по механизму порации, т.е. когда НК проникают в клетки через поры, образованные в клеточной мембране, в процессе какого-либо физического или химического воздействия на мембрану клетки. Например, некоторые «тяжелые» наночастицы при умеренных дозах могут вызывать обратимые повреждения в клеточной мембране за счет своей кинетической энергии. В качестве таких наночастиц могут быть использованы наночастицы коллоидного золота. Оптимальный размер наночастиц в этом случае должен быть порядка 4-6 нм. Наночастицы диоксида титана TiO_2 , в качестве другого примера, способны образовывать обратимые повреждения в клеточных мембранах за счет окислительно-восстановительных реакций, протекающих на поверхности наночастиц с образованием и участием гидроксильных радикалов, как в присутствии, так и в отсутствии облучения. Таким образом, наночастицы TiO_2 и коллоидного золота могут быть использованы в качестве эффективных средств доставки АОН в клетки, исключая образование эндосомных компартментов.

Перспективными соединениями в качестве АОН являются пептидно-нуклеиновые кислоты (ПНК). ПНК – аналоги ДНК, в которых сахарофосфатный остов ДНК заменен псевдопептидным. ПНК, в отличие от ДНК или РНК, формируют более стабильные дуплексы с нуклеиновыми кислотами и устойчивы к действию клеточных нуклеаз.

В настоящей работе приведены способы иммобилизации антисмысловых ПНК на наночастицы двуокиси титана и на наночастицы коллоидного золота в виде гибридных ДНК/ПНК дуплексов. Показано, что в случае TiO_2 наночастиц антисмысловые ПНК могут быть обратимо присоединены к TiO_2 частицам (предварительно обработанных полилизинном или другим поликатионом) в виде комлементарных ДНК/ПНК дуплексов. В случае использования наночастиц коллоидного золота подобраны оптимальные условия иммобилизации ПНК в виде гибридного ДНК/ПНК дуплекса, при которых иммобилизация ПНК не приводит к агрегации и коагуляции наночастиц золота в коллоидном растворе даже при высокой ионной силе раствора.

Работа поддержана интеграционным грантом СО РАН № 61, РФФИ № 08-04-01045-а.

АНАНЬИНА Л.Н., ПЛОТНИКОВА Е.Г.

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук,
Пермь, Россия*

ГАЛОФИЛЬНЫЕ БАКТЕРИИ СЕМЕЙСТВА *HALOMONADACEAE* РАЙОНА ПРОМЫШЛЕННОЙ РАЗРАБОТКИ ВЕРХНЕКАМСКОГО МЕСТОРОЖДЕНИЯ СОЛЕЙ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ОБЪЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

В настоящее время особое внимание уделяется изучению бактерий «экстремальных» экосистем в связи с их высоким биотехнологическим потенциалом. Примером «экстремальной» экосистемы является район промышленной разработки Верхнекамского месторождения калийно-магниевых солей Пермского края. Поскольку при извлечении и складировании на поверхности отходов производства, основным компонентом которых является галит (более 90% NaCl), специфическим загрязнителем

этой экосистемы становится засоление (Ерёмченко и Лымарь, 2007). Исследования биоразнообразия микробоценоза и функциональных свойств бактерий района солеразработки, проводимые нами более десяти лет, позволили выделить галотолерантные бактерии-деструкторы (моно)полициклических ароматических углеводов (Плотникова и др., 2001; 2006; 2011; Ястребова и др., 2009; Anan'ina et al., 2011) и галофильные бактерии, в том числе более 50 изолятов родов *Salinicola* (Ананьина и др., 2007), *Chromohalobacter*, *Halomonas*, *Kushneria* семейства *Halomonadaceae*.

Широко распространенные в микробоценозах засоленных экосистем разных эколого-географических зон, характеризующихся различными физико-химическими свойствами, бактерии сем. *Halomonadaceae* заслуживают особого внимания (Arahal and Ventosa, 2006). Бактерии этой таксономической группы не требуют сложных питательных сред и условий культивирования, обладают рядом применимых в биотехнологии свойств. Известны бактерии сем. *Halomonadaceae*, продуцирующие внеклеточные гидролитические ферменты: протеазы, амилазы, липазы, ДНКазы, имеющие достаточно разные возможные варианты использования в различных областях, таких как ферментация продуктов питания, производство кормовых добавок, биомедицина и химическая промышленность (Sa'nchez-Porro et al., 2003). В связи с вышесказанным, выделенные нами бактериальные культуры были проверены на способность продуцировать внеклеточные гидролитические ферменты. В ходе скрининга были выявлены штаммы гидролизующие желатин, а также два штамма *Salinicola* sp. BA1 и *Salinicola socius* SMB35, обладающие протеазной, амилазной и липазной активностями и сохраняющие их при культивировании в присутствии 10% хлорида натрия.

Одно из перспективных направлений биотехнологии - это использование представителей сем. *Halomonadaceae* в качестве продуцентов низкомолекулярных органических соединений — осмолитов (совместимые вещества). Основным осмолитом, накапливаемым клетками галомонад в ответ на гиперосмотический стресс, является эктоин (Ventosa et al., 1998; Roberts, 2005). Высокая совместимость с биологическими системами, отсутствие токсичности, стабилизирующие макромолекулы (ферменты, ДНК и РНК, мембраны) свойства и общее клеткозащитное действие делают эктоин многообещающим кандидатом для применения в различных биотехнологических целях. В настоящее время наиболее широкое практическое применение эктоин находит в

косметической промышленности (в частности, в средствах по уходу за кожей). Кроме того, особый интерес представляет направление использования эктоина в фармацевтической промышленности и медицине - для консервации биологического материала и увеличения сроков сохранности и эффективности лекарственных препаратов (Lentzen and Schwarz, 2006). Выделенные нами штаммы были изучены на способность синтезировать эктоин. На первом этапе работ был осуществлен скрининг изолятов путем детекции *ect*-генов, кодирующих ферменты синтеза эктоина, с использованием вырожденных праймеров (Ананьина и Плотникова 2011). Амплификация привела к наработке ПЦР-продукта у более 30 штаммов родов *Salinicola*, *Chromohalobacter*, *Halomonas* и *Kushneria*. Для подтверждения амплификации нужного фрагмента проведено прямое секвенирование ампликонов с использованием разработанных праймеров на автоматическом секвенаторе Genetic Analyzer 3500xl («Applied Biosystems», США). Последующий сравнительный анализ полученных нуклеотидных последовательностей с депонированными в публичных базах *ect*-генами с помощью программы Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) выявил более чем 80% гомологии. На втором этапе определяли внутриклеточную концентрацию эктоина методом ВЭЖХ (Ешинимаяев и др., 2007) у изолятов, на матрице ДНК которых был получен специфический продукт амплификации *ect*-генов. Установлено, что концентрация эктоина варьировала в зависимости от штамма в пределах 0,18-0,67 мкмоль мг⁻¹ сухого веса. Наиболее высоким внутриклеточным содержанием эктоина характеризовались штаммы рода *Salinicola*.

Таким образом, путем скрининга выделенных из района промышленной разработки Верхнекамского месторождения солей (Пермский край) бактерий сем. *Halomonadaceae* были выявлены штаммы, перспективные для использования в биотехнологических целях.

Работа поддержана научным проектом молодых ученых УрО РАН №11-4-НП-425 и программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» №01201256872.

АНАНЬКО Г.Г., ТЕПЛЯКОВА Т.В.

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

НОВЫЕ МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ СПОР ГРИБОВ-ГЕЛЬМИНТОФАГОВ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА БИОНЕМАТИЦИДОВ НА ИХ ОСНОВЕ

Фитопатогенные нематоды поражают практически все виды культурных растений, что приводит к ежегодным потерям около 10% мировой продукции растениеводства. В 50-70-х гг. 20 в. проблема решалась с помощью химических нематицидов. Сегодня в развитых странах многие химические нематициды запрещены к использованию из-за высокой токсичности. Поэтому необходимость разработки альтернативных методов контроля численности фитопатогенных нематод не вызывает сомнений. Хорошей альтернативой химическим нематицидам могут служить биологические средства защиты растений.

Выбор группы хищных грибов в качестве наиболее перспективных биоконтрольных агентов обусловлен рядом причин: хищные грибы уничтожают только нематод и не представляют опасности для других организмов; они легко культивируются на обычных питательных средах, что позволяет наладить их масштабное производство. Такой хищный гриб как *Duddingtonia flagrans* не специализирован, т.е. может уничтожать широкий спектр различных видов нематод, паразитирующих на растениях и животных, что делает потенциальный рынок препаратов на их основе чрезвычайно обширным. Хламидоспоры *D. flagrans* способны годами сохранять жизнеспособность, следовательно, препараты на их основе удовлетворяют современным требованиям по срокам хранения готовых биопрепаратов. В задачи нашего исследования входил поиск факторов, стимулирующих спорообразование у *D. flagrans*, и разработка эффективных методов получения хламидоспор, используемых в качестве основы бионематицида.

Известные технологии были рассчитаны на производство небольших партий грибных нематицидов в условиях биологических лабораторий при тепличных комбинатах и станциях защиты растений, которые функционировали во многих регионах Советского Союза. Технологии достаточно простые, чтобы их можно было реализовать на ограниченном наборе технологического оборудования, которым располагали биологические лаборатории. Однако с современной точки зрения, традиционные технологии обладают рядом недостатков:

высокие затраты ручного труда (грибы выращивали в 2 – 3-х литровых банках); большая продолжительность производственного цикла (4 – 6 недель); колебания качества различных партий биопрепарата из-за нестандартности субстратов и контаминации посторонними микроорганизмами. Производственный цикл включает выращивание инокулюма и собственно получение спор на поверхности твердого субстрата. В традиционной схеме производства грибных препаратов, с точки зрения затрат времени, лимитирующими являются стадии выращивания посевного материала (1 – 2 недели) на агаризованной среде или зерне и получение спорового препарата на частицах твердого органического субстрата (2 – 4 недели).

Мы предлагаем выращивать инокулюм в глубинной культуре, на качалке или в биореакторе, в зависимости от требуемых объемов. В хорошо перемешиваемой глубинной культуре мицелий лучше снабжается кислородом и питательными веществами, затраты времени на приготовление инокулюма сокращаются до 1 – 2-х суток. В известных технологиях на второй стадии, собственно получения спорового препарата, используют твердые органические субстраты, выполняющие одновременно функции носителя и источника питания. Мы разделили эти две функции: в качестве носителя мы первые использовали частицы вспученного вермикулита, пропитанные питательной средой на основе растворимых источников углерода и азота (мелассы и кукурузного экстракта). Выбор обусловлен высокой водоемкостью вспученного вермикулита, до 4 мл воды на 1 г. В предлагаемой нами технологии на вспученный вермикулит сразу наносится достаточное количество вегетативного мицелия (инокулюма), выращенного в глубинной культуре, а также растворимых добавок, необходимых для процесса спорообразования. Мицелий, нанесенный на поверхность носителя, продуцирует хламидоспоры за минимально необходимое время (4 суток), при этом исключаются затраты времени на выращивание самого мицелия. На нерастворимых субстратах (например, крахмал, мука) процесс формирования хламидоспор замедляется в 3 – 4 раза, так как основное время тратится на предваряющие стадии: расщепление полимерных субстратов и рост мицелия.

Таким образом, разработанная нами технология (патент РФ № 2366178) позволяет в 4 – 6 раз ускорить процесс получения хламидоспор на поверхности носителя (вспученного вермикулита), в сравнении с традиционной схемой.

АНАНЬКО Г.Г., ИБРАГИМОВА Ж.Б., МАЗУРКОВА Н.А., ТЕПЛЯКОВА Т.В.

Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ХИЩНЫХ ГРИБОВ-ГИФОМИЦЕТОВ В ПРОИЗВОДСТВЕ ПРОТИВОПАРАЗИТАРНЫХ И ПРОТИВОВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Хищные грибы-гифомицеты выделяют широкий спектр биологически активных веществ – ферментов, аттрактантов, токсинов, участвующих в процессах жизнедеятельности нематофагов, в том числе в механизме хищничества при формировании ловушек на мицелии (Раджабова А.А., 1971; Беккер З.Э., 1972; Теплякова Т.В., 1999). Данные грибы изучались нами с целью разработки биопрепаратов для защиты растений и животных от паразитических нематод. На два штамма, проявляющих высокий нематофаговый эффект были получены патенты: *Arthrobotrys oligospora* ВКМ F-3062 (а.с. СССР 1688818, 1991) и *Duddingtonia flagrans* F-882 (патент РФ 2253671, 2005).

Задачами данной работы были: получение биомассы нематофаговых грибов в условиях погруженной ферментации с помощью вихревого реактора «БИОК» (ЗАО Саяны, Новосибирск) объемом 5 л; изучение биологической активности мицелия и экстрактов из него в отношении паразитических нематод животных и некоторых вирусов, патогенных для человека.

В ходе проведенных исследований получены следующие результаты. Оптимальная доза для засева качалочных колб с пробирок с целью получения жидкого инокулюма для засева биореактора составляет 4 мл на 100 мл среды (1:25) с титром грибных пропагул в 1мл 5×10^4 . Полученный на качалке в течение 2-х суток инокулюм начинает расти в биореакторе практически сразу и за 1 сутки концентрация биомассы увеличивается в 11 раз. Ускорению процесса роста культуры за счет сокращения лаг-фазы способствует высокое содержание относительно молодого мицелия в инокулюме, а также использование одинаковой по составу питательной среды на основе мелассы и кукурузного экстракта для выращивания культуры в колбах и в биореакторе. Содержание биомассы по сухому веществу у грибов *Duddingtonia flagrans* и *Arthrobotrys oligospora* за 4 суток роста в

биореакторе достигало значения 12-18 г/л. При изучении микроморфологии мицелия в динамике установлено, что о готовности биомассы *D. flagrans* свидетельствует формирование к третьим суткам роста в биореакторе многочисленных спиралевидных гиф, отмеченных ранее в условиях качалочной культуры. У гриба *Arthrobotrys oligospora* в этот же период отмечались на гифах спонтанно формирующиеся петли и кольца, характерные для данного штамма.

Эксперименты, проведенные *in vitro* на гельминтах животных рода *Syphacia*, выделенных из слепого отдела кишечника лабораторных мышей, показали, что уже на 2-3 сутки мицелий исследуемых штаммов пронизывает тела нематод и разрастается внутри них. При этом многочисленные яйца самок изменяют свою первоначальную структуру, что, вероятно, связано с воздействием на них токсических соединений грибов. Позднее было подтверждено электронно-микроскопическими исследованиями, что под влиянием биологически активных соединений хищных грибов нарушается структура клеток всех органов и тканей гельминтов мышей (Теплякова Т.В. и др., 2005).

Водные экстракты, полученные нами из биомассы хищных грибов, были протестированы на перевиваемых клеточных культурах MDCK и Vero, а также на лабораторных мышах в отношении ряда патогенных для человека вирусов. В результате исследований было установлено, что все исследуемые образцы были нетоксичными или малотоксичными для клеточных культур MDCK и Vero.

Образцы на основе мицелия *Arthrobotrys oligospora* подавляли репликацию вируса гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) на клетках MDCK, индекс нейтрализации составил от 2,5-4,1 lg, в отношении вируса гриппа человека A/Aichi/2/68 (H3N2) – 3,7-4,4 lg.

Образцы на основе *Duddingtonia flagrans* подавляли вирус гриппа птиц на 3,6-4,9 lg, а гриппа человека на 4,2-5,4 lg. Нейтрализация вируса осповакцины в культуре клеток Vero составила для образцов на основе гриба *Arthrobotrys oligospora* от 0,2 до 2,2 lg, а для образцов на основе гриба *Duddingtonia flagrans* от 1,7 до 2,2 lg.

В экспериментах *in vivo* при определении противовирусной активности грибных экстрактов на основе биомассы хищного гриба *Duddingtonia flagrans* обнаружен выраженный защитный эффект в отношении вируса гриппа человека A/Aichi/2/68 (H3N2) и вируса экстремелии К-1 (оспы мышей).

Полученные данные свидетельствуют о перспективах получения противопаразитарных и противовирусных препаратов на основе активных штаммов нематофаговых грибов.

АНДРЕЕВА И.Н., АЛЯБЬЕВ А.Ю., РАХМАТУЛЛИНА Д.Ф., ОГОРОДНИКОВА Т.И.
*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки "Казанский институт биохимии и биофизики" Казанского научного центра Российской академии наук,
Казань, Россия*

АБИОТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ КАК РЕГУЛЯТОР ЭНЕРГООБМЕНА РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ

Окружающая среда оказывает существенное влияние на энергообмен растительной клетки. Поддержание клеточного гомеостаза требует существенных энергетических затрат ("цена адаптации").

Одноклеточные микроводоросли представляют собой полноценный растительный организм и могут рассматриваться как модельный объект – одиночная растительная клетка (культура растительных клеток). Изучение условий, влияющих на рост и физиологическую активность *Chlorella vulgaris* и *Dunaliella maritima*, имеет и самостоятельное значение, как с точки зрения экологии (одноклеточные микроводоросли – важный компонент природных биоценозов), так и для биотехнологии (производство биомассы, физиологически-активных веществ, биотоплива). Сопоставление энергодающих процессов (дыхания и фотосинтеза) и тепловыделения клетки позволяет суммарно оценивать энергетический баланс клетки, а также реакцию клетки на факторы окружающей среды. К важнейшим характеристикам среды обитания водных растений относится засоление, изменение рН и осмотичности.

Повышение концентрации хлористого натрия в ростовой среде, от 0,5 М в контроле до 1,5-2 М, усиливает дыхание, фотосинтез и тепловыделение галотолерантной *D.maritima*, что свидетельствует об активации метаболизма водоросли и как следствие - адаптация к действию стресс-фактора. Пресноводная водоросль хлорелла на слабое засоление, 0,1-0,15 М, также отвечает усилением дыхания и тепловыделения, однако, при более высоких концентрациях соли, 0,2 М и выше, адаптационные возможности клетки исчерпываются,

что проявляется в снижении скорости дыхания и тепловыделения. Фотосинтез хлореллы снижается уже при минимальном засолении.

Концентрация H^+ , как фактор среды, представляет особый интерес, так как трансмембранный градиент протонов, равно как и трансмембранный электрохимический потенциал является важнейшим фактором энергетики клетки. В процессе жизнедеятельности микроводорослей существенно изменяется рН культуральной жидкости (в темноте - подкисление, а на свету при интенсивном фотосинтезе – защелачивание), что позволяет рассматривать этот показатель как фактор саморегуляции на уровне популяции водоросли.

Подкисление растущей культуры микроводорослей с помощью HCl, (для *S. vulgaris*: от рН 10,5-11,5 до 8-9; для *D.maritima*: от 9-9,5 до 7-7,5) усиливает тепловыделение и фотосинтез. Увеличению выделения кислорода на 30-40% и выше фиксируется как по газообмену, так и прямым измерением запасания световой энергии фотомикрокалориметрическим методом. Наблюдаемое повышение интенсивности фотосинтеза сохраняется от 30-40 минут до 2-3 часов, в зависимости от скорости восстановления исходной величины рН.

Повышение интенсификация фотосинтеза, вызываемое подкислением культуральной жидкости, осуществляется через гиперполяризацию цитоплазматической мембраны (увеличение градиента протонов) и образование при этом дополнительного АТФ. Избыток АТФ в цитоплазме может стимулировать фотосинтетическую активность хлоропластов.

Подщелачивание культуры водорослей (внесением NaOH), сопровождается деполяризацией цитоплазматической мембраны клетки и приводит к временному (от 30-40 минут до 3-4 часов) торможению фотосинтетического выделения кислорода.

Внесение в растущую культуру изучаемых микроводорослей NaCl с одновременным ее подкислением, снимает стимулирующий эффект подкисления, что является, как мы полагаем, следствием деполяризации плазматической мембраны, возникающей в каскаде ответных реакций клетки на засоление. Представляет интерес тот факт, что подкисление культуры водорослей спустя 1-1.5 часа после внесения NaCl, (после стабилизации клетки к засолению), вызывало повышение интенсивности фотосинтеза (т.е. проявляется реакция, подобная таковой у контрольных водорослей).

Таким образом, микрокалориметрия (темновая и световая) в сочетании с измерением газообмена, представляет перспективный подход экологического мониторинга и оценки энергетической эффективности культивирования микроводорослей. Показана принципиальная возможность интенсификации фотосинтетической активности фотосинтезирующих культур в производственных условиях посредством регулирования рН культуры.

АНДРЕЕВА И.С., САФАТОВ А.С., БУРЯК Г.А., ОЛЬКИН С.Е., КАРЯЧКИНА О.С.

Федеральное бюджетное учреждение науки

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «ВЕКТОР»,

пос. Кольцово, Новосибирская область, Россия

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ОБРАЗЦОВ ВОДЫ ГОРЬКО-СОЛЕННЫХ ОЗЕР КУЧУКСКОЕ И БОЛЬШОЕ ЯРОВОЕ (АЛТАЙСКИЙ КРАЙ)

Содовые и соленые озера распространены во внутриконтинентальных аридных районах. По своим характеристикам содово-соленые озера относятся к экстремальным системам из-за высокой минерализации (от 10 до 360 г/л) и щелочности (от 1,5 до 450 г/л), рН (от 9 до 11). Алкалофильные сообщества содовых озер исследуются с повышенным интересом как биотехнологически важные агенты и как биохимически своеобразные организмы, существующие в условиях избытка натрия, высокого рН и ограниченной доступности ряда элементов, играющие важную роль центра формирования наземной биоты и микробного разнообразия. В рамках комплексного экологического исследования совместной экспедицией ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», ИХКиГ СО РАН и ИВЭП СО РАН проведено микробиологическое исследование образцов воды и аэрозолей воздуха прибрежной территории горько-соленых озер Алтайского края - Кучукского (Славгородский район) и Большого Яровое (Благовещенский район). Питательные среды, используемые для выделения микроорганизмов, отличались составом, диапазоном рН (от 7,0 до 9,0) и солевой нагрузкой (от 1 до 5 % NaCl 5%). Поскольку исследуемые озера активно используются в оздоровительных целях и имеют высокую антропогенную нагрузку, образцы воды и аэрозолей были высеяны также на селективные среды (Эндо,

Плоскирева, висмут-сульфитный агар, среду для энтерококков, РПА с 10% NaCl и др.) для обнаружения патогенных микроорганизмов. Выделенные при этом чистые культуры были тестированы на наличие косвенных признаков патогенности и устойчивость к антибиотикам. Высевы инкубировали при температуре 30°С в течение 3-20 дней.

Определение морфологических и биохимических признаков выделенных микроорганизмов проводили согласно стандартным методикам. Концентрацию микроорганизмов в пробах определяли, подсчитывая выросшие изолированные колонии (КОЕ – колониобразующие единицы), при усреднении 2 параллелей высевок на 4-5 различных питательных средах. Наличие факторов патогенности определяли известными косвенными методами, устойчивость к антибиотикам - с помощью аппликации дисков с антибиотиками производства НИЦФ (Санкт-Петербург, Россия) на поверхность питательного агара, засеянного испытуемым микроорганизмом.

Результаты посева образцов аэрозолей воздуха, взятых над поверхностью озер Большое Яровое и Кучукское, показали, что количество обнаруживаемых колоний существенно зависит от значения pH используемой питательной среды: при pH 7,0 обнаружены единичные колонии, при pH 9,0 количество выявляемых бактерий составляло $1,7 \times 10^4$ КОЕ/м³, грибов – $4,3 \times 10^3$ КОЕ/м³. Для образцов воды из озер ситуация была аналогичной: наибольшая численность выделенных микроорганизмов была показана на питательном агаре со значением pH 9,0: составляла для разных образцов от $4,0 \times 10^3$ до $1,5 \times 10^4$ КОЕ/мл. Обнаруженные микроорганизмы были представлены спорообразующими и неспороносными бактериями, включая актиномицеты, их численное соотношение было сходно с литературными данными, имеющимися для микробиоты соленых содовых озер. Наблюдалось большое количество пигментированных микроорганизмов, что также характерно для микробного населения озер исследуемого типа. Следует отметить, что на среде Сабура со значением pH 5,4, кроме колоний плесневых грибов с численностью в среднем 2,8 КОЕ/мл образца выросло большое количество мельчайших бактериальных колоний (до $2-7 \times 10^3$ КОЕ/мл), не пересеваемых при последующих пассажах. В дальнейшем было выделено и охарактеризовано 152 чистых культуры. Среди выделенных микроорганизмов многие обладали высокоактивными внеклеточными щелочными амилазами, обуславливающими способность к утилизации растительных остатков. Были обнаружены также бактерии с высоким уровнем секреции полисахаридов, перспективные

для биотехнологических разработок. На селективных средах для обнаружения патогенов выделено 32 культуры. Идентификация и тестирование косвенными методами на наличие признаков патогенности не подтвердили их принадлежности к искомым родам, таким как *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Enterobacter* и некоторым другим. Все штаммы, выделенные на упомянутых селективных средах, в условиях опыта не проявили признаков патогенности. По отношению к антибиотикам большая часть изолятов представлена полирезистентными штаммами.

АНДРЕЕВА Л.Ю.¹, СИНИЦЫН П.Г.¹, СЕВЕРИН Ф.Ф.², ДМИТРИЕВ С.Е.²

¹Факультет биоинженерии и биоинформатики,

²НИИ Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского

Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,

Москва, Россия

АНАЛИЗ ФЕНОТИПА *S. CEREVISIAE* С ИЗМЕНЁННЫМ УРОВНЕМ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *TMA64*

Одним из ключевых факторов инициации трансляции у эукариот является ГТФаза eIF2. При классическом механизме инициации трансляции eIF2 в комплексе с ГТФ доставляет Met-тРНК_i в Р-сайт 40S рибосомной субчастицы и участвует в последующем сканировании 5'-нетранслируемой области. В условиях клеточного стресса eIF2 фосфорилируется, что приводит к драматическому падению общего уровня трансляции. Тем не менее, некоторые мРНК продолжают транслироваться, следовательно, существуют альтернативные механизмы доставки тРНК в Р-сайт.

Фактор инициации eIF2D, открытый недавно в нашей лаборатории, тоже способен располагать тРНК в Р-сайте 40S субчастицы – однако, в отличие от eIF2, он может работать не только с Met-тРНК_i, но и с элонгаторными и даже с деацелированными тРНК. В системе *in vitro* человеческий eIF2D способен заменить eIF2 в образовании 48S инициаторного комплекса с мРНК, инициация трансляции которых не требует сканирования 5'-НТО (безлидерной мРНК, мРНК с IRES-элементом вируса HCV и др.)

Однако функция eIF2D в живой клетке, а также клеточные мРНК и условия, при которых eIF2D может участвовать в трансляции, до их пор неизвестны.

Ортолог человеческого фактора eIF2D в дрожжах *S. cerevisiae* – TMA64. Известно, что ген *TMA64* индуцируется между фазами MI и MII при мейозе (в процессе споруляции). Нокаут $\Delta tma64$ жизнеспособен, но чёткие данные о его фенотипических проявлениях отсутствуют. Данные об эффективности споруляции штамма $\Delta tma64$ также противоречивы.

В работе исследовался фенотип *S. cerevisiae* с различным уровнем экспрессии гена *TMA64*. Для исследования были получены штаммы SK1 *S. cerevisiae* с нокаутом гена *TMA64* и с его оверэкспрессией на основе плазмиды pYES2. В ходе работы было показано влияние нокаута *TMA64* на скорость роста дрожжей, причём влияние оказалось позитивным: в среде YPD при 30°C скорость роста диплоидов, содержащих нокаут (время удвоения 1,8 часа), превышает скорость роста диплоидов дикого типа (время удвоения 2 часа). В то же время для гаплоидных штаммов скорость роста оказалась одинаковой. Такая зависимость проявления фенотипа от пloidности может говорить об участии данного белка в процессах, связанных с гомологичной рекомбинацией при репарации ДНК. Кроме того, оказалось, что эффект нокаута *TMA64* на рост диплоидов зависит от условий культивирования дрожжей: при замене в среде источника углерода с глюкозы на ацетат калия диплоидные штаммы *wt* и $\Delta tma64$ показали одинаковую скорость. Было также обнаружено изменение морфологии колоний в ответ на отсутствие гена *TMA64*: колонии SK1 дикого типа имели уплощённую форму с широким краем (меньшее число клеток было расположено в центре колонии, большее – на периферии, что для SK1 является нормой при ограничении питательных веществ), в то время как штамм $\Delta tma64$ образовывал округлые выпуклые колонии. Можно предположить, что TMA64 участвует в отрицательном контроле клеточного цикла при неблагоприятных условиях среды – в частности, в ответе на глюкозное голодание или на повреждение ДНК.

Оверэкспрессия гена *TMA64* привела к драматическому снижению скорости роста дрожжей и к изменению морфологии клеток (увеличению линейных размеров клеток в 1,5-2 раза). Колонии клеток с оверэкспрессией *TMA64* имели морфологию дикого типа.

При изучении влияния нокаута гена *TMA64* на эффективность споруляции дрожжей было обнаружено, что диплоиды $\Delta tma64$ спорулируют с меньшей эффективностью, чем *wt*:

процентное содержание тетрад в спорулирующей культуре последних составило 83%, в то время как *Δtma64* образовывали лишь 37% тетрад. Такая разница может быть связана как с неадекватным ответом мутантных дрожжей на недостаток аминокислот (поскольку процесс споруляции у дрожжей запускается при азотном голодании), так и с нарушениями в ходе мейотических делений (в частности, при кроссинговере) – что вписывается в вышеупомянутое предположение об участии ТМА64 в ответе на стресс или в рекомбинации. Проверка этих гипотез требует дополнительных экспериментов.

АНДРУСЕНКО С.Ф., ЗУБЕНКО Ю.С.

Ставропольский государственный университет, Ставрополь, Россия

ОПТИМИЗАЦИЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ПЕКТИНА

Начиная с 1990 года на мировом рынке, наблюдается устойчивый рост потребления пектина в среднем 3-3.5% в год, главным образом, за счет роста потребления пектина в кондитерской и консервной промышленности. Пектины обладают рядом уникальных свойств, которые обуславливают их широкое применение в различных областях, препараты пектина нашли широкое применение в качестве энтеросорбентов, в частности, при интоксикации тяжелыми металлами. Таким образом, поиск новых источников для выделения пектиновых веществ и расширение областей их использования – является актуальной задачей в биотехнологии.

Пектины получают с помощью сложных и дорогостоящих технологий из промышленно значимого растительного сырья. Наиболее распространенным сырьем для получения пектина являются выжимки цитрусовых и яблок, жом сахарной свеклы и сердцевина корзинок подсолнечника.

Целью нашего исследования было получение пектина из унаби (*Ziziphus jujuba*) и проведение сравнительного физико – химического анализа пектинов из разных источников сырья.

Выделение пектиновых веществ осуществляли методом экстракции, осаждали ацетоном, этиловым спиртом, пропиловым спиртом. Наибольший выход был при выделении цитрусового пектина –29%, яблочного - 26%, свекловичного –23%, пектина из

унаби – 22%.

Проводилось выделение пектина по пектату кальция. Результаты исследования показывают, что при выделении пектиновых веществ по пектату кальция наибольший выход для яблочного пектина – 28%, свекловичного – 25%, из унаби – 24%, и наименьший выход цитрусового пектина.

Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности использования того или иного метода, выделения пектина из разных источников сырья.

Таким образом, были оптимизированы условия выделения пектина различными методами. Оптимальным является выделение пектина при его осаждении этиловым спиртом и хлоридом кальция, после его омыления.

АНИКАЕВ А.Ю., КОРОБЕЙНИКОВА А.В., КОРЕПАНОВ А.П., БУБУНЕНКО М.Г.,
КЛЯШТОРНЫЙ В.Г., НИКОНОВ С.В., ГАРБЕР М.Б., ГОНГАДЗЕ Г.М.
Учреждение Российской академии наук Институт белка РАН, Пушкино

РОЛЬ БЕЛКА СЕМЕЙСТВА СТС В ФОРМИРОВАНИИ ФУНКЦИОНАЛЬНО- АКТИВНОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ РИБОСОМЫ *IN VIVO*

Наш интерес к 5S рРНК-связывающим белкам семейства СТС определяется тем, что они являются особенностью бактериального аппарата трансляции. В связи с этим изучение роли данных белков в формировании и функционировании рибосомы может иметь не только фундаментальное, но и прикладное значение, так как именно рибосома является мишенью для антибиотиков и токсинов. Самый изученный представитель семейства – однодоменный рибосомный белок L25 *Escherichia coli*. Этот белок расположен в центральном протуберанце (ЦП) большой рибосомной субчастицы вблизи от ее функциональных центров. Однако из современных кристаллографических данных известно, что рибосомный белок L25 не образует прямых контактов с лигандами трансляции, а недавно нами было показано, что этот белок не является жизненно важным для *E. coli*. О другом представителе данного семейства, белке СТС *Bacillus subtilis*, известно, что он является временно ассоциирующим с рибосомой, так как синтезируется в клетке только при стрессе и при этом обнаруживается в рибосоме. На основании этих

данных, можно было предположить, что белки семейства СТС не являются необходимыми для функционирования бактериальной рибосомы. Однако, как было нами ранее показано, клетки *E. coli*, лишенные белка L25, хотя и выживают, но растут гораздо медленнее контрольных клеток, а их рибосомы оказываются менее эффективными в синтезе белка. Данная работа посвящена изучению роли белка L25 и его межмолекулярных контактов в формировании функционально-активной рибосомы. Показано, что рибосомы из клеток Δ L25-штамма, очищенные от компонентов трансляции, содержат значительное количество диссоциированных субчастиц. Анализ 50S субчастиц из этой фракции показал, что они утратили рибосомный белок L16, и функционально неактивны. В то же время, 70S фракция Δ L25-рибосом обладала такой же белоксинтезирующей активностью, как контрольные рибосомы. Таким образом, становится очевидной причина низкой эффективности в синтезе белка Δ L25-рибосом в системах *in vivo* и *in vitro*. Современные структурные исследования рибосом показали, что белок L25 в рибосоме образует контакты с двумя молекулами: 5S рРНК и белок L16. Мы предполагаем, что отсутствие белка L25, может вызывать дестабилизацию в структуре ЦП, тем самым нарушая контакты белка L16 и его удержание в рибосоме. Ранее нами было показано, что одиночная замена в РНК-связывающем модуле белка L25 приводит к невозможности образования им комплекса с изолированной 5S рРНК. В настоящей работе исследовано влияние подобных изменений в белке L25 на его встраивание в рибосому *in vivo*. Была создана серия мутантных штаммов *E. coli*, содержащих в хромосоме ген белка L25 с разными заменами в его РНК-связывающем модуле. Одиночная замена в белке не повлияла на его встраивание в рибосому *in vivo* и эффективность функционирования рибосом. Поэтому мы внесли в 5S рРНК-связывающий модуль белка L25 несколько массивных остатков, которые должны были создать стерические препятствия для его взаимодействия с РНК. Замена двух или трех аминокислотных остатков в белке L25 приводила к замедлению роста клеток и ослаблению удержания этого белка в рибосоме. Эффект некоторых внесенных замен в белок L25 оказался сравним с эффектом нокаута его гена. Полученные данные позволяют заключить, что образование прочного комплекса с изолированной 5S рРНК не является обязательным условием для встраивания белка L25 в рибосому *in vivo*, однако, образование этого межмолекулярного контакта строго необходимо для удержания белка в рибосоме. Для двух представителей семейства СТС ранее было показано, что, несмотря на

низкую гомологию первичных структур, пространственные структуры белка L25 и 5S рРНК-связывающего домена белка TL5 *Thermus thermophilus*, и их взаимодействие с РНК очень сходны. Мы проверили, может ли указанный домен белка TL5 заменить белок L25 в рибосоме *in vivo*. Оказалось, что при физиологических концентрациях фрагмента белка TL5 в клетке (замена гена в хромосоме) наблюдается эффект сравнимый с отсутствием белка L25 в клетке. Суперпродукция белка *in trans* приводит к подавлению роста клеток. При этом некоторое количество данного белка обнаруживается в выделенных рибосомах, но легко из них отмывается. Вероятно, локальные различия в пространственной структуре двух белков исключают их функциональную взаимозаменяемость *in vivo*. Одним из таких мест является область контакта с белком L16, поэтому полученные данные могут указывать на чрезвычайную важность контакта этих двух белков для функционирования рибосомы.

Работа поддержана Программой «Молекулярная и клеточная биология» РАН.

АНТИПЬЕВА М.В.¹, КАРНАЖИЦКАЯ Т.Д.²

¹Пермский институт (филиал) Российского государственного торгово-экономического университета, Пермь, Россия

²ФБУН Федеральный научный центр Медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения, Пермь, Россия

БИОМОНИТОРИНГ КСЕНОБИОТИКОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДАХ ЧЕЛОВЕКА

Одним из перспективных направлений оценки качества среды обитания является биомониторинг ксенобиотиков в биологических средах человека. Уровень содержания экообусловленных химических веществ в биологических средах зависит от степени загрязнения внешней среды обитания (атмосферный воздух, вода водоемов, почва) локальными выбросами и сбросами промышленных предприятий, от бытовых условий проживания (воздух внутри помещений, употребление загрязненных продуктов питания и питьевой воды, эксплуатация пластмассовых изделий и др.), от региональных экологических факторов. Изучение общих механизмов взаимодействия организма

человека с химическими факторами окружающей среды и выявление риска для здоровья при малых уровнях воздействия различных токсичных веществ, представляет собой сложную и комплексную задачу.

Стирол (винилбензол) – экологически значимый токсикант окружающей среды, присутствующий в воздухе в виде паров и поступающий в атмосферу с выбросами предприятий органического синтеза по производству и переработке стирола, нефтехимической и нефтеперерабатывающей промышленности, с выхлопными газами автомобилей, при эксплуатации изделий из полимерных материалов и др.. Впервые стирол был получен перегонкой природной растительной смолы стиракс.. В больших количествах стирол используется для производства полимерных материалов промышленного и бытового назначения. Многочисленные исследования и испытания показали, что этот материал потенциально опасен для здоровья

В работе представлены результаты исследований содержания стирола в цельной крови детей, проживающих на условно чистых территориях Пермского края, исключающих влияние антропогенных факторов на состояние среды обитания населения (вдали от промышленных предприятий, крупных автомагистралей), с целью обнаружения и установления фонового уровня содержания стирола в биопробах детского населения. Всего обследовано 226 детей в возрасте от 3 до 14 лет. Дети, в силу их возрастных особенностей, наиболее уязвимы в отношении неблагоприятных воздействий экологических факторов и развития экопатологий.

В качестве условно чистых территорий исследовались сельские территории (село Уинское (n=16), Ильинское (n=78)), поселки городского типа (Усть-Качка (n=59), Юго-Камск (n=15), Сылва (n=8)), рекреационная зона г. Перми, расположенная на правом берегу р. Кама в сосновом бору (комплекс Пермского государственного технического университета (ПГТУ) (n=50)). Фоновый уровень содержания стирола в крови детей для каждой территории рассчитывали как среднегрупповую концентрацию по изучаемой территории.

Количественное определение стирола в крови проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуориметрическим детектированием. В ходе проведенных исследований установлено, что среднегрупповые концентрации варьируют в диапазоне от $0,00032 \pm 0,00007$ до $0,0029 \pm 0,0007$ мг/дм³. Минимальные

фоновые уровни содержания стирола в крови установлены на территориях поселков Юго-Камск и Сылва – $0,00032 \pm 0,00007$ мг/дм³ и $0,00041 \pm 0,00009$ мг/дм³ соответственно. Максимальный фоновый уровень стирола в крови детей зафиксирован на территории поселка городского типа Усть-Качка – $0,00293 \pm 0,00067$ мг/дм³.

Присутствие стирола в крови детей, проживающих на относительно благополучной территории, вероятно, связано с бытовыми условиями среды обитания, а также потреблением загрязненных стиролом продуктов питания и питьевой воды.

С точки зрения технологии, наиболее легко формуемым полимером является полистирол. Он широко используется для производства одноразовой посуды и для расфасовки пищевых продуктов. Лотки из полистирола предназначенные для непосредственной упаковки пищевых продуктов (кусковое мясо, птица, рыба, овощи, фрукты, зелень, ягоды, орехи, грибы, сухофрукты, кулинарные и кондитерские изделия и т.д.), являются потенциальным источником поступления стирола в организм человека.

АНТИФЕЕВ И.Е., ГАЛЬПЕРИНА Е.И.

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук,
Санкт-Петербург, Россия*

ОТРАЖЕНИЕ МЫСЛЕННО ВООБРАЖАЕМЫХ ДВИЖЕНИЙ В ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ЭЭГ

Выявление сходства пространственной организации биоэлектрической активности мозга человека при выполнении реальных движений и их мысленной имитации может оказаться актуальным для решения проблемы управления протезами конечностей с использованием сигналов мозга.

В исследовании приняли участие 25 взрослых испытуемых (средний возраст 22 года, 7 юнош и 18 девушек). 10 из них были профессиональными спортсменами (синхронное плавание, борьба и др.). Все испытуемые выполняли следующие двигательные нагрузки: сгибание с последующим нажатием на кнопку указательного, большого, среднего пальца руки и хватательное движение кисти. Каждое действие

повторялось с частотой одно действие в секунду в течение 2 минут, нагрузка выполнялась с точной синхронизацией действий испытуемого с помощью метронома, отдельно правой и левой рукой сначала реально, а затем мысленно. ЭЭГ регистрировали от 21 монополярного отведения. Регистрация производилась непрерывно как в фоне (спокойное бодрствование с закрытыми глазами), так и при выполнении тестовых нагрузок.

С помощью спектрального, корреляционного и кластерного анализа ЭЭГ проводили сравнение пространственно-временных отношений биопотенциалов мозга при реальных движениях и их мысленной имитации.

У всех испытуемых при сопоставлении результатов анализа ЭЭГ заметно высокое визуальное сходство изменений по сравнению с фоном паттернов пространственно-временной организации колебаний биопотенциалов мозга между реальными и соответствующими мысленно имитированными движениями. Важно при этом отметить, что в каждом конкретном случае выявленные изменения отличаются индивидуальными особенностями и могут сильно отличаться между собой у разных испытуемых. Достоверно в группе спортсменов сходство между реальными и мысленно имитированными движениями выше, чем в контрольной группе.

Обнаруженное высокое сходство паттернов изменения системного взаимодействия биопотенциалов мозга, как в группе спортсменов, так и в контрольной группе, выявилось и при анализе коэффициентов статистического сходства (КС). Значения КС у разных испытуемых колеблются в пределах 0,57 - 0,96, средние значения - в пределах 0,70 - 0,84.

При неоднократных наблюдениях у одного и того же индивидуума выявляется высокая устойчивость изучаемых параметров. Данная закономерность наблюдается у каждого из обследованных испытуемых, как в группе спортсменов, так и в контрольной группе. Достоверно более высокие значения сходства пространственной организации биопотенциалов мозга при выполнении реальных и мысленно имитированных движений в группе спортсменов по сравнению с контрольной группой позволяют предполагать, что такое сходство является отражением тренированности навыка мысленного представления движения.

Сравнения коэффициентов сходства между паттернами корреляционных связей ЭЭГ при реальных и мысленно имитированных движениях показали, что максимальное сходство паттернов наблюдается при реальном и мысленном имитированном нажатии на

кнопку указательным пальцем, минимальное сходство выявлялось при выполнении хватательного движения.

Поскольку пространственные структуры межрегиональных связей биопотенциалов коры, наблюдаемые при выполнении реального движения, и при его мысленной имитации обладают достаточно высоким статистическим сходством, можно предположить также сходство корковых процессов, лежащих в основе, как реальных произвольных движений, так и их мысленной имитации, что дает основание использовать в дальнейшем биоэлектрические сигналы мозга, регистрируемые при имитации движений, в разработках системы управления протезами.

АНТОНОВ С.А., МАНУИЛОВА Е.С., АРСЕНЬЕВА Е.Л., ХАЙДАРОВА Н.В.,
КОБЫЛЯНСКИЙ А.Г., ГРИВЕННИКОВ И.А.

Институт Молекулярной Генетики РАН, Москва, Россия

ПОЛУЧЕНИЕ ЛИНИЙ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЫШИ, СТАБИЛЬНО ТРАНСФИЦИРОВАННЫХ ФАКТОРОМ РОСТА НЕРВОВ, ПОД УПРАВЛЕНИЕМ КОНСТИТУТИВНЫХ И ИНДУЦИБЕЛЬНЫХ ПРОМОТОРОВ

Основной причиной нарушений в работе центральной нервной системы (ЦНС), происходящих при ишемическом инсульте, травмах головного и спинного мозга и нейродегенеративных заболеваниях, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и др., является гибель нейронов. Существующие на сегодняшний день фармакологические подходы способны лишь незначительно замедлить или ограничить гибель клеток ЦНС. Нейротрофические факторы (НФ) являются белковыми факторами роста, специфически воздействующими на выживаемость нейронов, и способными останавливать их гибель при повреждениях. Самым изученным представителем НФ является фактор роста нервов (ФРН). Этот белок продуцируется многими типами клеток, в том числе нейронами и клетками глии. В ЦНС взрослых животных ФРН необходим для поддержания нормального фенотипа ряда популяций нейронов, направления роста нейритов и формирования синапсов. В экспериментальных моделях ряда нейропатологий для ФРН была показана способность предотвращать гибель нейронов. ФРН имеет относительно короткое время

полураспада, поэтому необходимо создание эффективной системы его доставки в такую труднодоступную область организма как ЦНС. Было показано, что инъекционные методы в данном случае непригодны. Большие перспективы имеет клеточная система доставки, когда необходимый фактор роста продуцируется трансплантированными клетками. Наиболее является введение клеток, фенотипически характерных для той ткани, куда осуществляется трансплантация. Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) способны к неограниченному самообновлению, обладают плюрипотентностью и, как следствие, могут быть использованы для получения неограниченного количества любых типов клеток, в том числе нейронов. Нами были получены плазмидные векторы, в которых была встроена последовательность, кодирующая пре-пропептид ФРН человека под управлением индуцибельного промотора металлотioneина мыши Р МТ-1 (вектор рМТ-NGF), активируемого ионами двухвалентных тяжелых металлов, или конститутивного промотора рибосомального фактора элонгации 1-альфа, Р EF1-а (вектор рEF-NGF), а также гены устойчивости к селективному антибиотику неомицину. Данными векторами были трансфицированы ЭСК мыши линии R1, стабильные трансфектанты отобраны на селективной среде содержащей неомицин. С помощью ПЦР в полученных линиях R1-МТ-NGF и R1-EF-NGF была подтверждена интеграция трансгена в геномную ДНК. Трансгенные клетки экспрессировали мРНК ФРН человека, что было показано методом ПЦР сопряженного с обратной транскрипцией. Для определения наличия у клеток исследуемых линий секрети биологически активного трансгенного белка в среду, мы использовали модель дифференцировки клеток феохромоцитомы крысы линии PC12. Данные клетки экспрессируют рецептор к ФРН и при культивировании их в среде, содержащей ФРН, изменяют морфологию, приобретая нейроноподобный фенотип. Были получены кондиционированные среды от исследуемых линий ЭСК - R1-МТ-NGF и R1-EF-NGF, и этими средами обрабатывались клетки PC12. В качестве отрицательного контроля использовались среды от клеток исходной линии R1, трансфицированных теми же векторами, в которых последовательность гена ФРН была заменена на последовательность гена зеленого флуоресцентного белка. В качестве положительного контроля использовался рекомбинантный коммерческий ФРН. Кондиционированные среды от клеток R1-EF-NGF вызывали образование нейритов у более чем у 90% клеток PC12, что сравнимо с эффектом 10 нг рекомбинантного ФРН. В кондиционированных

средах, полученных от клеток R1-MT-NGF, как и в контрольных средах эффектов не обнаруживалось. Для получения клеток, секретирующих трансгенный ФРН, линия R1-MT-NGF была подвергнута клонированию. Из 40 исследованных клонов R1-MT-NGF 5 оказались индуцибельными, т.е. они экспрессировали трансгенную мРНК только в присутствии индуктора Zn^{2+} . Ведется дальнейшее изучение этих клонов. Также исследовались свойства линии R1-EF-NGF, с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания специфических маркеров - определялась способность дифференцироваться в нейроны и нейрональные предшественники (НП). В эмбриоидных телах (ЭТ), полученных от R1-EF-NGF, наблюдалось увеличение числа иммунопозитивных к нестину НП (на 10 день дифференцировки) и бета-III-тубулин-положительных нейронов (на 14 день) по сравнению с ЭТ, полученными от контрольных линий. В некоторых ЭТ от R1-EF-NGF наблюдалось формирование организованных структур с радиально мигрирующими нейрональными предшественниками, что не встречалось в контроле. Дальнейшими целями работы является исследование возможностей полученных нами клеток вызывать терапевтические эффекты при трансплантации животным с моделями патологий ЦНС, такими как ишемический инсульт.

Работа выполнена при поддержке ГК от «21» февраля 2011 г. № 14.740.11.0171

АНТРОПОВА А.Б.¹, АХАПКИНА И.Г.¹, БИЛАНЕНКО Е.Н.², МОКЕЕВА В.Л.²,
ЧЕКУНОВА Л.Н.², ГЛУШАКОВА А.М.¹, ЧЕРНОВ И.Ю.², ЖЕЛТИКОВА Т.М.¹

¹ ФГБУ «НИИ вакцин и сывороток им.И.И.Мечникова» РАМН, Москва, Россия

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

ГРИБЫ - КОНТАМИНАНТЫ СЫРЬЯ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ПЫЛЬЦЕВЫХ АЛЛЕРГОВАКЦИН

Работа проведена при поддержке гранта РФФИ №11-04-01063-а.

Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что аллерговакцины, в том числе пыльцевые, существенно отличаются по биологической активности и концентрации основных клинически значимых аллергенов у различных производителей. Однако только стандартизированные препараты могут гарантировать эффективность и безопасность

аллергенспецифической иммунотерапии (АСИТ). Первый этап стандартизации аллергенов связан со стандартизацией сырья для их производства. Сырьем служат различные организмы, продуцирующие аллергены - клещи, насекомые, бактерии, грибы, пыльца и т.д. Эти организмы либо выращивают в лабораторных культурах (клещи, насекомые, микроорганизмы), либо собирают в естественных условиях (пыльца растений). Общее требование к любому сырью – строгая видовая идентификация и отсутствие посторонних примесей. При визуальном и микробиологическом анализах в сырье разрешается присутствие не более 1% посторонних примесей (Food and Drug Administration, 21 CFR 680.1). Однако различные организмы часто находятся в тесных биоценологических отношениях. Так, например, пыльца растений всегда ассоциирована с разнообразной микрофлорой (бактерии, грибы), поскольку богата сахаристыми соединениями, служащими пищей микроорганизмам.

Нами проведено изучение ассоциации пыльцы ветроопыляемых растений с различными грибами. Полученные данные свидетельствуют о том, что в пробах пыльцы растений, являющихся ведущими источниками аллергенов средней полосы России - березы повислой (*Betula pendula* Roth), лещины обыкновенной (*Corylus avellana* L.) и ежи сборной (*Dactylis glomerata* L.), используемой в качестве сырья для производства пыльцевых аллергенов, постоянно присутствуют дрожжевые и мицелиальные грибы. При этом их численность может достигать 10^6 КОЕ/г пыльцы. Видовое разнообразие грибов в пробах пыльцы составляет не менее 20-40 видов. Большинство выявленных таксонов являются доказанными источниками аллергенов. Установлено, что для пыльцы растений разных видов и разных жизненных форм характерны различные комплексы микромицетов. Наиболее часто доминируют *Aureobasidium pullulans* и *Rhodotorula mucilaginosa*.

Таким образом, при производстве пыльцевых алерговакцин грибы могут поставлять дополнительные и весьма нежелательные антигены. Кроме того, необходимо учитывать возможность синергизма между грибами и пыльцой, т.е. грибы могут играть роль адъювантов, усиливая действие пыльцевых аллергенов на организм человека.

АРТОХИН К.С., ИГНАТОВА П.К.

Южный Федеральный Университет, Ростов на Дону, Россия

ЭКОТЕХНОЛОГИИ В ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ

Основными элементами экотехнологий в защите растений является охрана опылителей, обоснованное применение пестицидов только на основе мониторинга по критериям вредоносности и снижение норм расхода пестицидов.

Одиночные пчелиные являются основными опылителями главных энтомофильных культур в нашей стране - подсолнечника и люцерны. В Ростовской области более 500 видов пчелиных и среди них около 100 экономически значимых опылителей. В современных сложившихся агроэкосистемах с дискретно-мозаичным размещением культур в севооборотах (агрolandшафтах) доминируют кочующие популяции одиночных пчел. Одиночные пчелы рассредоточены по всей территории агроландшафта. Период лёта экономически значимых видов опылителей охватывает период с мая по август. В Ростовской области часть видов пчел концентрируется в мае на рапсе и эспарцете, в июне на люцерне, в июле на подсолнечнике.

Последнее время для борьбы с вредителями регистрируются высокотоксичные для пчел инсектициды из группы неоникотиноидов. В экологических ограничениях по применению этих препаратов есть регламенты по температуре и пространственной изоляции в 5 км для медоносной пчелы, но одиночные пчелы в них никак не учитываются. Сама регистрация неоникотиноидов против личинок вредной черепашки является нарушением экологических ограничений по применению этих препаратов. Нами выявлены факты отрицательного влияния применения неоникотиноидов на опылителей и урожай энтомофильных культур.

При продолжении практики игнорирования экологических ограничений в применении пестицидов прогнозируется тяжелая ситуация для опылителей и снижение урожая энтомофильных культур. Также прогнозируется исчезновение многих видов энтомофильных растений. В экотехнологиях необходим полный запрет применения неоникотиноидов в агроэкосистемах в период лёта пчел (с мая по август для юга России).

Основной методологический инструмент регламентации проведения защитных мер предусматривает обработку только тех полей, где численность фитофагов превышает экономический порог вредоносности (ЭПВ).

ЭПВ носит выраженный зональный характер и позволяют регламентировать применение средств защиты растений в конкретных технологиях. Такие дифференцированные пороги вредоносности разрабатываются нами для условий Ростовской области для вредителей пшеницы и люцерны. Например установлен порог вредоносности фитонюса для фуражной люцерны и семенной.

По определению и по факту практики норма расхода пестицидов является константной величиной, независимо от реальной фитосанитарной ситуации на полях. Нормативное применение инсектицидов губительно прежде всего для полезной фауны (опылители и энтомофаги). Эффективность большинства современных препаратов при нормативном применении составляет почти 100%. При этом фактическая численность вредителей часто превышает ЭПВ только в 3-4 раза и такая высокая эффективность избыточна.

Разрабатывается концепция эколого-адекватного метода (ЭАМ) применения инсектицидов. Суть метода состоит в том, что норма расхода препарата является переменной величиной и определяется, исходя из видовой и популяционной чувствительности к пестициду и его фактической численности в каждом агроценозе.

Основным экологическим обоснованием норм расхода инсектицидов по ЭАМ является количественная зависимость эффективности препарата от нормы его расхода. Например зависимость эффективности препарата лямбда-цигалотрин (У) от нормы расхода (Х) в отношении опасного вредителя клопа вредная черепашка описывается уравнением $Y=2,56 \ln x+87,5$.

Использование эколого-адаптивного метода применения пестицидов обеспечивает значительное снижение количества применяемых пестицидов и возможность стабилизации равновесия в агроэкосистемах за счет сохранения биоценологических связей внутри экологических пирамид и между разными трофическими цепями. В отношении защиты от сорняков разрабатывается система дробного внесения гербицидов и их адекватное применение в зависимости от видового состава сорной флоры.

Использование экотехнологий позволяет уменьшить пестицидные нагрузки и сохранить опылителей и энтомофагов при проведении защитных мероприятий. Обязательным является участие экологов в разработке практических технологий защиты растений.

АРТЮШИНА И.Ю.

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

УВЕЛИЧЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА ЛЕТУЧИХ АРОМАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ (УСИЛЕНИЕ ЗАПАХА) У РОЗ ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ В ЗАЩИЩЕННОМ ГРУНТЕ И В СРЕЗКЕ

Роза выращивается практически во всех странах мира как садовое растение, на срезку и в качестве источника эфирного масла. Современные сорта роз на срезку часто не имеют своего специфического запаха. В настоящее время большинство исследований натуральных ароматических соединений у роз были направлены на определение их структуры и способов химического синтеза исключительно для нужд производства. Значительно меньше внимания уделялось вопросу связи минерального питания роз и выработкой ими эфирных масел, т.е. их ароматом. В то же время запах розы, наряду с цветом и формой цветка, длиной стебля и другими морфометрическими показателями, является важной характеристикой ее качества. Известно, что аромат роз обусловлен выработкой ими эфирных масел в процессе функционирования углеводного, белкового и липидного обменов в растении. Влияние агрохимическими средствами на эти биохимические процессы способно усилить выработку натуральных ароматических соединений у роз в защищенном грунте. Улучшая аромат цветов, можно увеличить их товарную ценность и, как следствие, прибыль производителя. Идея метаболического влияния на цветочный аромат заключается в применении к растению композиции, состоящей, по меньшей мере, из одного предшественника цветочного аромата. Это такое вещество, которое принимает непосредственное участие в синтезе компонентов аромата растения, и при добавлении которого в питательный субстрат будет изменяться биосинтез и эмиссия этих соединений. Согласно ряду авторов, примеры предшественников, которые

могут быть использованы, включают несколько веществ, в т.ч. салициловую и ацетилсалициловую кислоты и фенилаланин – фенолсодержащие предшественники, которые были выбраны нами для проведения экспериментов. Кроме предшественников композиция может содержать питательные компоненты (в нашем случае - глюкоза).

Цель работы заключается в определении действия предшественников цветочного аромата при добавлении их в питательный субстрат на усиление запаха роз, выращиваемых в защищенном грунте, а также в срезке.

Исследование направлено на разработку состава композиции, которая будет усиливать аромат роз (как горшечных, так и срезанных), и иметь практическую пользу (в быту, в места розничной продажи цветов, для флористических салонов)

Для проведения исследования был выбран сорт роз, обладающих слабым, невыраженным ароматом, - Flash Night.

Изменение аромата было принято фиксировать по качественным и количественным характеристикам, выделяемых растением соединений. Сорбция проводилась в непосредственной близости от цветка на твердофазный адсорбент – активированный уголь («Supelco» Carborack Z 60/80 mesh). Вещества определялись на газовом хроматографе-масс-спектрометре (AT 5973 D фирмы Agilent Technologies).

Был проведен эксперимент со срезкой роз сорта Флеш Найт (Flash Night), где изучалось влияние состава растворов на аромат роз. Эксперимент проводился со следующими растворами 1) глюкоза + фенилаланин (0,5 мг/мл + 1 мг/мл); 2) глюкоза + ацетилсалициловая к-та (0,5 мг/мл + 1 мг/мл); 3) глюкоза + салициловая к-та (0,5 мг/мл + 0,2 мг/мл); 4) контроль (вода без добавок). Розы находились в растворе 48 ч, затем помещались в термостат, и при температуре 50°C с продувкой горячим воздухом в течение 10 минут проводилась сорбция летучих компонентов аромата. Сорбированные ароматические вещества смывались с адсорбента при помощи диэтилового эфира, элюат далее анализировался методом масс-спектрометрии. Был сделан вывод, что варианты опыта, где в качестве предшественников синтеза ароматических веществ были внесены салициловая и ацетилсалициловая кислота относительно контрольного варианта имеют большее количество сорбированных веществ. При сравнении аромата роз при помощи обоняния (статистический анализ) вариант с салициловой кислотой значительно отличался от остальных по качеству и силе аромата.

АРУСТАМЯН Э.С.^{1,2}, АРУСТАМЯН Л.Э.³

¹*Межрегиональное объединение участников рынка складских свидетельств и реструктуризации производства*

²*ООО Инвестиционная консалтинговая компания "ТИ-ЭЙ" Москва, Россия*

³*CIF Engineering & Construction s.r.o, Прага, Чешская Республика*

ОРГАНИЗАЦИЯ ЛЬГОТНОГО ФИНАНСИРОВАНИЯ ИНВЕСТИЦИОННЫХ ПРОЕКТОВ

В работе приводится анализ подходов российских и зарубежных банков к финансированию инвестиционных проектов.

Рассмотрены условия финансирования инвестиционных проектов и подготовка предприятий к их реализации.

Авторы рассматривают комплекс мероприятий, необходимых для организации финансирования в российских и чешских банках и реализации инвестиционных проектов.

Процесс получения финансовых ресурсов из зарубежных банков, в частности из банков Чешской Республики, с которыми мы работаем на протяжении последних 8 лет, состоит из 2-х основных этапов:

Первый этап – получение индикативного финансового предложения от банка с основными условиями финансирования, включая величину выделенного кредита, размер ориентировочной годовой процентной ставки, сроки реализации проекта, наличие льготного периода по срокам возврата «тела» кредита и др.

Второй этап - подготовка и подписание кредитного договора.

Для получения финансового предложения от чешских банков предприятию необходимо подготовить следующие документы: презентацию и бизнес-план инвестиционного проекта; отчет о проведенных маркетинговых исследованиях, выполненных независимой известной российской компанией; отчет о проведении экологического аудита. Кроме того, необходимо разработать концепцию инвестиционного проекта с основными планировочными чертежами производственных процессов.

В процессе подготовки второго этапа – заключения кредитного договора с банком – предприятие должно осуществить разработку проектной документации и получить

разрешение соответствующих государственных органов на проведение строительных работ.

Авторы отмечают, что впервые в России осуществили выделение чешским банком прямого кредита получателю – российской фармацевтической компании. Чешским банком в рамках экспортного финансирования был выделен кредит без гарантии и поручительства российского банка.

В статье отмечается, что имеют место большие сложности в получении инвестиционных кредитов от российских банков; завышенные требования, предъявляемые банками к залоговой массе и финансовому положению потенциальных заемщиков. Несмотря на Правительственную Программу «О поддержке малого и среднего бизнеса», в том числе в разработке инновационных проектов и выделение значительных финансовых ресурсов Российскому банку поддержки малого и среднего предпринимательства (Банк МСП), лишь немногим счастливицам удастся пройти через жесткие требования, предъявляемые банками-агентами.

Чешские банки, в отличие от российских, не требуют наличия у потенциального заемщика большого залогового обеспечения. В качестве залога принимается земля, на которой планируется строительство инвестиционного объекта, а также производственный комплекс, построенный на кредитные деньги.

Эффективная кредитная ставка чешских банков, включающая все затраты по организации финансирования, в настоящее время не превышает 5-6%, что значительно ниже (в 2-3 раза) кредитных ставок российских банков.

Кроме того чешские банки охотно предоставляют кредиты на срок до 8-10 лет.

Инвестиционная Консалтинговая Компания «Ти-Эй» совместно с чешскими и российскими партнерами осуществляет полный комплекс работ от организации финансирования до сдачи инвестиционных объектов «под ключ».

В настоящее время компанией разработана модульная схема строительства и пуска фармацевтических предприятий, производящих таблетки, капсулы и жидкие лекарственные формы.

Мы готовы к эффективному сотрудничеству с предприятиями, осуществляющими разработку и внедрение биофармпрепаратов. Особое внимание будет уделяться проектам,

базирующимся на совокупности прорывных технологий, определяющих возможность появления новой высокоэффективной продукции.

АРХИПОВА В.И., СТОЛБОУШКИНА Е.А., НИКОНОВ О.С.,
НИКОНОВ С.В., ГАРБЕР М.Б.

Институт белка РАН, Пущино, Россия

КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНОВ И ВЫДЕЛЕНИЕ СУБЪЕДИНИЦ ЭУКАРИОТИЧЕСКОГО ФАКТОРА ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ 2

У эукариот и архей фактор инициации трансляции 2 (e/aIF2) состоит из трех субъединиц (α , β , γ) и выполняет ключевую роль в процессе инициации трансляции: в ГТФ-связанной форме доставляет инициаторную метионил-тРНК в Р-участок малой рибосомной субчастицы. У эукариот eIF2 дополнительно участвует в регуляции процесса биосинтеза белка посредством фосфорилирования/дефосфорилирования α -субъединицы. Система специфического фосфорилирования была также обнаружена для архейного aIF2, тем не менее, его роль в регуляции инициации трансляции до сих пор остается неизвестной.

К настоящему времени накоплен большой объем информации о функционировании второго фактора инициации трансляции эукариотического типа. При этом основная масса структурных исследований сделана на факторе aIF2 из гипертермофильных архей. Известны кристаллические структуры изолированных субъединиц, межсубъединичных димеров $\alpha\gamma$, $\beta\gamma$ и неполноразмерного aIF2. В нашей лаборатории определена структура полноразмерного фактора инициации трансляции 2 из археи *Sulfolobus solfataricus*. Для эукариотического eIF2 известна ЯМР структура α -субъединицы, а также кристаллическая структура комплекса α -субъединицы eIF2 с каталитическим доменом протеин-киназы PKR. Отставание в рентгеноструктурных исследованиях эукариотического eIF2 обусловлено техническими трудностями выделения гомогенных препаратов этого фактора из клеток эукариот, большой сложностью клонирования эукариотических генов и получения штаммов-суперпродуцентов, а также проблемами с получением совершенных кристаллов эукариотических белков.

Целью наших исследований является определение структуры фактора инициации трансляции 2 из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Для этого мы клонировали гены, кодирующие α , β и γ субъединицы eIF2, и экспрессировали их в клетках *Escherichia coli*. В настоящее время мы разрабатываем методики выделения и очистки субъединиц eIF2.

Работа поддержана Программой МКБ РАН.

АРХИПОВА Л.В.¹, КУЛИКОВ Д.А.^{1,3}, КУЛИКОВА П.А.², СМИРНОВА Г.Н.²,

КУРАНОВА А.В.¹, РОГАТКИН Е.В.³, МАШКОВ А.Е.³, КУЛИКОВ А.В.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, Пущино, Россия

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

³Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф.

Владимирского, Москва, Россия

ЭНКОПРЕЗ. СОЗДАНИЕ МОДЕЛИ И НОВОГО СПОСОБА ЛЕЧЕНИЯ

Энкопрез – изнуряющее заболевание, которое имеет важное медицинское, социальное и экономическое значение. Анальная инконтиненция (энкопрез) - та или иная степень слабости замыкательного аппарата прямой кишки с нарушением произвольного удержания содержимого толстой кишки. Заболеваемость увеличивается с возрастом – энкопрез диагностируется у 45% пациентов домов престарелых. (Chitkara, 2007; Palsson, Turner et al., 2009). Это одна из наиболее частых причин, приводящих к необходимости домашнего медицинского ухода за больными (Brown, Wadhawan, Nelson, 2010). Люди с анальной инконтиненцией испытывают значительные трудности с адаптацией в обществе. У пациентов с нарушением акта дефекации выше психо-социальная заболеваемость (Athanasakos, Kemal et al., 2010). На сегодня ни у кого из специалистов в данной области нет сомнений, что энкопрез приводит к уменьшению ожидаемой продолжительности жизни.

Исходя из анализа литературы, мы предположили возможность применения аллотрансплантации тканей для коррекции энкопреза. Ключевой проблемой на тот момент

явилось отсутствие адекватной модели данного заболевания. В связи с этим, прежде всего нами была разработана экспериментальная модель анальной инконтиненции, суть которой заключается в хирургическом иссечении участка прямой кишки с захватом мышц наружного анального сфинктера. После оперативного повреждения анальной области нарушалась функция запирающего аппарата прямой кишки. Для ликвидации образовавшегося органического и функционального дефекта проводили аллогенную пересадку ткани костного мозга в зону вокруг хирургической раны, что приводило к ускоренному безруцовому заживлению раны. Проведены все необходимые физиологические и гистологические исследования. После завершения экспериментальных исследований метод модифицирован для клиники, где в качестве трансплантата использовали уже не аллогенную, а аутологическую ткань костного мозга. На сегодня проведено 9 спешных операций. Получено авторское свидетельство РФ.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы президиума РАН «Поддержка инноваций и разработок», 2007, 2009, 2011; гранта Президента РФ для государственной поддержки молодых российских ученых МК -1245.2011.7., программы РАН «Фундаментальные науки медицине» 2012.

АСТАФЬЕВА О.В.

ФГБОУ ВПО «Астраханский государственный университет», Астрахань, Россия

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВОМИКРОБНЫХ СВОЙСТВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ КОМПОНЕНТОВ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ И ВОЗМОЖНОСТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

Лечение растениями наряду с хирургией это один из самых древних методов лечения, известных человечеству. Вплоть до начала XX века фитотерапия занимала почетное место среди прочих методов лечения. Однако синтез сульфаниламидов и антибиотиков существенно поколебали позиции траволечения в современной терапии. Стало казаться, что все проблемы пациента можно быстро и без осложнений решить с помощью химиотерапевтических средств. До сих пор в нашей стране фитопрепараты составляют около 40% от количества выпускаемых лекарственных средств, а в

кардиологии – около 70%. В настоящее время интерес к фитотерапии во всем мире возрастает. Одной из главных причин популярности растительных средств является высокий риск побочных эффектов при использовании мощных химических препаратов. Поэтому использование противомикробных препаратов растительного происхождения взамен химических аналогов является актуальным направлением современной медицины, фармакологии и косметологии. Перспективными для этих целей являются биологически активные вещества экстрактов растений. Активность экстрактов во многом обусловлена наличием в них определенных химических веществ (флавоноиды, гликозиды, эфирные масла, витамины и др.). Эти действующие биологически активные вещества имеют разнообразный состав и относятся к различным классам химических соединений.

Целью данной работы является изучение способов выделения биологически активных компонентов растений, а также исследования свойств (противомикробных, антиоксидантных и др.) выделенных биологически активных веществ растений Астраханского региона и возможности применения их для приготовления препаратов, в том числе и для нужд косметологии.

Направление данного исследования – выделение биологически активных компонентов растительных экстрактов - является новым и актуальным для Астраханского региона в частности. Оригинальность и новизна выделения и производства биологически активных экстрактов с противомикробными и фитонцидными свойствами из растений экологически благополучных районов Астраханского региона заключается в том, что природные экологические условия: высокая инсоляция, высокие температуры и низкая влажность способствуют формированию биологически активных веществ с повышенными концентрациями.

Мы изучали и отработывали методы экстрагирования комплекса биологически активных компонентов (например, флавоноидные соединения корня солодки голой *Glycyrrhiza glabra*, соцветий цмина песчаного *Helichrysum arenarium* и тысячелистника мелкоцветкового *Achillea micranta*).

Также исследовали противомикробные свойства как экстрактов исследуемых растений Астраханской области (соцветий цмина песчаного (*Helichrysum arenarium L.*), тысячелистника мелкоцветкового (*Achillea micranta L.*), корней солодки голой (*Glycyrrhiza glabra*)), так и отдельных фракций, полученных в результате препаративной

хроматографии. Противомикробную активность проверяли в отношении штаммов *Staphylococcus aureus* (6538 ДСМ 799) и выделенного из внешней среды (из кожи рук, микрофлоры воды) *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis*. Все исследуемые вещества, обладали противомикробной активностью, выраженной в различной степени.

Также были проведены предварительные исследования химического состава исследуемых экстрактов растений методами тонкослойной хроматографии (ТСХ), ВЭЖХ.

Полученные растительные экстракты, содержащие разнообразные по химическому составу биологически активные компоненты с противомикробным, бактерицидным, ранозаживляющим и др. действием могут использоваться в качестве основных компонентов препаратов различного назначения, в том числе при создании косметических средств и биологически активных добавок БАД.

АХАПКИНА И.Г.

ФГБУ «НИИВС им. И.И. Мечникова, РАМН», Москва, Россия

ИСКУССТВЕННЫЕ ПИТАТЕЛЬНЫЕ СУБСТРАТЫ ДЛЯ КЛЕЩЕЙ ДОМАШНЕЙ ПЫЛИ (ACARIFORMES: PYROGLYPHIDAE)

Клещи домашней пыли (семейство Pyroglyphidae), являющиеся источниками аллергенных соединений, встречаются во всем мире. Еще в 1964 году двумя группами исследователей под руководством R. Voorhorst и S. Oshima клещи этого семейства впервые были обнаружены в пыли жилых помещений. В дальнейшем пироглифидные клещи были обнаружены и в пыли различных общественных помещений (детских садов, гостиниц, больниц, вагонах поездов дальнего следования, парикмахерских, прачечных, театров). Клещи переносятся из помещения в помещение антропохорным путем, т.е. при помощи человека. Например, на верхней и нижней одежде, постельных принадлежностях, мягких игрушках и т.д. Жизненный цикл пироглифидных клещей включает существование фазы покоящейся протонимфы, которая в неблагоприятных условиях не нуждается в питательных веществах, что значительно увеличивает шансы сохранения и выживания популяции в данном биотопе. В связи с чем опасность развития аллергических

заболеваний, обусловленных чувствительностью к клещевым аллергенам, угрожает человеку в течение всего года, несмотря на то, что численность клещей может колебаться с течением времени.

Гиперчувствительность к клещевым аллергенам может проявляться такими аллергическими заболеваниями, как ринит, бронхиальная астма, атопический дерматит. Существующие методы лечения заключаются в подавлении отдельных приступообразных проявлений (экстренная помощь) и проведении специфической иммунотерапии (СИТ). Обычно для диагностики и терапии в качестве аллергенов используют экстракты, представляющие собой сложные смеси соединений с различной химической природой. Общая картина иммунного ответа складывается из совокупности всех реакций на каждый компонент и, соответственно, зависит от концентрационного соотношения всех компонентов аллерговакцины. Ранее было показано, что аллергенные экстракты клещей домашней пыли разных производителей отличаются по иммунохимическим свойствам, поэтому вопрос стандартизации аллергенных экстрактов не теряет своей актуальности.

Сырьем для получения аллергенных экстрактов клещей домашней пыли служат питательные субстраты, получаемые в процессе культивирования. Компонентный состав клещевых аллерговакцин зависит от среды культивирования клещей и технологии получения. Зарубежные производители аллерговакцин используют синтетические (смесь аминокислот, витаминов и специфических добавок на инертном носителе) и искусственные (например, смесь перемолотых ростков пшеницы и дрожжей). Отечественные производители используют в качестве питательного субстрата природные субстраты - пыль жилых помещений и утильные волосы человека, которые часто бывают заражены грибами. Использование шрота микроводорослей в качестве основы питательных субстратов оказалось весьма эффективным, однако микроводоросли сами обладают аллергенными свойствами, поэтому такой способ культивирования был пригоден только для создания маточных культур клещей.

Настоящие исследования направлены на создание искусственных питательных субстратов, представляющих собой смесь биологически активных соединений низкой молекулярной массы, природного гипоаллергенного носителя и антибиотических препаратов для предотвращения заражения и развития популяций грибов и бактерий. Антибиотики и элементы среды удаляются из аллергенного экстракта клещей в процессе

диализа. Новые питательные субстраты позволяют получать клещевые алерговакцины, не отягощенные чужеродными антигенами белковой и полисахаридной природы. Последнее особенно важно, поскольку пирогенным свойствам фармакологических препаратов в настоящее время уделяется большое внимание.

АХМЕТОВА А.И., ШАРИПОВА М.Р.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

КЛОНИРОВАНИЕ И СЕКВЕНИРОВАНИЕ ГЕНА ФИТАТ-ГИДРОЛИЗУЮЩЕГО ФЕРМЕНТА *BACILLUSGINSENGIHUMI*

Незаменимым элементом для роста любого организма является фосфор. Это важный составляющий элемент нуклеиновых кислот и клеточных мембран, основной структурный компонент скелетных тканей. Фосфор принимает непосредственное участие в энергетических реакциях клетки и должен присутствовать в достаточных количествах в кормах для поддержания здоровья, функций и производительности сельскохозяйственных животных.

Количество общего фосфора в большинстве коммерческих кормов достаточно высокое. Однако, основная часть (50-80% от общего количества) фосфора в растительных кормах присутствует в виде фитатов. Фитазы, ферменты гидролизующие фитат, практически не вырабатываются в пищеварительном тракте свиней, птицы и других животных с однокамерным желудком. Из-за недостатка упомянутого фермента фитиновый фосфор проходит без изменений по пищеварительному тракту животных и выходит с пометом, который позднее в качестве органического удобрения вносится в почву. Добавление в животные корма фитазы микроорганизмов даст возможность усваивать фосфор непосредственно из ингредиентов кормов и сократит количество фосфатов в помете. Несмотря на то, что фитазы некоторых микроорганизмов выделены и описаны, история фитаз еще далека от завершения. Максимально подходящие для использования в животноводстве фитазы до сих пор отсутствуют. Поэтому ведется постоянный поиск новых продуцентов фитаз.

Целью данной работы явилась идентификация гена фитазы в геноме штамма *Bacillus ginsengihumi* и клонирование в вектор гиперэкспрессии.

Ранее из образцов почв Республики Татарстан было выделено более ста изолятов с высокой активностью гена фитазы. В ходе работы были установлены морфологические характеристики отдельных клеток и колоний выделенных изолятов. В результате ПЦР-анализа с праймерами для 16s РНК было выяснено, что наиболее активным является штамм *B. ginsengihumi*. Данный микроорганизм является грамм - положительной аэробной или факультативно анаэробной бактерией, образующей эндоспору, которая была открыта на плантации женьшеня провинции Южной Кореи.

С целью идентификации и сравнительного анализа генов, кодирующих фитазу, проводили анализ геномов бактерий рода *Bacillus* представленных в базе данных сервера NCBI. Результаты выравнивания последовательностей генов фитаз бацилл, имеющихся в мировых базах данных, позволил выявить высокую степень гомологии этих генов.

В связи с тем, что ген фитазы *B.ginsengihumi* секвенирован ранее не был, нами в ходе работы была использована известная последовательность гена фитазы *B.subtilis*, на основе которой были написаны праймеры для амплификации. В ходе работы были сконструированы две пары праймеров для увеличения вероятности прохождения реакции амплификации. Праймеры Phy-B.sub-ORF-dir и Phy-B.sub-ORF-rev были написаны так, чтобы репликация ДНК полимеразой начиналась со стартового кодона и заканчивалась у стоп-кодона, нарабатывая при этом всю рамку считывания гена. Праймеры Phy-B.sub-NCBI-dir и Phy-B.sub-NCBI-rev были выданы на сервере NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). В результате ПЦР нами был получен фрагмент ДНК, размер которого соответствовал размеру гена *phy* в 1149 п.н. В ходе работы было выяснено, что наиболее оптимальной является температура 60°C, т.к. именно при этой температуре увеличивается специфичность и возрастает эффективность отжига. В следующем этапе работы нами была выделена геномная ДНК *B. ginsengihumi*, сконструированы праймеры для амплификации гена с добавлением дополнительных сайтов для рестрикции и наработан ПЦР-продукт. Полученную последовательность гена фитазы клонировали в вектор pTZ57R/T. Данная система InsT/Aclone™ представляет собой систему для клонирования ПЦР-продуктов с некомплементарным дезоксиаденозином на 3'-конце.

Для последующего секвенирования были использованы стандартные M13/pUC-спраймеры. В результате реакций секвенирования была определена нуклеотидная последовательность фрагмента геномной ДНК *B.ginsengihumi* размером в 1149 п.н.

Дальнейшее выравнивание последовательностей генов фитаз бацилл подтвердило данные о высокой гомологии среди представителей рода. Выравнивание последовательности генов показало полное соответствие бациллярных фитаз.

Таким образом, нами была клонирована и секвенирована последовательность гена фитазы *B.ginsengihumi*.

Работа выполнена при финансовой поддержке федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг и гранта РФФИ 12-08-00942а.

БАЖЕНОВА Б.А., ДАНИЛОВ М.Б., БУДАЕВА А.Е.

*Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления,
Улан-Удэ, Россия*

ФУНКЦИОНАЛЬНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ФАРША КОЛБАС-ПОЛУФАБРИКАТОВ ИЗ СУБПРОДУКТОВ ЯКА

Увеличение объемов выпуска продукции мясной промышленности связано с разработкой новых ресурсосберегающих технологий и комплексным использованием животноводческого сырья, в том числе за счет вовлечения в производство побочных продуктов переработки скота, значительные ресурсы которых реализуются не всегда рационально.

В настоящее время в мясной промышленности все большее развитие получает производство замороженных полуфабрикатов. В бурятской национальной кухне блюда из субпродуктов, крови и кишок всегда занимали почетное место. И это закономерно, так как химический состав их свидетельствует о достаточно высокой пищевой ценности. При разработке технологии мясных изделий из субпродуктов яка учтено, что национальные мясные изделия употребляются только в горячем виде, поэтому рационально выпускать полуфабрикаты в замороженном состоянии.

Мясо яков находит применение в производстве мясопродуктов, а свойства и состав сопутствующего сырья остаются малоизученными.

Целью работы явилось изучение функционально-технологические показатели фарша колбас-полуфабрикатов из субпродуктов яка

На данном этапе работы были разработаны рецептуры колбас-полуфабрикатов из субпродуктов яка, изучены функционально-технологические свойства.

Рецептуры колбасок-полуфабрикатов варьировали в зависимости от вида субпродуктов, в основном второй категории и добавок (соевый белковый изолят, фосфаты). В рецептурах использовали субпродукты как первой, так и второй категории.

Рубец и летошку включали в рецептуру колбасок после модификации его свойств методом кислотного гидролиза в 3 % растворе уксусной кислоты и последующей варке при температуре 95°C в течение 60 мин.

Свежую свиную шкуру предварительно варили в течение 4 часов, измельчали и добавляли в фарш.

При выборе белковой добавки учитывали, что среди добавок животного и растительного происхождения, наибольшее распространение в колбасном производстве получили молочные и соевые белки. Соевый белковый изолят обладает высокой водосвязывающей и гелеобразующей способностями, поэтому наиболее целесообразно его использовать в гидратированном виде, модуль гидратации составил 1:5. Пищевые фосфаты повышают адгезию и величину влагосвязывающей способности фарша. Фосфаты добавляли также в предварительно гидратированном виде.

Воду добавляли сверх рецептуры в количестве 20 % с учетом воды, используемой на гидратацию соевого белкового изолята и фосфатов.

После разработки рецептур изучили водосвязывающую способность (ВСС) образцов субпродуктового фарша разных вариантов в % к общей массе образца.

Анализ результатов исследования водосвязывающей способности субпродуктового фарша с добавками показал, что он обладает высокой ВСС в связи с тем, что в рецептуру этого фарша включены соевый белковый изолят и фосфаты. Известно, что соевый изолят стабилизирует мясную эмульсию, повышает уровень водосвязывающей способности. Фосфаты увеличивают рН системы, что способствует увеличению водосвязывающей

способности субпродуктового фарша. Образцы субпродуктового фарша не содержащие соевый белковый изолят имеют ВСС на уровне 89-92%.

На следующем этапе подготовленные образец фарша формовали в натуральную кишечную оболочку, полученную при забое яка, подвергали обжарке на подсолнечном масле и определяли водоудерживающую и жирудерживающую способности готовых колбасок.

После тепловой обработки водоудерживающая способность субпродуктового фарша без добавок составила 90,1-93,5%, а с добавками - 98,2 %. Жирудерживающая способность субпродуктового фарша без добавок составила 92,2-94,1%, а при использовании в рецептуре колбас соевого белкового изолята и фосфатов - 99,4%.

Таким образом, функционально-технологические показатели субпродуктового фарша достаточно высокие и повышаются при использовании соевого белкового изолята и фосфатов.

БАКАХОНОВ А.А.

Джизакский государственный педагогический институт, Джизак, Узбекистан

ИЗУЧЕНИЕ СОЛЕУСТОЙЧИВОСТИ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ

Высокий выход сельскохозяйственной продукции, получаемый в экономически развитых странах, прежде всего, связан с хозяйствованием. А это означает, что для выращивания и сохранения урожай сельскохозяйственных культур крупномасштабно используется минеральные удобрения, инсектициды, гербициды и различные химикаты. Но химические удобрения стоят очень дорого из-за сокращения добычи ископаемого сырья. Кроме того, их использование сильно загрязняет окружающей среды. Всем ясно, что высокие дозы минеральных удобрений ухудшают агрохимические свойства почвы, снижают ее биологическую активность, уменьшают численность полезных групп микроорганизмов. Поэтому большое внимание сейчас стараются уделять биотехнологическим методам ведения сельского хозяйства. Одним из эффективных путей замены азотосодержащих минеральных удобрений является использование микроорганизмов с функциями азотфиксации. Важность этого метода привела к

интенсивным исследованиям бактерий, способных вступать в симбиотические отношения с бобовыми культурами. Это, прежде всего, бактерии рода *Rhizobium*, которые обитают в корневой системе бобовых растений.

Засоленные почвы занимают на многих странах огромные пространства, составляя значительную часть земельного фонда важнейших сельскохозяйственных районов. Одним из основных путей повышения плодородия засоленных почв считается, использование азотфиксирующих микроорганизмов.

Солеустойчивый штамм растет на известных твердых питательных средах. Бактерии штамма солеустойчивых штаммов имеют форму палочек, в молодом возрасте подвижные, монотрихи, грамотрепательные, медленно растущие.

Величина клеток пятисуточный культуры на среде №79 1,5-2,5×0,8-1,0 мкм.

Штрих на среде №79 обильный, слизистый, белый. Колонии появляются на 5-7 сутки, однотипные, мелкие, 0,8-1,0 мм., круглые, выпуклые белые, слизистые.

При инокуляции этими препаратами из клубеньковых бактерий происходят изменения некоторых продуктивных признаков растений.

Использование микробной биотехнологии открывает новые перспективы для создания безотходных и малоотходных технологий утилизации.

БАЛАШОВА М.В.

Российский Национальный Контактный Центр по разделу "Биотехнология, сельское, лесное хозяйство и пища" 7 Рамочной Программы ЕС, Москва, Россия

ГМО И ПИЩЕВАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ

В работе проводится анализ норм оценки степени риска пищевой ГМ-продукции, обзор существующей российской нормативно-правовой базы, а также ее сравнение с международными стандартами.

Первый ГМ пищевой продукт (томаты с отложенным сроком созревания) появился на рынке США в середине 90-х годов. За период с 1996 по 2007 год в мире площади посевов генетически модифицированных культур возросли в 60 раз, достигнув более 110 млн. га. В настоящее время в разных странах разрешено к применению более 120 видов

трансгенных растений, в том числе 86 - в Европе. В 1993 году Организация экономического сотрудничества и развития (ОЭСР) сформулировала концепцию оценки безопасности ГМО «эквивалентность по существу». Её смысл состоит в определении не абсолютной, а относительной безопасности ГМО. За исходный уровень безопасности принимается традиционный аналог ГМ-продукта.

В 2003 г. вступили в силу основные международные нормативные документы, регулирующие безвредность ГМ продуктов питания (Свод принципов, CodexPrinciples-SAC 2003b) и экологическую безопасность (Картахенский протокол биобезопасности - CBD 2000). Для обеспечения согласованности результатов оценки риска на международном уровне при проведении анализа безопасности ГМ продуктов питания используют принципы, разработанные специалистами из CodexAlimentariusCommission (дочерняя организация ФАО и ВОЗ по разработке продовольственных стандартов).

В России разработка системы оценки качества и безопасности ГМ-пищи и первые экспериментальные исследования были начаты в 1996-1997 годах. В 2000 году Минздравом России утверждена методическая база по оценке качества и безопасности для здоровья человека продовольственного сырья и пищевых продуктов. Разработка методических подходов осуществлялась с учетом рекомендаций ФАО и ВОЗ. Федеральный Закон от 02.01.2000 № 29-ФЗ «О качестве и безопасности пищевых продуктов» не выделяет пищевые продукты и продовольственное сырье, полученные из ГМО, в самостоятельную группу продукции, требующую индивидуального подхода к оценке качества и безопасности для здоровья человека.

Также в 2003 году Госстандартом России утверждены Национальные стандарты РФ ГОСТ Р 52173-2003 «Сырье и продукты пищевые. Метод идентификации генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения» и ГОСТ Р 52174-2003 «Сырье и продукты пищевые. Метод идентификации генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения с применением биологического микрочипа». Содержание в пищевых продуктах менее 0,9% ГМО освобождает их от специальной маркировки (Федеральный закон от 25.10.2007 № 234-ФЗ). 6 марта 2004 г. Главным государственным санитарным врачом РФ утверждены Методические указания МУК 4.2.1913-04 "Методы количественного определения генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения в

продуктах питания". В системе Роспотребнадзора практически в каждом субъекте Российской Федерации имеется лабораторная база по исследованию пищевых продуктов на наличие ГМО. В Российской Федерации прошли полный цикл всех необходимых исследований и разрешены для использования в пищевой промышленности и реализации населению без ограничений: 14 видов пищевой продукции растительного происхождения, полученных с применением трансгенных технологий (3 сорта сои, 6 сортов кукурузы, 3 сорта картофеля, 1 сорт сахарной свеклы и 1 сорт риса); 5 видов ГМ-микроорганизмов.

В связи с инициацией процесса вступления в ОЭСР Россия обязалась следовать нормам и принципам ОЭСР в соответствии с требованиями документов «Дорожной карты» присоединения Российской Федерации к Конвенции об учреждении ОЭСР в частности в сфере биотехнологической и пищевой безопасности. Предварительный сравнительный анализ, проведенный рабочей группой ОЭСР по биотехнологии (РГБ ОЭСР) показал соответствие российского законодательства в области пищевой и биотехнологической безопасности нормативно-правовой базе ОЭСР.

*Работа проведена при поддержке гранта № 13.G38.31.0006-1 «Создание инновационной инфраструктуры для развития сельского хозяйства, агробио- и пищевых технологий»

БАЛЬЖИНИМАЕВА С.К., ДАНИЛОВ М.Б.

Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления,

Улан-Удэ, Россия

ОРГАНОЛЕПТИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПЕЧЕНОЧНОГО ПАШТЕТА, ВЫРАБОТАННОГО С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БЕЛКОВО-ЖИРОВОЙ ЭМУЛЬСИИ

Одним из перспективных направлений пищевой промышленности является создание технологий мясопродуктов функционального назначения, которые сохраняют и улучшают здоровье человека и снижают риск развития заболеваний, благодаря наличию в их составе функциональных ингредиентов.

Известно, что химический состав продуктов животноводства во многом определяется составом корма и природно-географическими особенностями региона. Эти факторы в большой степени оказывают влияние на микроэлементный состав пищевых сырьевых ресурсов. Так, Забайкальский край, Республика Бурятия, Якутия относятся к высокоэндемическим по селену регионам. Селен является эссенциальным микроэлементом, спектр его действия в организме довольно широк, он выполняет каталитическую, структурную и регуляторную функции. Согласно данным эпидемиологических исследований более 80 % населения России обеспечены селеном ниже оптимального уровня.

Целью работы явилось исследование органолептических показателей печеночного паштета с белково-жировой эмульсией, содержащей селенированную муку.

Анализ различных способов и приемов обогащения пищевых продуктов селеном показал, что одним из рациональных способов обогащения мясопродуктов может быть создание селеносодержащих белково-жировых эмульсий (БЖЭ). Рецептуры БЖЭ, наряду с жировой и белковой составляющей, могут включать и полисахариды. Мы обратили внимание на возможность создания БЖЭ с использованием пшеничной муки селенированной биотехнологическим способом, где элемент присутствует в виде биодоступного селен-метионина (Se-Met).

В наших экспериментах белковая часть белково-жировой эмульсии представлена молочным белком «Анисомином», жировая часть - соевым маслом, а также в состав эмульсии включена полисахаридсодержащая биологически активная добавка – это селенированная мука.

Разработку рецептур эмульсий осуществляли методом моделирования возможных комбинаций сырьевых компонентов: селенированная мука, молочный белок «Анисомин», соевое масло, вода. Состав эмульсии был оптимизирован методом линейного программирования.

Объектами исследований при выполнении работы являлись модельные образцы печеночного паштета с внесением белково-жировой эмульсии в количестве 5, 10, 15 и 20 %, в состав которой входила пшеничная мука высшего сорта по ГОСТ (контроль) и селенированная биотехнологическим методом пшеничная мука (опыт). Селенированную муку с крупностью помола не более 5 % получали из проросших зерен пшеницы.

Принятые дозы белково-жировой эмульсии были обусловлены как технологическими рекомендациями по использованию эмульсий, так и физиологически допустимыми дозами селена в продуктах питания. Так с учетом содержания микроэлемента в селенированной муке количество селена в 100 г фарша составило, в зависимости от дозы внесения белково-жировой эмульсии, от 32 до 127 мкг селена.

В ходе исследований изучали органолептические показатели паштетного фарша. В качестве контроля служил паштетный фарш с введением БЖЭ с пшеничной мукой. Сравнивали органолептические показатели контрольных и опытных образцов паштетного фарша, а также образцов фарша без белково-жировой эмульсии.

Органолептический анализ показал, что контрольные образцы фарша имеют темный цвет, приятный запах, однако чувствуется небольшая горечь от большого количества печени в рецептуре паштета. Консистенция немного рассыпчатая. При добавлении БЖЭ с пшеничной мукой и селенированной мукой органолептические показатели улучшаются, вкус и аромат становятся приятными, цвет - светлее, консистенция сочная. Однако, при увеличении дозы БЖЭ до 20% паштет становится безвкусным. В связи с этим оптимальным количеством вносимой дозы белково-жировой эмульсии принято - 15%.

Исследования органолептических показателей паштета с селенированной пшеничной мукой показали, что характер изменения ее органолептических характеристик аналогичен динамике их изменений в паштете с белково-жировой эмульсией, содержащей пшеничную муку. Использование в составе белково-жировой эмульсии селенированной муки не ухудшает органолептические характеристики мясного продукта. Кроме того, с учетом содержания микроэлемента в селенированной муке, фарш обогащается биодоступным селеном, содержание которого в 100 г фарша, в зависимости от дозы БЖЭ, составляет 49,5 мг.

Таким образом, опытные образцы паштета, обогащенные селеном имеют высокие органолептические показатели.

БАРАНЕЦ А.П., СЕЛЕЗНЕВА Ю.В., ПРИСЯЖНЕНКО О.К.,
ЕВТУШЕНКОВ А.Н., НИКОЛАЙЧИК Е.А
Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

АГРОБАКТЕРИАЛЬНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ ТАБАКА ВЕКТОРНОЙ КОНСТРУКЦИЕЙ С ГЕНОМ УСТОЙЧИВОСТИ К ГЛИФОСАТУ

Современное сельское хозяйство невозможно представить без использования гербицидов. Поэтому устойчивость к гербицидам является одним из важнейших признаков сельскохозяйственных культур, позволяющим снизить издержки производства на борьбу с сорняками. На сегодняшний день глифосат является наиболее широко распространенным гербицидом в мире. Его действие основано на ингибировании растительного фермента 5-енолпируватшикимат-3-фосфат синтетазы - ключевого фермента в синтезе ароматических аминокислот: тирозина, триптофана, фенилаланина. При недостатке вышеперечисленных аминокислот у растений наблюдаются симптомы азотного голодания, и они погибают в течение двух недель после обработки глифосатом. В настоящий момент разработаны способы создания устойчивых к гербицидам сельскохозяйственных растений методами генной инженерии, в том числе с использованием агробактериальной трансформации растений.

Целью нашей работы стало получение трансгенного табака устойчивого к глифосату.

В качестве векторной конструкции для трансформации табака использован бинарный вектор pBI-121-GO, несущий экспрессионную кассету 35S-СТР-GO, которая состоит из промотора вируса мозаики цветной капусты – 35S, фрагмента кодирующего сигнал транспорта в хлоропласт – СТР, модифицированного гена глицинооксидазы- GO, ответственного за устойчивость к глифосату.

Целевой ген глицинооксидазы был клонирован из бактерий *Bacillus subtilis* 1,5. В ген глицинооксидазы были введены три точечные мутации (Gly51Ser; Ala54Arg; His244Ala) необходимые для изменения субстратной специфичности фермента к глифосату. Для селекции трансформантов в качестве маркерного гена использован ген *nptII*, находящийся под контролем промотора NOS и придающий устойчивость к антибиотику канамицину. Для переноса данной конструкции в растения табака использовали штамм *Agrobacterium*

tumefaciens Agl0. Вектор pBI-121-GO вводили в штамм *A. tumefaciens Agl0* методом электропорации. Полученные агробактерии были использованы для трансформации модельного объекта *Nicotiana tabacum cv. Havana Petit SR1*. В качестве эксплантов были использованы прекультивированные листовые пластинки растений табака, выращенные в асептических условиях. Регенерация наблюдалась через 4-5 недель после начала эксперимента в условиях селективного давления канамицина (25 мг/л). Спустя еще 7-14 суток устойчивые побеги формировались полностью. При переносе на безгормональные среды укоренение регенерантов происходило в течение последующих 2-3 недель.

В ходе экспериментов были получены и отобраны на селективной среде независимые линии табака *Nicotiana tabacum cv. Petit Havana SR1*. В последующих экспериментах трансгенные растения всех линий табака, размноженные черенкованием и нетрансформированные растения - регенеранты (контрольные) после укоренения были высажены в почву в условиях фитотрона и протестированы на устойчивость к глифосату. Для этого все растения, в том числе и контрольные, опрыскивались 0,3% глифосатсодержащим гербицидом «Торнадо». Визуализация ответной реакции растений на действие глифосата проводилась через 3-7 дней. У контрольных растений наблюдались признаки азотного голодания (пожелтение листьев и некроз тканей) уже через 4 дня после обработки гербицидом. У трансформированных растений табака спустя 7 дней наблюдалось слабое пожелтение листьев, что может быть связано с не достаточным уровнем экспрессии целевого гена глицинооксидазы.

В дальнейшем планируется использовать векторную конструкцию pBI-121-GO для агробактериальной трансформации рапса.

БАРАНЕЦ А.П., СЕЛЕЗНЕВА Ю.В., ПРИСЯЖНЕНКО О.К.,

ЕВТУШЕНКОВ А.Н., НИКОЛАЙЧИК Е.А

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

СОЗДАНИЕ ВЕКТОРНОЙ КОНСТРУКЦИИ С ГЕНОМ УСТОЙЧИВОСТИ К ГЛИФОСАТУ

Генетическая инженерия растений дает возможность получение растений со свойствами, присутствие которых нельзя обеспечить методами традиционной селекции. С

помощью современных методов генной инженерии можно конструировать генетические структуры из фрагментов генов от различных организмов и вводить такие конструкции в растительную клетку, создавая условия экспрессии чужеродных генов. Созданные генетические конструкции используются для генетической трансформации растений, в ходе которой растения приобретают признаки представляющие интерес для сельскохозяйственного производства. Одним из самых распространенных признаков среди трансгенных растений является устойчивость к гербицидам.

Глифосат является одним из самых распространенных гербицидов в мире. В настоящее время существует несколько подходов обеспечивающих получение генно - модифицированных растений устойчивых к глифосату. Согласно одному из них устойчивость к гербициду может быть результатом введения в растительный организм генетической конструкции содержащей модифицированный ген, кодирующий гербицид деградирующий фермент. Для глифосата таким ферментом является глициноксидаза, которая обладает способностью окислять глифосат до аминокислотной кислоты и гликоксилата.

Целью нашей работы является создание векторной конструкции с геном глициноксидазы из *Bacillus subtilis* 1,5.

Целевой ген глициноксидазы был клонирован из бактерий *B. subtilis* 1,5. Далее ген был модифицирован с помощью сайт - направленного мутагенеза. В ген *GO* были введены три точечные мутации(Gly51Ser; Ala54Arg; His244Ala), благодаря чему фермент стал более активен по отношению к глифосату, чем к глицину.

При создании бинарного вектора был взят за основу вектор pBI-121. В своем составе вектор имеет маркерный ген *nptII*, находящийся под контролем промотора NOS и придающий устойчивость к антибиотику канамицину, что в свою очередь делает возможной процедуру селекции первичных трансформантов. Сконструированная векторная конструкция имеет экспрессионную кассету 35S-СТР-*GO*, которая состоит из промотора вируса мозаики цветной капусты – 35S, фрагмента кодирующего сигнал транспорта в хлоропласт – СТР, модифицированного гена глициноксидазы- *GO*, ответственного за устойчивость к глифосату.

В дальнейшем предполагается проверка созданной генетической конструкции при агробактериальной трансформации табака в качестве модельного объекта.

БАРАНОВА Е.В.

*Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена,
Санкт-Петербург, Россия*

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ РЕЗЕРВЫ ОРГАНИЗМА ПРИ ДЕЙСТВИИ ГИПОКСИИ

Высокогорная гипоксия, возникающая при подъемах на высоту (горная болезнь), а также острая кислородная недостаточность в сочетании с гипокапнией, испытываемая летным составом в аварийных ситуациях (при разгерметизации кабин в космических полетах, высотной авиации) – важнейший экстремальный фактор. Это может стать причиной не только потери работоспособности у лиц, прибывающих в высокогорные районы, но, и гибели летного экипажа в полете.

В настоящее время изучены многие механизмы действия самых различных форм, степеней и продолжительности гипоксии на различные функциональные системы организма. Однако во многих работах не учитывается роль гипокапнии, которая неизбежно возникает в результате гипервентиляции, которая является компенсаторной реакцией на гипоксию, направленной на увеличение доставки кислорода.

Целью работы явилось исследование реакций дыхательной и сердечно-сосудистой систем в условиях быстрого нарастания острой степени гипоксической гипоксии.

Эксперименты проведены на 13 наркотизированных и трахеостомированных лабораторных крысах линии Wistar, массой 250-300 г. В ходе эксперимента проводили синхронную регистрацию параметров дыхания и сердечно-сосудистой системы.

Гипоксическое воздействие осуществляли с использованием метода «возвратного дыхания» (дыхание в замкнутом цикле). Длительность гипоксического воздействия составляла примерно одинаковое время для всех исследуемых животных (10 мин).

Результаты экспериментов свидетельствуют, что быстрое снижение кислорода во вдыхаемой смеси до 6% не приводит к существенным сдвигам минутной легочной вентиляции, снижения силы сокращения дыхательных мышц и компенсаторных возможностей дыхательной системы. Показатели сердечно-сосудистой системы (АДс, АДд, ЧСС) оставались практически без изменений вплоть до 9% O₂ во вдыхаемой газовой смеси. Существенные изменения этих показателей происходили в диапазоне от 8 до 6% O₂,

при этом наибольшие сдвиги наблюдались в динамике АДд и АДс, что проявлялось в их резком снижении, в то время как изменение ЧСС в этом диапазоне было незначительным.

Углубление степени гипоксии ниже 6%O₂, что соответствует высоте 9000-10000 м над уровнем моря, приводило к остановке дыхания. Во всех случаях полной остановки дыхания предшествовал терминальный тип дыхания – гаспинг. Сердечная деятельность при остановке дыхания сохранялась, хотя и на низком уровне. АД систолическое соответствовало 54 мм рт.ст., АДд –30 мм рт.ст., ЧСС – 220 уд.мин. Переключение животных на дыхание воздухом сопровождалось резким подъемом АД и урежением ЧСС. На этом фоне наблюдалось спонтанное восстановление дыхания в среднем через 10-12 секунд.

На основании проведенного исследования можно прийти к заключению, что кратковременное снижение содержания кислорода до 6% критических изменений дыхания и кровообращения у наркотизированных крыс не вызывает. Глубокая гипоксия (ниже 6%O₂) оказывает угнетающее влияние на центральный дыхательный механизм, что проявляется в падении вентиляции, развитии терминального типа дыхания и полной остановке дыхания. Дополнительными факторами, приводящими к критическому состоянию дыхательной системы, являются, по всей видимости – гипокапния и снижение доставки кислорода к дыхательным мышцам, поскольку перераспределение региональных объемов крови при гипоксии, направлено в первую очередь, на улучшение кровоснабжения жизненно-важных органов – мозга и сердца. Появление дыхательных движений после прекращения гипоксического воздействия было обусловлено в первую очередь накоплением углекислого газа в процессе метаболизма, который стимулировал возобновление дыхательной активности.

Таким образом, в условиях острой и сверхострой степени гипоксии сопутствующая гипокапния, которая возникает вторично в результате гипервентиляции, усугубляет неблагоприятные эффекты гипоксического воздействия. Полученные данные необходимы для формирования целостного представления о развитии процесса адаптации организма в экстремальных условиях, сопровождающихся крайними степенями дефицита кислорода и могут учитываться при разработке профилактических мер, направленных на улучшение кислородного обеспечения организма.

БАТАЕВА М.В., ГНЕЗДИЛОВА Л.А., ПЕТРОВА Т.Н.

ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина», Москва, Россия

ВЛИЯНИЕ ПРОБИОТИКА ЛАКТОБИФАДОЛ НА КАЧЕСТВО СПЕРМЫ БАРАНОВ

Приводятся результаты влияния пробиотика лактобифадол на показатели спермы баранов: активность, интенсивность дыхания, резистентность.

Материалы и методы. Исследования проводились на баранах породы тексель на базе ОАО «Ставропольское», Ставропольского края.

Для проведения научного эксперимента было создано 3 группы из баранов. В первой группе животным давали лактобифадол в дозе 0,2г на кг массы тела; во второй группе - в дозе 0,6 г на кг живой массы тела, третья группа являлась контрольной – животным не давали лактобифадол. Пробиотик применяли в течение месяца.

Перед экспериментом и после него проводили морфологическое и биохимическое исследование крови у баранов всех групп, а также оценивали качество спермы.

Критериями оценки эффективности действия препарата служили показатели спермы баранов: объем эякулята, активность спермиев, интенсивность дыхания, резистентность.

Результаты эксперимента. В результате проведенного исследования до применения пробиотика лактобифадола объем эякулята баранов в 1 опытной группы в среднем составил 1 мл, во второй опытной группе 1,5 мл, в контрольной группе 1,5 мл. Активность спермиев, соответственно, в среднем по группам: 5 баллов, 6 баллов и 5 баллов; интенсивность дыхания в среднем по группам: 62 мин, 58 мин, 60 мин; показатель резистентности спермиев в среднем по группам: 18 мл, 15,4 мл, 16,8 мл .

Через месяц после применения лактобифадола показатели качества спермы баранов опытных групп улучшились, в то время, как показатели качества спермы баранов контрольной группы практически не изменились.

В результате проведенного исследования после применения пробиотика лактобифадола объем эякулята баранов в 1 опытной группы в среднем составил 1,5 мл, во второй опытной группе 1,6 мл, в контрольной группе 0,7 мл. Активность спермиев,

соответственно, в среднем по группам: 7 баллов, 7 баллов и 5 баллов; интенсивность дыхания в среднем по группам: 74 мин, 63 мин, 54 мин; показатель резистентности спермиев в среднем по группам: 32 мл, 26,4 мл, 16,0 мл .

При исследовании крови у баранов опытных групп отмечалась лучшая стабилизация гематологических и биохимических показателей по сравнению с животными контрольной группы.

Вывод. Применение баранам пробиотика лактобифадол способствует улучшению качества спермы:

- у животных опытных групп увеличился объем эякулята, повысилась активность спермиев, улучшилась интенсивность дыхания и резистентность спермиев;

- лучшие показатели качества спермы получены у баранов первой группы, которым применяли лактобифадол в дозе 0,2г на кг массы тела.

БАТАЕВА Ю.В.

*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Астраханский государственный университет»,
Астрахань, Россия*

ЦИАНОБАКТЕРИИ АРИДНОЙ ЗОНЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В АГРОТЕХНОЛОГИЯХ

В настоящее время в агропромышленном комплексе отдается предпочтение химическим препаратам, которые отрицательно влияют на плодородие почв, окружающую среду, качество продукции. Биологической альтернативой различного рода химическим удобрениям и пестицидам является микробная составляющая почвы. Почвенные микроорганизмы образуют многочисленные физиологически активные вещества, которые поступают в корни растений и стимулируют их рост, повышая качество урожая, а также антифунгальные антибиотики, подавляющие развитие фитопатогенов. Различного рода микроорганизмы можно интродуцировать в агроэкосистему, в том числе микробные препараты сложного состава.

Особое место в почвенных ценозах занимают водоросли и цианобактерии. Цианобактерии в отличие от других почвенных водорослей фиксируют из атмосферы не только углерод, но и молекулярный азот, продуцируют биологически активные вещества и образуют первичную продукцию органического вещества, предотвращают ветровую эрозию, склеивая частички почвы и уменьшая скорость испарения с ее поверхности воды. Особенно важен этот процесс для песчаных поверхностей, а также для слабогумифицированных почв, чем и отличаются почвы Астраханской области. В природных условиях цианобактерии всегда развиваются в ассоциациях с множеством других организмов, благодаря слизистым чехлам, и, вследствие этого, обладают прекрасными адаптационными возможностями и устойчивостью к резко изменяющимся физико-химическим условиям среды. Это создает предпосылки для более эффективного приспособления циано-бактериальных сообществ (ЦБС) при их интродуцировании в почву. Материалы о роли цианобактерий в создании почвенного плодородия убеждают в необходимости вовлечения этих организмов почвы в сферу сельскохозяйственного использования.

Преимуществом препаратов на основе цианобактерий является отсутствие специфичности в ряду культурных растений, неприхотливость в хранении, экономичность при культивировании (выращивание на минеральных жидких средах), мало затрат на обработку площадей, что позволяет сокращать нормы расхода фосфорных удобрений. Обладая быстрыми скоростями роста цианобактерии за 20 дней накапливают до 15 т биомассы на 1 га.

В связи с особенностями расположения и аридным климатом Астраханского региона, почвы здесь представляют собой своеобразные природные экосистемы с высокими концентрациями солей и недостатком влаги, при этом создаются экстремальные условия для существования живых организмов, в том числе сельскохозяйственных растений. На этой территории развиваются специфические циано-бактериальные сообщества, обладающие устойчивостью к высоким температурам, повышенной солености, интенсивности света, высушиванию, ультрафиолетовому облучению и т.д.

С помощью метода накопительных культур на основе отобранных на территории Астраханского региона почвенных образцов, выделены циано-бактериальные сообщества.

Доминирующей формой структурообразователей изучаемых сообществ явились цианобактерии родов *Phormidium*, *Anabaena*, *Nostoc*, *Oscillatoria*.

В лабораторных и вегетационных опытах проведены исследования по влиянию 25 выделенных сообществ на рост растений. Нетоксичными для семян кресс-салата (семейство крестоцветные) и пырея бескорневищного (семейство злаковые) оказались 24 из 25 исследуемых циано-бактериальных сообществ. Рост и развитие проростков картофеля стимулировали 5 сообществ. Прорастание семян моркови и лука стимулировали 2 сообщества. Значительную ростстимулирующую активность проявляли 4 сообщества цианобактерий в отношении всех опытных растений.

Также исследовали влияние цианобактерий на фитопатогенные грибы родов *Fusarium* и *Alternaria*.

В результате проведенных экспериментов отобрано несколько сообществ цианобактерий, обладающих наиболее активными ростстимулирующими и фунгицидными свойствами, которые можно использовать для дальнейших разработок в агробιοтехнологиях.

БАУЛИНА Л.В., ВЫСОЦКИЙ В.А., АЛЕКСЕЕНКО Л.В.

*Государственное научное учреждение Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства
Российской академии сельскохозяйственных наук, Москва, Россия*

ВЛИЯНИЕ СПЕКТРАЛЬНОГО СОСТАВА СВЕТА И ЭЛИСИТОРОВ НА РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ ЗЕМЛЯНИКИ *IN VITRO* И *IN VIVO*

Изучали влияние спектрального состава света и элиситоров на укореняемость эксплантов земляники на этапе ризогенеза, приживаемость адаптированных микрорастений к нестерильным условиям, а также последствие этих факторов на вегетативную и генеративную продуктивность растений земляники, высаженных в полевые условия. В ходе эксперимента экспланты земляники различных сортов облучали люминесцентными лампами с преобладанием излучения в красной или синей областях спектра. На этапе укоренения применяли элиситоры – эмистим, арахидоновую кислоту и

экост 1/3. В результате исследований показано, что, изменяя условия культивирования эксплантов земляники, можно влиять на их биометрические показатели *in vitro*, а также в определенной степени контролировать процессы роста и развития растений *in vivo*.

Под воздействием красного и синего света существенно увеличилась частота укоренения эксплантов земляники на этапе ризогенеза, а также процент приживаемости микрорастений земляники на этапе адаптации к нестерильным условиям. Использование ламп различного спектрального состава обеспечило повышение вегетативной продуктивности (число усов, листьев и розеток) в зависимости от сорта. Наблюдалось увеличение отдельных показателей генеративной продуктивности (общее число генеративных образований, среднее число генеративных образований на цветонос) растений земляники в полевых условиях после облучения их в культуре тканей красным светом. В ходе эксперимента были отмечены сортовые различия в реакции растений на действие различных факторов культивирования.

Включение в питательную среду для укоренения арахидоновой кислоты в концентрации 10^{-7} М стимулировало рост корней в длину у микрорастений земляники. Лабораторные исследования показали, что под влиянием препарата экост 1/3 корнеобразование у некоторых сортов земляники замедлялось, а в полевых условиях последствие применения этого препарата проявилось в уменьшении у некоторых сортов числа листьев, усов и розеток по сравнению с остальными испытанными элиситорами. У растений, выращенных с применением элиситима и арахидоновой кислоты, была отмечена тенденция к увеличению числа розеток в полевых условиях.

БАХМЕТЬЕВА О.И., ПУТИНЦЕВА О.В., АРТЮХОВ В.Г.

*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Воронежский государственный университет»,
Воронеж, Россия*

ВЛИЯНИЕ ОКСИДА УГЛЕРОДА (II) НА РАЗВИТИЕ ПРОГРАММИРУЕМОЙ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Традиционно считалось, что монооксид углерода (CO), угарный газ, является сильнейшим ядом, и сама мысль о том, что это вещество может играть какую-либо

полезную роль для организма, казалась абсурдной. Это вещество образуется в процессе деградации гема под влиянием гемоксигеназы и используется в качестве мессенджера и регулятора многих физиологических функций. С ним связываются большие надежды на успех в разработке новых фармакологических средств, корригирующих эти нарушенные функции.

Естественный уровень CO в атмосфере — 0,01-0,9 мг/м³. В более высоких концентрациях весьма токсичен для человека и животных, вызывает кислородное голодание тканей за счет связывания с гемсодержащими белками (гемоглобином, миоглобином, цитохромами), что нарушает транспорт кислорода и тканевое дыхание. В настоящее время точно установлено, что CO вышел за рамки старой парадигмы, что угарный газ лишь токсичен и смертелен для организма. Сейчас доказано, что CO в низких физиологических концентрациях играет важную роль в различных физиологических и патологических процессах (П.П. Загоскин, 2008).

Иммунная система человека – сложно организованная многоуровневая структура, постоянно и одновременно реагирующая на многочисленные экзогенные и эндогенные агенты, раздражения, сигналы. Воздействие монооксида углерода на иммунокомпетентные клетки может привести к нарушению функционирования систем иммунитета, а возможно, и к гибели лимфоцитов. Из литературных данных известно, что эндогенно образовавшийся CO в организме человека может как стимулировать, так и ингибировать программируемую клеточную гибель тимоцитов, гепатоцитов, эндотелиальных и эпителиальных клеток, а также фибробластов и клеток Jurkat (Wu Lingyun, 2005).

В связи с вышесказанным целью исследования явилось изучение влияния оксида углерода (II) в различном диапазоне времени (60, 75 и 90 минут) на развитие программируемой клеточной гибели (ПКГ, апоптоз) лимфоцитарных клеток человека, в качестве показателя которой были выбраны уровень экспрессии CD95 маркера на их мембранах и степень фрагментации ДНК.

Лимфоциты выделяли из венозной крови доноров путем центрифугирования на градиенте плотности фиколл-урографин ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$) (Д. Кэтти, 2007). Суспензию клеток помещали в атмосферу оксида углерода (II), который получали лабораторным способом по химической реакции между концентрированными серной и муравьиной кислотами. Уровень экспрессии CD95 маркера на поверхности мембран нативных и CO-

модифицированных лимфоцитов крови человека (1×10^6 кл/мл) определяли методом цитофлуориметрии на проточном цитометре EPICS XL-MCL («Beckman coulter», США). Выделение ДНК из исследуемых клеток (2×10^6 кл/мл) проводили в соответствии с протоколом фирмы-производителя («Amplisens»), а изменения ее структуры (фрагментация) анализировали методом электрофореза в агарозном геле. Статистическую обработку результатов экспериментов проводили с помощью прикладной программы Microsoft Excel 2010.

Установлено, что средний уровень экспрессии CD95 антигенов на поверхности мембран нативных лимфоцитов составил $35,98 \pm 3,12$ %. После СО-модификации суспензии иммуноцитов в течение 60, 75 и 90 минут уровень анализируемого поверхностного маркера снизился до значений $31,51 \pm 1,20$ %, $28,94 \pm 1,33$ % и $26,09 \pm 1,26$ % соответственно. Можно предположить, что после воздействия молекулы СО на образцы лимфоцитов могут возникать процессы, способствующие падению экспрессии CD95 маркеров на поверхности мембран клеток: интернализация маркеров в более глубокие слои мембраны, шеддинг рецепторов с внешних примембранных слоев гликокаликса клеток, изменение конформации молекул CD95 в результате прямого или опосредованного действия оксида углерода (II), возможное блокирование синтеза исследуемых маркеров.

Методом электрофореза в агарозном геле было выявлено, что ДНК СО-модифицированных лимфоцитов мигрирует одной электрофоретической фракцией, характерной для ее нативной формы.

Следовательно, инкубация лимфоцитов крови человека в атмосфере оксида углерода (II) в течение 60, 75 и 90 минут не вызывает фрагментации молекулы ДНК и не индуцирует их апоптоз.

БЕЛЕНОВА А.С.¹, СЛИВКИН А.И.¹, КОВАЛЕВА Т.А.¹,

СЛИВКИН Д.А.², ЛОГВИНОВА Е.Е.¹

¹ Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

² Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

РАЗРАБОТКА НОВЫХ БИОПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ГИДРОЛАЗ

Липаза (триацилглицерол-ацилгидролаза, КФ 3.1.1.3) находит свое применение в различных областях промышленности и медицине. Уникальные каталитические свойства липолитических ферментов позволяют использовать их для получения различных соединений, как в лабораторных, так и в промышленных масштабах.

Липазы применяют для производства глицерина, жирных кислот, моноглицеридов, конверсии растительных масел в маргарины, для переэстерификации пищевых масел (получение масла какао).

Известно, что ферменты могут существовать как в свободной, так и в связанной формах. При этом имеются некоторые требования к носителям для иммобилизации ферментов: химическая и биологическая устойчивость, механическая прочность, высокая гидрофильность для обеспечения возможности протекания реакции в водной среде, достаточная проницаемость как для фермента, так и для соответствующего субстрата, безвредность при применении в медицине и пищевой промышленности.

Одним из таких носителей является хитин и его производные хитозаны, получаемые при деацетилировании хитина. По химической структуре хитозан является сополимером D-глюкозамина и N-ацетил-D-глюкозамина. За счет большого количество водородных связей, которые может образовать хитозан, он является универсальным сорбентом, связывающим огромный спектр веществ органической и неорганической природы, в том числе и ферментов.

В связи с возможным использованием хитозана как самостоятельного лекарственного препарата, его высокой биологической совместимостью и низкой токсичностью хитозанон становится перспективным носителем для создания новых лекарственных препаратов пролонгированного действия.

В этой связи мы осуществили адсорбционную иммобилизацию липазы из *Rhizopus niveus* на растворимом хитозане.

Определение количества белка в препарате свободной липазы осуществляли методом Лоури, в иммобилизованном ферменте – модифицированным методом Лоури. Каталитическую активность свободной и иммобилизованной липазы измеряли при помощи метода Андерсона-Маккарти.

Инфракрасные спектры поглощения липазы регистрировали на ИК-спектрофотометре Specord M-80 в диапазоне 4000-400 см⁻¹.

Наши опыты показали, что липаза, иммобилизованная на хитозане ($0,84 \pm 0,2$ кДа), сохраняет 55 % активности нативного фермента.

При исследовании зависимости каталитической активности фермента от температуры гидролиза триглицеридов установлено, что при иммобилизации фермента на хитозане расширяется диапазон оптимальных значений температуры гидролиза от 37 °С до 45 °С.

Выявлено, что свободный и иммобилизованный на исследуемом носителе фермент проявляет оптимальную каталитическую активность при pH 7,0.

Для получения данных о механизме взаимодействия фермента с носителями были зарегистрированы спектры поглощения свободного фермента, липазы иммобилизованной на хитозане, а так же спектры свободных носителей.

Проведенные исследования позволяют предположить, что при взаимодействии липазы с хитозаном связывание протекает по карбоксильным группам (аспарагиновой и глутаминовой кислоты) липазы и аминок группам носителя по типу водородных и электростатических взаимодействий.

Анализ полученных результатов по иммобилизации липазы на хитозане позволяет сделать заключение о том, что адсорбция фермента, не приводит к изменениям каталитически активной конформации, что позволяет считать хитозан перспективным носителем для иммобилизации ферментных препаратов с целью получения растворимых, стабильных и высокоактивных лекарственных препаратов пролонгированного действия.

БЕЛОУШКО Е.Е., ТИХОНОВА Л.А., КАМИНСКИЙ Ю.Г., КОСЕНКО Е.А.

Пуцинский государственный естественно-научный институт, Пушкино, Россия

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия

БИОТЕХНОЛОГИЯ ДЛЯ СНИЖЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ АРГИНИНА В КРОВИ

Работа посвящена разработке клеточной технологии для снижения патологически высокой концентрации аргинина в крови с помощью аргоцитов – эритроцитов с инкапсулированным в них ферментом аргиназой.

Врожденный недостаток фермента аргиназы может вызвать гипераргининемию с токсическим действием аргинина на печень и мозг у новорожденных детей. Гипераргининемия - метаболическое расстройство с симптомами прогрессирующих нейрологических и интеллектуальных нарушений, спастического паралича, задержки роста и эпизодической гипераммониемии, атрофией мозга. Врожденная гипераргининемия фатальна. Фундаментальные работы по снижению концентрации аргинина в крови в литературе отсутствуют. Биотехнологии по снижению концентрации аргинина в крови не существует, и ее разработка является главной задачей нашей работы.

Для приготовления аргоцитов-переносчиков аргиназы использовали эритроциты, полученные из смешанной крови лабораторных мышей. Процедура инкапсуляции аргиназы основана на гипотоническом диализе, «закаливании» и изотоническом «запечатывании» полученных клеток. Разработанный способ позволяет включить фермент, обладающий активностью, десятикратно превышающей активность, обнаруживаемую у пациентов с врожденным недостатком аргиназы в эритроцитах. Сразу после внутривенного введения аргоцитов или нативных эритроцитов мышам внутрибрюшинно вводили аргинин. Затем брали кровь из ретроорбитального венозного сплетения и в ней определяли аргинин, а также орнитин и мочевину ферментативными методами.

Введение аргоцитов резко, в 1.5-2.5 раза, ускорило метаболическое удаление аргинина при сравнении с его естественным удалением после введения нативных эритроцитов. Концентрация аргинина достигала нормального уровня (не отличимого от контроля) уже через 1 час после введения аргоцитов и продолжала оставаться на этом и даже более низком уровне через 2 часа и 4 часа, в то время как после введения

эритроцитов она нормализовалась только после 4 часов и вдвое превосходила концентрацию, достигаемую после введения аргоцитов.

Тенденция к повышению концентраций орнитина и мочевины в плазме крови мышей, получающих эритроциты или аргоциты, после введения аргинина сохранялась на всем протяжении 4-часового периода наблюдений. Это указывает на превращение аргинина в мочевину и орнитин в реакции, катализируемой внедренной в аргоциты аргиназой.

Заключение. Исследования показали, что аргоциты ускоряют убыль аргинина в плазме животных с гипераргининемией, что сопровождается усиленным образованием орнитина и мочевины. Они могут использоваться *in vivo* в качестве защитной системы при патологической гипераргининемии, в частности при генетическом недостатке аргиназы, а разработанная методика может рассматриваться как новая биотехнология, применимая в медицине и ветеринарии.

Работа поддержана Министерством образования и науки РФ.

Примечание: Белоушко Е.Е. и Тихонова Л.А. являются магистрантами Пущинского государственного естественно-научного института.

БЕЛЯЕВА Е.А.¹, СИРОШ А.А.²

¹*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук,
Санкт-Петербург, Россия*

²*Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия, Санкт-Петербург, Россия*

ПАКСИЛЛИН КАК ПРОТЕКТОР ОТ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

Митохондрии это первичная клеточная мишень для тяжелых металлов, являющихся важнейшими загрязнителями окружающей среды и причиной различных заболеваний и патологий. Выяснено, что в механизме цитотоксического действия тяжелых металлов

задействованы изменения во внутриклеточной продукции активных форм кислорода и митохондриальная дисфункция, опосредованная повреждением электрон-транспортной цепи и открытием $\text{Ca}(2+)$ -зависимой неселективной поры внутренней мембраны митохондрий. Однако возможные взаимодействия тяжелых металлов с другими митохондриальными каналами, в частности с селективными калиевыми каналами, такими, например, как $\text{Ca}(2+)$ -активируемый калиевый канал большой проводимости, который, как считается, выполняет защитные функции в клетке, практически не изучены. Не исследованы и механизмы взаимосвязи этих «защитных» калиевых каналов с электрон-транспортной цепью и неселективной порой внутренней мембраны митохондрий в процессе индукции митохондриальной дисфункции и клеточной смерти разного типа. Нами были получены данные, указывающие на достоверный защитный эффект паксиллина, блокатора $\text{Ca}(2+)$ -активируемого калиевого канала большой проводимости, против цитотоксического действия такого тяжелого металла как $\text{Cd}(\text{II})$. На двух клеточных линиях крысы - асцитной гепатоме AS-30D и нейрональной PC12 было показано, что паксиллин, взятый в концентрации 1 мкМ, усиливал клеточную выживаемость, существенно сниженную данным тяжелым металлом. В частности, паксиллин увеличивал на 10-15% жизнеспособность AS-30D клеток и на 15-20% - жизнеспособность PC12 клеток. Кроме того, недавно нами были получены интересные результаты по действию паксиллина на внутриклеточную продукцию активных форм кислорода в присутствии различных концентраций ионов $\text{Cd}(\text{II})$. Оказалось, что паксиллин снижает внутриклеточную генерацию активных форм кислорода, усиленную кратковременными инкубациями (30 мин и 3 часа) с $\text{Cd}(2+)$, что указывает на возможный терапевтический потенциал данного блокатора при различных патологиях. Будет продолжено использование метода мониторинга митохондриальной дисфункции как маркера патологического состояния клеток. Данный подход включает в себя оценку основных биоэнергетических параметров клетки, а именно скоростей клеточного и митохондриального дыхания в различных энергетических состояниях и величин дыхательного контроля и трансмембранного потенциала, а также измерение внутриклеточной продукции активных форм кислорода и проницаемости внутренней мембраны митохондрий и определение их чувствительности к различным эффекторам, в частности к эффекторам $\text{Ca}(2+)$ -активируемого калиевого канала большой проводимости,

неселективной поры и электрон-транспортной цепи митохондрий. Подобные исследования способны привести к лучшему пониманию молекулярных основ функционирования клеток в норме и при патологии, что существенно для разработки новых подходов к лечению многих заболеваний, для создания новых эффективных лекарств, и для решения практических проблем клинической медицины.

БЕРЕЖНЕВА З.А., ШПИРНАЯ И.А., ЦВЕТКОВ В.О.
Башкирский государственный университет, Уфа, Россия

ТРИПСИНОПОДОБНЫЕ ПРОТЕИНАЗЫ И ИНГИБИТОРЫ ТРИПСИНА В ПЛОДОВЫХ ТЕЛАХ ТРУТОВЫХ ГРИБОВ

В лесах на территории европейской части нашей страны произрастает несколько сотен различных видов и разновидностей трутовиков. Трутовые грибы или трутовики – группа грибов, относящаяся к классу *Basidiomycetes* и порядку *Aphyllophorales*.

Большая часть веществ, необходимых грибам для питания, находится в нерастворимом состоянии, особенно это касается источников углеродного питания. Поэтому огромную роль в жизни грибов играют гидролитические ферменты, переводящие различные соединения из нерастворимого состояния в растворимое. Наивысшая активность большинства ферментов наблюдается у целлюлозоразрушающих грибов, которыми являются трутовики. Биологически активные вещества трутовых грибов активно изучаются в связи с использованием их в медицине, промышленности, животноводстве.

Один из механизмов регуляции активности ферментов связан с присутствием в клетках живых организмов молекул, ингибирующих ферменты. Наиболее изученными ингибиторами являются белки растений и животных, подавляющие активность эндогенных и экзогенных протеолитических ферментов.

К настоящему времени имеется небольшое количество работ, посвященных изучению ингибиторов протеиназ в плодовых телах базидиомицетов.

Целью настоящей работы является определение уровня активности протеолитических ферментов и ингибиторов трипсина в плодовых телах трутовых грибов.

Объектом исследования служили плодовые тела трутовиков пяти видов: Трутовика лакированного (*Ganoderma lucidum*), Т. разноцветного (*Trametes versicolor*), Т. горбатого (*Trametes gibbosa*), Т. лиственничного (*Fomitopsis officinalis*), Т. плоского (*Ganoderma applanatum*). Сбор плодовых тел осуществляли осенью в Иглинском районе Республики Башкортостан. Отбирали молодые (неодревесневшие) плодовые тела, которые после сбора замораживали.

Для экспериментальных исследований навеску замороженных плодовых тел растирали в фарфоровой ступке с кварцевым песком, заливали дистиллированной водой в соотношении 1:1. Оставляли экстракт на 1,5 часа при 4⁰С, далее фильтровали и дважды центрифугировали при 10000 об/мин на центрифуге MPW-310 (Польша) в течение 10 мин. В дальнейших исследованиях использовали супернатант.

Фотометрическое определение активности протеиназ и ингибиторов трипсина, осуществляли по интенсивности гидролиза синтетического субстрата БАПНА (N, α -бензоил-DL-аргинин-паранитроанилид). За единицу активности фермента (Е) принимали такое его количество, которое в стандартных условиях образует 1 мМ п-нитроанилида за 1 мин.

Все исследованные образцы трутовых грибов характеризуются высокой протеолитической активностью. Наибольшая активность отмечена для плодовых тел Т. разноцветного (476,3 Е/г сырой массы), Т. горбатого (502,65 Е/г сырой массы), Т. лиственничного (431,6 Е/г сырой массы). Активность ингибиторов трипсина, также выявляется на достаточно высоком уровне.

В целом, прослеживается четкая закономерность – в образцах, обладающих высокой протеолитической активностью уровень активности ингибиторов трипсина значительно снижен. Так, к примеру, для Трутовика горбатого активность протеиназ составляет 502,65 Е/г сырой массы, ингибиторов трипсина – 86,85 ИЕ/г сырой массы; для Трутовика лакированного активность протеиназ – 207,9 Е/г сырой массы, ингибиторов трипсина - 394,75 ИЕ/г сырой массы. Напротив образцы со средними значениями активности протеиназ, обладают большей активностью ингибиторов трипсина.

Вероятно, ингибиторы представлены в основном белками, основной функцией которых является регуляция активности эндогенных протеолитических ферментов.

Изменение баланса «протеиназы – ингибиторы» в ту или иную сторону является следствием изменения физиологического состояния организма гриба.

Трутовые грибы обладают высоким биосинтетическим потенциалом, продуцируя широкий спектр ферментов и биологически активных веществ. В частности, обладая высокой активностью комплекса «протеолитические ферменты – ингибиторы протеиназ» трутовые грибы могут являться доступным сырьем для получения данных соединений.

БЕРЕЗИНА Е.В., ПАВЛОВА Е.Е., БРИЛКИНА А.А.

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,

Нижний Новгород, Россия

СОДЕРЖАНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ У РАСТЕНИЙ КЛЮКВЫ БОЛОТНОЙ И КРУПНОПЛОДНОЙ В УСЛОВИЯХ *IN VIVO* И *IN VITRO*

Аскорбиновая кислота в растительном организме выполняет ряд важных функций: так, она является антиоксидантом, защищает от избыточной инсоляции, стимулирует рост и цветение. Для человека это соединение является витамином С, и, помимо антиоксидантного действия, для аскорбата характерно участие в биосинтезе нейромедиаторов, гормонов, коллагена, в формировании иммунного ответа. Ценным источником витамина С являются многие плоды, в частности ягоды клюквы.

Цель работы заключалась в оценке содержания аскорбиновой кислоты в листьях и ягодах клюквы. Объектами исследования служили интактные и стерильные растения клюквы болотной (*Oxycoccus palustris* Pers.) и крупноплодной (*O. macrocarpus* (Ait.) Pers. – сортов Ранний черный, Стивенс и Ховес). Листья растений открытого грунта собирали в 2011 г. в периоды набухания почек, цветения и плодоношения; ягоды собирали в фазу спелости. Стерильные пробирочные растения были получены из семян и пазушных почек. Содержание аскорбата определяли спектрофотометрически (UV-1700 (Shimadzu)) по реакции с гексацианоферритом калия.

В период набухания почек содержание аскорбиновой кислоты было приблизительно одинаковым у всех исследованных растений – 1.05-1.14 мг/г сырой массы. В июне, в период цветения, этот показатель составил 0.95 мг/г сырой массы (клюква

болотная), 1.21 (Ранний черный), 1.25 (Ховес), 1.30 (Стивенс; статистически значимые отличия отмечены между клюквой болотной и сортом Стивенс, $p < 0.05$). При переходе к плодоношению содержание аскорбата у клюквы крупноплодной уменьшилось в 5.3-7.8 раза (в зависимости от сорта), тогда как у клюквы болотной оно увеличивалось на 35%. Примечательно резкое падение уровня аскорбиновой кислоты в листьях клюквы крупноплодной: очевидно, что для растений вида-интродуцента, исконно произрастающего только на территории Северной Америки, осеннее похолодание привело к активному вовлечению аскорбата в работу антиоксидантной системы.

Итак, листья клюквы могут накапливать значительное количество аскорбата, однако в пищу в качестве источника витамина С употребляются ягоды. В результате проведенной работы показано, что по изучаемому показателю плоды клюквы болотной превосходят плоды клюквы крупноплодной сорта Стивенс более чем в два раза (0.13 и 0.06 мг/г сырой массы). Анализируя полученные данные, можно заключить, что ягоды накапливают меньше аскорбиновой кислоты, чем листья, и максимальные различия между листьями и ягодами по содержанию витамина С могут достигать 10 раз для клюквы болотной и 24 раз – для крупноплодной.

При введении растений в культуру *in vitro* способность к синтезу аскорбиновой кислоты, в целом, сохранялась. Наименьшее количество аскорбиновой кислоты обнаружено в стерильных растениях клюквы болотной и клюквы крупноплодной сорта Стивенс: соответственно 0.06 и 0.23 мг/г сырой массы при отсутствии статистически значимых ($p < 0.05$) различий. Сорта Ховес и Ранний черный накапливали соответственно 1.49 и 1.61 мг/г сырой массы при отсутствии статистически значимых ($p < 0.05$) различий. Т.о., растения сорта Стивенс, по сравнению с другими исследованными сортами клюквы крупноплодной, в период цветения имели тенденцию к накоплению большего количества аскорбата и так же, как и растения клюквы болотной, в условиях *in vitro* аскорбиновой кислоты синтезировали в меньшем количестве. Для пробирочных же растений сортов Ранний черный и Ховес отмечена тенденция к накоплению большего количества аскорбата, чем в максимуме за вегетацию (период цветения).

Согласно полученным результатам можно сделать вывод о том, что способность к синтезу витамина С зависит от генотипа, периода вегетации, органа, а также от условий местообитания/культивирования. Так, в условиях открытого грунта аскорбиновой кислоты

в листьях синтезируется больше, чем в ягодах, и в клюкве болотной, как правило, больше, чем в крупноплодной. При этом в стерильных условиях уровень накопления значительно снижен у клюквы болотной и сорта Стивенс, тогда как у сортов Ранний черный и Ховес клюквы крупноплодной он даже несколько увеличился по сравнению с максимумом для интактных растений.

БЕРЛОВ Д.Н.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

ПЕРЕХОД ОТ ДЕТЕКТОРНОГО ВОСПРИЯТИЯ К ОБЪЕКТНОМУ КАК ВОЗМОЖНАЯ ДЕТЕРМИНАНТА ЭВОЛЮЦИИ КОГНИТИВНЫХ ФУНКЦИЙ

Со времен классической работы “What the Frog's Eye Tells the Frog's Brain” (Lettvin et al., 1959) считается, что зрение лягушки основано на детекторах, что существенно отличается от зрительного восприятия человека, основанного на выделении объектов (Wannig et al., 2011). Нейроны-детекторы, селективно настроенные на определенную комбинацию признаков внешнего сигнала, запускают определенное поведение со своим набором стереотипных движений: пищевое, оборонительное поведение и т.д. (Смит, 2005). Для детектирования нет необходимости выделения всех характеристик объекта, полного его описания, достаточно определить набор ключевых признаков. Такая система позволяет быстро реагировать на типичные ситуации, но ограничивает репертуар поведенческих реакций. Построение более гибкого поведения на тех же принципах сталкивается со значительными трудностями. Добавление новых детекторов в систему требует добавления новых морфологических элементов и возможно только в ограниченных пределах. С другой стороны, увеличение количества детекторов приводит к увеличению вероятности ситуации, в которой один объект вызывает реакцию сразу нескольких детекторов и соответственно активацию нескольких моторных программ, возможно противоречивых.

Согласно нашей гипотезе переход от детекторного восприятия к объектному является ключевым звеном в цепи, связанной с появлением психических (ментальных) состояний. Момент, когда мог произойти подобный переход, пока неизвестен. Анализ информации у лягушек возможен на уровне интеграции информации от детекторов

первого уровня, такая возможность сопоставлять комбинации с различных детекторов может быть первым шагом к объектному восприятию. Так, в зрительном тектуме лягушки помимо нейронов связанных с детекторами постоянного контраста, детекторами выпуклости, детекторами движущегося края и On- и Off- детекторами, обнаружены и другие типы нейронов с большими рецептивными полями – "детекторы нового" и "детекторы прежнего" (Смит, 2005).

Необходимо учитывать, что сравнительные исследования наборов детекторов (детектируемых признаков) у разных видов малочисленны. Остается открытым вопрос, является ли этот набор филогенетически устойчивым или он неустойчив и сильно зависит от экологии вида. Так А. Robins и L.J. Rogers (2006) показали, что у жаб наблюдается латерализация пищевого поведения для незнакомых и знакомых объектов добычи, сопровождающаяся устойчивой долговременной памятью. Тем не менее, сравнительное исследование морфологии и рецептивных полей тектума игуаны и верхнего двуххолмия хомяка и кошки показало, что между представителями этих групп наблюдается значительное сходство (Stein, Gaither, 1983).

Переход к восприятию, основанному на выделении объектов, мог иметь ряд важных последствий. Во-первых, у объекта есть семантическое значение, что создает предпосылки к развитию долговременной памяти и усилению роли условных рефлексов. Во-вторых, выбор конкретной интерпретации всегда связан с некоторой степенью уверенности в такой интерпретации, имеющей как объективную, так и субъективную модальность. В-третьих, объектное восприятие, как способ выделения объекта из фона, могло быть одним из этапов совершенствования системы внутреннего картирования пространства, что в свою очередь могло привести к появлению способности мозга к проекции, важной для филогенеза сознания (Feinberg, 2012).

Таким образом, изменения в строении и функционировании нервной системы способствующие возникновению и развитию психики могли возникнуть в процессе эволюции от амфибий к высшим амниотам. Данная точка зрения сходна с представлениями М. Cabanas и соавторов (2009), считающих (на основе сравнительного анализа анатомии, распределения дофаминовых рецепторов и ряда физиологических реакций), что возникновение сознания связано с изменениями в работе мозга у ранних амниот. В тоже время, имеющийся на данный момент уровень знаний не позволяет

однозначно определить этот момент, не исключено, что необходимые предпосылки могли возникать неоднократно. Это требует дальнейших исследований с учетом факторов образа жизни животного и эволюции теленцефалона.

БЕШКАРЕВА М.А., ТРЕТЬЯКОВ В.Ф.

ИНХС РАН им. А.В. Топчиева, Москва, Россия

ПОЛУЧЕНИЕ АВИАЦИОННОГО ТОПЛИВА ДЛЯ СОВРЕМЕННЫХ ДВИГАТЕЛЕЙ ИЗ БИОСПИРТОВ

В мире в связи с растущим потреблением моторных топлив и сокращением нефтяных запасов ведется эффективный поиск альтернативы традиционному углеводородному сырью. При этом резко повысился интерес к возобновляемым источникам энергии в связи с проблемой глобального потепления и принятием многими странами Киотского соглашения, ограничивающего объем выбросов диоксида углерода в атмосферу Земли. Используя нефть, уголь, природный газ и горючие сланцы, достичь сокращения выбросов диоксида углерода невозможно, так как в любом случае он выделяется при сжигании или иных типах конверсии входящего в их состав углерода.

Коммерческий авиационный транспорт на сегодняшний день несет ответственность за выбросы диоксида углерода, полученного при сжигании авиационного топлива, в размере 700 млн. тонн, что составляет 2,31% от общего антропогенного диоксида углерода. Прогнозы роста авиационного парка показывают, что выбросы диоксида углерода, осуществляемые быстро растущим сектором, достигнут более 1 млрд. тонн к 2025 году.

Для использования реактивных двигателей 5 поколения подходят только высокоплотные топлива. Получить такие виды топлива из нефти невозможно, поэтому США принято решение использовать для нужд ВВС керосины с повышенной плотностью, получаемые из биосырья.

На сегодняшний день биоспирты рассматриваются как перспективный сырьевой источник для получения различных углеводов, в том числе олефинов, толуола, ксилола, алканов и моторных топлив различного назначения.

С точки зрения экологии биоспирты, как возобновляемое сырье, являются наилучшим источником углеводов по сравнению с углем или нефтью. Биоспирты (биоэтанол и биобутанол) могут быть получены посредством ферментации из биосырья любого происхождения. Авиационное топливо, полученное из биоспиртов, не приводит к увеличению выбросов диоксида углерода в атмосферу Земли.

В настоящее время во всем мире уделяют большое внимание альтернативным энергоносителям. **Авиакомпания Lufthansa (Германия) начала испытания биотоплива на регулярных рейсах. В одном из двигателей самолетов будут использовать смесь обычного топлива и биокеросина** (производится из чистой биомассы без примесей, переработанной в жидкость, и состоит из грибов семейства рыжиковых, животных жиров и семян растений) **в соотношении 50:50**. Авиакомпания TAM (крупнейшая авиакомпания Бразилии) совместно с Airbus провели первый тестовый полет на биотопливе, полученном из ятрофы. Королевские ВВС Нидерландов продемонстрировали вертолет Apache на биотопливе (50/50 устойчивого биокеросина и стандартного реактивного топлива). Авиакомпания Iberia первой в Испании выполнила полет с использованием биотоплива на самолете Airbus A320 по маршруту из Мадрида в Барселону. Полет был выполнен с использованием смеси традиционного авиационного топлива (75%) и биотоплива (25%), полученного из растения рыжик.

В России пробные опыты получения авиационного топлива из биоэтанола и смеси биоэтанола и биобутанола были проведены в ИНХС РАН им. А.В. Топчиева.

Нами разработан метод каталитической конверсии биоэтанола на цеолитных катализаторах типа HZSM-5 с получением жидкой фракции, содержащей более 50% ароматических углеводов, гидрирование которой позволяет получать углеводородные компоненты, соответствующие составу углеводородных моторных топлив различного назначения.

После проведения процесса гидрирования количество ароматических углеводов снижается, в зависимости от глубины гидрирования, до 12-21%. При этом в конечном продукте практически отсутствует бензол. Таким образом, полученная фракция после гидрирования используется как реактивное или автомобильное топливо.

В результате сравнения фактических численных значений нормируемых техническими требованиями основных показателей реактивного топлива, получаемого из

нефти, и соответствующих показателей полученного образца реактивного топлива из биоэтанола показано, что опытный образец соответствует нормативным требованиям к реактивному топливу для авиационных газотурбинных двигателей.

Таким образом, впервые в России по Техническим требованиям ЦИАМ в ИНХС РАН им. А.В. Топчиева совместно с ЦИАМ и МИТХТ им. М.В. Ломоносова созданы опытные образцы жидкого синтетического углеводородного топлива для авиационных ГТД из биосырья.

БИЛЯЛОВА А.С., ШПИДОНОВА Е.А., ВОЙНО Л.И.

Московский государственный университет пищевых производств, Москва, Россия

ВЫСШИЙ БАЗИДИАЛЬНЫЙ ГРИБ LAETIPORUS SULPHUREUS – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ПРОДУЦЕНТ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Laetiporus sulphureus – гриб - трутовик растет и развивается с последней декады мая до сентября на дубах, ясенях, реже на кленах, ивах.

Трутовиковые грибы относятся к классу Базидиальных грибов, к подклассу Холобазидиомицеты (*Holobasidiomycetidae*). Этот подкласс объединяет грибы с нераздельной одноклеточной булавовидной или цилиндрической базидией, развивающейся непосредственно из производящей её и затем распространяющей клетки. Трутовик серно-жёлтый (*Laetiporus sulphureus*) относится к семейству Полипоровые (*Polyporaceae*). Он является ксилотрофом, факультативным сапрофитом, возбудителем бурой гнили древесины. В литературе этот гриб называют « Желтым цыпленком леса».

Серно-жёлтый трутовик имеет однолетнее плодовое тело, расположенное обычно невысоко над землёй на стволах деревьев. На первой стадии развития оно выглядит как каплевидная желтоватая мясистая масса от интенсивно жёлтого до оранжевого цвета. Постепенно плодовое тело твердеет, приобретая характерную форму «уха», состоящего из нескольких сросшихся веерообразных шляпок, часто сидящих на одном общем основании, изредка одиночных. Размер шляпок от 10 до 40 см. Максимальная толщина у ствола дерева — около 7 см. Масса гриба может достигать 10 кг и более. Гриб покрыт лёгким пушком кремово-жёлтого цвета. Мякоть: мясистая, упругая, сочная, светло-желтая со

специфическим запахом, затем - сухая, беловатая, позднее - твердая и деревянистая. Старые грибы сильно поражаются насекомыми.

Гименофор трубчатый с мелкими округлыми или зубчатыми порами. Молодые грибы обильно выделяют водянистые капельки жёлтого цвета. Трубочки жёлтые, короткие, длиной 2—4 мм.

Споровый материал бледно-кремовый. Генеративные гифы в ткани тонкостенные, с простыми перегородками, относительно редко ветвящиеся, диаметром 4—12 мкм. С возрастом появляются связывающие гифы с утолщенными или толстыми стенками, сильно ветвящиеся, с ветвями, отходящими от главного ствола, диаметр 4—20 мкм, полностью замещающие генеративные. Базидии булабовидные, с 2—4 стеригмами и соответственно формируют 2 или 4 базидиоспоры.

Биомасса гриба содержит до 38–40% белка, характеризующегося высоким содержанием особо ценных незаменимых аминокислот. В сравнении с эталонным белком содержание: лизина 130%, лейцина 120%, валина и фенилаланина 148%. Отсутствуют тяжелые металлы, обладающие токсичностью. Молибден, никель, кобальт, хром и кадмий находятся в количествах, не превышающих допустимых норм. Имеются данные об антимикробных свойствах плодовых тел *Laetiporus sulphureus*.

Содержание органических кислот, углеводов, жирных кислот, фенолов, алкалоидов и аминокислот в значительной степени определяется климатическими условиями места произрастания гриба. Доминирующую роль в проявлении антиоксидантного эффекта экстрактов из плодовых тел и биомассы *Laetiporus sulphureus* играют фенольные соединения, водорастворимые полисахариды и каротиноиды.

Плодовые тела и биомасса содержат до 20%. Пищевая и фармакологическая ценность липидов определяется содержанием и сбалансированностью в них незаменимых полиненасыщенных жирных кислот. В липидах *Laetiporus sulphureus* присутствуют в основном жирные кислоты с длиной цепи от 14 до 18 атомов углерода, 60-80% от суммы жирных кислот составляют ненасыщенные жирные кислоты, содержание линолевой кислоты – 55-70% и выше, доля олеиновой кислоты не превышает 8-15%. Среди насыщенных жирных кислот липидов наибольший удельный вес приходится на пальмитиновую кислоту, составляющую 7,6-26,3% от суммы всех кислот. Что касается

других жирных кислот в составе общих липидов, то они содержатся в незначительных количествах, и их доля не превышает 1-3% от суммы всех кислот.

Имеющиеся в настоящее время многочисленные данные о способности синтезировать широкий спектр ценных биологически активных веществ свидетельствуют о важности и перспективности исследования и культивирования гриба *Laetiporus sulphureus* с целью получения широкого спектра биологически активных веществ.

БЛИНКОВА Л.П., БЕРЖЕЦ В.М., ХЛГАТЯН С.В., КОРЕНЕВА Е.В.,

ВАСИЛЬЕВА А.В., ЕМЕЛЬЯНОВА О.Ю., ПИЩУЛИНА Л.А.

ФГБУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, РАМН, Москва, Россия

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К СОЗДАНИЮ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ АЛЛЕРГЕНОВ ИЗ *CANDIDA ALBICANS*

В связи с высокой потребностью в препаратах для диагностики микогенной аллергии целью исследования являлась разработка технологии получения грибковых аллергенов для диагностических панелей. Условия создания таких препаратов включают: поиск штаммов – продуцентов антигенов с высокой аллергенной активностью, характерной для возбудителей определенной климато-географической области; подбор сред, адекватных для данного штамма-продуцента, а также биотехнологических параметров выращивания культур. Биомассу подвергают инаktivации с последующим выделением из нее целевых аллергенспецифических продуктов.

Методы и средства. Эксперименты проводили, используя чистые культуры одного из наиболее активных микромицетов - *C. albicans*, выделенные от больных, и музейные штаммы. Для выращивания *C. albicans* были сконструированы 2 минеральные (безбелковые) среды СС1 и МЛ в жидком и агаризованном вариантах. В опытах также использовали традиционную среду Сабуро. Поскольку формирование биополимеров клетки зависит от энергетических источников, в питательные среды добавляли глюкозу в концентрациях от 0,25 до 4%. Одним из параметров культивирования было время выращивания. Инаktivированную биомассу использовали для экстракции аллергенов. Иммунохимическую оценку препаратов проводили методом электрофореза в

полиакриламидном геле. Содержание белка, углеводов и нуклеиновых кислот в препаратах определяли традиционными методами (по Несслеру и Бредфорду, Дюбуа, Спирину, соответственно). Специфическую аллергенную активность оценивали *in vitro* в реакции непрямо́й дегрануляции тучных клеток крыс (НДТК), а также по проценту связывания IgE-антител в сыворотках больных.

Результаты. Электрофорез препаратов показал, что молекулярная масса белков была 32-97 кДа. В зависимости от условий культивирования в 15 сериях аллергенная активность в НДТК колебалась от 8 до 36%. Методом иммуоблота выявлено, что белковые фракции имели IgE-связывающую активность до 80%.

Выводы. Таким образом, испытанные условия выращивания штаммов *C. albicans* и выделения из них антигенов, позволяют получить аллергенспецифические препараты.

БЛИНКОВА Л.П.¹, СТОЯНОВА Л.Г.², ГОРБАТКО Е.С.¹, ПАХОМОВ Ю.Д.¹,
ЗАЙЦЕВА Е.В.¹, УСТЮГОВА Е.А.², МАКСИМОВА О.В.³

¹ФГБУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН, Москва, Россия

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

³МГМУ им. И.И. Сеченова, Москва, Россия

БАКТЕРИОЦИНЫ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ИСТОЧНИК АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Цель. Скрининг, выделение, изучение свойств бактериоцинов - антибактериальных и иммунорегулирующих веществ пептидной, белковой, полисахаридно-белковой природы (низин, томицид, стафилококцины и др.), которые, как известно, эффективны в отношении антибиотикорезистентных культур и, как правило, присутствуют в пробиотических штаммах.

Материалы и методы. С использованием адекватных методов выявления продукции бактериоцинов у возбудителей разных таксономических групп, циркулирующих в клиниках среди больных с разной нозологией заболеваний, проводится поиск наиболее эффективных веществ с широким спектром действия.

Результаты. Нами было показано, что частота встречаемости признака бактериоцинопродукции среди клинических штаммов, выделенных от детей и взрослых, составляла от 50 до 60%. Штаммы-продуценты были депонированы в Национальных коллекциях. Для дальнейшего поиска бактериоциносинтезирующих культур выбраны группы больных с разной нозологией заболевания (имеющие аллергические заболевания, инфекции ЖКТ, верхних дыхательных путей и др.).

Нами формируется лабораторная коллекция клинических штаммов – продуцентов бактериоцинов.

Выводы. Высокий процент бактериоцинопродуцирующих штаммов, выявленный у свежесделанных клинических культур, свидетельствует о перспективности проводящегося скрининга для получения эффективных антибактериальных препаратов. Теоретический и практический интерес представляет вопрос о выявлении в клиническом материале некультивируемых форм, которые могут влиять на возникновение хронического процесса инфекционного заболевания.

БОГДАЕВ А.А., БОГДАЕВ А.Г., ПОПОВ В.Н.

Воронежский Государственный Университет, Воронеж, Россия

НЕКОТОРЫЕ ИТОГИ РАЗВИТИЯ ПРОМЫШЛЕННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШИИ-ТАКЕ (*Lentinus edodes* (Berk.))

В КНР основой повышения продуктового обеспечения населения в период интенсивного роста экономического развития стало, в частности, промышленное грибоводство. Объёмы производства шии-таке возросли в Китае в десятки раз. Плодовые тела шии-таке являются диетическим продуктом со сбалансированным составом аминокислот, высокой пищевой доступностью, отсутствием вредных веществ. Шии-таке – продукт, соответствующий принципу «еда лечит». Ткани грибов содержат спектр веществ, оказывающих благотворное влияние на ряд систем организма млекопитающих. В том числе на иммунную и кровеносную системы – наиболее уязвимые среди населения крупных городов. Компоненты, содержащиеся в тканях плодовых тел, способны снижать риск образования онкоклеток, уменьшать интенсивность накопления точечных мутаций в

соматических тканях человека. *L. Edodes* является редуцентом первого порядка, что означает, что биопроизводство грибов происходит по самой короткой схеме: утилизация растительных остатков с высоким содержанием лигнина завершается получением непосредственно продукта питания. Отработанные субстратные блоки – ценная высокобелковая биомасса для компостирования.

В период с 1999 года наши усилия, направленные на формирование и совершенствование промышленного производства шиитакэ (применительно к климатическим условиям Центральной России) сопровождались рядом успешных результатов. К 2000 году был разработан и внедрён регламент производства мицелия и субстратных блоков шиитакэ с минимальным процентом брака по инфицированию (<1%). В 2003 году был разработан новый продукт питания – растительное масло с добавлением масляного экстракта свежих плодовых тел шиитакэ. Позже было определено, что продукт может служить средством вспомогательной терапии при проведении химиотерапии ряда онкозаболеваний. Продукт был запатентован, было выпущено 2 промышленных партии масла с экстрактом шиитакэ.

К 2006 году нами была подробно изучена физиология плодоношения шиитакэ в промышленных условиях (в том числе водный баланс в период плодообразования). Полученные сведения позволили модифицировать практиковавшиеся ранее технологические приёмы в направлении энергосбережения, водосбережения, повышения валовой урожайности, снижения потерь от инфицирования блоков (до 1,5%), многократного снижения затрат ручного труда. Прикладные исследования позволили авторам в 2009 году для союзной Республики Беларусь осуществить коррекцию проекта ростовых комплексов для крупнейшего в Восточной Европе комплекса по производству и переработке шиитакэ. Климатически условия юга РБ позволили радикально удешевить систему организации микроклимата, внедрить принцип автономности и дублирования систем.

Для российских грибководческих ферм изначально остро стоял вопрос производства стерильных блоков шиитакэ, что лимитировало перспективу создания шиитаковых хозяйств. Например, работа ООО «Экополис», неоднократно была парализована потерями из-за инфицирования блоков при производстве (40-90%).

В 2008 году на ООО «Хоши» после существенной модификации стерилизующего комплекса нам удалось впервые в России организовать механизированное производство стерильных блоков ши-таке, что реализовало перспективу производства качественных блоков большими партиями (до 16 тысяч шт./мес), стандартного качества, при низком инфицировании. Это расширяет перспективы производства ши-таке в климатических условиях России.

БОГДАЕВ А.А., БОГДАЕВ А.Г., ПОПОВ В.Н.

Воронежский Государственный Университет, Воронеж, Россия

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОНТРАСТНЫХ ТЕМПЕРАТУР ПРИ СЕЛЕКЦИИ ТКАНЕЙ ПРОМЫШЛЕННОГО ШТАММА ШИИ-ТАКЕ (*Lentinus edodes* (Berk.))

В качестве исходного объекта селекционной работы использовалась линия промышленного штамма ши-таке (4080, Silvan), содержащая мутационные изменения, приводящие к формированию базидиом с аномальной морфологией (БАМ). При культивировании в условиях промышленной фермы «Bio-ur» (Швейцария), изучаемая линия ши-таке демонстрировала высокие технологические характеристики как в период инкубации субстратных блоков, так и в период плодоношения (в том числе высокий процент урожайности). Однако 25-40% полученных плодовых тел имели морфологические аномалии (диспропорции в развитии шляпки и ножки базидиом, аномальная форма шляпки), ведущие к потере товарного вида. Присутствие большого количества морфологически нормальных плодовых тел, а также варьирование процента аномальных базидиом в различных партиях субстратных блоков позволили предположить наличие генетической мозаичности клеток тканей как у субстратных блоков ши-таке, так и в тканях самих базидиом.

Также было учтено предположение о том, что крупные морфологические аномалии базидиом не являются результатом точечных мутаций, а стали следствием комплексного повреждения генетического аппарата мутантных клеток, что, возможно, приводит к ослаблению метаболической активности в целом.

Была предпринята попытка осуществить разделение клеток, несущих мутантные изменения и нормальных. Планировалось создать контрастные селективные условия, обеспечивающие преимущества для роста и развития клеток мицелия шиитаке, не имеющих комплекса мутаций. В качестве селективного агента использовали контрастные температурные условия культивирования (нижняя температурная граница - +1С) на протяжении длительного периода (65 суток), включающего как период инкубации субстратных блоков, так и фазу первой волны плодоношения. Был получен ряд линий мицелия, донорами которых являлись морфологически нормальные зародыши плодовых тел шиитаке, сформировавшиеся в селективных температурных условиях.

Отобранные линии подвергались морфо-физиологическому контролю на ряде субстратов, традиционных для культивирования шиитаке.

В результате работы был получен штамм, характеризующийся отсутствием морфологических аномалий базидиом. Плодовые тела полученного штамма имеют менее насыщенную пигментацию по сравнению с исходным штаммом.

БОЕВА Т.В.¹, МУКАТОВА М.Д.²

¹ ГНУ Всероссийский научно исследовательский институт орошаемого овощеводства и бахчеводства, Камызяк, Россия

² Астраханский государственный технический университет, Астрахань, Россия

БИОСТИМУЛЯТОР ДЛЯ ПРЕДПОСЕВНОЙ ОБРАБОТКИ СЕМЯН АРБУЗА

В последние годы наблюдается повышенный интерес к использованию в сельскохозяйственном производстве, в том числе бахчеводстве, экологически безопасных средств защиты растений и стимуляторов роста на биологической основе. Хитозан из панциря речных раков является уникальным биополимером, на основе которого возможно изготовление биологического препарата. На основе низкомолекулярного хитозана в ФГБОУ ВПО «Астраханский государственный технический университет» был разработан, препарат «Агростимул», являющийся совершенно безопасным препаратом, приготовленным на основе природного сырья.

Учеными Всероссийского научно-исследовательского института орошаемого овощеводства и бахчеводства в творческом содружестве с исследователями лаборатории «Пищевая биотехнология и БАВ» Астраханского государственного технического университета проводились исследования по разработке применения препарата Агростимул для предпосевной обработки семян арбуза, для обеспечения высоких посевных качеств семян, повышения урожайности товарных и семеноводческих посевов бахчевых культур.

В качестве объектов исследования были использованы: низкомолекулярный хитозан с молекулярной массой (Мм) 20 кДа, препарат «Агростимул», семена и плоды арбуза сорта Фотон.

Полученный препарат «Агростимул» был использован для обработки семян арбуза сорта «Фотон» перед посевом в лаборатории ГНУ ВНИИОБ и в полевых условиях.

На первом этапе биологических испытаний было проведено изучение действия предпосевной обработки семян препаратом «Агростимул» на основе низкомолекулярного хитозана с Мм 20 кДа. Обработка была проведена в лабораторных условиях препаратом «Агростимул» (раствором хитозана с концентрацией 0,02%) продолжительностью 6 часов. Контролем служили семена замоченные в воде в течение 6 часов.

Выявлено, что предпосевная обработка семян арбуза сорта «Фотон» препаратом «Агростимул» повышает посевные качества семян: энергию прорастания, лабораторную и полевую всхожесть на 3-11% соответственно по сравнению с контролем. Обработка семян перед посевом положительно повлияла и на формирование плодов арбуза.

Урожайность при обработке семян препаратом «Агростимул» выросла на 9,5 т/га и составила 43,3 т/га, что на 28 % выше в сравнении с контролем (33,8 т/га). Выход семян превысил контрольный вариант на 9,6 %.

Предпосевная обработка семян препаратом «Агростимул» положительно сказалась и на качестве плодов; во всех вариантах отмечено увеличение в плодах сухих веществ, накопление сахаров и аскорбиновой кислоты по сравнению с контролем.

В полевых условиях у растений арбуза сорта «Фотон» наблюдалось повышение устойчивости к неблагоприятным факторам. Препарат «Агростимул» способствовал повышению адаптивной возможности растений арбуза, включая быструю перестройку метаболизма в условиях резкой смены некоторых факторов окружающей среды, устойчивости к болезням, а также повышению урожайности.

Таким образом, результаты лабораторных и полевых испытаний предпосевной обработан семян арбуза сорта «Фотон» препаратом «Агростимул», изготовленным на основе низкомолекулярного хитозана с Мм 20 кДа, показали стимулирующее действие на следующие процессы:

- усиление энергии прорастания семян, повышении всхожести и формирование вегетативной массы.

- предпосевная обработка семян арбуза сорта «Фотон» препаратом «Агростимул» способствует увеличению урожайности на 28 % по сравнению с контролем, что является дополнительным резервом увеличения продуктивности товарных и семеноводческих посевов и повышения качества выращиваемой продукции.

БОЗОРОВ Б.М., ХОДЖИЕВА Д., МИРЗАЕВА Н.Д.

Самаркандский государственный университет, Самарканд, Узбекистан

ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТИ ВЫСШЕЙ НЕРВНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ У ГРЫЗУНОВ В РАЗЛИЧНЫЕ СЕЗОНЫ ГОДА

Желтый суслик это типичный представитель глинистых пустынь и предгорных полупустынь Центральной Азии. Биология и экология его изучена еще недостаточно. Желтый суслик самым крупным представителем своего рода и где 7-8 месяцев в году проводит в летнее-осенне-зимней спячке. В период летней спячки температура его тела падает до 21-26⁰ С при норме 36-37⁰ С. Летняя спячка этих животных тесно связана с повышением температуры окружающей среды до 42-45⁰ С высыханием эфимерной растительности, отсутствие воды в пустыне и созданием неблагоприятных условий заставляют животных впадать в летнюю спячку.

Поэтому над нами была поставлена задача изучить их высшую нервную деятельность в период наибольшей активности (весной) и в период вхождения на фоне летней спячки (летом).

Методика исследования. Опыты проводили по оборонительной методике в экспериментальную камеру размером 60x80x130 см. Камера была разделена на эти отсеки. В среднем отсеке камеры на полу были вмонтированы металлические контакты с

расстоянием между ними 2-3 мм. Условным положительным раздражителем служил четырехугольник. Условным отрицательным раздражителем служил треугольник. Безусловным раздражителем служил электрический ток напряжением 40-60 подающий на контакты в полу. Результаты исследования. Опыты показали, что при предъявлении четырехугольника условные рефлексy проявились на $19,6 \pm 0,3$ а укрепились на $72,3 \pm 1,5$ сочетаний. Их стабилизация наблюдается на 20-30 опытные дни. Величина правильных ответов составляла 85-90%. Латентный период в среднем составлял $5 \pm 0,6$ с время. Дифференцировочное торможение на четырехугольник появилось в среднем после $17,3 \pm 1,9$ укрепилось после $70,3 \pm 3,5$. У сусликов в период активности наблюдается активизация всех форм поведенческой деятельности: пищевая, оборонительная, а также условно-рефлекторная деятельность. В этот период у животных широко представлено инстинктивное поведение. В последующей серии опытов при наступлении периода летней спячки суслики постепенно переходит из активного состояния в сноподобное, характерное для летней спячки.

Заключение. Таким образом результаты наших опытов показали, что в активный период жизнедеятельности условные рефлексy на зрительные и слуховые стимулы несколько различны. Условные рефлексy на световые сигналы, как на положительные, так и на отрицательные более постоянны, чем со слухового анализатора. Как уже говорилось, на основании полученных данных установлено гетерогенная функция высшей нервной деятельности у сусликов в период жизненной активности и при вхождении в летнюю спячку.

Литература

1. Нуритдинов Э.Н. Нейропептиды и поведение. Монография. Душанбе, 2002.
2. Нуритдинов Э.Н., Ивазов Н.И. Спячка и поведение. Душанбе, 1992.

БОЛТНЕВА Н.П., СЕРЕБРЯКОВА О.Г., МАХАЕВА Г.Ф.,

СЕРКОВ И.В., ПРОШИН А.Н.

Институт физиологически активных веществ Российской Академии наук,

Черноголовка, Россия

ПОИСК СЕЛЕКТИВНЫХ ИНГИБИТОРОВ КАРБОКСИЛЭСТЕРАЗЫ В РЯДУ N, N-ЗАМЕЩЕННЫХ 5-ИОДМЕТИЛ-2-АМИНОТИАЗОЛИНОВ

Карбоксилэстеразы (КЭ, КФ 3.1.1.1) являются важным звеном в фармакокинетике большинства терапевтических средств, содержащих сложноэфирную или амидную группировку. Эти ферменты ответственны за активацию пролекарств и детоксикацию многих лекарственных средств. В связи с этим ингибиторы КЭ имеют важное терапевтическое значение.

Целью данного исследования является поиск новых селективных ингибиторов карбоксилэстеразы. В связи с этим в данной работе синтезирован ряд N,N-замещенных 5-иодметил-2-аминотиазолинов и изучена ингибиторная активность 11 соединений в отношении ацетилхолинэстеразы эритроцитов человека (АХЭ, КФ 3.1.1.7), бутирилхолинэстеразы сыворотки лошади (БХЭ, КФ 3.1.1.8) и карбоксилэстеразы печени свиньи. N,N-замещенные 5-иодметил-2-аминотиазолины были синтезированы реакцией аллилизотиоцианата со вторичными аминами с последующей галогенциклизацией полученной аллилтиомочевины.

Соединения растворяли в ДМСО. Образец фермента инкубировали с исследуемым соединением в концентрации от 0,002 до 20 мкМ в течение 10 минут при 25°C (2% об. ДМСО). Активность АХЭ и БХЭ определяли методом Ellman (λ 412 нм) с использованием в качестве субстрата ацетилтиохолина (1 мМ) и бутирилтиохолина (1 мМ), соответственно; условия определения: 0,1 М фосфатный буфер pH 7,5. Активность КЭ определяли спектрофотометрически по выделению 4-нитрофенола (λ 405 нм), субстрат - 4-нитрофенилацетат (1 мМ); условия определения: 0,1 М фосфатный буфер pH 8,0. Измерения проводили на микропланшетном спектрофотометре BioRad Benchmark Plus (Франция). Предварительную оценку ингибиторной активности синтезированных соединений в отношении трех сериновых эстераз теплокровных проводили при

концентрации 20 мкМ. Для перспективных соединений ингибиторную активность характеризовали величиной IC_{50} .

Кинетические исследования показали, что N,N-замещенные 5-иодметил-2-аминотиазолины в концентрации 20 мкМ не ингибируют АХЭ и проявляют ингибиторную активность в отношении БХЭ (степень ингибирования 21 – 62 %) и КЭ (степень ингибирования 12 - 75 %). Степень ингибиторной активности, как и селективность соединений в отношении КЭ по сравнению с БХЭ определяется структурой арильного фрагмента. В данном ряду соединений выявлен лидер - бензил-(4-трет-бутил-бензил)-(5-иодметил-4,5-тиазолин-2-ил)-амин, величина IC_{50} которого по отношению к КЭ составляет $0,45 \pm 0,06$ мкМ. Данное соединение менее эффективно ингибирует БХЭ ($IC_{50} = 9,99 \pm 0,13$ мкМ) и не ингибирует АХЭ. Ингибиторная селективность соединения - лидера в отношении КЭ по сравнению с БХЭ составляет 22,2.

Таким образом, нами предложен новый тип селективных ингибиторов КЭ, который может найти применение в качестве модуляторов лекарственных препаратов.

Работа выполнена при финансовой поддержке госконтракта по ФЦП № 14.740.11.0810, гранта по Программе Президиума РАН № 7, гранта РФФИ № №11-03-00581-а.

БОНДАРЕНКО И.М., БАБАЕВ А.А., НОВИКОВ В.В.

*НИИ молекулярной биологии и региональной экологии ННГУ им. Н.И. Лобачевского,
Нижний Новгород, Россия*

СУММАРНАЯ И ОЛИГОМЕРНАЯ ФРАКЦИИ РАСТВОРИМОГО БЕЛКА CD16 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ГЕРПЕСВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЯХ

Введение. FcRIII или дифференцировочная молекула CD16 является низкоаффинным рецептором, экспрессируемый на натуральных киллерах, макрофагах, нейтрофилах, эозинофилах и популяции Т - лимфоцитов. Основным лигандом антигена CD16, является Fc – участок IgG, посредством которого FcRIII участвует в реализации антителозависимой клеточной цитотоксичности. Молекула CD16(FcγRIII) встречается в двух альтернативных формах: FcγRIIIA и FcγRIIIB

FcγRIIIA экспрессируется на макрофагах, тучных клетках и натуральных киллерах. У полиморфно-ядерных нейтрофилов присутствует сильно гликозилированная форма CD16 - FcγRIIIB, заякоренная на мембране с помощью фосфатидилинозитола.

Растворимая форма CD16 (sCD16) антигена образуется путем шеддинга с поверхности антигенположительных клеток. Показано также участие альтернативного сплайсинга в образовании растворимой изоформы молекулы CD16, синтезируемой натуральными киллерами. Продуцируемый нейтрофилами растворимый CD16 антиген способен модулировать активность мононуклеарных клеток путем снижения их пролиферативной активности.

Изменение сывороточного содержания растворимых молекулы CD 16 служит мониторинговым показателем течения ряда иммуноопосредованных заболеваний.

Цели и задачи исследования. Целью настоящей работы явилась оценка сывороточного содержания sCD16 при герпетических инфекциях.

Материалы и методы. В работе использованы образцы сыворотки крови 100 здоровых доноров, предоставленных Нижегородской областной станцией переливания крови, 57 образцов сыворотки больных цитомегаловирусной инфекции (ЦМВ), 23 образца сыворотки больных вирусом ветряной оспы (ВВО) – и образцы сыворотки проб больных вирусом Эпштейна – Барра (ВЭБ) в количестве 18 проб, полученных из Нижегородской городской инфекционной больницы № 2. Определение уровня sCD16 проводили с помощью твердофазного иммуноферментного анализа с применением моноклональных антител серии ИКО-116 и поликлональных антител против антигенов мононуклеарных клеток периферической крови человека. Сывороточный уровень оценивали, переводя единицы оптической плотности в условные единицы (U/ml).

Результаты и выводы. Показано понижение сывороточного уровня суммарной фракции молекулы CD16 в 3,3 раза при таком типе герпеса, как вирус Эпштейна – Барра (ВЭБ). Содержание этой же фракции при цитомегаловирусной инфекции (ЦМВ) составляет $109,5 \pm 64,9$, что ниже нормы в 1,2 раза. При вирусе ветряной оспы концентрация суммарной фракции CD16 в сыворотке крови не отличалось от нормы. Наблюдалось повышение уровня олигомерной фракции CD16 антигена при всех типах герпеса.

У больных, инфицированных ВЭБ происходит увеличение олигомерной фракции в 1,4 раза в сравнении с нормой, при ЦМВ - в 1,2 раза и при ВВО - в 1,1 раза.

Формирование иммунного ответа при герпесвирусных инфекциях является сложным и многокомпонентным процессом, в ходе которого клеточная кооперация может нарушаться на различных этапах. Решающее значение на герпетическую инфекцию оказывает специфический клеточный иммунитет, опосредованный Т-лимфоцитами. Состояние клеточного иммунитета человека в значительной степени определяет характер течения герпетической инфекции, частоту и интенсивность рецидивов. Сывороточные уровни суммарной и олигомерной фракций растворимого CD16 белка, видимо, являются отражением работы клеточного звена иммунитета при герпесвирусных инфекциях.

БОРИСЕНКО Е.Г, ГОРИН К.В., БОРИСЕНКО Е.А., НГУЕН ЧЫОНГ ЗАНГ,
ЧАН ВАН ТИ, КАНОЧКИНА М.С., ГУЛИМОВА Л.А.

Московский государственный университет пищевых производств, Москва, Россия

НОВЫЕ ГОРИЗОНТЫ ПРОИЗВОДСТВА ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ НУТРИЕНТОВ

Вопрос, как производить высокоценный белок для быстрорастущего человечества (менее 2 млрд в 1900 году и 7 млрд сегодня) становится все более актуальным, особенно в целом ряде развивающихся стран.

Население Юго-Восточной Азии очень эффективно обогащает рисовые рационы человека с помощью белковых соусов из микробных культур на растительном сырье. В качестве продуцентов микробной биомассы чаще всего используются сложные ассоциации из мицелиальных грибов, дрожжей, актиномицетов и бактерий, которые выращивают на увлажненных твердофазных субстратах, прежде всего сахаристых и крахмалистых. Однако, в традиционных технологиях этого региона процесс длится достаточно долго (иногда до 2-3 недель), да и состав получаемых продуктов весьма нестандартный.

Наша работа в принципе близка азиатскому варианту, но в ней сформировался ряд новых специфических направлений.

Технологическое направление. Ввиду того, что микрофлора натурального молока животных и человека очень важна при формировании микробиоценозов желудочно-

кишечного тракта, именно в этом субстрате мы искали потенциальные продуценты микробной биомассы на растительном сырье. Из натурального молока разных животных и человека на агаровых средах очень легко выделяются чистые культуры молочнокислых бактерий. На стерильных отрубях, увлажненных натуральным молоком с добавлением антибактериальных антибиотиков, достаточно часто обнаруживаются дрожжи, активно накапливающие биомассу как на отрубях так и на различных твердых растительных субстратах (зеленая растительная масса, сено, солома, жомы, шроты, зерно, отходы его переработки и т.п.). Из полученного микробного материала мы получили более 200 чистых дрожжевых культур (в том числе 70 из женского грудного молока).

Самыми продуктивными оказались выделенные из грудного молока дрожжи рода *Pichia*, которые очень хорошо ассоциируются с лактобактериями, как свежевыделенными так и с их производственными культурами.

Техническое направление. Мы ни в коем случае не отказываемся от традиционного глубинного культивирования микроорганизмов с целью накопления биомассы. Однако твердофазное культивирование очень рационально для быстрого наращивания производства дополнительного белка прежде всего в развивающихся странах. Нами разработана для этих целей оригинальная модель крупнотоннажного ферментационного оборудования для твердофазного и твердофазно-глубинного культивирования микроорганизмов с высокой степенью защиты от посторонней микрофлоры. Мы готовы строить и испытывать эту систему совместно с заинтересованными структурами.

В этих растительных установках дрожже-бактериальные ассоциации засевают на стерильные чаще комплексные увлажненные субстраты (влажность 50-70%), инкубируют в аэробных условиях 48 часов при температуре $30 \pm 2^\circ\text{C}$, полученные твердофазные культуры (полуфабрикаты с содержанием $5-15 \cdot 10^9$ клеток дрожжей/г и 10^8-10^9 клеток/г лактобактерий) используют как нутриенты непосредственно или после высушивания при низких температурах. Вариантом технологии является разбавление их в 5-7 раз сахаристыми жидкостями и анаэробная глубинная ферментация 48-72 часа при температуре $30 \pm 2^\circ\text{C}$ с получением жидкой комплексной культуры, в которой количество дрожжей падает до 10^7-10^8 клеток/см³ а количество лактобактерий нарастает до $10^{11}-10^{12}$ клеток/см³. Лактобактерии формируют специфические органолептические свойства получаемых продуктов. Фракционирование жидких культур на ситах позволяет получать

новые напитки и твердые влажные добавки к кормам с живой микрофлорой (симбиотики). Высокотемпературная сушка, инактивирующая микроорганизмы, позволяет получать различные продукты со свойствами пребиотиков.

Нутрициологическое направление. Нарастание содержания белка и незаменимых аминокислот формируется преимущественно в ходе аэробной ферментации. Например, на этом этапе в отрубях содержание белка по сумме аминокислот увеличивается от 14-15% до 19-20% (т.е. на 25% от исходного содержания белка). Ферментация зеленой биомассы кукурузы увеличивает суммарное содержание аминокислот с 7,1% до 9%, т.е. тоже примерно на 25%. Нарастание содержания разных незаменимых аминокислот составляет от 17 до 36% и тем самым белок новых продуктов по химической характеристике достигает стандарта ФАО/ВОЗ на полноценный белок. Напитки, получаемые из разных твердых субстратов на первом этапе ферментации (сено, биомасса кукурузы, сахарного тростника, выжимки арбуза, ананаса) и жидких сахаристых продуктов на втором этапе (арбузный, ананасовый, плодовые, овощные соки, сахарный раствор) содержат 9-11% сухих веществ, в которых на белок приходится около 20%. Такие напитки по содержанию углеводов и белков близки к животному аналогу - обезжиренному молоку, что позволяет нам для обозначения нового продукта использовать термин “микробное молоко (Micromilk)”. Количество накапливаемой микробной биомассы на растительном сырье по предлагаемой технологии в 4-5 раз выше, чем в анаэробном процессе в рубце жвачных животных, а это позволяет по-новому решать проблему дефицита белка. По довольно давним прогнозам ФАО/ВОЗ в начале 21 века суммарная мировая потребность в кормовом и пищевом белке определена в 65 млн тонн в год. Переработка всего объема растительного сырья только в России (около 3 млрд тонн в год, как сельскохозяйственного так и дикорастущего) теоретически может давать весь объем необходимого миру дополнительного высокоценного белка.

Микроэкологическое направление. Собственная микрофлора желудочно-кишечного тракта производит особо ценные вторичные нутриенты, формирующие до 25-30% биомассы макроорганизма. Новые микробные продукты являются активными ее стимуляторами. Получаемые в настоящей технологии сухие пребиотики в экспериментах *in vivo* на ослабленных животных (собаки, норки) за 2 недели приема до 100 раз повышают содержание бифидо- и лактобактерий в фекалиях. В гастроэнтерологической клинике у

людей с циррозом печени за такой же период более заметно повышается титр бифидобактерий (10-15 раз), нежели лактобактерий (5-10 раз). Особо демонстративная позитивная динамика функций желудочно-кишечного тракта при систематическом потреблении этих продуктов отмечена у лиц с экстремальными условиями труда (сотрудники полярных станций, профессиональные спасатели, работники вредных химических производств).

Антиинфекционное направление. Эксперименты *in vitro* по введению дрожже-бактериальных продуктов в растущие жидкие культуры токсигенных стафилококков (*Staphylococcus aureus* FRI 722, S6-715H) показали, что инактивированные комплексные препараты, также как чистые живые культуры дрожжей активируют рост стафилококков и их токсинообразование, а живые комплексные культуры подавляют и рост и токсинообразование стафилококков. Следовательно, живые лактобактерии микробных ассоциаций придают им еще и определенные антибактериальные свойства, что может помочь более эффективно чем в Западной Европе в 2011 году бороться с бактериальными токсикоинфекциями. К сожалению, мы не имели условий изучить взаимодействие наших ферментированных продуктов с высокотоксигенными энтеробактериями, но в такой работе участвовать готовы.

Таким образом, мы считаем, что развитие вышеприведенных направлений может сформировать для человечества практически неограниченные возможности в производстве функциональной пищи и кормов. Мы готовы к сотрудничеству по всем затронутым в настоящей работе направлениям с любыми заинтересованными лицами и организациями как в России, так и за рубежом.

БОРОННИКОВА С.В., БЕЛТЮКОВА Н.Н., НЕЧАЕВА Ю.С.,

КОЛОСОВ Л.А., ЧИЖОВКИНА Е.С.

Пермский государственный национальный исследовательский университет

Естественнонаучный институт Пермь, Россия

ТЕХНОЛОГИЯ РНК-СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ПРЕПАРАТОВ С ЦЕЛЬЮ ЛЕЧЕНИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Мобилизация генетических ресурсов лекарственных видов растений необходима для решения проблемы производства отечественных лекарственных препаратов с использованием растительного сырья. Сердечно-сосудистые заболевания являются основной причиной смерти во всем мире. В мире ежегодно от сердечно-сосудистых заболеваний умирает около 17,3 млн человек, а в России – более 1,2 млн человек.

В настоящее время, большей частью в Америке, для структурно-функционального анализа геномов начинают активно использовать технологию РНК-секвенирования (RNAseq), в основном, для продовольственных культур (Pont et. al., 2011; Ly et. al., 2012) и модельных видов растений (Strickler et. al., 2012). Известны лишь единичные работы, в которых РНК-секвенирование применялось для изучения функциональной активности комплексов генов у лекарственных растений (Zhang et. al., 2010).

К числу мало изученных биологически активных веществ (БАВ) лекарственных растений относятся сердечные гликозиды и они искусственно не синтезированы. Из-за сложности строения и определения сердечных гликозидов, редкости в естественной среде видов растений, источников карденолидных средств, их изучение затруднено, но весьма перспективно для лечения сердечно-сосудистых заболеваний. При комплексном лечении необходимо применение препаратов, содержащих флавоноиды. Генетические ресурсы лекарственных видов растений имеют свою специфику, ориентированы на качественный и количественный состав БАВ. Одним из перспективных направлений развития геномных и постгеномных технологий создания лекарственных средств нового поколения является выявление взаимосвязи генотипа растений с процессами синтеза в них БАВ в природных и культивируемых популяциях, а также в культуре изолированных тканей. В ходе выполнения проекта планируется провести сравнительный анализ профилей геной

экспрессии у лекарственных и близкородственных нелекарственных форм с использованием РНК секвенирования, идентификацию регуляторных последовательностей и генов, отличающих профили генной экспрессии лекарственных и нелекарственных форм, выяснение принадлежности генов и регуляторных последовательностей, дифференцирующих профили генной экспрессии лекарственных и нелекарственных форм и близкородственных видов к разным метаболическим путям, оценку разнообразия и представленности дифференцирующих РНК последовательностей в популяциях лекарственных растений на одной и той же стадии онтогенеза и на его разных стадиях, выяснение иммуномодулирующих свойств на лабораторных линиях мышей вытяжки из разных групп лекарственных растений, отличающихся по представленности в их профилях генной экспрессии групп дифференцирующих РНК, оценку возможностей экзогенной индукции экспрессии групп дифференцирующих РНК в связи с выясненной принадлежностью их к разным метаболическим путям и проверка эффективности такой индукции на основании исследований изменений иммуномодулирующих свойств вытяжки из таких растений у лабораторных линий мышей. Кроме этого, планируется развитие ДНК-технологий, основанных на ретротранспозонах, выявление механизмов регуляции функциональной активности генов посредством мобильных генетических элементов. Проект предусматривает разработку и совершенствование культуры изолированных тканей, из которой в дальнейшем можно будет экстрагировать БАВ для промышленного производства лекарственных средств. В ходе выполнения проекта будут разработаны научно-методические основы для создания базы данных молекулярных маркеров, ассоциированных с высоким содержанием БАВ в лекарственных растениях, обладающих большим фармацевтическим потенциалом для лечения сердечно-сосудистых заболеваний.

В ходе выполнения проекта планируется обследование, инвентаризация, оценка и документирование растительных генетических ресурсов с учетом состояния и степени изменчивости в существующих популяциях, а также мониторинг поддержания жизнеспособности, степени изменчивости и генетической целостности растительных генетических ресурсов в культуре с использованием современных геномных технологий, таких как РНК-секвенирование.

БОЧАРНИКОВА Е.А., МАТЫЧЕНКОВ И.В.

¹ *Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН,
Пушино, Россия*

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

АКТИВНЫЙ КРЕМНИЙ И ПОВЫШЕНИЕ ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ

Проблема дефицита пресной воды обостряется с каждым годом. Наблюдаемые глобальные изменения климата Земли и, как результат, увеличение площадей засушливых регионов требуют разработки и применения новых подходов к сельскохозяйственному производству на таких территориях. Решение данной проблемы тесным образом связано с повышением эффективности использования растениями воды.

Одним из перспективных, но дорогих подходов, позволяющих снизить отрицательное действие водного стресса на сельскохозяйственные растения, является использование растений с модифицированным генетическим аппаратом. Широкое использование данного подхода, однако, остается под вопросом из-за возможности отрицательного воздействия продуктов, полученных из этих растений, на человека и окружающую среду. Другим подходом к повышению засухоустойчивости растений является оптимизация минерального питания растений. Однако, как правило, внесение азотных, фосфорных и калийных удобрений приводит не к увеличению, а к снижению устойчивости сельскохозяйственных растений к засухе, поскольку повышенное накопление биомассы требует дополнительного расхода воды и, соответственно, водного полива. Анализ литературных данных и результаты наших исследований свидетельствуют о том, что растение более эффективно использует влагу при внесении активных форм Si или цинксодержащих препаратов. Особый интерес заслуживает применение кремниевых препаратов, так как внесение в почву активных форм кремния (монокремниевая кислота, олигомеры кремниевой кислоты) способствует повышению устойчивости растений не только к засухе, но и к другим стрессовым воздействиям биогенной и абиогенной природы, а также положительно влияет на качество и количество урожая.

Существует несколько возможных механизмов повышения засухоустойчивости растений при повышении уровня кремниевого питания растений – увеличение корневой массы, снижение уровня испарения влаги, изменение угла наклона листьев растений и другие. Однако высокая эффективность при внесении активных форм кремния позволили предложить следующий механизм повышения засухоустойчивости растений, который по нашему мнению является доминирующим. Активные формы кремния (монокремниевая кислота и низкомолекулярные олигомеры кремниевой кислоты) обладают способностью накапливать и сохранять воду внутри организма благодаря формированию поликремниевых кислот и их гелей. Один атом Si в таких гелях может удерживать до 146 молекул воды. Расчеты свидетельствуют, что, например, среднеширотная культура ячмень (*Hordeum vulgare*), содержащая в среднем до 1,2–1,4% кремния на сухую массу, при нормальном кремниевом питании может запастись от 6 до 37 г воды на 100 г массы одного растения.

Теоретические исследования позволили разработать несколько препаратов, позволяющих повышать засухоустойчивость растений путем внесения активных форм кремния. Проведенные вегетационные и полевые испытания ряда препаратов, содержащих активные формы кремния («ЭкSi засуха» – Россия, «Zum-Sil» – США, «Natural Silica» – Австралия) позволили снизить нормы полива от 40 до 60% при одновременном повышении урожайности пшеницы, кукурузы, сорго, ячменя на 10-15%. Концентрация монокремниевой кислоты в тканях растений при внесении препаратов повышалась от 30 до 50% и этот параметр коррелировал с повышением биомассы растений в условиях дефицита влаги. В ряде экспериментов и практического применения разработанных препаратов выращиваемые растения выжили, тогда как на контрольных полях весь урожай погибал. Следует так же отметить, что все исследуемые препараты экологически чистые.

Засуха 2010 года показала необходимость повышения засухоустойчивости растений. При этом необходимо, чтобы применяемые препараты были бы химически, биологически и генетически безопасны.

БРАЖКИНА М.Ю.

ГОУ ВПО «Сибирский государственный технологический университет,

Красноярск, Россия

(Научный руководитель: д-р тех. наук, проф. Н.А. Величко)

ПЕРСПЕКТИВЫ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ ВЕТРЕНИЦЫ БАЙКАЛЬСКОЙ

Клональное микроразмножение растений приобретает все большее значение в современной биотехнологии, поскольку имеет значительные преимущества перед традиционными способами вегетативного размножения.

Методы биотехнологии позволяют осуществлять быстрое размножение ценного экземпляра растения, получать в больших количествах вегетативное потомство трудно размножаемых в обычных условиях видов и форм и планировать выпуск растений к определенному сроку.

Ветреница байкальская (*Arsenjevia baicalensis* (Turcz. ex Ledeb. Holub), семейство лютиковые (Ranunculaceae) — редкий вид, неморальный третичный реликт, эндемик южной части Красноярского края и Прибайкалья, представляющий большую научную ценность. Включен в сводки: «Красная книга России», «Красная книга Бурятии», «Редкие и исчезающие растения Сибири», «Исчезающие растения Сибири в интродукции», «Уникальные объекты живой природы бассейна Байкала».

В народной медицине лютиковые используют для лечения болезней печени, туберкулеза легких, ревматических и других заболеваний, что обусловлено содержанием разнообразных биологически активных веществ. К ним относятся: летучее, раздражающее кожу вещество протоанемонин (анемонол), алкалоиды, карденолиды, флавоноиды (кверцетин, лютеолин, кемпферол и др.). В небольших количествах встречаются эфирные масла, смолы, сапонины, дубильные вещества, в семенах — жирные масла.

Для сохранения популяций ветреницы байкальской в природе рекомендуется широкое интродукционное испытание в ботанических садах. В настоящее время вид изучается в Главном ботаническом саду (г. Москва), находится в процессе первичной интродукции в Центральном сибирском (г. Новосибирск) и Сибирском (г. Томск) ботанических садах.

Применение методов клонального микроразмножения ветреницы байкальской представляет интерес, как для сохранения вида, так и для получения биомассы — потенциального источника биологически активных веществ.

Задачей исследования было определение основных групп биологически активных веществ в надземной и подземной частях растения для оценки перспективности вида как возможного продуцента лекарственных веществ.

Объектом исследования служили части растений, собранных по методу плантационных площадок в предгорьях Западного Саяна в период цветения и в начале плодоношения.

Определение биологически активных веществ осуществляли по методикам, принятым в биохимии и химии растительного сырья.

На основании проведенных исследований установлено наличие следующих групп биологически активных веществ в ветренице байкальской: алкалоидов, сапонинов, флавоноидов, витаминов и протеина. И в подземной и надземной частях установлено высокое содержание алкалоидов (более 1%), что позволяет отнести ветреницу байкальскую к разряду высокоалкалоидоносных растений и использовать для получения ряда фармакологических препаратов.

Таким образом, введение в культуру и клональное микроразмножение ветреницы байкальской является перспективным способом получения растений регенерантов как для сохранения вида, так и для производства ценного лекарственного сырья.

БРЕЧАЛОВ А.В.

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

МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ РАБОТЫ БЕЛКА МЛЕКОПИТАЮЩИХ RNF10, СУБЪЕДИНИЦЫ КОМПЛЕКСА, РЕМОДЕЛИРУЮЩЕГО ХРОМАТИН

RNF10 – транскрипционный фактор, участвующий в регуляции экспрессии генов. Ранее было показано, что RNF10 необходим для пролиферации стволовых клеток нервной ткани в процессе эмбриогенеза мыши, а также, для пролиферации иммортализованных

фибробластов человека. RNF10 экспрессируется во всех мышечных тканях и входит в состав РВАР комплекса, семейства SWI/SNF, отвечающего за ремоделирование хроматина в процессе инициации транскрипции.

Нами было показано, что в мышечных тканях и в клетках линий человека представлено несколько форм белка RNF10. Мы доказали, что разнообразие форм белка RNF10 обусловлено посттрансляционными модификациями. В частности, были установлены три сайта, по которым происходит фосфорилирование белка протеинкиназой СК1. Помимо этого белок RNF10 подвергается сумоилированию. Методами ко-иммунопреципитации было показано, что в состав ремоделирующего хроматин комплекса РВАР входит только модифицированная форма RNF10.

БУЗМАКОВА Д.Ю.¹, КАЗЬЯНИН А.В.¹, ВОЛКОВА Л.В.²

¹*Пермская государственная фармацевтическая академия, Пермь, Россия*

²*Пермский национальный исследовательский политехнический университет,
Пермь, Россия*

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПУЛА НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ПЕПТИДОВ ИЗ ЭРИТРОЦИТАРНОЙ МАССЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Эритроцитарная масса представляет собой белковую фракцию крови доноров, на 95% состоящую из гемоглобина, содержащую все заменимые и незаменимые аминокислоты, кроме изолейцина, недостаток которого компенсируют другие остаточные компоненты крови. Гемоглобин служит одним из белков-предшественников, из которого образуется более 200 типов пептидных молекул. В организме человека деструкция гемоглобина осуществляется комплексом высокоспецифических протеаз, локализованных на внутренней стороне мембраны эритроцита. В результате образуются пептиды, модулирующие функции иммунной, нервной, эндокринной, сердечно-сосудистой и других систем организма. Пептиды, секретируемые эритроцитами, обладают широким спектром биологической активности— опиоидной, эритропоэтиновой, пролиферативной по отношению к нормальным клеткам и антипролиферативной, играющей непосредственную роль в противоопухолевой защите организма. При этом эндогенные регуляторные пептиды

гемоглобина обладают свойствами, сходными с ангиотензинами, в частности, в отношении ускорения репарационных процессов в поврежденных тканях.

Путем ограниченного ферментативного гидролиза эритромысы получена субстанция- депротеинизированный гемодериват крови человека (ДГКЧ). При этом было выявлено, что при протеолитическом расщеплении состав конечного продукта сохраняет исходный полноценный аминокислотный композит сырья. По результатам высокоэффективной жидкостной хроматографии состав ДГКЧ представлен комплексом низкомолекулярных пептидов с преобладанием пептидов от 4,5 до 6 кДа (до 71,2 %). Остальное- аминокислоты и пептиды с молекулярной массой (1,0-4,5) кДа и (6,0-10,0) кДа.

Биологическую активность ДГКЧ, представленного пулом низкомолекулярных пептидов эритромысы, оценивали в опытах *in vitro* и *in vivo*. В первом случае исследована пролиферативная активность питательных сред на основе ДГКЧ для выращивания нормальной культуры клеток почек эмбриона свиньи, используемых в технологии человеческого лейкоцитарного интерферона при оценке противовирусной активности. В результате выявлено, что клетки образуют ровный монослой на второй день культивирования, что сопоставимо с результатами выращивания на коммерческой среде 199. Таким образом, показана возможность использования модифицированной среды 199 с включением в ее состав субстрата с аминокислотной составляющей, представленной раствором ДГКЧ.

При определении биологической активности спиртового раствора ДГКЧ на модели морской свинки выявлена выраженная стимуляция роста ворса при отсутствии видимых кожно- раздражающих реакций. При ежедневной обработке в течение 3 недель выбритых зон длина волоса составила $(1,2 \pm 0,2)$ см, что на ~33% больше, чем на контрольных- $(0,80 \pm 0,15)$ см. Данный факт свидетельствует о высокой степени проницаемости единиц пептидного пула, выделенного из эритромысы, при прохождении через кожный покров. Свойство стимуляции роста ворса, возможно, обусловлено наличием в составе ДГКЧ серосодержащих аминокислот- метионина и цистина- основы структурной организации труднорастворимого белка- кератина волос. Данное свойство перспективно с точки зрения конструирования фармацевтических композиций для улучшения трофики тканей при наружном применении.

Таким образом, свойства пептидного пула, выделенного посредством ферментативного гидролиза из эритроцитарной массы крови человека и характеризующегося высокой биологической активностью, объясняются природой сырья. Перспективными в данном направлении являются исследования антипролиферативной активности пептидов ДГКЧ по отношению к раковым клеткам.

БУРГАНСКАЯ Е.И., ДЗЮБА М.В.

ФГБУН Центр «Биоинженерия» РАН, Москва, Россия

ФГБУН Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Москва, Россия

ПОДБОР ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ ДЛЯ РОСТА

КУЛЬТУРЫ И СИНТЕЗА МАГНЕТОСОМ ШТАММА *MAGNETOSPIRILLUM* SO1

Многие организмы способны синтезировать различные кристаллические соединения железа, обладающие магнитными свойствами. Одним из таких примеров является биоминерализация магнетосом магнитотактическими бактериями. Магнетосомы – это наночастицы магнетита (Fe_3O_4) или грейгита (Fe_3S_4), окруженные липопротеидной мембраной. Магнетосомная мембрана представляет собой естественное "покрытие", которое обеспечивает хорошую дисперсность частиц, а также дает возможность модификации и функционализации частиц. Несмотря на огромные усилия в химическом синтезе магнитных наночастиц, некоторые свойства бактериальных магнетосом в настоящее время невозможно воссоздать в лабораторных условиях. Эти особенности магнитных наночастиц представляют интерес для широкого круга научных дисциплин, включая науки о материалах, нанотехнологию и биотехнологию. В связи с перспективностью использования магнитотактических бактерий появилась необходимость в подборе условий для их культивирования, способствующих накоплению биомассы и повышению продукции магнетосом. Цель настоящего исследования заключалась в подборе оптимальных параметров роста культуры и формирования магнетосом штамма *Magnetospirillum* SO1. Было проведено исследование физиологических особенностей штамма *Magnetospirillum* SO1, выделенного ранее из прибрежного донного осадка реки Ольховка (г. Кисловодск). Было показано, что данный штамм может использовать в

качестве доноров электронов карбоновые кислоты и глицерол, причем наилучший рост и синтез магнетосом отмечен при внесении бутирата или сукцината, в концентрации 0,5 г/л. В отличие от других представителей рода *Magnetospirillum*, которые являются микроаэрофилами с оптимальным ростом при 1% кислорода, штамм SO1 проявляет большую аэротолерантность и способен расти при контакте с воздухом. Тем не менее, показано, что синтез магнетосом у SO1 полностью подавляется при высоких концентрациях кислорода. Таким образом, была определена оптимальная концентрация кислорода для формирования магнетосом, которая составила 3%. Были определены оптимальная температура (28°C) и рН (6.5-7.0). Также были проведены исследования по влиянию источника железа и его концентрации на синтез магнетосом. Наибольшее количество магнитных клеток в культуре наблюдается при внесении в среду сульфата железа (II) или лимоннокислого железа (III) в концентрации 20 мкМ. Подобранные в результате работы условия культивирования способствуют стабильному росту и стойкой продукции магнетосом. Культивирование штамма при указанных параметрах обеспечивает выход магнитных частиц не менее 50 мг с 1 л культуры. Таким образом, исследуемый штамм является перспективным продуцентом магнитных наночастиц и может быть использован в биотехнологическом производстве.

Научный руководитель – Дзюба М.В.

БУТВИЛОВСКИЙ А.В., БУТВИЛОВСКИЙ В.Э., КАГАНОВИЧ И.В.

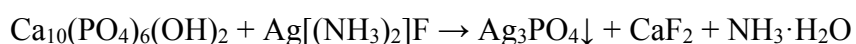
Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГИДРОКСИАПАТИТА С 38%-НЫМ РАСТВОРОМ ФТОРИДА ДИАММИНСЕРЕБРА

Одним из наиболее важных направлений развития биофармацевтики и биомедицины является научное обоснование разработки высокоэффективных лекарственных препаратов.

Фторид диамминсеребра используется в стоматологии для приостановления прогрессирования кариеса зубов путем образования на обработанной поверхности твердого, непроницаемого для бактерий, устойчивого к кариозному разрушению слоя (Chu

С.Н., Lo E.C., 2008). В 1972 году Yamaga R. и соавт. установили, что при обработке кариозного дентина фторидом диамминсеребра образуется нерастворимый фосфат серебра (желтого цвета), что и обуславливает увеличение твердости обработанных твердых тканей зубов. В щелочной среде данное соединение превращается в AgOH, разлагающийся на Ag₂O (буро-черного цвета) и воду. Оксид серебра также может распадаться под действием солнечного света и/или восстановителей. Образующееся в ходе этих процессов серебро реализует свои бактерицидные, антиферментные и др. свойства. Однако фосфат серебра не является единственным продуктом реакции взаимодействия ФДС с тканями зуба (Tonouchi T., 1989). Известно, что входящий в его состав фтор взаимодействует с кальцием апатитов, образуя фторид кальция, что способствует минерализации твердых тканей зубов. Упрощенная схема химической реакции, протекающей при аппликации ФДС (Ag[(NH₃)₂]F) на твердые ткани зубов, может быть записана следующим образом:



Недостатком применения фторида диамминсеребра принято считать окрашивание обработанных тканей в серые тона, что обуславливает отказ части стоматологов от его использования. Понимание механизмов взаимодействия фторида диамминсеребра с гидроксиапатитом как основным компонентом зуба позволит разработать перспективные направления уменьшения или нивелирования этого эффекта. Реализация данных направлений, на наш взгляд, наиболее целесообразна путем создания нового лекарственного препарата, содержащего производные фторида диамминсеребра.

Актуальность данного исследования связана с отсутствием данных об изменении размеров агломератов гидроксиапатита при взаимодействии с 38%-ным раствором фторида диамминсеребра.

Цель исследования: изучить изменения размеров агломератов гидроксиапатита при взаимодействии с 38%-ным раствором фторида диамминсеребра.

Материалы и методы. В качестве реагентов использовались порошок гидроксиапатита (Aldrich 289396) и 38%-ный раствор фторида диамминсеребра («Аргенат однокомпонентный», «ВладМиВа»). После смешивания реагентов (1,6 г. порошка и 1 мл «Аргената однокомпонентного») и выдержки рекомендованной производителем экспозиции (3 минуты) проводилось высушивание и изучение кристаллов методом растровой электронной микроскопии с помощью микроскопа Leo 1420 при увеличении

1000, 10000 и 20000 раз. В качестве контроля изучена структура порошка гидроксиапатита. Результаты обработаны методами описательной статистики, достоверность определена по критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Установлено, что порошок гидроксиапатита представлен пористыми агломератами, имеющими сферическую форму и состоящими из частиц. Размер агломератов колеблется в пределах 14,00-33,33 мкм и в среднем составляет $20,01 \pm 0,54$ мкм. После обработки фторидом диаминсеребра наблюдается достоверное ($p < 0,05$) увеличение размера агломератов на 9,1% ($21,84 \pm 0,68$ мкм), что, по нашему мнению, связано с осаждением на их поверхности фосфата серебра и фторида кальция.

При рассмотрении порошка гидроксиапатита на большом увеличении поверхность частиц выглядит относительно ровной, с единичными углублениями и вымощена кристаллами призматической формы. Гидроксиапатит, обработанный фторидом диаминсеребра, характеризуется существенным изменением поверхности частиц: она становится неровной за счет большого количества мелких кристаллов и конгломератов неправильной формы размером 0,1-0,5 и 0,4-0,7 мкм, соответственно. Следует отметить существенные отличия структуры данных кристаллов и агломератов от таковой гидроксиапатита (Ag_3PO_4 и CaF_2).

Заключение. Обработка порошка гидроксиапатита 38%-ным раствором ФДС приводит к достоверному увеличению размера агломератов на 9,1% (до $21,84 \pm 0,68$ мкм) и сопровождается существенной модификацией его поверхности, выражающейся в приобретении шероховатости за счет большого количества мелких кристаллов и конгломератов неправильной формы размером 0,1-0,5 и 0,4-0,7 мкм.

БУТВИЛОВСКИЙ А.В., ПЕРЕСЬКО Р.В., БУТВИЛОВСКИЙ В.Э., ЧЕРНОУС Е.А.

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

СРАВНЕНИЕ СХОДСТВА СТРАТЕГИЙ КОДИРОВАНИЯ БЕЛКОВ В МРНК АСКАРИД ЧЕЛОВЕКА И СВИНЬИ И ИХ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ХОЗЯЕВ

Изучение коэволюции паразитов и их хозяев на молекулярно-генетическом уровне имеет фундаментальное и прикладное значение, так как изменения компонентов систем

“паразит-хозяин” могут являться одной из причин изменения чувствительности возбудителей заболеваний к действию противопаразитарных препаратов. Одним из наиболее вероятных проявлений коэволюции паразитов и их хозяев на молекулярно-генетическом уровне является сходство стратегий кодирования белков в мРНК. Одним из важнейших показателей определяющих стратегию кодирования белка является насыщенность гуанином и цитозином (ГЦ-насыщенность) соответствующей мРНК.

Цель работы: сравнить сходство стратегий кодирования белков в мРНК аскарид и их потенциальных хозяев.

Материалы и методы. Проанализированы взятые из базы данных NCBI (National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov) последовательности мРНК, кодирующих ряд ферментов дыхательной цепи (субъединицы 1, 2, 3, 4, 4L, 5, 6 НАДН-дегидрогеназы, цитохром *b*, субъединицы 1, 2, 3 цитохром-*c*-оксидазы, γ -субъединица АТФ-синтазы) человека (*Homo sapiens*), свиньи домашней (*Sus scrofa domesticus*), аскариды человека (*Ascaris lumbricoides*), аскариды свиньи (*Ascaris suum*). ГЦ-насыщенность, частота использования претерминальных кодонов и ГЦЗ-кодонов (кодонов, содержащих в третьем положении гуанин либо цитозин) определены с помощью программного пакета Mega4. Полученные результаты обработаны методами описательной статистики. Достоверность различий определена по критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Установлено, что средняя ГЦ-насыщенность изученных мРНК свиньи домашней составляет $37,3 \pm 1,39\%$, человека – $31,1 \pm 0,92\%$, аскариды человека – $27,1 \pm 0,85\%$ и аскариды свиньи – $26,8 \pm 0,86\%$. Следует отметить, что данный показатель для мРНК аскариды человека на 12,9% меньше такового в мРНК человека, а для мРНК аскариды свиньи на 27,9% такового в мРНК свиньи ($p < 0,05$). Это наводит на мысль о потенциально более сильном сходстве стратегий кодирования митохондриальных белков в мРНК человека и аскариды человека по сравнению с таковыми свиньи и аскариды свиньи.

Однако использование ГЦ-насыщенности в качестве критерия сходства стратегий кодирования может в ряде случаев давать ложноположительный результат, поскольку нахождение гуанина и цитозина в первом и втором положении кодона может быть обусловлено структурной или функциональной необходимостью определенной аминокислоты. Для исключения такого результата целесообразно изучение содержания гуанина и цитозина в третьем положении кодона, преимущественно по которому и

реализуется вырожденность серий кодонов. Для этого нами изучена доля ГЦЗ-кодонов в анализируемых мРНК.

Максимальная доля ГЦЗ-кодонов в изученных мРНК наблюдается у человека и составляет $44,6 \pm 0,65\%$, у свиньи домашней – $39,5 \pm 0,81\%$, у аскариды человека – $29,1 \pm 0,85\%$, у аскариды свиньи – $28,8 \pm 0,80\%$. При попарном сравнении установлено, что данный показатель для мРНК аскариды человека на $34,8\%$ меньше такового в мРНК человека, а для мРНК аскариды свиньи – на $27,1\%$ такового в мРНК свиньи ($p < 0,05$). Это свидетельствует о том, что сходство картины использования ГЦЗ-кодонов в мРНК более выражено в паре «свинья и аскарида свиньи» (по сравнению с парой «человек и аскарида человека»), а по ГЦ-насыщенности потенциально получен ложноположительный результат.

При анализе содержания претерминальных кодонов в изученных мРНК установлено, что наибольшее содержание ПТК-кодонов наблюдается в ДНК человека ($48,0 \pm 0,86\%$), меньшее – у свиньи домашней ($35,9 \pm 1,33\%$), а наименьшее – у аскариды человека ($27,3 \pm 1,05\%$) и свиньи ($26,6 \pm 0,98\%$). При попарном сравнении установлено, что частота использования ПТК в мРНК аскариды человека на $43,1\%$ меньше таковой в мРНК человека, а в мРНК аскариды свиньи – на $25,9\%$ таковой в мРНК свиньи ($p < 0,05$). Это свидетельствует о том, что картина использования претерминальных кодонов более сходна в мРНК пары «свинья и аскарида свиньи» (по сравнению с парой «человек и аскарида человека») и подтверждает, что по ГЦ-насыщенности получен ложноположительный результат.

Заключение. Частота использования претерминальных и ГЦЗ-кодонов в изученных мРНК, кодирующих митохондриальные белки, более сходна у свиньи и аскариды свиньи, чем у человека и аскариды человека. Это может быть объяснено более ранним появлением в процессе эволюции паразитарной системы «свинья-аскарида свиньи».

БЫЧКОВ М.Л., ГАСПАРЯН М.Э.

ИБХ РАН, Москва, Россия

**ИССЛЕДОВАНИЕ АПОПТОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ РЕКОМБИНАНТОГО
ПРЕПАРАТА МУТАНТНОГО ВАРИАНТА ЦИТОКИНА TRAIL,
СПЕЦИФИЧНОГО К РЕЦЕПТОРУ DR5**

TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand, или Apo2L) является цитокином из семейства фактора некроза опухоли, селективно вызывающим апоптоз по внешнему механизму в опухолевых клетках. TRAIL взаимодействует с пятью рецепторами, два из которых (рецепторы смерти DR4 и DR5) проводят апоптотический сигнал, а три других (рецепторы-ловушки DcR1, DcR2 и растворимый остеопротегерин) не трансдуцируют сигналы апоптоза в клетку. В связи с высокой биологической активностью и селективностью, рекомбинантный препарат растворимого TRAIL является перспективным противоопухолевым средством, проходящим в настоящее время клинические испытания.

Однако терапевтическое применение препарата TRAIL ограничено, так как примерно 50 % раковых клеток не чувствительны к этому цитокину. Одной из главных причин резистентности клеток является сложное взаимодействие TRAIL с пятью рецепторами, при котором рецепторы ловушки конкурентно связываются с лигандом и ингибируют передачу сигнала. Показано, что апоптотический сигнал TRAIL в большинстве опухолевых клеток проводится преимущественно через DR5 рецептор, поэтому немалый клинический потенциал имеют DR5-специфические варианты цитокина TRAIL. Нами был получен уникальный DR5-специфичный вариант TRAIL – DR5-B. Его особенность состоит в том, что в отличие от всех других описанных ранее рецептор-селективных вариантов, он не связывается не только с рецептором смерти DR4, но и практически не взаимодействует с рецепторами ловушками DcR1, DcR2 и остеопротегерином.

В настоящей работе были проведены сравнительные исследования апоптоз-индуцирующей активности препаратов TRAIL дикого типа и рецептор-специфичного варианта DR5-B на опухолевых клеточных линиях, отличающихся уровнем экспрессии различных рецепторов TRAIL на поверхности клеток.

Исследования показали, что на клетках острой Т-клеточной лейкемии Jurkat, с высоким уровнем экспрессии DR5 рецептора и отсутствием других рецепторов, препарат

TRAIL DR5-B в 2 - 4 раза эффективнее вызывает апоптоз по сравнению с TRAIL дикого типа. Эффективная доза для этих клеток TRAIL дикого типа и DR5-специфического варианта TRAIL DR5-B составили 0.29 и 0.67 нг/мл соответственно. Уровень гибели клеток при 24-часовом действии 0.1 нг/мл препаратов цитокина составил 8.3% для TRAIL дикого типа, и 34.3% для TRAIL-DR5-B.

На клетках лейкемии HL-60, экспрессирующих все 4 мембранных рецептора TRAIL, апоптотическая активность препаратов TRAIL дикого типа и рецептор-специфичный вариант TRAIL-DR5-B практически не отличался, и эффективная доза обоих препаратов составила 0.25 нг/мл.

Были проведены исследования действия препаратов TRAIL и DR5-B на клетки карциномы легкого A549. Несмотря на то, что эти клетки экспрессируют все 4 мембранных рецептора TRAIL, они устойчивы к TRAIL дикого типа. Было показано, что апоптотический сигнал в клетках A549 при одновременном воздействии TRAIL и химиотерапевтических агентов проводится через DR5 рецептор. Наши исследования показали, что клетки A549 устойчивы к действию препаратов как TRAIL дикого типа, так и к DR5-селективного варианта DR5-B (максимальная гибель клеток составила 25% - 27%). Однако, при совместном действии TRAIL с низкими дозами химиотерапевтических реагентов – 50 нМ бортезомиба (протеасомного ингибитора) и 500 нМ таксола (ингибитора цитоскелета), клетки A549 погибли на 40 % и 60 % при использовании цитокина дикого типа и DR5-селективного варианта TRAIL DR5-B соответственно.

Таким образом, исследования апоптотических свойств препаратов TRAIL показали, что DR5-специфический мутантный вариант TRAIL более эффективно вызывает апоптоз в DR5-чувствительных клетках, по сравнению с препаратом TRAIL дикого типа. Кроме того, мы установили, что совместное применение химиотерапевтических агентов (таких, как бортезомиб и таксол) позволяет усилить апоптотический эффект препарата TRAIL и TRAIL DR5-B, причем последнее демонстрировал более высокую апоптотическую активность.

Получение отечественных эффективных рекомбинантных препаратов TRAIL и его рецептор-специфических мутантных вариантов чрезвычайно важно для исследования роли различных рецепторов в TRAIL опосредованном апоптозе. Высокая специфичность и биологическая активность полученного мутантного варианта TRAIL DR5-B позволяют

считать его перспективным кандидатом для терапии опухолей, резистентных к TRAIL дикого типа.

БЫЧКОВ М.Л., КИМ Я.В., ГАСПАРЯН М.Э.

ИБХ РАН, Москва, Россия

НОВЫЙ ПОДХОД К УВЕЛИЧЕНИЮ ЭФФЕКТИВНОСТИ РАСЩЕПЛЕНИЯ СЛИТНЫХ БЕЛКОВ ЭНТЕРОПЕПТИДАЗОЙ

Энтеропептидаза (EP) является сериновой протеазой, которая вырабатывается клетками слизистой оболочки двенадцатиперстного кишечника и активирует трипсиноген, расщепляя его в специфическом сайте (Асп)₄Лиз. Энтеропептидаза также активно используется для расщепления слитных белков и удаления аффинных последовательностей (tag) при очистке терапевтически важных рекомбинантных белковых препаратов. В связи с тем, что только 2 фермента – энтеропептидаза и фактор Ха – способны расщеплять слитные белки по специфичным сайтам вне зависимости от аминокислот следующих за сайтом действия фермента, значение энтеропептидазы для биотехнологии трудно переоценить. В настоящее время получены препараты легкой (каталитической) субъединицы энтеропептидазы быка (L-BEP) и человека (L-HEP). Однако, широкое применение этих протеаз в промышленной биотехнологии ограничивается их высокой стоимостью. Кроме того, при расщеплении белков большими количествами энтеропептидазы часто происходит неспецифическое расщепление в скрытых сайтах, что крайне отрицательно влияет на окончательный выход препаратов.

Ранее было показано, что замена аминокислотного остатка лизина на аргинин в сайте расщепления EP усиливает активацию трипсиногена в 2,5 – 3 раза. Структурная основа этого феномена объясняется тем, что Арг сильнее взаимодействует с Асп189 (нумерация химотрипсина) внизу специфического аминокислотного кармана. Гуанидиновая группа аргинина в P1 может образовать прямое взаимодействие с карбоксилатной группой Асп189, тогда как контакт между амино-группой лизина в P1 позиции и Асп189 опосредован молекулой воды.

Для улучшения эффективности расщепления слитных белков энтеропептидазой нами была предложена стратегия основанная на замене аминокислотного остатка лизина на аргинин в сайте действия фермента (Асп)₄Лиз, что позволило 3 – 6 раз увеличить эффективность расщепления слитных белков. Было показано, что после замены лизина на аргинин в сайте расщепления энтеропептидазы, эффективность 16-часового расщепления слитного белка тиоредоксин-TRAIL (TNF related apoptosis ligand) препаратами рекомбинантной легкой цепью энтеропептидазы человека и быка улучшается в 3 и 4.6 раза соответственно. Для расщепления рекомбинантного препарата тиоредоксин-FGF2 (Fibroblast growth factor 2) на 97 % с сайтом расщепления (Асп)₄Арг потребовалось 3.9 и 6.3 раза меньше энтеропептидазы человека и быка соответственно, по сравнению с слитным белком с нативным сайтом расщепления (Асп)₄Лиз.

Степень увеличения эффективности расщепления слитных белков препаратами легких цепей энтеропептидаз зависит от молярного соотношения фермент:субстрат. Для расщепления слитного белка тиоредоксин-TRAIL препаратами L-BEP и L-HEP, соотношение фермент:субстрат составило 1:8519 и 1:85100 соответственно. Оптимальным для расщепления белка тиоредоксин-FGF2 является соотношение фермент:субстрат 1:281212 для L-HEP и 1:80346 для L-BEP. Кроме того, снижение количества фермента позволило значительно сократить неспецифическое расщепление препарата тиоредоксин-TRAIL энтеропептидазой человека.

Замена Лиз/Арг в сайте расщепления энтеропептидазы в составе слитных белков тиоредоксин-TBRII-ED (внеклеточный домен рецептора второго типа трансформирующего фактора роста) и тиоредоксин-TGFβ1 (трансформирующего фактора роста 1) также привела к их эффективному расщеплению ферментом. Для полного расщепления этих белков с сайтами расщепления Асп₄Арг потребовалось использовать в 3-4 раза меньше рекомбинантной легкой цепи энтеропептидазы человека по сравнению с слитными белками с природным сайтом расщепления Асп₄Лиз.

Таким образом, предлагаемый нами способ позволяет в 4 – 6 раз уменьшить количество препаратов легких цепей энтеропептидазы быка и человека при удалении тагов рекомбинантных белковых препаратов, что имеет большое значение для промышленной биотехнологии и фармацевтической индустрии.

Наша работа является первой попыткой, при которой эффективность удаления тагов с помощью эндопептидазы улучшается с помощью изменения последовательности сайта расщепления фермента в слитных белках. Такой подход может быть применен ко всем предназначенным для удаления тагов ферментам, при нахождении для них более эффективных (отличающихся от природных) субстратов. Это практически решит главную проблему производства рекомбинантных терапевтических белков в фармацевтике, где относительно высокие количества фермента требуются для эффективного удаления тагов на *N*-конце белка, и неспецифическое расщепление целевого белка создает трудности для достижения желательных выходов.

БЫЧКОВА А.В., РОЗЕНФЕЛЬД М.А., ЛЕОНОВА В.Б., СОРОКИНА О.Н.,
КОВАРСКИЙ А.Л., ШАПИРО А.Б.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

ПОЛУЧЕНИЕ БИОСОВМЕСТИМЫХ ПОКРЫТИЙ НА МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦАХ ДЛЯ БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЫ

Магнитные наночастицы находят все более широкое применение в различных областях биологии и медицины: гипертермии, магнитно-резонансных исследованиях, иммунологическом анализе, клеточной и молекулярной сепарации, тканевой инженерии, векторной доставке лекарственных препаратов к клеткам-мишеням. Модификация поверхности наночастиц является обязательной стадией создания наносистем для биомедицины. Покрытия обеспечивают биосовместимость наносистем и возможность их локализации в биомишенях; кроме того, покрытия позволяют получать многофункциональные наносистемы, включающие биовекторы для нацеливания или узнавания биологических систем (органов, тканей, клеток и их составляющих) и терапевтические препараты. Закрепление покрытий на поверхности наночастиц предотвращает их нежелательную десорбцию при контакте с биообъектами. Научные коллективы в разных странах мира работают над созданием устойчивых покрытий на основе белков на поверхности наночастиц, что представляет исключительно сложную

научную задачу. Традиционный путь, включающий использование бифункциональных сшивателей, малоперспективен в связи как с неизбирательностью сшивания макромолекул, приводящей к образованию полидисперсного ансамбля частиц, так и с десорбцией белковых молекул с поверхности наночастиц. Нами предложен не имеющий аналогов способ закрепления белковых покрытий на поверхности магнитных наночастиц, основанный на свойстве белков вступать в свободнорадикальные реакции и образовывать межмолекулярные сшивки в результате генерации свободных радикалов строго на поверхности магнитных наночастиц (магнетита). Совокупностью физико-химических (ЭПР-спектроскопия, ферромагнитный резонанс (ФМР), упругое и динамическое светорассеяние, ИК-спектроскопия и др.) и биохимических методов доказано, что свободнорадикальное сшивание белков позволяет получать устойчивые однослойные белковые покрытия с толщиной в несколько нанометров на поверхности индивидуальных магнитных наночастиц, а свободнорадикальные процессы протекают исключительно в адсорбционном слое и не затрагивают макромолекулы, находящиеся в растворе. Исследование и количественное описание адсорбционных процессов (в том числе, конкурентной адсорбции) на поверхности магнитных наночастиц в дисперсии проводили с использованием подхода на основе ЭПР-спектроскопии спиновых меток и ФМР, разработанного авторами ранее. Продемонстрировано полное сохранение нативных свойств сшитых по свободнорадикальному механизму молекул белка на наночастицах.

Применение настоящего методически простого, одностадийного способа закрепления макромолекул белков на поверхности наночастиц позволяет создавать магнитоуправляемые наносистемы для диагностических и терапевтических целей с многофункциональными белковыми покрытиями, которые, в отличие от покрытий, получаемых другими известными ранее способами, могут удовлетворять всем необходимым требованиям. С использованием предлагаемого подхода может решаться целый ряд биомедицинских задач, таких как придание поверхностям биосовместимости и тромборезистентности с помощью иммобилизации белков, например, альбумина, создание наносистем с иммобилизованными ферментами, практически полностью сохраняющими свою активность (например, тромбина), иммобилизация моноклональных антител, которые могут быть использованы как терапевтические вещества или биовекторы и др. Способ может применяться для решения задач, связанных с получением пленочных

биосовместимых покрытий не только на поверхности наночастиц магнетита, но и на любых других поверхностях, содержащих ионы металлов переменной валентности (железа, меди, марганца, хрома).

ВАСИЛЬЕВ Д.М.¹, МАКСИМОВА Ю.Г.², ОВЕЧКИНА Г.В.², ДЕМАКОВ В.А.^{1,2}

¹ *Пермский государственный национальный исследовательский университет,
Пермь, Россия*

² *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия*

ПОЛУЧЕНИЕ ИЗОНИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ ИЗ 4-ЦИАНОПИРИДИНА, КАТАЛИЗИРУЕМОЕ КЛЕТКАМИ АКТИНОБАКТЕРИЙ РОДА *RHODOCOCCUS*

В настоящее время большое внимание уделяется разработке и внедрению биотехнологических методов синтеза разнообразных химических соединений. Как наиболее перспективное направление выделяют использование микроорганизмов и их ферментов. Выделить микробиологические технологии в число приоритетных направлений позволяет способность ферментов трансформировать органические вещества в более мягких условиях (нормальные температура и давление). Для биотехнологических производств чаще всего используют целые микробные клетки, т.к. их использование не предполагает дорогостоящего процесса выделения и очистки фермента. Поэтому использование микробных биотехнологий может существенно удешевить получение органических веществ и снизить давление химических производств на окружающую среду.

В данной работе была изучена возможность трансформации 4-цианоприидина ферментными системами нитрилгидролизующих микроорганизмов. Путем гидролиза 4-цианоприидина получают изоникотиновую кислоту – предшественник гидразина изоникотиновой кислоты (изониазида), используемого при лечении туберкулеза.

Гидролиз цианоприидинов может реализовываться двумя путями (двустадийный и одностадийный) и основан на работе ферментов нитрильного метаболизма микроорганизмов – нитрилазы, нитрилгидратазы и амидазы. Двустадийный путь заключается в конверсии нитрила до амида при помощи фермента нитригидратазы с

последующей конверсией амида ферментом амидазой до соответствующей кислоты. Одностадийный путь заключается в прямой конверсии нитрила до карбоновой кислоты при помощи фермента нитрилазы. Получение карбоновой кислоты из соответствующего нитрила может быть осуществлено штаммом микроорганизмов, содержащим нитрилазу, либо при условии, если активность амидазы сопоставима с таковой нитрилгидратазы. Если активность амидазы штамма мала, конверсия может осуществляться смешанной суспензией, в которой присутствует штамм с данной активностью.

В данной работе мы исследовали возможность конверсии 4-цианопиридина до соответствующей кислоты при помощи смешанной суспензии клеток штаммов двух видов актинобактерий: *Rhodococcus ruber* gt1, содержащего высокоактивную нитрилгидратазу и *Rhodococcus eritropolis* 11-2, у которого преобладала амидазная активность. Штаммы были выделены из антропогенно-загрязненных почв и селекционированы в лаборатории химического мутагенеза Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН.

Клетки бактерий выращивали до стационарной фазы роста на минимальной среде, содержащей 0,1% глюкозу. Реакцию трансформации 50 мМ раствора субстрата проводили в 20 мл калий-фосфатного буфера (рН 7,2), содержащем 11 мг и 13 мг клеток (по сухому весу) штаммов *Rhodococcus ruber* gt1 и *Rhodococcus eritropolis* 11-2 соответственно, при 30°C в течение 180 мин, пробы отбирали через каждые 30 мин. Концентрацию субстрата и продуктов определяли методом ВЭЖХ на хроматографе LC-10 «Shimadzu» (Япония) с колонкой C18 (250x4,6 мм), в качестве подвижной фазы использовали 10 мМ раствор K_2HPO_4 с 25% ацетонитрила, скорость потока составляла 0,5 мл/мин при 25°C.

При конверсии 50 мМ раствора 4-цианопиридина смешанной суспензией клеток данных штаммов полный гидролиз 4-цианопиридина происходил за первые 30 мин с образованием 88,1 мг изоникотинамида и 4 мг изоникотиновой кислоты. Основной вклад в трансформацию 4-цианопиридина до соответствующего амида, по-видимому, вносил штамм *Rhodococcus ruber* gt1, обладающий высокой нитрилгидратазной активностью. Последующая конверсия амида в соответствующую карбоновую кислоту происходила за счет клеток штамма *Rhodococcus eritropolis* 11-2, активность амидазы которого была значительно выше. В результате в реакционной смеси возросло количество изоникотиновой кислоты, которое через 180 мин реакции составило 23,2 мг в 20 мл.

Таким образом, получение изоникотиновой кислоты возможно при конверсии раствора 4-цианопиридина смешанной суспензией клеток родококков, которая представлена штаммами с высокой активностью нитрилгидратазы или амидазы.

Работа поддержана Программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

ВЕКШИН Н.Л.

ФГБУН Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Московская область, Россия

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ АКТИНОМИЦИНОВЫЕ ФАРМАКОСОМЫ

Изучено перераспределение актиномицина Д (АМД) и его флуоресцирующего аналога 7-амино-актиномицина Д (7ААМД) со шпилечного олигонуклеотида d(5'-AAAAAATAGTTTAAATATTTT-3') (HP1) на ДНК в растворе и клетке. Показана большая эффективность проникновения антибиотика в клетку в виде комплекса с HP1. На основе указанных веществ созданы нано-фармакосомы, перспективные для лечения онкологических заболеваний.

Феноксазоновые хромофоры 7ААМД и АМД локализуются в ДНК (или HP1) в малополярном окружении, сходном с пиридином. Встраивание актиномицинов происходит не на поверхности ДНК, а в динамической "полости" между двумя цепочками нуклеотидов, но без стэкинга с ними. Вероятно, именно поэтому актиномицины не являются канцерогенами (в отличие от этидиум бромида, интеркалирующего между основаниями ДНК по стэкинговому типу), а наоборот – служат эффективными противоопухолевыми препаратами.

Флуоресценция 7ААМД возрастает при связывании с HP1 в несколько раз сильнее, чем при связывании с нативной ДНК. Это позволяет наблюдать перераспределение 7ААМД из комплекса с HP1 на ДНК после добавления избытка ДНК. "Переползание" состоит из быстрой фазы – 4,5 сек и медленной - 101 сек. Две компоненты соответствуют двум типам участков ДНК. Первый - это петли и расплетения, а второй - двойная спираль. Увеличение ионной силы приводило к уменьшению амплитуды быстрой компоненты, т.к. при высокой ионной силе ДНК имеет менее рыхлую структуру.

Эти опыты позволили предположить, что актиномицины смогут проникать к ДНК опухолевых клеток, предварительно связавшись со шпилечными олигонуклеотидами. Сами по себе антибиотики плохо проникают в клетки.

С помощью люминесцентной микроскопии были изучены места локализации актиномицинов в клеточных структурах после инкубации клеток асцитной карциномы Эрлиха со свободным 7ААМД или с комплексом 7ААМД/НР1. Свободный 7ААМД сильно аккумулируется в плазматической мембране клеток. В случае же применения комплекса 7ААМД/НР1 наблюдается интенсивное прокрашивание ядер. Добавка АМД в питательную среду вызывала лишь небольшое увеличение гибели клеток карциномы по сравнению с контролем (без АМД). Это связано с тем, что АМД плохо проникает внутрь клеток. При инкубации в присутствии комплекса АМД/НР1 гибель клеток возрастала в несколько раз. При этом цитотоксичность самого НР1 в отношении карциномы была низка и сравнима с цитотоксичностью свободного АМД - не превышала 6%.

Итак, шпилечный олигонуклеотид НР1 существенно потенцирует действие АМД. Это можно объяснить не только самой по себе способностью НР1 переносить актиномицины к ДНК, но также высокой плотностью упаковки комплекса с антибиотиком, что создает условия для эффективного переноса через мембраны.

Другим переносчиком гетероциклических антибиотиков могут служить пуриновые кластеры, например, кластеры кофеина, образующиеся в воде спонтанно при миллимолярных концентрациях. Наблюдалось уменьшение коэффициента экстинкции при увеличении концентрации кофеина. При добавлении АМД или 7ААМД к кластерам кофеина возникали существенные изменения полос поглощения и возбуждения этих антибиотиков, что говорит о сильном взаимодействии с кофеином. Отсутствие сдвига спектра эмиссии 7ААМД в кофеиновых кластерах, а также наличие тушения динитрофенолом указывают на поверхностное связывание антибиотика. Было обнаружено достаточно быстрое (в течение минуты) перераспределение антибиотика с поверхности кофеиновых кластеров к ДНК в растворе.

При введении комплекса АМД / НР1 мышкам с привитой саркомой продолжительность жизни животных увеличивалась с 10-12 дней до 20-25 дней, в то время как введение антибиотика отдельно увеличивало срок жизни всего на 1-2 дня. В отношении саркомы комплекс гораздо эффективней, чем АМД отдельно.

На основе АМД, 7ААМД, НР1, кофеина и аденина были созданы противоопухолевые нано-фармакосомы – сферические частицы размером порядка 10 нм. Они могут служить эффективными переносчиками («доставщиками») гетероциклических антибиотиков, в частности актиномицинов, к ядерной ДНК опухолевых клеток и вызывать гибель этих клеток. Фармакосомы хорошо хранятся, не склонны к слипанию и обладают многократно большей эффективностью, чем растворы отдельных актиномицинов. При этом токсичность фармакосом в отношении нормальных клеток во много раз ниже.

Работа поддержана грантом «Фундаментальные науке – медицине – 2012».

ВЕЛЬМЯЙКИН И.Н., МОКШИН Е.В., ЕМЕЛЬЯНОВА И.С., ЛУКАТКИН А.С.

Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, Саранск, Россия

ВВЕДЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ СОРТОВ

HYACINTHUS ORIENTALIS L. В КУЛЬТУРУ IN VITRO

Гиацинт – мало описанная культура в фитобиотехнологии; литературные данные по нему часто носят противоречивый характер. Голландия использует достижения биотехнологии для размножения гиацинтов в промышленном цветоводстве, но они являются коммерческой тайной меристемной лаборатории. Известно, что коэффициент размножения гиацинта в условиях культуры ткани в 20-40 раз выше, чем при размножении их традиционным способом, применяемым в цветоводстве. Это обусловлено целым рядом факторов, которые необходимо эмпирически подбирать не только для конкретного вида, но и для сорта растения.

Объектом исследования служили луковицы гиацинта восточного (*Hyacinthus orientalis* L.) двух сортов Йеллоу Куин и Эприкот Пешн. Эксперимент включал в себя стерилизацию и введение в культуру. С целью получения хорошо растущей стерильной культуры растительный материал подвергали ступенчатой стерилизации: 0,1% KMnO_4 (20 минут) – 70% этиловый спирт (2 минуты) – 6 % хлорамин Б (от 10 до 20 минут). Для выяснения зависимости процессов регенерации от сезона, эксплантацию проводили в разные календарные сроки (октябрь – апрель). Экспланты помещали на питательную среду. В качестве основной питательной среды использовали агаризованную (0,7%) среду

с минеральной основой по Мурасиге и Скугу (рН 5,8–5,9), включающую витамины тиамин и пиридоксин (по 1,0 мг/л), сахарозу (30 г/л). Выращивание осуществляли при температуре 18–23°C и круглосуточном освещении белыми люминесцентными лампами с интенсивностью света 3 клк.

В результате исследования установили, что применение поэтапной стерилизации обеспечило наименьшую инфицированность эксплантов. Наиболее эффективным (85 и 90% стерильного материала для сортов Йеллоу Куин и Эприкот Пешн, соответственно) оказался вариант 0,1% KMnO_4 (20 минут) – 70% этиловый спирт (2 минуты) – 6% хлорамин Б (15 минут).

При изучении влияния сроков изоляции эксплантов на последующий органогенез выявлено, что у обоих сортов наибольшая регенерационная активность наблюдалась в период с марта по апрель. В этом случае формировалось максимальное количество микролуковичек – 6 шт./эксплант у сорта Йеллоу Куин и 7,5 шт./эксплант у сорта Эприкот Пешн. Введение в культуру в осенне-зимний период (октябрь–декабрь) ингибировало данный процесс: количество микролуковичек *de novo* при этом составило 2 шт./эксплант у сорта Йеллоу Куин и 1,5 шт./эксплант у сорта Эприкот Пешн. Также стоит отметить, что в вариантах с эксплантацией данных сортов гиацинта в период с октября по декабрь происходило торможение закладки микролуковичек на 2-3 месяца по сравнению с весенним периодом.

Таким образом, можно сделать вывод, что применение поэтапной стерилизации с включением этапа 6% хлорамин Б со временем экспозиции 15 минут обеспечило максимальный выход стерильного материала для обоих исследуемых сортов гиацинта. Оптимальным периодом для введения в культуру являлся весенний (март–апрель).

ВЕРШИНКИН Д.А.¹, ГЕТМАН И.А.¹, ЧИЖОВА С.И.¹,
ГРЯДУНОВ Д.А.², МИХАЙЛОВИЧ В.М.², ЗАСЕДАТЕЛЕВ А.С.², РОМАНОВ Г.А.¹

¹ *Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева, Москва, Россия*

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

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕННО-МОДИФИЦИРОВАННЫХ ОРГАНИЗМОВ С ПОМОЩЬЮ ГИДРОГЕЛЕВЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ МИКРОЧИПОВ

Появившаяся в начале 1970-х годов технология рекомбинантных ДНК дала возможность получения генно-модифицированных организмов (ГМО), содержащих чужеродные гены. Уже через десятилетие это позволило создать в США первые линии ГМО, предназначенные для коммерческого использования. С тех пор количество ГМО, предназначенных для использования на практике, неуклонно растет. Генная инженерия позволила создать новые сорта растений, устойчивых к неблагоприятным условиям внешней среды и вредителям, обладающих лучшими ростовыми и вкусовыми качествами. Проходят испытания ГМ-сортов древесных пород с повышенным содержанием целлюлозы и быстрым ростом. По данным Международной службы мониторинга использования сельскохозяйственных биотехнологий (ISAAA), на 2011 год набор коммерческих ГМ-культур включает 192 линии растений.

В то же время в связи с бурным развитием коммерческой биотехнологии возникла потребность в оценке биологических и экологических рисков. Особенно это актуально в случае использования ГМО при производстве продуктов питания. В странах Европейского союза (ЕС) законодательно введены строгие ограничения по выращиванию трансгенных культур и обязательная маркировка продуктов питания на присутствие трансгенных добавок, если их доля в составе продукта превышает 0.9%. В большинстве других развитых стран также введены требования маркировки продуктов питания при превышении порогового содержания ГМО. Аналогичная нормативная база, необходимая для организации и проведения эффективного надзора за пищевыми продуктами, содержащими ГМ-компоненты, выработана и в России. С 12.12.2007 в РФ, в соответствии с поправками в Федеральный Закон от 7.02.1992 № 2300-1 "О защите прав потребителей", предельное, не требующее маркировки, содержание ГМО в продуктах питания составляет, как и в странах ЕС, 0.9%. Продукты, в которых содержание ГМО больше этого значения,

подлежат обязательной маркировке. Вышеуказанная норма введена как для защиты прав потребителей, так и для соответствия требованиям ЕС по этикетированию ГМ-содержащих пищевых продуктов.

Еще в 2003 году, впервые в мире, в России был разработан (ИФР РАН совместно с ИМБ РАН) и утвержден в качестве национального стандарта РФ (ГОСТ Р 52174–2003) метод идентификации трансгенных последовательностей ДНК на основе гидрогелевых биологических микрочипов (биочипов). Процедура анализа включает мультиплексную амплификацию фрагментов векторных конструкций и маркерных генов, использованных в качестве трансгенных мишеней, с последующей гибридизацией полученных фрагментов на олигонуклеотидном биочипе. Этот метод позволяет выявлять трансгенную ДНК с высокой чувствительностью (от 0.5%). Такая чувствительность полностью удовлетворяет требованиям к предельному (для маркировки) содержанию ГМО в продуктах питания и сырье в России и ЕС и позволяет исключить из дальнейшего рассмотрения пищевые объекты с низким и сверхнизким их содержанием, которые, согласно действующему законодательству, не подлежат маркировке. Этот метод на данный момент позволяет идентифицировать сразу 10 фрагментов трансгенных элементов: промоторов (*NptII*, *35S CaMV*, *35S FMV*, *Act1*), терминаторов (*Nos*, *35St CaMV*, *RbcS*, *Ocs*) и маркерных генов (*Bar*, *Gus*), что дает возможность контролировать порядка 80% ГМ-культур, используемых в коммерческой биотехнологии, и 100% ГМ-линий, разрешенных для использования в РФ. В дальнейшем в связи с увеличением количества используемых на практике детерминант трансгенности планируется расширять набор детектируемых с помощью биочипа трансгенных элементов.

Разработанный метод высокотехнологичен и не требует значительных затрат труда персонала. Мультиплексная амплификация занимает не более 2.5 часов. Гибридизация на биочипе может проходить без участия сотрудников, что позволяет ее проводить в нерабочее время, например, в течение ночи. Анализ результатов производится в автоматическом режиме с использованием специализированного программного обеспечения. Всем этим данный метод выгодно отличается от альтернативных методов обнаружения ГМО. Метод нашел активное применение для мониторинга наличия ГМ-продуктов в торговых сетях Московского региона.

Работа выполняется при поддержке Программой Президиума РАН «Живая природа: современное состояние и проблемы развития», подпрограмма «Динамика и сохранение генофондов».

ВЕТОШКИНА Д.В., ЧЕПУРНОВА М.А., ЗАХАРЧЕНКО Н.С.

ФГБОУ ВПО «Тульский государственный университет»

Филиал ФГБУН Института биоорганической химии им. академиков

М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

ПОЛУЧЕНИЕ БЕЗМАРКЕРНЫХ БИОТЕХНИЧЕСКИХ РАСТЕНИЙ РАПСА

Рапс – ценная масличная культура, характеризующаяся высокой продуктивностью и исключительно стабильной урожайностью. Однако при выращивании и хранении рапса возникает проблема защиты его от патогенов. Одним из методов повышения устойчивости рапса к фитопатогенам является получение трансгенных растений с генами антимикробных пептидов. Традиционный способ получения биотехнических растений основан на применении конститутивно экспрессируемых селективных генов устойчивости к антибиотикам и гербицидам или генов-репортеров для отбора трансформированных растений-регенерантов. Однако после завершения отбора присутствие в геноме растений маркерных генов становится бесполезным и даже опасным. Это связано с возможностью горизонтального переноса генов устойчивости к антибиотикам кишечной микрофлоре животных и человека, а также вертикального переноса генов устойчивости к гербицидам сорным растениям.

Целью нашей работы было получение биотехнических растений рапса, экспрессирующих ген цекропина P1 и не содержащих селективных маркерных генов.

Для трансформации использовали стерильные семена рапса сорта «Галант». Трансформацию семян проводили методом вакуумной агроинфильтрации (в течении 5 минут при отрицательном давлении 0,8 Атм.) При увеличении времени воздействия вакуума всхожесть семян снижалась. Для трансформации использовали агробактерии *Agrobacterium tumefaciens CBE21 (pTiBo542, pBM::cecP1)*.

Отбор трансформированных растений проводили исследуя наличие антибиотической активности у растительных экстрактов. Для этого экстракты, содержащие 1 мг общего белка, добавляли в лунки в агаре, на поверхность которого сплошным газонем были высеяны бактерии *Erwinia carotovora*. По наличию зоны лизиса вокруг лунок судили об антибиотической активности экстрактов.

Отобранные трансформанты рапса проверяли на наличие целевого (сесP1) гена и экспрессии пептида в растениях. Для этого использовали метод полимеразной цепной реакции и иммуноферментный метод Вестерн-блот анализа. Электрофореграмма продуктов амплификации гена сес. P1 трансгенных растений показала его наличие у 1-5 исследуемых образцов каждой группы. Размер гена совпадал с размером продукта амплификации гена сес P1 плазмиды pGA482-35S-сес - 104 п.н.

Вестерн-блот анализ белковых экстрактов из трансгенных растений показал наличие иммунопозитивного результата, что соответствовало высокому уровню экспрессии пептида, с молекулярной массой 3,4 кДа, соответствующего зрелой форме цекропина P1. Биотехнические растения проверяли на устойчивость к некоторым бактериальным и грибным фитопатогенам. Для этого отдельные листья и целые растения искусственно инфицировали фитопатогенным грибом *Sclerotinia sclerotiorum* и бактерией *Erwinia carotovora*. Поражение контрольного листа на вторые сутки составило 50%, а на шестые – 100%. Следов поражения на трансгенных растениях, за аналогичный период, отмечено не было.

В ходе работы были получены биотехнические растения рапса, обладающие антибактериальной активностью к фитопатогенам. Антибактериальная активность обусловлена присутствием в геноме растений гена цекропина P1. Показано, что продуктивность трансформации методом вакуумной агроинфильтрации в 2 – 3 раза больше по сравнению с традиционным методом трансформации – кокультивации в суспензии агробактерий. Показана возможность отбора трансформантов без селективных маркерных генов.

АЗОТФИКСАЦИЯ В ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОМ ТРАКТЕ ПТИЦ-ФИТОФАГОВ

Сообщество микроорганизмов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) животных выполняет ряд физиологических функций, необходимых для жизнедеятельности организма-хозяина. Это, в первую очередь, обеспечение пищеварения, борьба с патогенными микроорганизмами, выработка иммунитета, синтез биологически-активных веществ. Вклад микробов в пищеварительный процесс у разных микробов неодинаков. Например, у хищных микробиоценоз ЖКТ играет незначительную роль в пищеварении, а у некоторых травоядных, особенно ксилофагов, микроорганизмы – основное звено пищеварения. Микробная азотфиксация в ЖКТ животных, потребляющие бедные диетарным азотом корма, показана как для беспозвоночных (Breznak et al., 1982; Noda et al., 2005; Distel et al., 2002; Lechene et al., 2007), так и для позвоночных (Jones & Thomas, 1974; Li Pun & Satter, 1975; Лаптев, 1995; Наумова и др., 2000; Варшавский и др. 2004; Мещерский и др., 2004). Однако данных о существовании подобного комплекса микроорганизмов у птиц нет. Для исследования активности диазотрофного сообщества птиц-фитофагов применяли метод газовой хроматографии. Содержание углерода и азота в ЖКТ птиц определяли на элементном анализаторе, для оценки функциональных особенностей сообществ микроорганизмов птиц использовали метод мультисубстратного тестирования (Горленко и др., 2005).

Содержание азота в слепой кишке птиц было значительно выше, чем в зобу (у глухаря, например, 5,74% и 2,77%). Значительное обогащение химуса азотом указывает на возможное протекание процессов микробной азотфиксации или реутилизации мочевины. Действительно, нитрогеназная активность была обнаружена во всех исследуемых отделах (зоб, желудок, тонкий кишечник, слепая кишка) ЖКТ как глухаря, так и тетерева. При этом, основным ферментером для птиц служит толстый кишечник – там активность азотфиксации выше, чем в остальных отделах (Kruskal-Wallis test, $p < 0,05$). Наибольшие уровни диазотрофной активности были обнаружены в слепой кишке птиц ($0,62 \pm 0,13$ нмоль $C_2H_4/г*ч$ и $0,55 \pm 0,05$ нмоль $C_2H_4/г*ч$, соответственно). Общая численность

микроорганизмов в слепой кишке птиц также была значительно выше, чем в остальных отделах ($1,5 \cdot 10^9$ для глухаря и $3,3 \cdot 10^{10}$ для тетерева соответственно).

Дополнительная характеристика активности микробных сообществ разных отделов ЖКТ птиц была получена методом мультисубстратного тестирования. Разные отделы ЖКТ заметно отличались по микробному разнообразию. Максимальное значение было отмечено для слепой кишки (Индекс Шеннона 4,81 для тетерева, и 5,14 для глухаря). Максимальное разнообразие потребляемых субстратов также было отмечено в слепой кишке. Причем у микробного сообщества слепой кишки глухаря спектр потребляемых субстратов в 3.5 раза шире, чем у сообщества зоба. Все это говорит о том, что слепая кишка является основным микробным ферментером ЖКТ тетеревиных птиц, отвечающим как за переваривание клетчатки, так и за фиксацию атмосферного азота.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в кишечнике тетеревиных птиц существует diazotrophic микробный комплекс, функционирующий по типу постгастральной ферментации. Вероятно, он играет заметную роль не только в переваривании трудноусвояемых полисахаридов, но и в обеспечении птиц азотом бактериального белка. Особенно высока роль микробной азотфиксации должна быть в зимний период, когда количество поступающего диетарного азота становится минимальным. О важности микробного комплекса для тетеревиных птиц говорит и большая относительная длина слепых кишок, составляющих около половины длины ЖКТ.

ВИКУЛОВА М.А.¹, ГНЕЗДИЛОВА Л.А.²

¹ ФГУ «Ставропольская межобластная ветеринарная лаборатория», Ставрополь, Россия

² ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина», Москва, Россия

ПРИМЕНЕНИЕ ИММУННОЙ МУЛЬТИВАЛЕНТНОЙ СЫВОРОТКИ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ТЕЛЯТ

В работе предлагается простой, действенный и экономически выгодный метод, который доказал свою эффективность при применении в сельскохозяйственных предприятиях. Данный метод складывается из нескольких этапов.

1. В неблагополучном хозяйстве в ходе проведения исследований отбирается биоматериал, том числе сыворотка крови, для лабораторной диагностики на все вирусные респираторно-кишечные инфекции, поражающие телят в возрасте от недели до 4-5 мес.

2. Сыворотку исследуют в реакции РНГА, методом, утвержденным и предложенным сотрудниками и аспирантами кафедры ветеринарной вирусологии МГАВМиБ, выявляя, таким образом, возбудителей вирусных респираторно-кишечных инфекций молодняка крупного рогатого скота, циркулирующих в данном хозяйстве, в т.ч. и к хламидиозу, если таковой присутствует. Затем их распределяют по приоритету, исходя из интенсивности напряженности титра антител.

3. От клинически здоровых, прошедших полную диспансеризацию и весь курс профилактических исследований, коров, матерей телят этой группы в количестве 35-40 голов, отбирают сыворотку крови в количестве 10 мл и подвергают серологическому исследованию в РНГА. Выбирают животных с наиболее высокими титрами антител к заболеваниям, выявленным у телят, формируя тем самым группу т.н. «матерей-доноров», титр антител при этом регулярно контролируют.

4. После формирования группы доноров проводили отбор донорской крови, не более 1500 мл от одного животного. Индивидуальности отбора не придерживались, заполняя стерильные сосуды емкостью 2000 мл на 2/3. Затем после обеззараживания и предварительной специфической обработки отобранной крови получали сыворотку, которую тщательно сливали в стерильные емкости и центрифугировали. После чего отцентрифугированную и профильтрованную сыворотку пропускали через специальный аппарат УФО-облучения и озонирования крови «НАДЕЖДА-О» со встроенными ртутно-кварцевыми лампами в режиме закрытого контура. Процедура производилась с предварительно подготовленным стерильным флаконом с сывороткой, через которую, с помощью встроенного роликового насоса аппарата через камеру облучателя прокачивается кислород и возвращается во флакон. Способ обеспечивает достижение в течение 15-20 минут высокой концентрации озона в сыворотке, обладающего сильным бактерицидным эффектом. В обрабатываемой таким методом сыворотке стерильность достигается не только пропусканием через нее озона, но и дополнительным ультрафиолетовым облучением.

5. К использованию допускалась только стерильная и нетоксичная сыворотка с оптимальными титрами антител.

6. Иммунную мультивалентную сыворотку применяли для пассивной лечебно-профилактической иммунизации молодняка КРС с 3-4 недельного возраста по определенной схеме, составленной индивидуально для каждой группы телят. Лечебные дозы, сроки и кратность введения зависели от формы и тяжести заболевания, общего состояния и веса животного. В профилактических дозах количество вводимого препарата соответственно снижалось.

При применении иммунной мультивалентной сыворотки были получены следующие результаты: после 3- 4-х кратного введения падеж телят сокращался на 20-30%; после применения в течение 7-8 месяцев - на 60-70%; по итогам года произошло оздоровление телят неблагополучного хозяйства.

Заключение: На основании проведенных исследований мы можем рекомендовать проведение серологической диагностики ассоциированных инфекций с применением РНГА и широкое использование иммунной мультивалентной сыворотки для лечения и профилактики пневмоэнтеритов телят вирусного генеза.

ВИННИЧЕНКО К.Я., ЛЕБЕДЕВ В.П., МАЛЫГИН А.В.

Институт физиологии им. И.П.Павлова Российской академии наук,

Санкт-Петербург, Россия

О ВОЗМОЖНЫХ МЕХАНИЗМАХ ГЕНЕРАЦИИ КОЖНО-ГАЛЬВАНИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ

В данной работе рассмотрены возможные механизмы генерации кожно-гальванической реакции (КГР), а также возможность её описания с помощью суперпозиции двух гауссовых функций. В литературе встречается две различные модели КГР. Согласно первой модели, физиологические процессы, происходящие при генерации КГР, могут быть описаны с помощью хорошо известной гауссовой функции. При этом форма кривой КГР существенно отличается от встречающейся в отечественной литературе, что может быть связано с тем, что данная кривая отображает проводимость,

тогда как в отечественных публикациях – сопротивление кожных покровов. Для второй (отечественной) модели характерно наличие предположения о вкладе двух компонент в формирование ответа, что авторами объясняется влиянием парасимпатической и симпатической систем на КГР. Однако компоненты в достаточной степени не выявлены, графически не отражены, а также не выявлено взаимодействие между ними, кроме того, влияние парасимпатической системы анатомически не подтверждается. Нами сделано предположение о том, что КГР можно представить суперпозицией двух разнонаправленных, но сходных по динамике процессов, каждый из которых имеет свои характеристики.

$$SV(t) = S(t) + V(t), \quad (1)$$

где $SV(t)$ - результат моделирования КГР.

$$V(t) = \frac{A_V}{\sqrt{2\pi\sigma_V^2}} e^{-\frac{(t-\mu_V)^2}{2\sigma_V^2}}, \quad S(t) = \frac{-A_S}{\sqrt{2\pi\sigma_S^2}} e^{-\frac{(t-\mu_S)^2}{2\sigma_S^2}}; \quad (2)$$

где $V(t), S(t)$ - компоненты реакции;

A_V, A_S - амплитуды соответственно первой и второй компоненты;

σ_V, σ_S - ширина первого и второго пика;

μ_V, μ_S - время достижения максимумов первой и второй кривой.

Также нами выдвинуты предположения о природе этих двух компонент: вероятно, одной из компонент является реакция потовых желёз, а вторая, возможно, отражает сосудистую реакцию. Известно, что потовые железы имеют холинэргическую иннервацию, а периферические сосуды – адренэргическую. В результате можно предположить наличие соответствующих биохимических компонент в совокупной КГР. Подобный подход позволил добиться достаточно чёткого совпадения экспериментальной и модельной кривых.

Сравнивая форму кривой с графиком аппроксимирующей функции по формуле (1) можно сделать вывод, что КГР может быть представлена в виде суммы двух разнонаправленных процессов, описываемых гауссовыми функциями.

С помощью полученной модели КГР в работе проанализирована реакция организма на медицинское воздействие на примере транскраниальной электростимуляции (ТЭС). В

результате наблюдалось четкое изменение одной из компонент (холинэргическое звено симпатической системы) под влиянием ТЭС, что подтверждает ранее полученные данные о влиянии ТЭС на данную компоненту.

Предложенная двухкомпонентная математическая модель требует дальнейшего развития и подтверждения, после чего, вероятно, может быть использована для оценки эффективности различных терапевтических методов с помощью КГР. При этом из данной модели следует, что использование КГР в качестве физиологического индикатора эффективности лечения целесообразно только в тех случаях, когда имеются основания предполагать влияние используемой терапии на симпатическую нервную систему, причём, на основе предложенной модели имеется возможность отдельного анализа влияния на холинэргическое и адренэргическое звенья.

ВИНОКУРОВ А.Ю.

*Государственный университет – учебно-научно-производственный комплекс,
Орел, Россия*

РАЦИОНАЛЬНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕСУРСОВ КАК ФАКТОР УЛУЧШЕНИЯ ТЕХНОЛОГИИ И СНИЖЕНИЯ СЕБЕСТОИМОСТИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ КРАХМАЛОВ

При производстве химически модифицированных крахмалов чаще всего применяется т.н. «мокрый» метод, при котором процесс осуществляется в водной суспензии полисахарида. Образующиеся при реализации данного метода жидкие сходы после очистных мероприятий или даже без них сбрасываются в естественные водоёмы. Организация более рационального использования ресурсов, в частности внедрение замкнутого водооборота, требует глубокого изучения реализуемой схемы производства и при получении модифицированных крахмалов не находит сегодня широкого применения.

При реализации стандартной технологии катионного крахмала (КтК) при производстве 1 т продукции может образовываться до 1-1,5 м³ стоков. В существующих технологических инструкциях допускается лишь использование жидких сходов механического обезвоживания КтК для разбавления суспензии после окончания

модифицирования, что, впрочем, не снижает объемов сбрасываемых сточных вод. Последние содержат растворимую фракцию крахмала (до 2%), отличающуюся высокой степенью замещения гидроксильных групп полимера молекулами алкилирующего реагента (АР), непрореагировавшую часть и продукты побочных взаимодействий АР, хлорид натрия (до 3%), образующийся в результате реакции АР с вводимой по технологии щелочью и при нейтрализации избытка последней по окончании процесса, а также дополнительно вносимые в реакционную суспензию соли (чаще всего – сульфат натрия). При этом концентрация SO_4^{2-} в стоках (до 15 г/л) превышает ПДК для водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового пользования более чем в 30 раз. В анаэробных условиях сульфаты количественно восстанавливаются до токсичного сероводорода. Попытки замены сульфата натрия на менее опасные для окружающей среды соединения, например, соли лимонной кислоты, снижает качество и выход конечного продукта.

Рациональное использование воды при производстве КтК должно быть основано на двух основных аспектах: снижении водопотребления каждой отдельно взятой операции и вторичном использовании производственных стоков. Для решения первой задачи могут быть реализованы следующие меры: 1) проведение модифицирования в суспензии с максимально возможным содержанием крахмала (до 42-45%); 2) введение необходимых реагентов в виде концентрированных растворов; 3) минимизация или исключение расхода свежей воды для промывания готового продукта. Помимо снижения водопотребления два первых подхода обеспечивают улучшение показателей технологии КтК: в среднем на 15% снижается расход щелочи и на 25% - длительность процесса.

На большинстве производств химической обработке подвергается крахмал в виде суспензии («молочка») основного потока производства. При организации замкнутого водооборота суспензию необходимо готовить из сухого крахмала с использованием сходов предыдущего цикла модифицирования. При этом увеличение числа циклов неизменно ведет к росту концентраций указанных выше соединений. Проведенные нами эксперименты показывают, что Na_2SO_4 и NaCl препятствуют чрезмерному набуханию гранул крахмала при нагревании в щелочной среде. Однако, в отличие от сульфата, хлорид натрия снижает скорость образования простого эфира крахмала и АР при получении КтК. Поскольку часть NaCl неизменно образуется в реакторе при взаимодействии АР со

щелочью, полностью избежать его накопления невозможно. Но замена соляной кислоты серной при нейтрализации суспензии по окончании процесса значительно снизит количество образующегося хлорида натрия, а также исключит необходимость искусственного внесения Na_2SO_4 . Увеличение концентрации солей в реакционной смеси вплоть до насыщения позволит значительно увеличить температуру (на 20-30°C), а значит и скорость (в 6-8 раз) процесса, а также снизить интенсивность побочных реакций АР с водой. Возврат с оборотными водами непрореагировавшей части АР повысит степень его использования. Уменьшение объема отделяемой при обезвоживании КтК жидкой фазы (обусловлено минимальной остаточной влажностью продукта, равной 40%) в среднем на 0,5 м³ на 1 т товарной продукции может быть компенсировано сходом, образующимся на этапе промывания. Таким образом, сброс сточных вод при производстве КтК полностью исключается. Совокупные преимущества такого подхода компенсируют повышенные расходы, связанные с использованием в качестве сырья сухого крахмала вместо крахмального молочка.

ВЛАДИМИРОВА С.Ф., АКИМОВА Н.А., ЖАРИКОВА Г.Г.

Российский экономический университет им. Г.В. Плеханова, Москва, Россия

ОРГАНОЛЕПТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА МУЧНЫХ ИЗДЕЛИЙ С ПОРОШКОМ БЕЛОГО ГРИБА

В Российском экономическом университете им. Г.В. Плеханова в течение ряда лет велись исследования по изучению жизненного цикла белого гриба. Одним из направлений исследований было получение грибного порошка плодового тела белого гриба и его использование в кулинарных изделиях. На грибной порошок получен патент и проведены первые опыты использования грибного порошка в кулинарных изделиях. Детально изучена безопасность грибных порошков, полученных в лабораторных условиях.

Грибной порошок в технологическом плане более удобен в использовании для приготовления мучных кулинарных изделий.

Разработана рецептура и технология производства полуфабрикатов мучных кулинарных изделий с грибным порошком- кулебяки с гречневой кашей и шанежек с

картофелем. Грибной порошок из высушенных и размолотых белых грибов используются в кулинарной практике недостаточно, поэтому это представляло определенную новизну и практическую значимость с точки зрения расширения ассортимента изделий для массового питания.

Разработана технологическая схема и технологические параметры приготовления полуфабрикатов кулинарных изделий. Полуфабрикаты быстро готовятся, легко формируются.

Была проведена органолептическая оценка качества разработанных изделий. Оценка производилась описательным, балльным и профильным методами.

Описательный метод (Descriptive method) - метод качественной оценки каждого из отдельно рассматриваемых свойств пищевого продукта с использованием перечня их качественных характеристик (дескрипторов), стандартизованных или нестандартизованных.

Метод балльной оценки - балльный метод (Point method) оценки пищевого продукта по нескольким качественным показателям, при котором их оценки, выраженные в баллах, суммируются. Использовали 20-балльные системы оценки. При суммировании оценок использовали коэффициент весомости каждого из качественных показателей.

Профильный метод - метод качественной и количественной оценки совокупности признаков- свойств: аромата, вкуса, текстуры с использованием предварительно выбранных описательных характеристик - дескрипторов. Словесное описание или количественное выражение органолептических признаков, оцениваемых в баллах или графически и расположенных по схеме: характерные оттенки признаков, их интенсивность, порядок проявления оттенков, последствие - называется профилем продукта

Исследования запаха (аромата) мучных кулинарных изделий показали большую устойчивость и насыщенность грибного аромата в образцах кулебяки с гречневой кашей.

Полученные данные свидетельствуют о лучшей органолептической оценке кулебяки с гречневой кашей и грибами по сравнению с шаньгами с картофельным фаршем.

Считаем возможным предложить использование грибного порошка для улучшения аромата кулинарных изделий.

ВЛАСОВА Т.А.

Московский Государственный Университет им. М.В.Ломоносова,

Биологический факультет, Москва, Россия

**ИЗМЕНЕНИЯ РОСТА ИЗОЛИРОВАННЫХ КОРНЕЙ ХЛОПЧАТНИКА
ВСЛЕДСТВИЕ ЗАРАЖЕНИЯ ФИТОПАТОГЕННЫМ ГРИБОМ
*VERTICILLIUM DAHLIAE***

Изолированные корни хлопчатника использовались в качестве модельной системы при изучении взаимодействия хлопчатника с грибом *Verticillium dahliae* Kleb., возбудителем вертициллезного увядания многих видов растений. В опытах корни проростков хлопчатника, выращенных в стерильных условиях, отделяли и переносили в колбы с агаризованной средой Смирнова. Инфицирование корней осуществляли смачиванием суспензией конидий гриба. Контрольные корни смачивали стерильной водой. Заражение изолированных корней *V.dahliae* приводило к значительному замедлению их роста в сравнении со здоровыми, которые росли довольно интенсивно, на 7-й день увеличиваясь в длину до трех раз, а далее и многократно. Отставание зараженных корней в росте от контроля отмечалось в некоторых случаях уже на 3-й или даже на 2-й день после инокуляции, на ранних этапах внедрения *V.dahliae* в корень или даже до внедрения. По мере развития инфекционного процесса различия в росте здоровых и зараженных корней возрастали вследствие уменьшения прироста инфицированных корней. Кроме того, у здоровых корней в большом количестве образовывались боковые корни, через 10 дней их количество достигало 20 и более на некоторых основных корнях. У зараженных корней боковых корешков было заметно меньше, а у некоторых они вообще отсутствовали. Микроскопическое исследование показало, что они закладывались и в этих случаях, но не развивались далее. Следует отметить, что в коре здоровых корней на 6-й – 7-й день после высаживания на среду в большом количестве наблюдались крахмальные зерна, а в зараженных крахмал не обнаруживался. Вероятно, подавление роста зараженных корней происходило вследствие общего снижения интенсивности синтетических процессов. Угнетение роста зараженных корней в преинфекционный период, возможно, объясняется влиянием токсических выделений гриба.

ВОЛКОВ А.Г.¹, КОРОБОВ В.П.²

¹ ПГМА им. ак. Е.А. Вагнера Росздрава, Пермь, Россия

² ИЭГМ УрО РАН, Пермь, Россия

АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЙ КОМПЛЕКС- ПОБОЧНЫЙ ПРОДУКТ ИНТЕРФЕРОНОГЕНЕЗА

Последние годы повышенное внимание исследователей привлечено к синтезируемым клеточными компонентами иммунной системы человека низкомолекулярным пептидным факторам, обладающим широким спектром антибактериального действия. Особый интерес направлен на антибактериальные пептиды лейкоцитов человека, которые синтезируются параллельно индукции α -интерферона. Перспективность этих исследований и развития данного направления биотехнологии очевидны, поскольку использование природных антибактериальных пептидных соединений, обладающих комбинированным, разнонаправленным действием, значительно расширяет арсенал средств для поддержания здоровья человека.

В связи с этим задачей настоящего исследования явилась разработка технологии получения новых антибактериальных пептидных комплексов из лейкоцитарных клеток человека и оценка их биологических свойств.

Разработанная технология получения фракции низкомолекулярных пептидов лейкоцитов человека основана на использовании метода ультрафильтрации на установках «Сартакон-мини». Каскадную фильтрацию препаратов, обладающих антибактериальной активностью, проводили на мембранных полисульфоновых платинах с номинальным отсечением от 300 до 5 кДа. Выделение пептидного комплекса осуществляли диафильтрацией путем промывания непрерывной подачей нового растворителя при постоянном рабочем объеме, с сохранением концентрация надмембранных веществ путем непрерывного разбавления свежим элюирующим раствором. С целью эффективной очистки препаратов пептидного комплекса для диафильтрации использовали апирогенную очищенную воду в объеме, равном пятикратному объему исходного концентрата. Полученный концентрат стерилизовали фильтрацией через поликарбонатную мембрану с размером пор 0,22 мкм. Оценку антибактериальной активности выделенной фракции проводили микрометодом двукратных разведений в 96-луночном планшете. В качестве

тест культуры использовали референтный штамм *Staphylococcus epidermidis* 33 из коллекции ГИСК им. Л.А. Тарасевича. Содержание белка в обессоленных препаратах определяли по методу Лоури.

По разработанной технологии получено 5 экспериментальных серий препаратов, обладающих антибактериальным действием. Показано, что уровень антибактериальной активности в них зависел от исходного сырья – донорской крови, условий проведения синтеза, и, в среднем, составлял 256.0 ± 70.12 УЕ/мл с удельной антибактериальной активностью с 772.92 ± 160.23 УЕ/мг. Полученные при использовании данного метода очистки пептидные фракции обладали значительно более высокой антибактериальной активностью от 2048 УЕ/мг до 4096 УЕ/мг. Оценка мол. массы пептидов в препаратах методом ВЭЖХ показала, наличие в них пептидов с мол. массой от 1.7 до 5.5 кДа. Следует отметить, что выделение антибактериальных факторов предлагаемым способом не предусматривает использования каких-либо стабилизаторов и консервантов. Это снижает риски индивидуальной непереносимости и побочного действия препарата как лечебного средства, а так же не требует дополнительного оборудования и схем получения. Использование разработанного метода является экономически целесообразным и более экологичным.

Пептидная природа комплекса антибактериальных факторов была подтверждена ферментативными исследованиями – антибактериальный эффект сохранялся после обработки ДНКазой и РНКазой, но полностью исчезал после обработки проназой. Исходная активность препарата сохранялась после кипячения в течение 60 мин, а так же автоклавирования. В дополнительных исследованиях было показано проявление антибактериальных свойств выделенного пептидного комплекса в достаточно широком диапазоне рН – от 3 до 8.

Таким образом, разработанный метод выделения обеспечивает получение пептидного препарата, который может быть использован как самостоятельное антибактериальное лечебное средство, так и в комплексе с препаратами интерферона. Это позволяет, с одной стороны, решить проблему отходов, с другой, значительно экономить дорогостоящее сырье с одновременным созданием новых лекарственных препаратов, которые в будущем могут заменить традиционные антибиотики в качестве природных защитных факторов при лечении инфекционных заболеваний.

ВОРОНОВА В.А., ДИТЧЕНКО Т.И.

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

**ВЛИЯНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА
СТЕПЕНЬ АГРЕГИРОВАННОСТИ КЛЕТОК СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ
ЭХИНАЦЕИ ПУРПУРНОЙ**

Суспензионные культуры, являясь одним из типов культивируемых *in vitro* растительных клеток, широко используются в качестве модельных систем для изучения влияния экзогенных факторов на метаболизм и рост клеточных популяций. Они имеют большое значение для генетики и молекулярной биологии: из суспендированных клеток получают протопласты, необходимые для соматической гибридизации, генетической инженерии и т.д. Признаком «хорошей» линии служит высокая скорость размножения в конкретных условиях культивирования, а также способность к быстрой перестройке метаболизма. К цитологическим характеристикам такой линии относятся высокая степень дезагрегации и морфологическая выравненность клеток (небольшие размеры, сферическая или овальная форма, плотная цитоплазма). Соотношение между одиночными клетками и клеточными агрегатами в суспензионной культуре определяется составом питательной среды, способом аэрации и скоростью перемешивания суспензии, размером инокулюма, отношением между биомассой и объемом свежей среды, частотой субкультивирования. В попытке получить суспензионные культуры, проявляющие высокий уровень клеточной диссоциации, чаще всего прибегают к контролю составу питательной среды.

В связи с этим целью настоящей работы явилось изучение характера влияния отдельных компонентов питательной среды (ионов Ca^{2+} и ауксинов) на степень агрегированности суспензионной культуры лекарственного растения эхинацеи пурпурной.

Объектом исследований служила высокоагрегированная суспензионная культура эхинацеи пурпурной, выращиваемая на питательной среде по прописи Мурасиге и Скуга с добавлением фитогормонов: 0,2 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д), 2,0 мг/л β -индолил-3-уксусной кислоты и 0,5 мг/л кинетина. В работе было использовано 3 опытных варианта сред: в первом осуществляли исключение ионов Ca^{2+} , во втором – повышение концентрации 2,4-Д до 0,5 мг/л, в третьем – исключение ионов Ca^{2+} и одновременное повышение содержания 2,4-Д до 0,5 мг/л.

Для определения степени агрегированности отбирали 10 мл клеточной суспензии в конце цикла выращивания (14 сут) и разбавляли 3%-ным раствором сахарозы в 5 раз. Затем с помощью автоматической пипетки помещали 50 мкл разбавленной клеточной суспензии на предметное стекло и рассматривали под микроскопом. Определяли количество одиночных клеток, клеточных групп (2-10 клеток) и клеточных агрегатов (более 10 клеток) в 10-ти полях зрения микроскопа, после чего рассчитывали процентное соотношение указанных выше фракций.

Установлено, что исключение ионов Ca^{2+} из состава питательной среды, а также повышение концентрации 2,4-Д приводило к снижению количества клеточных агрегатов в суспензионной культуре эхинацеи в 1,5-2 раза относительно контроля. Для всех опытных вариантов питательных сред отмечалось возрастание фракции клеточных групп. Процент одиночных клеток в суспензионной культуре эхинацеи пурпурной не претерпевал достоверных изменений при модификации состава питательной среды и составлял около 35%, что существенно ниже слабоагрегированных линий суспензионных культур (50-60%). Культивирование клеточной суспензии эхинацеи на опытных вариантах питательной среды также не сопровождалось существенными изменениями показателей ростовой активности (индекс роста и время удвоения биомассы).

Положительное влияние 2,4-Д на степень агрегированности исследуемой суспензионной культуры, вероятно, связано с тем, что одним из наиболее известных физиологических эффектов ауксинов на клеточном уровне является стимуляция роста растяжением. Клеточные группы и агрегаты, состоящие из более крупных клеток, как правило, гораздо быстрее и легче подвергаются диссоциации при культивировании в постоянно перемешиваемой жидкой питательной среде. Исключения из питательной среды солей Ca^{2+} является одним из способов получения каллусов рыхлого типа. Пектинаты кальция, являясь компонентами растительных клеточных стенок, оказывают значительное влияние на прочность межклеточных контактов. Следовательно, для максимальной диссоциации растительных клеток в суспензионной культуре рекомендуется создать условия, благоприятствующие их растяжению и ослаблению межклеточных контактов.

Таким образом, снижения степени агрегированности клеточной суспензии эхинацеи пурпурной без подавления ее ростовой активности можно добиться за счет достаточно

простой модификации питательной среды (исключение ионов Ca^{2+} и повышение концентрации 2,4-Д).

ВЫСОЦКАЯ О.Н.

Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева, Москва, Россия

КРИБАНК КАК ЭКОНОМНОЕ РЕШЕНИЕ ПРОБЛЕМЫ СОХРАНЕНИЯ БИОРАЗНООБРАЗИЯ РАСТЕНИЙ

Долговременное сохранение в жидком азоте разнообразного растительного материала (семян; пыльцы; зимних почек; апексов, изолированных из культивируемых *in vitro* побегов; суспензионных и каллусных культур клеток растений) существенно сокращает затраты труда и энергии на содержание генетических коллекций растений. В настоящее время метод криосохранения широко используется для хранения ценных коллекций растений в стабильных условиях сверхнизких температур, что снижает до минимума вероятность потерь коллекционных образцов из-за негативных внешних воздействий как природного, так и антропогенного характера. На ограниченном пространстве криобанка можно сосредоточить коллекции разнообразного растительного материала, принадлежащего видам, сортам, разновидностям, клонам и штаммам многих дикорастущих и культивируемых растений. После хранения в жидком азоте образцы растений, устойчивые к криогенному замораживанию, можно восстановить и затем размножить либо семенами, либо вегетативно.

Практически все сорта плодовых, ягодных и декоративных культур, принадлежащих к семейству *Rosaceae*, в том числе и земляники (*Fragaria* L.), обычно, размножают вегетативным способом. Исключением являются сорта диплоидной земляники (*Fragaria vesca* L.), и некоторые сорта крупноплодной земляники, которые размножают семенами. Традиционные полиплоидные сорта земляники садовой (*Fragaria x ananassa* Duch.) для сохранения их ценных сортовых свойств, практически всегда, размножают вегетативным способом:

- с помощью, деления куста или образования на усах дочерних растений;
- размножением *in vitro* через адвентивное побегообразование на жидких или

агаризованных питательных средах,

- размножением *in vitro* через соматический эмбриогенез в каллусной культуре или суспензионной культуре клеток.

Вегетативное потомство одного растения, выбранного селекционером, клонируют и после оздоровления оценивают по многочисленным параметрам, характеризующим его хозяйственную ценность и перспективность для дальнейшего использования в разных зонах земледелия. Для сохранения эталонного образца, выбранного селекционером клона, можно использовать разные способы, в том числе и метод хранения мериклонов растений *in vitro* на искусственных питательных средах. Однако наиболее экономически выгодным и надёжным способом длительного хранения генетических образцов, из всех известных современной науке, всё же, является криосохранение. Доказано, что этот метод позволяет сохранять в жизнеспособном состоянии разнообразные биологические образцы десятилетиями. Криогенное хранение останавливает все обменные процессы в живых тканях, что освобождает персонал генетических коллекций от необходимости периодически обновлять сохраняемые образцы, пересевать, пересаживать и т. п.. Таким образом, помещение образцов растительного материала в жидкий азот значительно снижает затраты на содержание живых коллекций. Криобанк может быть местом хранения эталонных образцов патентованных сортов и их оздоровленных клонов, а также редких сортов с ценными для селекционеров свойствами или же старых проверенных сортов, которые в данный момент активно не используются в производстве. Без сомнения, такие технологии как криосохранение в сочетании с приёмами биотехнологии, необходимы для интенсификации и стимуляции современного растениеводства в России.

В рамках криобанка Института физиологии растений РАН создана экспериментальная криоколлекция земляники, куда вошли 50 мериклонов (мериклон - вегетативное потомство одной меристемы) 49 сортов земляники садовой (*Fragaria x ananassa* Duch.) и 1 сорта земляники лесной (*Fragaria vesca* L.), а также образцы семян 5 сортов земляники лесной (*Fragaria vesca* L.).

Работа по формированию криобанка ИФР РАН в 2012 году поддерживается: программой фундаментальных исследований Президиума РАН «Живая природа» и межгосударственной целевой программой ЕврАзЭС «Инновационные биотехнологии» («Развитие национальных коллекций культур клеток растений для развития методов

современной селекции и сохранения редких генотипов», Госконтракт № 16.М04.12.0003).

Не вызывает никакого сомнения, что криобанки растений, в настоящее время, являются самым экономичным и наиболее высокотехнологичным способом сохранения биоразнообразия дикорастущих и культивируемых растений.

ГАЛЬПЕРИНА Е.И., КРУЧИНИНА О.В., РОЖКОВ В.П.

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук,
Санкт-Петербург, Россия*

ПОЛОВЫЕ ОСОБЕННОСТИ БИОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МОЗГА ПРИ ВЕРБАЛЬНОЙ И СТЕРЕОГНОСТИЧЕСКОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ В ПОДРОСТКОВОМ ПЕРИОДЕ

Характер половых отличий меняется с возрастом, ярко проявляясь в подростковом периоде, когда в организме подростка происходят бурные изменения практически во всех органах и системах, которые не могут не влиять на механизмы когнитивной деятельности. Цель данного исследования – выявление специфики центральной организации различных видов когнитивной деятельности в одном из критических периодов постнатального онтогенеза - подростковом возрасте.

С использованием ЭЭГ исследовали пространственно-временную организацию биопотенциалов мозга в 3 группах детей: 8-9 лет (n=11), 12-13 (n=31) и 15-17 (n=36) лет при выполнении ими вербальных (заучивание русского и заучивание английского стихотворений) и стереогностических тестов (поиск на ощупь заданной объемной фигурки; поиск символов рельефно-точечного шрифта). Оценку пространственно-временной организации биопотенциалов мозга производили с использованием оригинального метода измерения «объемов рассеяния» (Барвинок, Рожков, 1992) векторных отображений ЭЭГ-процессов в факторном пространстве. Метод позволяет количественно оценить степень согласованности электрических процессов биопотенциального поля мозга в целом, а также в пределах отдельных регионов коры.

Половые различия пространственной организации ЭЭГ выявились во всех возрастных группах. Так у девочек при выполнении всех заданий наблюдается постепенное нарастание пространственной организованности биопотенциального поля мозга, а у мальчиков - более резкое возрастание пространственной упорядоченности биопотенциалов в возрастном периоде между 13 и 15 годами. Половые различия при когнитивной деятельности наиболее ярко проявлялись в самой младшей из исследованных групп детей 8-10 лет. Достоверные межполушарные отличия пространственной организации ЭЭГ процессов выявлялись при вербальной деятельности у мальчиков и при стереогностической – у девочек. Возможно, это свидетельствует о большей межполушарной асимметрии при стереогностической деятельности у девочек и вербально-мнестической - у мальчиков.

Участие обоих полушарий мозга в различных видах когнитивной деятельности, показанное нами ранее для взрослых, характеризуется довольно поздним становлением в онтогенезе, по-разному протекающим у мальчиков и у девочек, при этом девочки достигают дефинитивного возраста, характерного для взрослых, примерно на 2 года раньше. Темпы созревания пространственно-временной организации биопотенциалов мозга, сопровождающих вербальную деятельность, у девочек выше, чем для стереогностической деятельности. У мальчиков темпы созревания пространственно-временной организации биопотенциалов мозга почти одинаковы для исследованных видов когнитивной деятельности, с небольшим опережением для стереогноза.

ГАРАСЬКО Е.В.¹, ВАШУРИН А.С.², ПУХОВСКАЯ С.Г.²

¹*Ивановская государственная медицинская академия, Иваново, Россия*

²*Ивановский государственный химико-технологический университет, Иваново, Россия*

ИССЛЕДОВАНИЕ БАКТЕРИЦИДНЫХ СВОЙСТВ КОМПЛЕКСА ВОДОРАСТВОРИМОГО ПОРФИРИНА С АЦЕТАТОМ СЕРЕБРА

Исследование направлено на изучение антимикробных свойств линейных и макрогетероциклических олигопиррольных соединений, а также гибридных материалов различной структуры. Работа выполнена по договору о научном сотрудничестве в области

проведения совместных исследований кафедрой микробиологии и вирусологии ИвГМА и кафедрой неорганической химии ИГХТУ. За последние годы интенсивно развивается синтетическая химия водорастворимых порфиринов. Амфифильные порфирины нашли широкое применение в аналитической химии, как уникальные реагенты для определения катионов металлов. Их используют в качестве модельных соединений в биохимических исследованиях. Имеются работы, посвященные медицинским аспектам использования координационных соединений водорастворимых порфиринов. В связи с этим актуальным направлением является исследование особенностей образования координационных соединений амфифильных порфиринов в водных растворах с солями переходных металлов.

В настоящей работе изучена кинетика образования комплекса серебра с водорастворимым порфирином катионного типа - тетратозилатом 5,10,15,20 – тетраакс(4-метилпиридил)порфина (H_2TPyP). Исследования проводились спектрофотометрическим методом при постоянном значении pH, близком к физиологическому и постоянной ионной силе раствора. Для исследованной системы спектральные изменения при комплексообразовании с ацетатом серебра протекают с сохранением чётких изобестических точек. При этом характерный для свободных порфиринов четырёхполосный (в видимой части) спектр превращается в двухполосный, обычный для металлопорфиринов. Установлено, что реакция имеет первый кинетический порядок, как по порфирину, так и по соли. Полученные кинетические данные могут быть использованы при аналитическом определении катионов $Ag(II)$ в водных растворах, например в плазмохимических процессах, реализующихся при действии газоразрядной плазмы на воду и растворы электролитов.

Для определения бактерицидных свойств полученный $AgTPyP$ наносили из водного раствора на диски из фильтровальной бумаги. Исследуемые образцы размером 10 x 10 мм раскладывали в чашки Петри с тест-культурами *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и грибами *Candida albicans*. Полученный металлокомплекс проявил выраженную бактерицидную активность в отношении тест-культуры *Staphylococcus aureus* на плотной питательной среде (зона задержки роста 25 мм); в отношении *Escherichia coli* активность менее выражена (зона задержки роста 15 мм). Результаты испытаний образцов в жидких питательных средах подтвердили результат, полученный на плотных питательных средах.

В отношении тест-культур *Candida albicans* выявлено полное отсутствие роста при высеве из жидкой питательной среды.

ГАРАСЬКО Е.В.¹, РУМЯНЦЕВ Е.В.², ТИМИН А.С.², УСОЛЬЦЕВ С.Д.²

¹Ивановская государственная медицинская академия, Иваново, Россия

²Ивановский государственный химико-технологический университет, Иваново, Россия

БИОЦИДНОЕ ДЕЙСТВИЕ ГИБРИДНЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ МЕЗОПОРИСТОГО ДИОКСИДА КРЕМНИЯ И НАНОРАЗМЕРНОГО СЕРЕБРА

В работе приводятся результаты исследований биоцидного действия гибридных материалов на основе мезопористого диоксида кремния и наночастиц серебра. Испытания проводились в бактериологической лаборатории кафедры микробиологии и вирусологии ИвГМА. Матричный композит получен с использованием экспериментально-лабораторного оборудования кафедры неорганической химии ИГХТУ. С применением золь-гель метода был получен матричный композит на основе оксида кремния и наночастиц серебра. В ходе эксперимента разработано несколько методик синтеза данного композиционного материала, основанного на гидролизе тетраэтоксисилана (ТЕОС) и восстановлении $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+$ до наночастиц серебра. Гибридные материалы охарактеризованы различными физико-химическими методами: электронной просвечивающей микроскопией (ЭПМ), лазерной дифракцией, атомно-силовой микроскопией (АСМ), порошковой дифрактометрией. В результате получены размерные и морфологические характеристики синтезированных материалов.

Данные материалы исследованы на антимикробную активность. Антимикробное действие изучали путем испытания синтезированных образцов *in vitro*:

– на грамположительных прокариотах рода *Staphylococcus* (в качестве тест-микроба использовали типовой вид рода *Staphylococcus* – *S. aureus* – ассоциированный с кожными покровами и слизистыми оболочками);

– на грамотрицательных прокариотах рода *Escherichia* (в качестве тест-микроба использовали типовой вид рода *Escherichia* – *E. Coli* – ассоциированный со слизистыми оболочками ЖКТ);

– на эукариотах – грибах рода *Candida* (в качестве тест-микроба использовали типовой вид рода *Candida* – *C. albicans*).

В результате испытаний установлено, что полученные гибридные материалы проявили высокую биоактивность с подавлением роста всех тест-культур. На плотных питательных средах диаметр зоны задержки роста тест-культуры стафилококка составил более 25 мм. В жидкой питательной среде отмечалось полное подавление роста всех тест-культур, что подтвердили результаты отсутствия роста при высеве из пробирок с жидкой питательной средой. Дальнейшее изучение действия текстильных тканей с включением данного нанокпозиционного материала на микроорганизмы так же выявило их высокую биоактивность.

Таким образом, экспериментальные исследования подтверждают антимикробное действие на условно-патогенные микроорганизмы, как самих гибридных материалов, так и тканей с включением такого гибридного материала. Прочное закрепление наночастиц серебра в матрице оксида кремния снижает токсичность наночастиц серебра с сохранением антимикробной активности данных материалов.

Результаты настоящей работы свидетельствуют о возможности применения полученных материалов в области медицинских нанобиотехнологий.

ГАРАСЬКО Е.В.¹, ЧУЛОВСКАЯ С.А.², КУЗЬМИН С.М.²,
СЕМЕНОВ Я.С.³, ПАРФЕНЮК В.И.²

¹*Ивановская государственная медицинская академия, Иваново, Россия*

²*Институт химии растворов РАН, Иваново, Россия*

³*Якутский государственный инженерно-технический институт, Якутск, Россия*

ФУНГИЦИДНЫЕ СВОЙСТВА КАРТОНА, СОДЕРЖАЩЕГО ДОБАВКИ ПРИРОДНОГО ЦЕОЛИТА

Природные цеолиты – ценнейшие минералы, содержащие богатый набор жизненно важных макро- и микроэлементов и обладающие уникальными сорбционными и ионообменными свойствами. К преимуществам использования природных цеолитов

относятся их распространенность, дешевизна, доступность, возможность неоднократного применения. Однако область практического применения цеолитов зависит от оценки качества таких физико-химических свойств цеолитового сырья как плотность, объемная масса, пористость, влагосодержание, сорбционная емкость, термическая стабильность, устойчивость по отношению к агрессивным веществам, а также содержание токсичных элементов.

В настоящей работе использовали высококремниевые цеолитовые породы месторождения Хонгуруу (Якутия), которые имеют широкое применение, в том числе для производства бумаги и картона для упаковки. Они с высокой экономической эффективностью могут быть использованы для очистки и осушки природного газа, для очистки питьевых и технических вод, для повышения продуктивности животноводства, для повышения урожайности, а также для изготовления картонной тары для хранения сельхозпродукции и продуктов питания. В связи с необходимостью повышения срока хранения пищевых продуктов при их неизменном качестве, требования к свойствам упаковки с каждым годом возрастают. Упаковочная тара должна защитить продукты от воздействия таких факторов, как влага, кислород воздуха, свет, различные микроорганизмы - бактерии и грибы и т.п. Поэтому возникает необходимость изготавливать упаковочные материалы из экологически безопасного, доступного и дешевого сырья. Широко применяемая практика введения консервантов различной природы в пищевые продукты, позволяющих продлевать их срок хранения за счет влияния на их химический состав, не всегда оправдана, поскольку использование этих веществ может быть опасным для здоровья человека. Одним из путей повышения потребительских свойств картона является введение в его состав минерального наполнителя и получение композиционного материала, отличающегося новыми, в том числе и антибактериальными свойствами.

Целью данной работы является исследование фунгицидной активности картона, имеющего в своем составе цеолит. Оценка фунгицидной активности КМ проводилась с использованием в качестве тест-микроба грибов рода *Candida* – типовой вид *C. albicans* в двух вариантах: на плотных и жидких питательных средах. Для подтверждения наличия фунгицидных свойств у исследуемых образцов в жидкой питательной среде определяли коэффициент пропускания и оптической плотности раствора на колориметре фотоэлектрическом концентрационном КФК-2. Показано, что картон, содержащий цеолит

в количестве 15 масс %, обладают фунгицидными свойствами по отношению к грибам рода *Candida*.

Проведенные исследования позволяют рассматривать цеолиты в качестве перспективного наполнителя для производства упаковочных материалов, служащих для хранения сельхозпродукции. Благодаря созданию благоприятной микроатмосферы внутри упаковки из картона, продукты не поражаются возбудителями грибковых заболеваний. Срок хранения пищевых продуктов, особенно скоропортящихся, значительно возрастает.

ГАРМАШ С.А., ГУДКОВ С.В.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пуцзино, Россия

Пуцзинский естественно-научный институт, Пуцзино, Россия

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ УРАНИЛА В КОНЦЕНТРАЦИЯХ, СОДЕРЖАЩИХСЯ В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ И МЕХАНИЗМ ИХ ДЕЙСТВИЯ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ

Концентрация урана в природных водоемах варьирует в широких пределах от 0,01 мкг/л до 12,4 мг/л в Западной Сибири, Казахстане, и других районах богатых залежами изотопов урана. В настоящее время обедненный уран (ОУ) широко используется как в мирных целях - в качестве балласта в судах, самолетах, для придания цвета стеклу и керамике, так и во время военных действий. В связи с войной на Балканах и в Персидском заливе, где применялись снаряды с урановыми сердечниками, опубликовано немало работ, связывающих действие уранила с заболеваниями неясной этиологии. Также опубликовано немало работ о том, что ОУ может являться причиной повреждения ДНК, мутагенеза, канцерогенеза. Несмотря на это, молекулярный механизм токсического действия ионов уранила на организм изучен не достаточно.

Цель данной работы заключалась в исследовании прооксидантных, генотоксических и цитотоксических свойств низких концентраций ионов уранила, присутствующих в окружающей среде, и их способности сенсibilизировать естественные факторы окружающей среды – тепло, видимый свет или ионизирующую радиацию.

В качестве модельной системы во всех экспериментах использовали раствор соли урана - уранилнитрат, в качестве отрицательного контроля для уранилнитрата использовали раствор нитрата натрия.

Впервые показано влияние ионов уранила на образование активных форм кислорода (АФК) в водных растворах *in vitro*. Установлено, что генерация перекиси водорода и гидроксильных радикалов, в растворах, содержащих ионы уранила происходит более интенсивно при повышении температуры и воздействии на растворы электромагнитных волн видимой части спектра. Концентрацию такой долгоживущей АФК, как перекись водорода измеряли с помощью метода усиленной хемилюминисценции в системе люминол-параоксифенол-пероксидаза с использованием сцинтиляционного счетчика «Бета-1» в режиме счета одиночных фотонов. Измерение концентрации гидроксильных радикалов производили с помощью флуоресцентного зонда - кумарин-3-карбоновой кислоты. Показано, что процесс образования перекиси водорода при совместном действии ионов уранила и тепла (40С, 200 мин), света (83.3 Вт/м², 2 ч), рентгеновского излучения (1 Гр) в существенной мере зависит от концентрации ионов уранила (5-100 мкМ) в растворе. Образование гидроксильных радикалов сильно зависит от концентрации ионов уранила (5-500 мкМ) в растворе при действии тепла и света.

Исследовано влияние широкого диапазона концентраций уранил нитрата – 0,01; 0,1; 0,2; 0,5; 1 мкМ на выживаемость клеток НEr2 – карциномы гортани человека. Результаты получены с помощью флуоресцентной микроскопии и оценены путем подсчета процентного содержания клеток, находившихся в состоянии нормы, апоптоза или некроза. Показано, что концентрация уранил нитрата 1 мМ приводит к гибели около 95% клеток. Минимальный цитотоксический эффект зафиксирован при концентрации уранил нитрата 10 мкМ.

Известно, что 8-оксогуанин является ключевым биомаркером окислительного повреждения ДНК. При помощи метода иммуноферментного анализа с использованием моноклональных антител к 8-оксогуанину было количественно определено его образование в ДНК под действием различных концентраций уранилнитрата. В результате, установлена концентрационная зависимость образования 8-оксогуанина в ДНК при концентрациях уранилнитрата 5-500 мкМ под действием ионов уранила, тепла и видимого света.

Методом микроядерного теста, показано, что ионы уранила вызывают повреждения ДНК *in vivo* с образованием микроядер в полихроматофильных эритроцитах костного мозга мышей при внутрибрюшинном введении раствора уранилнитрата. Показано, что при введении уранилнитрата в концентрации 0,1мМ количество МЯ в ПХЭ увеличивается в 1,7 раза по сравнению с необлученным контролем, при дальнейшем увеличении концентрации уранилнитрата наблюдалась тенденция линейного увеличения количества МЯ в ПХЭ.

Исследована выживаемость самцов белых мышей Kv:SHK при внутрибрюшинном введении им ионов уранила. Результаты показали, что при введении раствора уранилнитрата выживаемость животных резко снижается, по сравнению с контролем. Была вычислена полуметальная доза для всех вводимых веществ. Из полученных данных высчитали ФИД (Фактор Изменения Дозы) для уранилнитрата он составил 0,88, для ионов уранила 0,90.

Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований 10-04-01265-а.

ГИЛЬМАНОВА Р.И., ПЕТРОВА Н.В., КАРИМОВА Ф.Г.

Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, Казань, Россия

ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ ЛИСТЬЕВ ГОРОХА ПО ТИРОЗИНУ В МЕХАНИЗМАХ АБК-ИНДУЦИРОВАННОГО СИГНАЛИНГА ПРИ СТРЕССЕ

Абиотические стрессы ограничивают продуктивность основных культур сельскохозяйственных растений повсеместно, снижая среднюю урожайность на более чем 50% ежегодно. Низкая температура, наряду с засухой, засолением, является одним из основных абиотических стрессоров, для приспособления к которым растения задействуют почти все физиологические и метаболические процессы. Растения отвечают и приспосабливаются к холодному стрессу на молекулярном и клеточном уровнях, а также вызывают ряд биохимических и физиологических изменений, которые помогают растениям выжить. В клетках различных видов растений при действии холодного стресса увеличивается экспрессия многих генов. Продукты этих генов участвуют не только в процессах адаптации, таких как биосинтез продуктов, необходимых для регуляции

осмотического давления в клетке, генерация антиоксидантов и повышение текучести мембран, обуславливая тем самым формирование устойчивости растения к стрессору, но и в регуляции экспрессии генов и передачи сигналов в ответ на стрессовые факторы, например, транскрипционных факторов и белков, вовлеченных в процессинг РНК и ее транспорт в ядро. Расшифровка механизмов, при помощи которых растения распознают и передают сигнал внутрь клетки в условиях стресса для активации адаптивных ответов, является важным моментом для создания эффективной программы формирования устойчивости растений к пониженным температурам.

Абсцизовая кислота (АБК) – один из основных гормонов, имеющих важное значение в течение всего жизненного цикла растений, включая регуляцию их роста и развития, стимуляцию апикального доминирования, регуляцию старения, опадания листьев и плодов, обеспечение состояния покоя семян и почек, а так же формирование ответов растений на стрессовые факторы окружающей среды (низкие температуры, засуха, засоление и патогены). В каскаде передачи сигнала от АБК задействуются мембранный G-белок-рецепторный комплекс, фосфорилирование и активация цАДФР-циклазы, сверхпродукция универсального белка-транспортировщика $[Ca^{2+}]_i$. Однако большая часть этапов восприятия и передачи сигнала от АБК остается неизученной. Фосфорилирование/дефосфорилирование является одним из ключевых посттрансляционных модификаций белков. Оно осуществляется в основном по остаткам серина, треонина и тирозина. Известно, что белки, регуляция активности которых осуществляется посредством фосфорилирования по тирозину, критичны в процессах пролиферации и дифференциации клеток, онкогенезе. Фосфорилированные по тирозину белки принимают участие в регуляции клеточного цикла, сборки надмолекулярных комплексов и т.д.

Нами было показано, что уровень фосфорилирования белков(УТФ) по тирозину в клетках листьев растений гороха значительно возрастает в стрессовых условиях (поранение, гипотермия, засоление). Фосфорилирование белков по тирозину изучено нами в динамике: в контрольных растениях при поранении максимум фосфорилирования белков по тирозину наблюдался за 20 минут. Добавление в среду инкубации 1мкМ АБК ускорило достижение максимума УТФ белков (максимум УТФ наблюдался через 10 минут). Очевидно, АБК, запуская адаптационные механизмы, способствует более

быстрому приспособлению растений к стрессовым условиям. Также нами было показано, что АБК, вероятно, принимает участие в адаптации растений к низким температурам (4°C). В результате проведенных нами исследований было обнаружено, что характер изменения уровня фосфорилирования по тирозину белков листьев растений гороха, подвергавшихся действию гипотремии был схож с УТФ белков при действии АБК в оптимальных условиях. В то же время совместное действие гипотремии и АБК вызывало понижение уровня фосфорилирования некоторых белков. Идентификация белков, фосфорилирование по тирозину которых значительно изменялось, выявила, что эти белки, в основном, являются компонентами фотосинтетического цикла Кальвина-Бенсона.

Наши исследования представляют интерес еще и в связи с тем, что в последние годы появились данные о присутствии и функционировании АБК не только в клетках растений, грибов, водорослей и цианобактерий, клетках ряда низших животных (губок), но и в клетках высших животных, включая различные ткани и клетки человека. АБК может продуцироваться и высвобождаться из многих клеток животных (иммунные клетки, клетки сердечно-сосудистой системы, печени, стволовые клетки) как в физиологических условиях, так и при патологии. Было показано, что АБК - универсальная сигнальная молекула, которая может иметь применение в медицине при лечении некоторых заболеваний человека.

ГЛАДКОВ Е.А.

Институт Физиологии Растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия

Московский Государственный Технический Университет им.Н.Баумана, Москва, Россия

Московский Государственный Университет Инженерной Экологии, Москва, Россия

ПОЛУЧЕНИЕ ГАЗОННЫХ ТРАВ, ТОЛЕРАНТНЫХ К КОМПЛЕКСНОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ ТОКСИКАНТОВ

Для городских растений существенную опасность представляет комплексное влияние неблагоприятных антропогенных факторов. Основные загрязнители почвенного покрова Москвы среди тяжелых металлов - цинк, свинец, медь, а также кадмий. Основными источниками тяжелых металлов в условиях города являются: транспортно-

дорожный комплекс, промышленные предприятия, не утилизируемые промышленные и коммунально-бытовые отходы. Содержание тяжелых металлов в почвах города варьирует в широких пределах. Характерное действие комплекса загрязняющих веществ на городские газоны «краевой эффект» - состоящий в образовании не покрытых растительностью участков придорожных газонов вдоль проезжей части. Из-за постоянного действия тяжелых металлов у городских растений существенно снижаются декоративные качества, многие растения погибают. Исходя из результатов, полученных в водных растворах токсикантов, было показано, что фитотоксическое действие хлорида натрия и меди (в концентрациях, характерных для города) усиливается при взаимодействии со всеми исследуемыми токсикантами (кадмий,цинк,свинец), а при взаимодействии цинка с кадмием и свинцом усиление токсического действия не происходит.

Цель работы - получения газонных трав, устойчивых к комплексному воздействию.

Технологии клеточной селекции хорошо зарекомендовали себя при получении растений, толерантных к различным экологическим стрессовым факторам: засухе, засолению, низким и высоким температурам и др. Однако, клеточная селекция не использовалась ранее для получения растений, толерантных к комплексному воздействию тяжелых металлов. Для получения растений газонной травы полевицы побегоносной , устойчивых к комплексному воздействию -кадмия, цинка и свинца была использована ступенчатая схема селекции, из-за чрезвычайно высокой фитотоксичности поллютантов. Была выбрана следующая схема селекции - культивирование каллуса проводили в течение 2 пассажей при концентрации кадмия 7 мг/ л, цинка 200 мг/л, свинца 330 мг/л, с увеличением концентраций тяжелых металлов - кадмия 10 мг/ л, цинка 200 мг/л , свинца 650 мг/л на стадии получения и укоренения растений . Всего в селективных условиях было получено 58 регенерантов полевицы побегоносной. Большинство регенерантов имели нормальную морфологию и хороший рост, у части регенерантов листья имели значительно более темную окраску и большую толщину, низкорослость наблюдалась у 4 регенерантов. Данная схема селекции была использована при получении газонной травы овсяницы красной, устойчивой к высоким концентрациям кадмия, цинка и свинца. Растения-регенеранты и исходные растения для оценки толерантности к комплексному воздействию выращивали в грунте, подстригали до высоты 10 см, затем вносили в почву

в расчете на сухой вес соли тяжёлых металлов путем полива до содержания в почве заданной концентрации. Комплексное воздействие тяжелых металлов оказалось особенно токсичным. В первые дни после внесения, реакция растений была различной, у регенерантов наблюдался прирост при высоких концентрациях тяжелых металлов, у исходных растений прироста не было. К концу второго месяца (на 56 день) растения полученные методом клеточной селекции при концентрации в почве (Cd 30 мг/кг, Zn 150 мг/кг, Pb 630 мг/кг) демонстрировали прирост на уровне растений, растущих без токсикантов, в отличие от исходных, у которых наблюдалось существенное ингибирование роста. Декоративные качества большинства селекционных растений не отличались от исходных образцов, лишь у одного регенеранта наблюдались обильные пожелтения листьев. Газонная трава имела сочный ярко-зелёный цвет, кустистость была на уровне контроля. Таким образом, впервые с помощью клеточной селекции были получены растения, толерантные к комплексному воздействию. Большинство исследуемых растений–регенерантов, обладало повышенной толерантностью к комплексному воздействию. В дальнейших исследованиях показано сохранение устойчивости в следующих поколениях.

ГЛАДКОВ Е.А., ДОЛГИХ Ю.И.

Институт Физиологии Растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия

Московский Государственный Технический Университет им.Н.Баумана , Москва, Россия

Московский Государственный Университет Инженерной Экологии, Москва, Россия

**КЛЕТОЧНАЯ СЕЛЕКЦИЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ГАЗОННЫХ ТРАВ,
ТОЛЕРАНТНЫХ К НЕБЛАГОПРИЯТНЫМ ЭКОЛОГИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ
ГОРОДОВ (НА ПРИМЕРЕ МЕДИ И ЦИНКА)**

Город представляет собой экосистему, характерной особенностью которой является загрязнение окружающей среды. Городские растения важнейший элемент экосистемы мегаполисов. Растения оздоравливают окружающую среду, снижая концентрацию загрязняющих веществ, смягчая летнюю жару и сухость, ионизируют воздух, уменьшают шум и поглощают пыль. Однако, городские условия крайне

неблагоприятны для произрастания растений. Наибольшую опасность представляют тяжелые металлы. На территории города Москвы выделяются участки с сверхвысоким уровнем загрязнения почв металлами, так и с отсутствием высокого уровня загрязнения. Например, концентрация меди в Москве на особо загрязненных территориях может достигать 528 мг/ кг, т.е. 4 значений ОДК и почти 10 ПДК! Крайне высокое содержание тяжелых металлов фиксируется даже в почвах некоторых скверов и парков. Наиболее распространенные металлы – цинк и медь.

Один из способов решения проблемы озеленения города, даже в неблагоприятных экологических условиях, является получение растений, устойчивых к загрязнениям почвы. Технологии клеточной селекции хорошо зарекомендовали себя при получении сельскохозяйственных растений. Однако, клеточная селекция не использовалась для решения экологических проблем городов. Требования к городским растениям отличаются от сельскохозяйственных, в первую очередь это сохранение жизнеспособности и декоративных качеств в условиях высокого техногенного загрязнения.

Целью данной работы являлась разработка биотехнологий создания растений толерантных к неблагоприятным факторам мегаполисов (солям тяжелых металлов), на примере газонной травы – полевицы побегоносной.

На основании исследования действия меди на каллусные ткани полевицы, доза 150 мг/л была выбрана в качестве селективной для отбора устойчивых клеток и растений. Концентрация цинка 300 мг/л была выбрана для дальнейшей селекции в культуре клеток.

Для получения растений, устойчивых к тяжелым металлам была использована прямая схема селекции, включающая в себя культивирование каллуса в течение 2 пассажей на модифицированной среде Мурасиге-Скуга с токсикантом, регенерацию на среде Мурасиге-Скуга с токсикантом и укоренение растений на среде Мурасиге-Скуга с токсикантом. Таким образом, селективный фактор присутствовал в среде на всех этапах отбора, включая укоренение регенерантов, для того чтобы повысить вероятность получения устойчивых растений.

Для получения растений, устойчивых к меди была использована схема селекции, включающая в себя культивирование каллуса в течение 2 пассажей на модифицированной среде Мурасиге-Скуга с 150 мг/ л меди , регенерацию на среде Мурасиге-Скуга с 150 мг/ л меди и укоренение растений на среде Мурасиге-Скуга с 150

мг/ л меди. Продолжительность селекции составляла 4 месяца. Для отбора толерантных к цинку растений была использована такая же схема селекции, как и в случае с медью.

Большинство растений–регенерантов, полученных из устойчивых к меди и цинку клеточных линий, обладало повышенной толерантностью к этим металлам, у растений полевицы показано наследование устойчивости к меди в следующих поколениях. Таким образом, современные методы клеточной селекции можно использовать для получения растений, устойчивых к неблагоприятным экологическим факторам мегаполисов.

ГОМБОЕВА С.В.

*Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления,
Улан-Удэ, Россия*

ИЗМЕНЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

В почве протекают различные физические, химические и биологические процессы, которые в результате загрязнения нарушаются. Основными загрязняющими веществами являются металлы и их соединения, удобрения и пестициды, радиоактивные отходы. По пищевым цепям эти загрязнения попадают в организм человека, оказывая токсическое, канцерогенное, мутагенное действие, подавляя иммунитет.

Тяжелые металлы (ТМ) способны к биоаккумуляции и концентрированию при движении по трофической цепи. Их трудно разрушить или преобразовать в ходе химических процессов. Удаление ТМ из организма затруднено, поскольку они прочно связываются с белками и другими компонентами клеточных структур.

Особенно важными для решения экологических проблем и охраны окружающей среды являются микробиологические подходы и приемы, которые основаны на использовании потенциала растений и почвенных микроорганизмов, в том числе силикатных и фосфатмобилизирующих бактерий.

Уровень накопления металлов микроорганизмами возрастает с повышением их содержания в окружающей среде. Металлы накапливаются в клетках микроорганизмов до насыщающей концентрации, после чего при дальнейшем повышении их содержания в

среде поглощение металлов клетками не увеличивается. А ккумуляция элементов может длиться от нескольких секунд до нескольких часов. Металлы сорбируются и живыми, и мертвыми клетками, при этом мертвая биомасса, как правило, обладает большей сорбционной способностью. ТМ могут концентрироваться как внутри клеток, так и на их поверхности.

Токсичность ТМ проявляется по-разному. Многие металлы при токсичных уровнях концентраций ингибируют деятельность ферментов (медь, ртуть). Некоторые тяжелые металлы образуют комплексы с обычными метаболитами, нарушая нормальный обмен веществ (железо). Такие металлы, как кадмий, медь, железо (II), взаимодействуют с клеточными мембранами, изменяя их проницаемость и другие свойства (например, разрыв клеточных мембран). ТМ подавляют биохимическую активность почвенных микроорганизмов, вызывают изменения их общей численности. Загрязнение тяжелыми металлами проявляется в изменении видового состава комплекса почвенных микроорганизмов.

Микробиологический анализ показал, что под действием ТМ силикатные и фосфатмобилизующие бактерии способны к изменению морфологических характеристик. Приспосабливаясь, к неблагоприятным условиям силикатные бактерии приобрели форму вытянутых палочек и образовали капсулы, а клетки фосфатмобилизующих бактерий стали образовывать более длинные цепочки. Наиболее чувствительными к воздействию ТМ оказались силикатные бактерии, фосфатмобилизующие бактерии более устойчивы. Было установлено, что в симбиотическом отношении культуры более устойчивы к действию ТМ. Механизм биотрансформации тяжелых металлов происходит за счет захвата минеральных частиц слизистой капсулой силикатных бактерий. В ней, начиная со смачивания минерала слизью капсулы, протекает процесс его окисления, т.к. слизистое вещество обладает высокой ферментативной активностью.

ГОНГАЕВА А.Г., ЖАМСАРАНОВА С.Д.

Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления,

Улан-Удэ, Россия

БИОРЕГУЛЯТОРНЫЕ ПЕПТИДЫ ТКАНИ СЕЛЕЗЕНКИ ЯКОВ БУРЯТСКОГО ЭКОТИПА И ОЦЕНКА ИХ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ

Иммунная система занимает первое место по числу известных медиаторов. Значительная дифференциация функций иммунокомпетентных клеток, большое число их субпопуляций и возможных способов взаимодействия требуют высокоразвитых и селективных механизмов передачи информации, обеспечивающих слаженную работу системы в целом. Основную часть медиаторов иммунной системы составляют вещества пептидной природы.

В настоящее время все большую значимость приобретают исследования, направленные на поиск средств избирательного воздействия на отдельные этапы развития иммунного ответа и на отдельные популяции клеток иммунной системы. Наиболее перспективный подход к решению данной проблемы – создание иммуномодуляторов на основе эндогенных регуляторных пептидов. Важную роль в качестве продуцентов последних играют центральные и периферические органы иммунной системы убойных животных.

Известно, что нервная и эндокринная системы модулируют функции иммунной системы с помощью нейротрансмиттеров, нейропептидов и гормонов, а иммунная система взаимодействует с нейроэндокринной системой с помощью цитокинов, иммунопептидов и других иммуотрансмиттеров. В настоящее время установлена роль эндогенных пептидов в формировании компенсаторно-приспособительных реакций организма в ответ на стресс и нарушения гомеостаза. Система пептидов рассматривается в качестве универсальной при нейроиммуноэндокринных взаимодействиях.

Учитывая данный факт, нами было исследовано действие биорегуляторных пептидов на нейротропную активность экспериментальных животных на фоне иммунодефицитного состояния, вызванного цитостатиком азатиоприном. Установлено, что изучаемые биорегуляторы усиливали суммарную двигательную активность и ориентировочно-исследовательское поведение экспериментальных животных в тесте

«открытое поле», что свидетельствовало об усилении общей адаптационной реакции организма.

Особенности адаптационных перестроек при воздействии факторов, вызывающих стрессовое состояние, заключается в том, что они формируются на фоне изменений нейрогуморальной регуляции и снижения синтеза тканеспецифических белков; в конечном счете это приводит к снижению резервных возможностей организма, кумуляции продуктов катаболизма, прогрессированию деструктивных процессов и развитию заболеваний.

Исследования, связанные с изучением адаптогенной активности, показали, что введение биорегуляторных пептидов в организм животных на фоне иммуносупрессии, сопровождалось выраженной иммуномодулирующей эффективностью и повышением физической выносливости животных. Полученные данные указывали на то, что биорегуляторные пептиды селезенки яков с высокой тимической ростстимулирующей активностью достоверно восстанавливали показатели иммунной системы лабораторных животных и на этом фоне выявлено выраженное адаптогенное действие, о чем свидетельствует повышение общей, антиортостатической и силовой физической выносливости животных, характеризующихся различными механизмами энергообеспечения тканей.

Таким образом, проведенные исследования показали биологическую эффективность биорегуляторных пептидов, выделенных из органов иммунной системы номадных животных, проявляющуюся в коррекции иммунологических, компенсаторно-приспособительных процессов в организме и подтверждают роль пептидов в регуляции гомеостаза.

ГОНЧАРОВА Н.В., ЕГОРОВА З.Е.

Белорусский государственный технологический университет, Минск, Беларусь

**ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ И АНТАГОНИСТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
ТИПИЧНЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СПОРООБРАЗУЮЩЕЙ АЭРОБНОЙ
МИКРОБИОТЫ РАСТИТЕЛЬНОЙ ПРОДУКЦИИ**

Спорообразующие аэробные бактерии рода *Bacillus* и близкородственные им являются типичными представителями микробиоты растительного сырья и пищевых

продуктов из него, в том числе консервированных. Широкий спектр биологической активности микроорганизмов указанной группы обусловил их применение в создании пробиотических препаратов.

Учитывая сказанное, целью работы являлся скрининг штаммов, обладающих высокой ферментативной и антагонистической активностью, среди спорообразующей аэробной микробиоты растительных пищевых продуктов и сырья.

Объектами исследований являлись чистые культуры микроорганизмов рода *Bacillus* (171 штамм), выделенные из плодоовощных консервов, полуфабрикатов и растительного сырья.

При исследовании ферментативной активности микроорганизмов изучалась их способность сбраживать сахара - лактозу, мальтозу, сахарозу, глюкозу (посредством анализа роста на средах Гисса), продуцировать амилазы (на питательном агаре с 1 % крахмала), разжижать желатин и утилизировать казеин (на молочном агаре). Токсигенный потенциал микроорганизмов оценивали по результатам тестов на наличие лецитиназной, гемолитической и коагулазной активности.

Исследование антагонистической активности микроорганизмов по отношению к тест-штаммам *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* проводили методом перпендикулярных штрихов.

При изучении устойчивости микроорганизмов к соляной кислоте споры, выдержанные в течение 6 часов при температуре 37 °С в среде с добавлением соляной кислоты (0,3 %, 0,5 %, 0,6 %), высевали на питательный агар и термостатировали при оптимальной температуре развития микроорганизмов в течение 24 – 48 часов. Аналогично определяли устойчивость микроорганизмов к желчи (10 %, 20 %, 30 %, 40 %) и фенолу (0,1 %, 0,2 %, 0,4 %, 0,6 %).

Результаты исследований показали, что большинство исследованных штаммов сбраживали сахарозу (более 80 %), глюкозу (около 90 %), мальтозу (около 80 %), лактозу (более 60 %), гидролизovali крахмал (около 80 %). Более 60 % исследованных штаммов обладали способностью разжижать желатин, большинство расщепляло казеин. При этом наиболее выраженная ферментативная активность наблюдалась у микроорганизмов - контаминантов свежего растительного сырья, по сравнению с микроорганизмами, выделенными из продуктов его переработки.

Исследования токсигенного потенциала микробиоты растительного сырья и продуктов на его основе показали, что более 40 % исследованных штаммов обладало лецитиназной активностью, около 50 % штаммов проявили коагулазную активность, большая часть микроорганизмов вызывала гемолиз эритроцитов (более 80 %). При этом 20 штаммов проявило все исследованные факторы патогенности и лишь 5 штаммов – ни одного.

Индикаторные культуры *Escherichia coli* проявили чувствительность к бактериоцинопродукции 44 % исследованных бацилл, *Salmonella typhimurium* – к 47 %, *Staphylococcus aureus* – к 58 %, *Bacillus cereus* – к 56 % бацилл. Дальнейшие исследования штаммов, в наибольшей мере проявивших антагонистическую активность, показали их способность выживать и развиваться в условиях повышенной кислотности, в присутствии солей желчи, и пепсина.

Итак, высокая биологическая активность и устойчивость спорообразующих аэробных микроорганизмов растительного сырья и пищевых продуктов на его основе подтвердила возможность выявления среди них штаммов, перспективных для создания пробиотических препаратов. Учитывая, что степень проявления практически всех исследованных сторон биологической активности штаммов не зависела от видовой принадлежности микроорганизмов и варьировала для штаммов одного вида, при создании препаратов на основе бактерий, обладающих пробиотическими свойствами, следует руководствоваться не только видовой принадлежностью микроорганизмов, но и особенностями конкретных штаммов. Частое обнаружение факторов патогенности у штаммов бацилл, выделенных из пищевых продуктов и сырья, настораживает и требует более глубокого изучения токсигенного потенциала микроорганизмов, а также свидетельствует в пользу целесообразности использования для создания препаратов пробиотического действия не живых культур спорообразующих микроорганизмов, а их активных метаболитов.

ГОНЧАРУК Е.А., НЕЧАЕВА Т.Л., ЛАПШИН П.В.,

НИКОЛАЕВА Т.Н., ЗАГОСКИНА Н.В.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия

КАЛЛУСНЫЕ КУЛЬТУРЫ РАСТЕНИЙ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ СТРЕССОВЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ

Биотехнология является одним из приоритетных научных направлений современности. Именно с ее помощью возможно успешное решение различных вопросов как фундаментального, так и прикладного характера, в том числе адаптации растений к техногенным воздействиям. Это связано с тем, что производственная и «бытовая» деятельность человека приводит к значительному накоплению в почве и атмосфере разнообразных поллютантов, а растения выполняют в этом случае роль «санитаров», способствуя не только их поглощению, но и катаболизму.

К числу наиболее токсичных и широко распространенных поллютантов следует отнести тяжелые металлы, такие как кадмий, свинец, ртуть, медь и другие соединения. Реакция растений на их действия может быть различной, что обусловлено как химической природой вещества, так и его концентрацией.

Одним из успешных подходов для изучения действия таких техногенных соединений как тяжелые металлы на клетки высших растений могут быть культуры *in vitro*. Их преимуществом является достаточно простой уровень организации и возможность культивирования в различных условиях, в том числе при широком диапазоне стрессовых воздействий.

К числу веществ, привлекающих внимание исследователей, относятся фенольные соединения, обладающие высокой биологической активностью и все более широко используемые в фармакологических целях. Известно, что эти «продукты» так называемого вторичного метаболизма синтезируются практически во всех клетках высших растений. При этом уровень их накопления зависит от многих факторов как биотической, так и абиотической природы.

Целью нашего исследования являлось изучение влияния кадмия на каллусную культуру чайного растения, характеризующуюся способностью к синтезу фенольных соединений, в том числе флаванов – веществ, обладающих Р-витаминной

капилляроукрепляющей активностью. Установлено, что при длительном его воздействии в каллусных культурах происходило значительное увеличение количества этих вторичных метаболитов: в начале цикла культивирования возрастало накопление фенилпропаноидов и флавоноидов, а в конце – накопление лигнина. При этом интенсивность ответной реакции клеток зависела от концентрации тяжелого металла в среде.

Все это свидетельствует о том, что поступление тяжелых металлов в клетки растений приводит к изменениям в биосинтезе фенольных соединений, в первую очередь, на уровне накопления мономерных, а в дальнейшем – и полимерных их форм.

ГРИГОРИАДИ А.С., КИРЕЕВА Н.А.

Башкирский государственный университет, Уфа, Россия

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРИЕМОВ ФИТОРЕКУЛЬТИВАЦИИ ДЛЯ ОЧИСТКИ ТЕРРИТОРИЙ, ЗАГРЯЗНЕННЫХ ПРЕДПРИЯТИЯМИ НЕФТЕДОБЫВАЮЩИЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Использование экологически чистых технологии для восстановления почвенных экосистем, загрязненных различными поллютантами, приобретает большую популярность, которая связана с экономической выгодой и минимизации вреда, оказываемого традиционными методами. Основой таких технологии является использования биологических объектов, таких как микроорганизмы или растения. Для очистки нефтезагрязненных территорий в настоящее время широко применяют технологии биоремедиации микробными препаратами и на стадиях доочистки – фиторемедиации.

Целью данной работы явилось исследования эффективности использования растений костреца (*Bromopsis inermis* Leys) для рекультивации почвы, загрязненной продуктами сгорания природного и попутного нефтяного газа. Попутный нефтяной газ представляет собой смесь газов и парообразных углеводородных и неуглеводородных компонентов, выделяющихся из нефтяных скважин и из пластовой нефти при её сепарации. Продукты сгорания попутного нефтяного газа (ПНГ) на факелах, поступающие в окружающую среду, представляют собой потенциальную угрозу здоровью человека и могут нанести вред экологическому состоянию.

Опыт проводился на территории прилегающей к факельному стояку НГДУ "Октябрьскнефть" (филиал "Башнефть-Уфа"). Объектом исследований служила почва (чернозем выщелоченный $pH_{\text{водн.}} - 6,8$; гумус 7,9%; $N_{\text{общ.}} - 5786$ мг/кг), подвергающаяся хроническому загрязнению в результате сжигания попутных нефтяных газов. Растительность на участке отсутствовала. Контролем являлась почва отобранная на границе санитарно-защитной зоны факельной установки на расстоянии 300 м от факельного хозяйства. Рекультивация проводилась на участках площадью 10 м², прилежащим к факельному стояку с северной и восточной сторон (в соответствии с преобладающим направлением ветра) на расстоянии 100 м от факела. В качестве фитомелиоранта использовался кострец (*Bromopsis inermis* Leys). Первоначальная концентрация нефтяных углеводородов в почве составляла 5,8-6,2 г/100г.

Известно, что кострец безостый обладает развитой корневой системой и высокой почвозадерняющей способностью. Это способствует ускорению процесса деструкции нефтяных углеводородов за счет увеличения численности и активности углеводородоксилирующих микроорганизмов (УОМ) путем создания благоприятных условий для их жизнедеятельности. Выносимое положение было доказано опытным путем. Фитомелиорация почвы, загрязненной продуктами неполного сгорания нефтяных газов в факельной системе способствовала повышению численности УОМ. Причем, численность УОМ была выше в ризосфере растений на протяжении всего эксперимента, тогда как в эдафосфере каких-либо достоверных различий с загрязненной почвой не обнаружено.

Рост численности почвенных грибов, способных использовать нефтяные углеводороды в качестве источника питания, является естественным процессом для большинства загрязненных почв. Через три дня после постановки опыта и до окончания эксперимента наблюдалось снижение численности углеводородоксилирующих грибов в ризосфере растений. В целом, численность микромицетов в ризосферных образцах почвы была ниже, чем в эдафосфере. В ризосфере костреца в незагрязненной почве преобладали типичные частые виды - *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium solani*, *Penicillium* sp. В основу комплекса микроскопических грибов загрязненной почвы в ризосфере костреца составляли виды: *Penicillium oxalicum*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium* sp.

Содержание углеводородов в почве под посевами костреца уменьшалось, особенно интенсивно процесс деградации происходил в ризосфере растений. К окончанию

эксперимента убыль нефтяных углеводородов составила в ризосфере около 70% и составляла 1,69-1,87 г/100г, в эдафосфере – только 20%. Также следует учитывать, что на рекультивируемом участке происходило постоянное загрязнение почвы продуктами сгорания природного и нефтяного газа.

Таким образом, использование предложенного в качестве фиторемедианта *Bromopsis inermis* интенсифицировало развитие углеводородоокисляющих микроорганизмов в ризосфере (бактерий и микроскопических грибов), что привело в значительному снижению содержанию нефтяных углеводородов в почве в условиях хронического загрязнения в результате сжигания попутного нефтяного газа. Полученные результаты позволяют рекомендовать применение растений костреца как для фиторекультивации, так и для комплексной ремедиации территорий, загрязненных органическими поллютантами.

ГРИШИН С.Ю., ЗАЯКИН В.В., НАМ И.Я.

*Брянский государственный университет имени академика И.Г. Петровского,
Брянск, Россия*

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ ХОЗЯЙСТВЕННО-ЦЕННЫХ ПРИЗНАКОВ У РОССИЙСКИХ И БЕЛОРУССКИХ СОРТОВ ЛЮПИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДНК-МАРКЕРОВ

Люпин представляет интерес для сельскохозяйственного производства как ценная зернобобовая культура кормового и сидерального значения. В России и Белоруссии ведется селекция в основном трех видов рода *Lupinus*: люпина узколистного (*L. angustifolius* (L.)), люпина белого (*L. albus* (L.)) и люпина желтого (*L. luteus* (L.)). В современной селекции сельскохозяйственных культур используются достижения методов молекулярного анализа генетических ресурсов растений, в частности ДНК-маркерный отбор генотипов (Marker Assisted Selection – MAS). MAS позволяет расширить возможности традиционных методов отбора потомков, несущих те или иные аллели генов хозяйственно-ценных признаков родителей, и существенно ускорить селекционный процесс.

В Австралии для использования в программе MAS были разработаны ДНК-маркеры ряда хозяйственно-ценных признаков люпина узколистного и люпина белого. Актуальным является внедрение достижений австралийских исследователей в селекцию российских и белорусских сортов и гибридов. В связи с тем, что сорта различаются по генотипу, почвенно-климатическим условиям произрастания, важной задачей является оценка эффективности ДНК-маркеров, полученных австралийскими исследователями для использования в селекции российских и белорусских сортов и линий люпина. Для этого необходимо провести молекулярно-генетический анализ, а затем сравнить его результаты с фенотипическими данными о проявлении соответствующих признаков у изученных образцов.

В данной работе были исследованы российские и белорусские образцы люпина узколистного и люпина белого с целью выявления аллелей ДНК-маркеров, полученных австралийскими исследователями для признаков устойчивости к антракнозу, низкой алкалоидности, реакции на яровизирующие температуры. Растительный материал для анализа был предоставлен сотрудниками ВНИИ люпина РАСХН и РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию». Маркерный анализ проводили на 40 образцах люпина узколистного и 27 образцах люпина белого российской селекции, а также на 34 образцах люпина узколистного белорусской селекции. Применяли сайт-специфичные праймеры в ПЦР (полимеразной цепной реакции) для обнаружения маркерных аллелей. Разделение продуктов амплификации проводили в полиакриламидном геле. ДНК-маркеры AntjM1, AntjM2, AnManM1 использовались для выявления аллелей устойчивости и восприимчивости образцов люпина узколистного к антракнозу. С помощью маркера KuNM1, сцепленного с геном *Ku*, а также маркера IucLi, сцепленного с геном *iucundus*, были проанализированы соответственно реакция на яровизирующие температуры и низкая алкалоидность образцов люпина узколистного. Генотипы люпина белого были исследованы с помощью маркеров WANR1 и WANR3, которые используются в австралийской программе селекции на устойчивость к антракнозу. Маркер RauperM1, сцепленный с геном *rauper* использовался для идентификации низкоалкалоидных образцов люпина белого.

Данные молекулярно-генетического анализа российских и белорусских образцов люпина узколистного и люпина белого планируется сравнить с фенотипическим

проявлением изученных признаков в полевых и тепличных условиях. Подтверждение эффективности ДНК-маркеров, полученных австралийскими исследователями, позволит проводить ДНК-маркерный отбор генотипов люпина при создании новых сортов и гибридов в России и Белоруссии.

ГРОМОВА О.Н., КАУХОВА И.Е., СЛЕПЯН Л.И., КУЗЬМИНА Н.С.

*ГБОУ ВПО Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия
Минздравсоцразвития России, Санкт-Петербург, Россия*

БИОМАССА КЛЕТОК ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ, КАК МАТРИЦА В БИОТЕХНОЛОГИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Организм современного человека подвержен воздействию негативных факторов окружающей среды. Прежде всего, это активизация вирусных инфекций, высокая нервно – эмоциональная и информационная нагрузка, нерациональное питание (дефицит витаминов, жирных кислот, белков) и так далее. Результатом является ослабление иммунной системы, и, как следствие, обострение острых сезонных и хронических заболеваний. В связи с этим приобретают актуальность препараты на основе натуральных биологически активных веществ. Предпочтение отдается комплексам веществ, извлекаемым из растительного сырья. Основным фактором повышения интереса к лечебным свойствам лекарственных растений явилось то, что значительной части синтетических сильнодействующих препаратов присущи различные нежелательные, даже опасные побочные эффекты.

На сегодняшний день фармацевтический рынок РФ располагает значительным количеством доступных монопрепаратов и биологически активных добавок, имеющих в своем составе различные растения тонизирующего действия. Однако анализ рынка демонстрирует недостаточность ассортимента по группе иммуномодуляторов растительного происхождения, особенно в сегменте недорогих эффективных препаратов – адаптогенов из растений семейства Аралиевых: женьшеня обыкновенного - *Panax ginseng* С.А. Меу, панакса пятилистного - *Panax quinquefolius* L. и полисциаса папоротниколистного - *Polyscias filicifolia* (Moore ex Fournier) Bailey.

Таким образом, представляет интерес поиск и создание принципиально новых препаратов с использованием, полученной *in vitro* биомассы клеток лекарственных растений как матрицы в инновационной биофармацевтике.

Используя клетки женьшеня, панакса пятилистного и полисциаса папоротниколистного, впервые разработаны новые составы и технологии лекарственных средств.

1. Буккальные пленки на основе биомассы женьшеня. Буккальные пленки являются одними из перспективных трансдермальных лекарственных форм, за счет своих технологических и биофармацевтических свойств. Их можно использовать как в амбулаторных условиях, так и самостоятельно пациентом. Обладая хорошей адгезией, биорастворимые лекарственные пленки легко фиксируются на поверхности десны. Экспозиция набухания и последующей деструкции пленок составляет от 60 до 180 минут. За этот период происходит выделение до 100% лекарственных веществ, которые концентрируются в очаге поражения, поступают в системный кровоток. Преимуществом такой динамики всасывания является отсутствие деструктивного воздействия ферментов желудочно-кишечного тракта, направленность, пролонгированность действия, точность дозирования биологически-активных веществ, использование малых терапевтических доз.

2. Эликсир на основе смеси биомасс женьшеня, панакса и полисциаса - оказывает мягкое действие на организм, обеспечивает быстрое наступление терапевтического эффекта (10-15 минут после приема). Технология эликсиров проста и не требует сложного аппаратного оформления;

3. Микрокапсулы, полученные во вращающемся дражировочном котле из экстракта биомассы клеток женьшеня и раствора пленкообразователя, а в качестве ядра был использован шрот от биомассы женьшеня. Образующиеся пленка высыхала, а при попадании в желудок шрот набухал, разрушая микрокапсулу, обеспечивая таким образом двойное действие. Как энтеросорбента (за счет шрота) и адаптогена за счет экстракта из биомассы. Микрокапсулирование открывает интересные возможности при использовании ряда лекарственных веществ особенно при необходимости пролонгирования действия и обеспечения поддержания определенного уровня лекарства в организме с эффективным терапевтическим действием в течение длительного времени.

4. Впервые разработан гель для приема внутрь на основе биомассы женьшеня. – Данное лекарственное средство имеет ряд достоинств: приятный вкус, легкость применения, возможность применения совместно с пищевыми продуктами, что позволяет исключить психологический акцент «надо принять лекарство».

5. Капли для приема внутрь на основе водного извлечения из биомассы женьшеня представляют особый интерес, т.к. данная лекарственная форма удобна в применении и имеет сравнительно высокую биодоступность.

Для данных лекарственных средств разработаны показатели качества, определены сроки годности и разработаны проекты фармакопейных статей.

Технология культивирования штаммов безотходная и экологически чистая.

ГРУЗДЕВ Д.С.¹, ДЗЮБА М.В.²

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

² *Федеральное государственное бюджетное учреждение науки*

Центр «Биоинженерия» РАН, Москва, Россия

МОДИФИКАЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ

Одним из направлений развития нанотехнологий в биологии и медицине является усовершенствование методов визуализации, идентификации и анализа биоматериала, обеспечивающих высокую степень разрешения. В рамках данного направления в последнее время успешно развиваются методы диагностики заболеваний с использованием магнитных наночастиц, несущих иммобилизованные на их поверхности антитела. Одним из наиболее часто используемых методов иммобилизации иммуноглобулинов на магнитных частицах является химическая сшивка антител с поверхностью наночастиц.

Открытие магнитотактических бактерий, способных синтезировать магнетосомы - наночастицы магнетита (Fe_3O_4) или грейгита (Fe_3S_4), размером от 35 до 120 нм, заключенные в липопротеидные мембраны, открыло новые возможности для развития высокочувствительных методов диагностики. Наличие липопротеидной мембраны позволяет функционализировать бактериальные магнитные наночастицы (БМЧ) с

помощью методов генетической инженерии. Модификация поверхности БМЧ включает получение гибридных белков мембраны магнетосом и иммуноглобулин-связывающих белков, к примеру, стафилококкового белка А, с последующим встраиванием в мембрану магнетосом *in vitro*. Второй подход потенциально более перспективен, чем метод химической сшивки, т.к. предполагает более строгое ориентирование антител на поверхности наночастиц.

Для конструирования гибридных белков нами был выбран способ, основанный на модификации белка Mam12 мембраны магнетосом. Ранее было показано, что белок Mam12 является более эффективной якорной молекулой, чем другие белки мембраны магнетосом. Полученный на его основе гибридный белок способен связывать широкий спектр антител, что открывает возможность создания диагностических наборов для идентификации различных целевых молекул.

Первым направлением работы являлось получение и исследование функциональной активности гибридных белков, состоящих из белка Mam12 мембраны магнетосом магнитотактической бактерии *Magnetospirillum magnetotacticum* и иммуноглобулин-связывающих доменов белка А *Staphylococcus aureus*.

На данном этапе работы осуществлен дизайн и синтезированы генетические конструкции, кодирующие мембранный белок магнитотактической бактерии *Magnetospirillum magnetotacticum* MS-1 Mam12 с одним и двумя доменами В белка А и двумя доменами Z, который является синтетическим аналогом домена В белка А *S. aureus*. Проведены экспрессия, фракционирование и очистка модифицированных белков. Показана экспрессия гибридных белков в мембранной фракции. Проведено исследование их активности. Белки проявляют иммуноглобулин-связывающую активность. На основании анализа данных твердофазного ИФА с ориентированными и неориентированными антителами, выдвинуто предположение о преимущественном связывании исследуемых белков с Fc-фрагментом антител. В результате было показано, что белки Mbb и Mzz проявляют сравнимый уровень специфичности взаимодействия с антителами, тогда как уровень специфичности между белком Mb и иммуноглобулинами была на порядок ниже. Полученные данные позволяют предположить, что четыре аминокислотные замены в белке Mbb не приводят к снижению уровня связывания антител, но при этом снимают токсичность гибридного белка для бактериальных клеток.

Вторым направлением являлось модификация поверхности БМЧ иммуноглобулин-связывающим белком *in vitro*. Была отработана методика и подобраны оптимальные параметры выделения магнетосом с интактной мембраной. Проведена наработка препарата бактериальных магнитных наночастиц нового штамма магнитотактических бактерий *Magnetospirillum* SO-1. Для модификации поверхности бактериальных магнитных наночастиц *in vitro*, был выбран способ вставки иммуноглобулин-связывающего белка Mbb посредством ультразвука. В результате магнитного иммуноферментного анализа показана способность функционализированных магнетосом неспецифически связывать антитела мыши.

ГРЯЗНОВ А.Ю.,¹ ДЕРКАЧ К.В.,² ШПАКОВ А.О.²

¹ГУЗ «Женская консультация № 44» Пушкинского района, Центр планирования семьи,
Санкт-Петербург, Россия;

²ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской
академии наук, Санкт-Петербург, Россия

АКТИВНОСТЬ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗ В СПЕРМАТОЗОИДАХ ЧЕЛОВЕКА С РАЗЛИЧНОЙ ПОДВИЖНОСТЬЮ

Изучение молекулярных механизмов, ответственных за регуляцию созревания сперматозоидов и их капацитацию является одной из актуальных проблем репродуктивной медицины. В процессе капацитации сперматозоиды становятся гиперподвижными, приобретают способность к хемотаксису и акросомальной реакции, что необходимо для их направленного движения по женскому половому тракту и оплодотворения яйцеклетки. Ключевую роль в контроле созревания сперматозоидов и капацитации играют гормоны и вещества негормональной природы, регулирующие цитозольные и мембранно-связанные формы аденилатциклазы (АЦ). Однако молекулярные механизмы их влияния на АЦ в эякулированных сперматозоидах (СЭ) исследованы недостаточно. Цель работы состояла в функциональной характеристике бикарбонат-чувствительной цитозольной АЦ и гормоночувствительной мембранно-связанной АЦ, которая сопряжена с рецепторами серпантинного типа и гетеротримерными G-белками стимулирующего или

ингибирующего типа (G_s и G_i), во фракциях СЭ с различной подвижностью, полученных от доноров-добровольцев. Показано, что при повышении доли подвижных СЭ от 13 до 93 млн/мл базальная активность АЦ повышается от 11.4 ± 0.8 до 29.9 ± 1.1 пмоль цАМФ/мин на мг белка. Во фракциях с высокой подвижностью СЭ увеличивается прирост активности АЦ над ее базальным уровнем при действии активаторов цитозольных АЦ – NaHCO_3 (50 мМ) и Mn^{2+} (5 мМ), что хорошо согласуется с данными об определяющей роли этих форм АЦ в контроле подвижности сперматозоидов. В то же время, чувствительность мембраносвязанных АЦ к негормональным регуляторам (гуаниновые нуклеотиды, форсколин) и к гормонам, действующим через G_s - (изопротеренол, норадреналин) и G_i - белки (норадреналин, серотонин), напротив, была повышена во фракциях с низкой подвижностью СЭ, а при увеличении доли подвижных СЭ в значительной степени снижалась. Таким образом, впервые показано, что во фракциях с низкой долей подвижных сперматозоидов чувствительность мембраносвязанных АЦ к гормонам, действующим через G_s - и G_i -белки, существенно повышена. В то же время базальная активность АЦ и ее регуляция NaHCO_3 и Mn^{2+} была выше у высокоподвижных сперматозоидов, что может быть связано с повышением в них активности цитозольных АЦ. Снижение подвижности СЭ обычно связывают с нарушениями или незавершенностью процессов их дифференцирования, развития и созревания. Полученные нами результаты будут способствовать разработке новых подходов для гормональной коррекции функционального состояния СЭ, направленных на ускорение их созревания и повышение фертильности.

ГУЛАМАНОВА Г.А., ТОКАРЕВА С.Ю.

Башкирский государственный университет, Уфа, Россия

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ФИТОПЛАНКТОНА
ДЛЯ ОЦЕНКИ СТЕПЕНИ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ВОДОТОКА В ГОРОДСКОЙ
ПРОМЫШЛЕННОЙ ЗОНЕ (Р. ШУГУРОВКА, Г. УФА)**

Р. Шугуровка - правый приток р.Уфы, имеет длину 15 км, площадь водосбора 95 км², среднегоголетний расход 0,54 м³/с. Она является накопителем сточных вод

химических, нефтехимических и других предприятий северной части г. Уфы. Содержание органических веществ и различных металлов многократно превышает предельно допустимые концентрации их для открытых источников.

Целью работы была оценка степени загрязнения р. Шугуровки по уровню развития фитопланктона. Для этого был исследован качественный и количественный состав фитопланктона, выявлена сезонная динамика развития фитопланктона, определены степень трофности водотока и уровень органического загрязнения реки с использованием индикаторных видов фитопланктона.

Материалом для данной работы послужили 120 проб фитопланктона, отобранных на 15 станциях р. Шугуровки и её притоков. Пробы отбирались в вегетационный период с мая по октябрь 2010 г. и в июне и августе 2011 г. Некоторые станции периодически пересыхали.

В фитопланктоне р. Шугуровки и её притоков выявлено 87 видов и внутривидовых таксонов водорослей и цианопрокариот. Постоянными и преобладающими по видовому разнообразию являлись *Bacillariophyta* – 56 видов и внутривидовых таксонов. Широко представлены были роды *Navicula* (12 видов и разновидностей), род *Nitzschia* (6 видов и разновидностей) и род *Surirella* (5 видов). Остальные классы включали незначительное число видов. Остальные отделы отличались более бедным видовым составом: *Chlorophyta* – 12, *Суанопрокэрыота* – 12, *Euglenophyta* – 3, *Dinophyta* – 1, *Chrysophyta* – 1 вид.

Общая пропорция флоры (среднее число видов в семействе, среднее число родов в семействе и среднее число видов в роде) - 2,3:1,3:1,8, что показывает низкое систематическое разнообразие флоры исследуемых водоёмов. Анализ флоры показал, что общий родовой коэффициент составляет 1,6, наибольшее значение у цианопрокариот, со значением 2,2; наименьшее – у отделов *Dinophyta* и *Chrysophyta* (по 1,0).

Характерен весенний пик видового богатства альгофлоры в мае, после чего, с июня при установлении температурной стратификации, наблюдается обеднение видового состава.

В течение вегетационного периода наблюдается снижение количественных показателей развития фитопланктона: численность снижается с 1310,57 тыс.кл/л в мае, до 110,66 тыс.кл/л в октябре. В течение всего вегетационного периода, кроме августа, численно преобладали диатомовые водоросли. В августе доминирование диатомовых

сменяется массовым развитием синезелёных водорослей, подтверждением чего является высокая численность *Microcystis aeruginosa* - 44,9 % от общей численности, способный при большом скоплении вызывать «цветение» воды. Численность зелёных водорослей плавно снижается по мере понижения температуры. Малочисленно представлены отделы *Chrysophyta*, *Dinophyta* и *Euglenophyta*, их численность колеблется независимо от времени отбора проб.

Был выявлен комплекс доминирующий видов. За исследованный период в него вошли представители трёх отделов: *Microcystis aeruginosa* (цианопрокариоты), *Chlorella vulgaris* (зеленые водоросли), *Diatoma vulgare*, *Meridion circulare*, *Melosira varians* (диатомовые водоросли).

По результатам кластерного анализа была построена дендрограмма сезонной динамики развития фитопланктона, показавшая следующее: выделяются 3 кластера по срокам отбора проб: первый - весенний (май), второй - раннелетний (июнь), третий – летний и осенний (июль, сентябрь, октябрь). Август незначительно выбивается из последнего кластера, вследствие выпадения нескольких пересохших станций.

По шкале трофности водоток относится к олиго-мезотрофно-мезотрофному типу, с уровнем первичной продукции ниже среднего.

Индекс сапробности варьировал от 1,51-3,81, что характеризует изменение от β -мезосапробной зоны очищения до полисапробной. По числу индикаторных видов преобладали β -мезосапробы. Водоток соответствует по разряду качества воды от «достаточно чистых» (3а) до «весьма грязных» (5а).

ГУЛИЙ О.И.¹, ЗАЙЦЕВ Б.Д.², КУЗНЕЦОВА И.Е.²,
ШИХАБУДИНОВ А.М.², КАРАВАЕВА О.А.¹, ДЫКМАН Л.А.¹,
СТАРОВЕРОВ С.А.¹, ПАВЛИЙ С.А.¹, ИГНАТОВ О.В.¹

¹ Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия

² Саратовский филиал Института радиотехники и электроники, Саратов, Россия

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФАГОВЫХ МИНИАНТИТЕЛ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ МИКРОБНЫХ КЛЕТОК *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* SP245 С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРОАКУСТИЧЕСКОГО ДАТЧИКА

Получены фаговые мини-антитела к бактериальным клеткам штамма *Azospirillum brasilense* Sp245 и исследована возможность их применения для детекции микробных клеток с помощью пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем. Установлено, что частотные зависимости реальной и мнимой частей электрического импеданса такого резонатора, нагруженного суспензией клеток *A. brasilense* Sp245 с мини-антителами, значительно отличаются от зависимостей резонатора с контрольной суспензией клеток без мини-антител. Найден предел возможного определения концентрации микробных клеток, который составляет 10^3 кл/мл при их взаимодействии с мини-антителами. Установлено, что детекция клеток *A. brasilense* Sp245 с помощью мини-антител возможна в присутствии посторонних культур, например, клеток *Escherichia coli* BL-Ril и *A. brasilense* Sp7. Представленные результаты показывают перспективность анализа микробных суспензий с помощью пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем и демонстрируют возможность разработки биологического датчика для количественной детекции микробных клеток.

Работы выполнены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, гранты № 10-02-01313а и №12-02-01057а.

ГУЛЬНЕВА М.Ю., МАЛАФЕЕВА Э.В., НОСКОВ С.М.
ГБОУ ВПО «Ярославская государственная медицинская академия»,
Ярославль, Россия

МИКРОЭКОЛОГИЯ КИШЕЧНИКА БОЛЬНЫХ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКОЙ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ПРОБИОТИКОВ

В работе представлены результаты изучения микрофлоры толстого кишечника у больных системной красной волчанкой (СКВ) при применении пробиотиков. Обследовано 90 пациентов, из них 60 больных СКВ и 30 больных кардиологического профиля, составивших группу сравнения. Диагноз системной красной волчанки устанавливали согласно критериям Американской ревматологической ассоциации (1982). Степень активности заболевания определяли, используя индекс ECLAM. Обследованы больные СКВ I (43,33%) и II (56,67% больных) степени активности, с подострым (58,33%) и хроническим (41,67% больных) течением. Для оценки качественного и количественного состава микрофлоры толстого кишечника использовали бактериологический метод в соответствии с методическими указаниями «Бактериологическая диагностика дисбактериоза кишечника» (2004). Определяли видовой состав, количество отдельных представителей микрофлоры кишечника в КОЕ/г испражнений и степень микробиологических нарушений микрофлоры толстого кишечника (ОСТ 91500.11.0004-2003). Структуру симбиотических взаимоотношений микроорганизмов, участвующих в формировании микробиоценоза кишечника, характеризовали показателем постоянства (С) основных представителей. В зависимости от полученных значений частоты выделения все виды изолированных микроорганизмов разделены на доминирующие ($C > 50$), добавочные ($25 < C < 50$) и транзиторные ($C < 25$). Статистический анализ данных выполнен на IBM PC совместимом компьютере с помощью программы STATISTICA[®] (Data analysis software system, StatSoft) версия 6.0. Результаты исследований представлены в виде средней \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$). Сравнение непрерывных величин с нормальным распределением проводилось с помощью t-критерия. Дискретные величины сравнивались с использованием критерия χ^2 . Различия между группами считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования микрофлоры кишечника больных СКВ свидетельствуют о нарушении микроэкологии кишечника больных. Нарушение кишечной микрофлоры установлено у 95% больных. У 33,3% больных выявлена I степень, у 45% – II степень и у 16,2% больных III степень микробиологических нарушений микрофлоры толстого кишечника. Существенно изменяется доминирование основных симбионтов. В доминантном составе ценопита принимают участие энтерококки, кишечные палочки со сниженной ферментативной активностью и стафилококки, имеющие меньшую значимость у лиц группы сравнения, входящие в добавочных и транзиторных виды. При СКВ установлено значительное снижение количества бифидобактерий до $\lg 6,93 \pm 0,93$ КОЕ/г против их уровня у лиц группы сравнения $\lg 9,37 \pm 0,59$ КОЕ/г. Особенностью изменения биоценоза больных также было существенное возрастание количества стафилококков до $\lg 4,67 \pm 0,78$ КОЕ/г и гемолитических микроорганизмов до $\lg 4,0 \pm 1,60$ КОЕ/г (у здоровых лиц соответственно $\lg 2,75 \pm 0,46$ КОЕ/г и 0). Одновременно у больных СКВ снижался уровень типичных кишечных палочек и повышалось количество эшерихий с измененными ферментативными свойствами ($p < 0,05$). Формирование дисбиотических изменений бактериальной микрофлоры явилось основанием для применения в комплексном лечении больных биологически активных веществ. С целью регуляции микробиоценоза использован монокомпонентный пробиотик IV поколения – бифидумбактерин форте. Пробиотик применялся в дозе 2 пакета ($10 \cdot 10^7$ КОЕ бифидобактерий) 2 раза в день. Продолжительность курса лечения 20 дней. Применение пробиотика сопровождалось нормализацией микробиоценоза кишечника больных. Количество бифидобактерий возросло до $\lg 8,07 \pm 0,96$ КОЕ/г, уровень стафилококков снизился до $\lg 3,77 \pm 0,91$ КОЕ/г, повышалось количество лактозопозитивных кишечных палочек до $\lg 7,90 \pm 0,82$ КОЕ/г

Согласно современным воззрениям отдельные параметры нормы микробиоценоза кишечника достаточно широки, однако установленные показатели основных симбионтов кишечника больных СКВ позволяют говорить о формировании нарушений микроэкологии данного биотопа, структурной перестройке микрофлоры кишечника, смене абсолютных доминант и появлении условно-патогенных микроорганизмов, обладающих гемолитическими свойствами. Для регуляции микробиоценоза кишечника больных СКВ целесообразно использовать пробиотик, содержащий бифидобактерии. Применение

пробиотика нормализует микрофлору кишечника, восстанавливает симбиотические взаимоотношения индигенной флоры кишечника больных СКВ. Уменьшение уровня условно-патогенных микроорганизмов позволит снизить риск развития гнойно-воспалительных осложнений и повысить эффективность профилактики эндогенных инфекций.

ГЮНТЕР Е.А.¹, ПОПЕЙКО О.В.¹, ШКРЫЛЬ Ю.Н.²,
БУЛГАКОВ В.П.², ВЕРЕМЕЙЧИК Г.Н.², ОВОДОВ Ю.С.¹

¹Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, Россия

²Биолого-почвенный институт ДВО РАН, Владивосток, Россия

ВЛИЯНИЕ АГРОБАКТЕРИАЛЬНЫХ ГЕНОВ *rol* НА СТРОЕНИЕ ПЕКТИНОВ КУЛЬТУР ТРАНСГЕННЫХ КЛЕТОК *RUBIA CORDIFOLIA*

Определен моносахаридный состав пектинов трансгенных культур марены сердцелистной, трансформированной генами *rolA*, *rolB* и *rolC*, в сравнении с нетрансгенными. Показано, что пектины из трансгенных и нетрансгенных каллусов марены содержат большое количество остатков D-галактурановой кислоты (44-75%), основными нейтральными компонентами являются остатки галактозы (5.3-12.2%), арабинозы (2.7-8.2%) и рамнозы (0.8-1.5%) (табл. 3.61). Соотношение арабиноза/галактоза составляет 1:(0.9-2.6). В составе полисахарида также обнаружены в небольшом количестве остатки глюкозы, ксилозы и маннозы.

При трансформации клеток генами *rolB* и *rolC* в линиях со средней (RBM и RCM) и высокой (RBH и RCH) экспрессией в пектине наблюдали снижение содержания остатков арабинозы в 1.3 и 1.4-2.4 раза соответственно. В линиях RBH и RCL отмечено увеличение содержания остатков галактозы в 1.6 и 1.3 раза соответственно. В корнеобразующей линии с высокой экспрессией RCH-roots suspension происходит снижение содержания остатков арабинозы и галактозы в 1.2 и 1.5 раза соответственно. В корнеобразующей линии RCH-roots callus наблюдали снижение содержания остатков галактозы в 1.4 раза. В *rolA* трансгенах количество нейтральных моносахаридных остатков существенно не изменяется. Содержание остатков галактурановой кислоты уменьшается в *rolA*, *rolB*, и

rolC трансгенах в 1.7, 1.5 и 1.2 раза соответственно. Для всех линий отмечено снижение содержания белка и остатков глюкозы.

При трансформации клеток генами *rolA* Mw пектина является близкой к контролю. В *rolB* трансгенах с низкой и средней экспрессией Mw пектина увеличивается в 1.1 раза, тогда как в трансгенах с высокой экспрессией - снижается в 1.1 раза. В *rolC* трансгенах с низкой, средней и высокой экспрессией Mw пектина возрастает в 1.1-1.3 раза. В корнеобразующих линиях RCH-roots suspension наблюдали снижение Mw в 1.5 раза, тогда как в RCH-roots callus отмечается увеличение Mw в 1.2 раза. Mw всех пектинов уменьшается по сравнению с контролем.

Таким образом, содержание остатков арабинозы и галактозы изменяется под действием генов *rolB* и *rolC*, тогда как в *rolA* трансгенах таких изменений не обнаружено. Содержание остатков галактуроновой кислоты изменяется в зависимости от типа гена следующим образом: снижение количества остатков усиливается в ряду от *rolC* к *rolB* и *rolA* трансгенам. С увеличением силы экспрессии генов происходит более существенное снижение содержания остатков арабинозы в пектине.

Показано, что активность б-галактозидазы в каллусе марены по сравнению с контролем (линия R) снижается в линиях RBH и RCL в 1.6 и 1.7 раза соответственно, тогда как в линии RA увеличивается в 1.5 раза. Активность а-L-арабинофуранозидазы в трансгенах возрастает, достигая наибольших значений в линиях со средней экспрессией (RBM и RCM) и в линии RA. Отмечено снижение активности 1,3-β-глюканазы в 1.4-1.7 раза в линиях RA, RA4, RBH, RCL, RCM и RCH-roots suspension. Активность полигалактуроназы в трансгенных каллусах снижается в 1.4-7.2 раза. В результате трансформации клеток марены генами *rolA*, *rolB* и *rolC* наблюдали увеличение активности пектинэстеразы в 2.1-4.3 раза в линиях RA, RBL, RBM, RCM, RCH и RCH-roots suspension. При этом наибольшее увеличение активности наблюдается у линий со средней экспрессией (RBM и RCM).

Таким образом, гены *rol* участвуют в регуляции активности гликаназ, которые оказывают гидролитическое действие на пектины клеточных стенок, тем самым, модифицируя их структуру. Снижение содержания остатков арабинозы в пектине связано с возрастанием активности а-L-арабинофуранозидазы в трансгенных каллусах марены. Увеличение содержания остатков галактозы в ряде трансгенных линий марены

обусловлено снижением активности β -галактозидазы в них. Моносахаридный состав пектинов в культурах клеток, трансформированных агробактериальными генами *rolA*, *rolB* и *rolC*, изменяется в зависимости от типа гена и силы экспрессии трансгена.

Работа выполнена при финансовой поддержке интеграционного гранта УрО РАН и ДВО РАН и программы «Ведущие научные школы».

ДАВЫДОВ С.О.¹, УХОВ Н.В.²

¹*Северо-Восточный государственный университет, Магадан, Россия*

²*Институт Биологических проблем Севера СОРАН, Магадан, Россия*

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ КОРНЕВОЙ СИСТЕМЫ ДЕРЕВЬЕВ В ДОЛИНАХ РЕК СЕВЕРА

Для Севера, в условиях острого дефицита тепла в почве, часть проводящих и скелетных корней, в зависимости от эколого-геокриологических условий, значительное время, начиная от первой, реже, до второй частей, вегетационного периода, находятся в мерзлой почве. В связи с чем, при существенном изменении термического режима северных почв, вследствие накопления осадков, торфа, склоновых наносов, заболачивания, уменьшения глубины сезонного протаивания, реакция корневой системы будет сильнее, чем в более южных районах.

Исследования строения корневой системы деревьев: лиственницы (*Larix sibirica*), чозении (*Chosenia arbutifolia*), тополя (*Populus suaveolens*), отобранных в поймах рек Колымы и Буянды, проводились в лаборатории геоботаники ИБПС ДВО РАН. Основное внимание при этом уделялось особенностям строения корней, с учетом сукцессии пойменных биогеоценозов, которые бы однозначно отражали влияние тех или иных изменений эдафических условий в процессе развития деревьев.

Из рассматриваемых пород деревьев, лиственница является самой холодостойкой, менее требовательная к температурному режиму почв, т. е. относится к эвритермным организмам. Якорно-поверхностная система скелетных корней, расположенных в одной плоскости характерна для образцов, отобранных на стабильном почвенном слое (1 надпойменной террасе) т. е. при отсутствии накопления-размыва.

В условиях периодического, ритмического, накопления осадков от главного стержневого корня, ниже корневой шейки, имеют место 2 - 4 (реже 5) горизонтов боковых скелетных и проводящих корней, расположенных, как правило, в одной плоскости и с близкой «розой» направлением. Во всех случаях размеры корней, и, в первую очередь, диаметр их, увеличивается от нижнего к верхнему ярусу, по мере развития (роста) деревьев, а расстояние между ними может быть различным, но, как правило, в пределах 10-30см. Своеобразная якорно-стержневая система скелетных и проводящих корней на глубину до 80-90см от корневой шейки характерна для образцов деревьев, отобранных в местах накопления пойменного аллювия в днищах, делювиальных отложений на склонах долин рек, а так же болотах с активным накоплением мохового покрова. Многоуровневое строение корней, вероятнее всего, приурочено к участкам ухудшения термического режима почвенных горизонтов. К особенностям строения корней лиственницы следует отнести их срастание и асимметричность строения в поперечных разрезах.

У некоторых лиственниц скелетные корни формируют своеобразную якорно-поверхностную систему. Такие корни в поперечном сечении имеют вертикальный размер в несколько раз больше горизонтального, а так же диаметра ствола дерева. Такая структура корневой системы могла сформироваться в результате постепенного ухудшения термического режима почв в местах произрастания деревьев.

Тополя произрастают, как правило, на пойменных таликах рек и характеризуются, в зависимости от эдафических условий, различными типами корневой системы: поверхностной, комбинированной, поверхностно-стержневой. При отсутствии существенного осадконакопления на участках низких уровней и неглубоком залегании к поверхности грунтовых вод формируется поверхностный тип корневой системы «мочалообразной» формы. В этом случае основная масса корней располагается в 40-60-ти сантиметровом слое, а особо крупные скелетные корни, как правило, отсутствуют. На некоторых участках пойм с продолжающимся осадконакоплением и сравнительно глубоким залегании грунтовых вод формируется поверхностно-стержневая корневая система. Для таких деревьев продолжением ствола служит сравнительно длинный (до 2,5м) стержневой корень, а ниже корневой шейки (слой 30-35), корневой горизонт мелкоскелетных и проводящих корней.

Чезения – является пионером среди древесной растительности галечниковых кос и имеет стержневой корень. В одних случаях ствол дерева плавно переходит в, уменьшающийся по глубине, стержневой корень, длиной до 2,0-2,5м с боковыми отростками, распределенными по его длине в разных направлениях, а в других сильно искривленные и ступенчато изогнутые корни стержневого типа гораздо меньших размеров, которые, как правило, с глубины 0,8-1,2м разветвляются.

Проведенные исследования показали, что комплексных геоботанический мониторинг лесов, следует дополнить изучением структуры и строения корневой системы деревьев, как связующее звено в дендроиндикации эдафических условий мест произрастания.

ДАВЫДОВА Д.Ю.

ФГБУ «НИИЭМ им Н.Ф.Гамалеи» Минздравсоцразвития России, Москва, Россия

ПОЛУЧЕНИЕ АКТИВНОЙ ФОРМЫ ПРОТЕОСОМНОГО БЕЛКА *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

Хламидийные инфекции остаются актуальной проблемой инфекционной патологии человека в связи с их широкой распространенностью и наблюдающимся ростом заболеваемости. Проблема контроля за заболеваниями связана с высоким процентом хронических форм, для лечения которых в настоящий момент не существует эффективных препаратов. В связи с этим, актуальным является идентификация новых биомишеней и поиск высокоспецифичных к ним ингибиторов, с целью разработки принципиально новых антибактериальных препаратов, не вызывающих развития антибиотикорезистентности в отношении хронических хламидиозов.

Одним из основных факторов патогенности хламидий является белок CPAF, что делает его перспективной мишенью при создании инновационных антихламидийных препаратов.

Белок CPAF (Chlamydial Protease\proteasome-like Activity Factor) - специфичная протеаза хламидий, которая секретируется в цитозоль клетки-хозяина. Белок CPAF расщепляет многие транскрипционные факторы и компоненты системы промежуточных

филаментов клетки-хозяина, препятствуя презентации антигенов хламидий на поверхности зараженной клетки, блокируя индукцию апоптоза хозяйской клетки и способствуя росту хламидийных включений. СРАФ синтезируется в хламидийных включениях в форме неактивного зимогена размером ~70 kDa, однако в дальнейшем он претерпевает серию автокаталитических реакций гидролиза и димеризацию, и в итоге активная протеаза СРАФ представляет собой гомодимер, каждый мономер которого состоит из двух фрагментов размером 29 и 35 kDa.

Целью настоящего исследования стало получение рекомбинантного белка хламидий СРАФ для дальнейшего использования его при скрининге потенциальных ингибиторов.

В процессе проведения данной работы был клонирован ген белка СРАФ *C.trachomatis* в составе рекомбинантной плазмиды в эукариотической клетке. Работа проводилась в несколько стадий. На первом этапе была клонирована нуклеотидная последовательность, кодирующая протеазу СРАФ. Проведенный масс-спектрометрический анализ показал практически полную гомологию по аминокислотной последовательности рекомбинантного белка аннотированному белку СРАФ. С использованием экспрессирующей системы *E. coli* был создан штамм-продуцент, обеспечивающий продукцию «зрелой формы» СРАФ, содержащей полигистидиновый пептид для эффективной очистки препарата. Однако цельноразмерный белок СРАФ продуцировался в небольших количествах, поэтому на следующем этапе у клонированного гена была делетирована последовательность предполагаемого сигнального пептида, в результате чего продукция белка СРАФ увеличилась в 50-100 раз. С целью дальнейшей характеристики клонированного белка была получена поликлональная сыворотка, специфично взаимодействующая с белком СРАФ.

Большая часть белка СРАФ находилась в нерастворимой фракции, в тельцах включений, поэтому использовать данный препарат в тестировании протеазной активности невозможно ввиду его нерастворимости. Таким образом, на следующем этапе работы удалось создать бактериальный штамм-продуцент, обеспечивающий продукцию «зрелой формы» СРАФ в растворимой форме и имеющей глутатион-трансферазный пептид для эффективной очистки препарата. Полученный препарат можно использовать на

следующем этапе работы для исследования ингибирующей активности химических соединений в протеазном тесте *in vitro*.

ДАНИЛОВА С.А.

*Федеральное государственное учреждение науки институт физиологии растений
Российской академии наук, Москва, Россия*

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТРАНСПЛАСТОМНЫХ РАСТЕНИЙ

Достижения в биотехнологии, несомненно, открывают новые возможности для человечества. Развитие генетической инженерии растений позволяет изменять геном растений за счет переноса в них «полезных» генов не только от других растений, но и от бактерий, грибов и даже животных и человека. Таким путем можно получить полезные растения нового поколения, которые способны противостоять вирусным, бактериальным, грибковым заболеваниям и неблагоприятным условиям окружающей среды. Новая технология за короткий срок (в сравнении с традиционными подходами и технологиями) позволяет улучшить как пищевую ценность, так и декоративные качества культурных растений. Чтобы снизить стоимость белков (антигенов, антител, ферментов и др.) медицинского назначения, для их получения используют трансгенные растения в качестве живых биореакторов. Переноса отдельные гены в растительный геном, изучают влияние экспрессии этих генов на развитие растения, что, безусловно, поможет более глубокому пониманию их функции. Однако наряду с прогрессом в области генной инженерии растений нельзя забывать и об ответственности ученых, работающих в этой области. Несмотря на широкое применение генетически модифицированных растений, они являются потенциально опасными для человека и окружающей среды, поэтому идет активный поиск новых технологий, которые позволили бы снизить или исключить возможные риски при их использовании.

Особенно перспективны в этом отношении растения с трансформированными хлоропластами. Хлоропласт является компонентом растительной клетки и представляет собой одну из разновидностей пластид. В клетках растений присутствуют несколько типов пластид с разными функциями: в зеленой пластиде – хлоропласте происходит фотосинтез,

в амилопластах синтезируется и откладывается в запас крахмал, в хромопластах накапливаются пигменты - каротиноиды. Для пластид характерна двойная оболочка, наличие своего генетического аппарата и белоксинтезирующей системы, а также способность делиться внутри растительной клетки. В отличие от линейных молекул ДНК в хромосомах ядра, хлоропластная ДНК представляет собой замкнутую кольцевую двуспиральную молекулу. Ее размеры варьируют у разных видов растений большей частью в интервале от 130 тыс. до 160 тыс. пар оснований. Хлоропластный геном имеет не более 100 генов. Генетический материал хлоропластного генома передается потомству обычно по материнской линии и не принимает участия в процессе опыления, что исключает вероятность переноса при помощи пыльцы любых генов, введенных в геном пластид. Поэтому использование растений с трансформированными пластидами (т.е. трансплантомных) приносит наименьший вред окружающей среде, и они являются экологически более безопасными.

Техника получения геномных и транспластомных ГМ-растений значительно различается. Отличие касается не только применяемых векторов, методов трансформации, но и отбора стабильных трансформантов. Технология экспрессии генов хлоропластов основывается на исключительной способности этих клеточных органелл эффективно синтезировать и накапливать белки. Что особенно ценно, хлоропласты даже лучше справляются с задачей синтеза чужеродных белков, чем традиционно применяемые дрожжи и микроорганизмы, или традиционные трансгенные растения. И, что наиболее актуально, хлоропласты лучше справляются с задачей синтеза человеческих белков, чем даже традиционные микроорганизмы, используемые для ферментации (такие, как *E. coli*), или растения с генами, встроенными в их ядра. Эта технология позволяет получать различные белки в больших количествах при малых затратах, что чрезвычайно важно для коммерческого использования.

В настоящее время в нашей лаборатории отработана эффективная технология хлоропластной трансформации табака, и ведется активная работа для получения транспластомов у широкого ряда культурных растений.

ДАНИЛОВА Ю.В., ШАРИПОВА М.Р.

Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия

ТРОМБОЛИТИЧЕСКИЕ И АНТИКОАГУЛЯНТНЫЕ СВОЙСТВА СЕРИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ БАЦИЛЛ

В фокусе современной медицины – разработка новых эффективных тромболитических препаратов. Особое внимание исследователей привлекают протеиназы, обладающие фибринолитическими свойствами, а также способные лизировать тромбы. Нами были получены ферменты бацилл, изучены их каталитические, энзиматические и физико-химические свойства. Основной задачей явилось исследование способности сериновых протеиназ лизировать преобразованный тромб (тромболитическую активность) и препятствовать формированию тромба (антикоагулянтную активность).

Данные исследования проводились *in vitro* на плазме крови человека.

Для определения тромболитических свойств протеиназ аликвоту крови человека смешивали с раствором тромбина и выдерживали в течении 10 минут в водяном термостате при 37°C для образования сгустков. К сгусткам добавляли раствор препарата фермента и помещали в водяной термостат (в контрольные пробирки добавляли 0.145 М NaCl). Отмечали время полного лизиса сгустков.

Способность белков предотвращать образование фибриновых сгустков исследовали с помощью тромбоэластографа. Для снятия тромбоэластограмм использовали плазму крови человека, титрованную цитратом натрия в соотношении 9:1. Аликвоту плазмы крови человека смешивали с препаратом фермента и выдерживали при комнатной температуре. Затем добавляли раствор CaCl₂ (для запуска коагуляционного каскада). В контрольные пробирки вместо белка добавляли 0.145 М NaCl. За процессом тромбообразования следили по кривой тромбоэластографа ("Hellige", Австрия).

Результатом работы является выявление ярко выраженной способности сериновых протеиназ лизировать преобразованный тромб и препятствовать его формированию.

ДАРМОВ И.В.¹, ПОГОРЕЛЬСКИЙ И.П.¹, ЧИЧЕРИН И.Ю.²,
ЛУНДОВСКИХ И.А.¹, ТЕТЕРИН В.В.¹

¹*Вятский государственный университет, Киров, Россия*

²*ООО «Медстар», Москва, Россия*

**МИКРОБИОЛОГИЯ ПРОБИОТИКОВ:
ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ
ДИСБИОТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ КИШЕЧНИКА**

При совокупном воздействии многочисленных эндо - и экзогенных факторов развиваются нарушения микробиоценоза различных биотопов организма людей, в частности тонкой и толстой кишки, где развиваются, соответственно, синдром избыточного бактериального роста и дисбактериозы. Указанные патологические состояния обуславливают снижение пищеварительной активности желудочно-кишечного тракта, а также функции разрушения и выведения токсических веществ из организма. В отсутствие нормально функционирующей кишечной микрофлоры в организме человека постоянно накапливаются шлаки. Так, при дисбиозах у больного к 30 годам в кишечнике может накопиться до 16 кг непереваренной пищи, которая увеличивает интоксикацию организма и усугубляет течение многих соматических заболеваний. Можно без преувеличения утверждать, что нормальная микрофлора кишечника выполняет важные функции, которые утрачены клетками и органами человека: разложение некоторых видов биополимеров, синтез ряда незаменимых витаминов и коферментов, нейтрализация многих видов химических токсических веществ.

Известно, что для коррекции микробиологических нарушений кишечника используются пробиотики, пребиотики, синбиотики и микробные метаболиты. Пробиотики (бифидо - и лактобактерии, эшерихии, энтерококки и др.) на протяжении десятилетий используются для профилактики и лечения дисбактериозов. Безопасность и их эффективность в настоящее время подвергаются пересмотру. Применение пробиотиков на протяжении длительного периода, а также больших доз приводит к органическим поражениям ряда органов и систем. Положительный эффект даже при длительном применении пробиотиков носит транзиторный характер или даже отсутствует. Одной из главных причин низкой эффективности (или ее отсутствия) пробиотикотерапии является

чужеродность микроорганизмов пробиотиков для человека. А также высокая видовая, индивидуальная и анатомическая специфичность нормальной микрофлоры кишечника.

С использованием комплекса микробиологических методов нами была изучена выживаемость пробиотических микроорганизмов (бифидо - и лактобактерий) в условиях *in vitro*, имитирующих пищеварение в желудке и кишечнике человека. Установлено значительное (на 4-5 порядков) снижение числа жизнеспособных пробиотических микроорганизмов при их инкубации в модельных средах. Было высказано предположение о том, что в живом организме пробиотические микроорганизмы в результате пассажа через желудочно-кишечный тракт больного дисбактериозом еще более значительно уменьшают свою численность и это сказывается на эффективности пробиотикотерапии в целом. Для подтверждения гипотезы об экологической и функциональной маргинальности пробиотических микроорганизмов были проведены дополнительные исследования. Так, был разработан способ получения экспериментального антибиотико-ассоциированного дисбактериоза у белых мышей и морских свинок, были получены маркированные производные пробиотических микроорганизмов, хорошо идентифицируемые в микробном сообществе кишечного содержимого. Установлено, что маркированные пробиотические микроорганизмы, вводимые перорально лабораторным животным с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом в течение 14 суток, появляются в фекалиях животных на 2 сутки эксперимента. Однако после окончания их перорального введения спустя 3 суток введенные перорально пробиотические микроорганизмы перестают обнаруживаться в фекалиях животных. Таким образом, с использованием микробиологических методов контроля фекальной микрофлоры в прямых опытах на лабораторных животных с экспериментальным антибиотико-ассоциированным дисбактериозом впервые показано существенное - на 4-7 порядков снижение численности выживания в желудочно-кишечном тракте пробиотических микроорганизмов и отсутствие пробиотического эффекта.

Получение нами в опытах *in vitro* экспериментальные данные свидетельствуют о транзитном характере пребывания пробиотических микроорганизмов в пищеварительном тракте лабораторных животных. Следовательно, пробиотикотерапия при дисбиотических состояниях не восполняет дефицит микроорганизмов нормальной кишечной микрофлоры. Именно микрoэкологические нарушения в кишечнике с изменением качественного и количественного состава микрофлоры можно считать

нарушенным звеном регуляции гомеостаза, которое утратило возможность самовосстановления. В этой связи ставится под сомнение существующий принцип заместительного действия пробиотикотерапии, что очень важно для реализации положений концепции пребиотической терапии, связанной с необходимостью поддержания и восстановления собственной кишечной микрофлоры.

ДЕДКОВ В.Н., ГНЕУШЕВА И.А., ПАВЛОВСКАЯ Н.Е.

ФГБОУ ВПО «Орловский государственный аграрный Университет», Орел, Россия

ПОЛУЧЕНИЕ БЕЛКОВО-УГЛЕВОДНЫХ КОРМОВЫХ ПРОДУКТОВ ДЛЯ ЖИВОТНОВОДСТВА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГРИБОВ РОДА TRICHODERMA

В связи с тенденцией мирового роста цен на продукты питания, энергоносители, сферу услуг и прочее, самым незащищенным сектором реальной экономики РФ остается АПК из-за отсутствия отлаженного механизма протекционизма в отрасли. Не исключение и животноводческий комплекс.

Актуальная проблема животноводства во всем мире — несбалансированность белков в растительных кормах по аминокислотному составу. Увеличение рациона в этом случае не способствует повышению усвояемости корма и его питательности, а себестоимость продукции при этом возрастает.

В мире каждый год накапливаются большие запасы малоиспользуемых органических отходов сельскохозяйственного производства, которые в основном характеризуются низкой кормовой ценностью из-за наличия трудногидролизуемых полисахаридов и невысокого содержания усваиваемого белка, а также компонентов, сдерживающих их использование в кормопроизводстве.

Одной из важнейших задач прикладной биотехнологии является создание препаратов для сельскохозяйственного производства, обеспечивающих расширение кормовой базы, биологическую защиту растений и животных от болезней, восстанавливающих и повышающих плодородие почвы и не наносящих при этом ощутимого ущерба природе.

Современные условия производства, связанные с переходом на малоотходную переработку сырья, предопределяют необходимость в постоянном расширении ассортимента за счет разработки новых рецептур и технологий производства продуктов высокого качества, обогащенных БАВ и благополучных в медико-биологическом отношении.

Полученные в результате исследований данные показывают, что при твердофазном культивировании грибов рода *Trichoderma* на ферментолизатах соломы пшеницы и при последующем автолизе этиловым спиртом содержание «сырого» протеина в кормовых продуктах повышалось до 14,04%.

Методом биотестирования установлена токсикологическая безопасность полученных кормовых добавок, о чем свидетельствует интенсивное накопление численности и активности *Tetrachimena rugiformis* в течение 72 часов экспонирования образцов.

Таким образом, при использовании грибов рода *Trichoderma* в биоконверсии соломы злаковых культур возможно получение белково-углеводных кормовых продуктов для животноводства с содержанием «сырого» протеина до 14,04%, «сырой» клетчатки до 18,84. По стандартной методике определена биологическая безопасность полученных продуктов.

ДЕМИН Д.В., СЕВОСТЬЯНОВ С.М., ДЕЕВА Н.Ф., ИЛЬИНА А.А., АЛАДИН Д.Ю.

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт
фундаментальных проблем биологии Российской академии наук (ИФПБ РАН),*

Пушино, Россия

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АМИНОКИСЛОТНЫХ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ РЕМЕДИАЦИИ ПОЧВ ЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЛИХЛОРИРОВАННЫМИ БИФЕНИЛАМИ (ПХБ)

До настоящего времени не сформировалось целостного представления о технологии реабилитации земель, загрязненных ПХБ.

Существующие методы по химической деструкции основаны на изъятии почвы, обработке ее реагентами и промывке от продуктов разрушения [3, 4]. Обычно они

сочетаются с нагревом почвы. Данные по химической деструкции в почве *in situ* ПХБ практически отсутствуют.

Нами проведены исследования по химической деструкции ПХБ в почвах, с целью осуществления ремедиации почв без их изъятия.

Известно, что хлорорганические соединения способны взаимодействовать с производными первичных и вторичных аминов, в том числе с простыми и сложными аминокислотами.

Источником производными первичных и вторичных аминов послужил реагент, который представляет собой щелочной гидролизат, получаемый из отходов кожевенного и мехового производства, основная составляющая которого – натриевые соли аминокислот (NaL).

Для подтверждения эффекта детоксикации и возможности применения аминокислотной композиции для обработки почв, загрязненных полихлорированными бифенилами была проведена серия экспериментов, которые можно разделить на две части – модельные в лабораторных условиях и опыты в реальных условиях загрязненных почв.

Эффект деструкции ПХБ аминокислотным реагентом в субстратах оценивали несколькими методами: структурные изменения молекул ПХБ методом Фурье-спектроскопии; содержание суммы ПХБ методом газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ) с использованием стандартов, а определение конгенов ПХБ - методами ГЖХ/МСНР (масс-спектрометрия низкого разрешения) или ГЖХ/МСВР (масс-спектрометрия высокого разрешения).

При обработке почв реагентом дозой 85 мл/кг (вариант 1) содержание ПХБ в первом образце снизилось в 4,2 раза, во втором образце в 4,3, а в третьем - в 25,2 раза соответственно. При обработке двойной дозой реагента (170 мл/кг) для первого и второго образцов получили примерно те же данные. Этот факт объясняется тем, что обработка всех трех образцов реагентом проводилось без результатов лабораторного определения ПХБ в данных почвах (анализы были получены позже). Одинаковое количество неразрушенного ПХБ в первом и втором образце при двух дозах NaL может свидетельствовать о том, что данное количество ПХБ жестко связано с минеральной частью или гумусовым веществом почвы. Однако по содержанию гумуса эти почвы сильно различаются, поэтому можно предположить, что происходит сорбция этого

количества ПХБ минеральной частью почвы, вследствие чего оно не доступно для химического разрушения. Можно сделать вывод, что доза 85 мл/кг приводит к деструкции всего химически доступного количества ПХБ за данное время экспозиции (10 суток). Можно предположить, что доза реагента 85 мл/кг, внесенная в загрязненный образец в несколько приемов в течение более длительного времени, позволит более полно разрушить оставшееся количество ПХБ. К тому же оставшиеся концентрации ПХБ ниже ПДК, поэтому в данном случае можно говорить о восстановлении почв.

В третьем образце ПХБ при двойной дозе реагента уменьшается в 63 раза, тем не менее, его количество в почве остается достаточно высоким. В данном случае количества реагента было недостаточно, так как расчет доз для обработки почвенных образцов производился по аналогии с серой лесной почвой, имеющей загрязнение 71900 мкг/кг (табл. 2), что меньше концентрации ПХБ в третьем образце в 4,73 раза.

Эксперименты по детоксикации ПХБ в образцах из верхних горизонтов почв в лабораторных условиях показали уменьшение в несколько раз содержания стойких органических соединений.

Доза аминокислотного реагента 85 мл/кг (концентрация 2 моль/л) приводит к деструкции всего химически доступного количества ПХБ за данное время экспозиции (10 суток)

В итоге можно подчеркнуть, что в экспериментах с натурными образцами получены положительные результаты по деструкции ПХБ солями аминокислот.

Работа выполнена по программе «Поддержка инноваций и разработок РАН».

ДЕМИНА О.В.^{1,2}, ЛУКИН А.Ю.¹, ЛАПТЕВ А.В.^{1,2}, БЕЛИКОВ Н.Е.^{1,2}, КАРПОВА М.Ю.¹,
ВАРФОЛОМЕЕВ С.Д.², ХОДОНОВ А.А.^{1,2}

¹ *Московский государственный университет тонких химических технологий*

им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

² *ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук,
Москва, Россия*

АНТИАГРЕГАЦИОННЫЕ СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ 3,5-ЗАМЕЩЕННЫХ ИЗОКСАЗОЛОВ И ИХ 4.5-ДИГИДРОПРОИЗВОДНЫХ

Возможность корректировать патологические состояния человеческого организма очень важна для возможной полноценной жизни людей. Направленная регуляция системы гемостаза человека является одной из важных проблем фундаментальной и прикладной науки, так как смертность в результате нарушений в системе свертывания крови при сосудистых заболеваниях занимает одно из первых мест в мире. Тромбоциты, образующие первичный тромб для предотвращения кровопотери в организме, являются критическим звеном системы гемостаза. Изучение сигнальных путей тромбоцита, приводящих к полному биологическому ответу клетки при использовании новых синтетических веществ различной химической природы, необходимо для выявления всех белков-мишеней и создания новых лекарственных препаратов с меньшими побочными эффектами, чем у применяемых в настоящее время лекарственных средств, таких как аспирин, кетопрофен и дипиридамол. Подобные исследования позволяют определить возможный механизм действия соединений, чьи белки - мишени еще не представлены в виде кристаллических 3D-структур, и выявить возможный фармакофорный фрагмент для дальнейшей разработки. В настоящее время ведущими фармацевтическими компаниями интенсивно ведется разработка новых антиагрегационных средств, важное место среди которых занимают гетероциклические соединения, подавляющие синтез тромбоксана A₂.

Ранее нами был впервые синтезирован ряд новых 3,5-замещенных изоксазолов и выявлена их антиагрегационная активность. Было показано, что 5-замещенные 3-пиридилизоксазолы проявляют антиагрегационную активность *in vitro* в диапазоне концентраций $10^{-6} \div 10^{-4}$ М под влиянием арахидоновой кислоты, не являются токсичными веществами, и, возможно, могут быть антагонистами рецептора тромбоксана A₂.

В данной работе, выполняемой ИБХФ РАН совместно с кафедрой Биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ, для выяснения механизма действия соединений класса 3,5-замещенных изоксазолов и выявления перспектив дальнейшей разработки был синтезирован ряд новых веществ класса 5-замещенных 3-пиридилизоксазолов и их 4,5-дигидропроизводных, а также их биоизостеры – 5-замещенные 3-пиридил-1,2,4-оксадиазолы. Для синтеза соединений класса изоксазолов и их 4,5-дигидропроизводных была использована модифицированная нами методика [3+2]циклоприсоединения нитрилоксидов к алкинам или алкенам с варьированием заместителей по С5-положению изоксазольного или изоксазолинового кольца и сохранением по С3-положению 2-, 3- или 4-пиридинового фрагмента в качестве заместителя. Для получения 5-замещенных 3-пиридил-1,2,4-оксадиазолов использовали реакцию ацилирования исходного амидоксима хлорангидридом кислоты с последующей циклизацией соответствующего О-ациламидоксима в присутствии фторида тетрабутиламмония как катализатора. Нами было проведено тестирование этих веществ на антиагрегационную активность *in vitro* при использовании ряда индукторов агрегации – арахидоновой кислоты, ADP, адреналина, U46619 и фактора активации тромбоцитов по стандартизированной методике на агрегометре «Биола» на образцах плазмы крови человека, обогащенной тромбоцитами, и на образцах суспензий отмытых тромбоцитов человека. Было показано, что данные соединения не являются ингибиторами тромбина (совместно с ГНЦ МЗСР).

Полученные экспериментальные данные позволили уточнить, на какой участок сигнальной цепи действуют указанные ингибиторы агрегации, выявить фармакофорный фрагмент молекул 5-замещенных 3-(3-пиридил)изоксазолов и их биоизостеров. Показано, что все соединения подавляют агрегацию тромбоцитов в диапазоне концентраций $10^{-6} \div 10^{-4}$ М, что антиагрегационная активность 5-замещенных 3-пиридилизоксазолов выше, чем у 4,5-дигидропроизводных и биоизостеров.

Данная работа была частично поддержана грантом РФФИ № 09-04-01003а и государственным контрактом 16.740.11.0177 в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы».

ДИТЧЕНКО Т.И., БАЛУХО А.В.

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ИММОБИЛИЗАЦИИ КЛЕТОК СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ ЭХИНАЦЕИ ПУРПУРНОЙ

Одним из перспективных направлений биотехнологии растительной клетки является получение вторичных метаболитов для фармацевтической и пищевой промышленности, парфюмерии, а также сельского хозяйства. За последние десятилетия в этой области достигнуты значительные успехи. Однако для промышленного использования культур растительных клеток с целью получения широкого спектра биологически активных соединений необходимо учитывать, что растительные клетки в культуре значительно отличаются от клеток микроорганизмов, поэтому новейшие способы ферментации, разработанные для последних, в большинстве случаев не годятся для культивирования растительных клеток. Одним из подходов, направленных на решение указанной проблемы является проведение иммобилизации клеток растений, т.е. их заключение в защитную полимерную матрицу. Для крупных растительных клеток наиболее подходящим методом иммобилизации является включение в гель. При этом клетки замедляют свой рост, но могут длительное время продуцировать необходимые вещества, выделяя их в среду для культивирования.

Целью настоящей работы явилась оптимизация процедуры иммобилизации клеток суспензионной культуры эхинацеи пурпурной (*Echinacea purpurea* L.) в гранулы Са-альгинатного геля на основе варьирования концентрации альгината натрия и хлорида кальция.

Объектом исследований служила суспензионная культура эхинацеи пурпурной, которая была получена из каллусов рыхлого типа. В работе использовали питательную среду по прописи Мурасиге и Скуга с добавлением фитогормонов: 0,2 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, 2,0 мг/л β -индолил-3-уксусной кислоты и 0,5 мг/л кинетина. Культивирование иммобилизованных в Са-альгинатные гранулы клеток, также как и свободных клеток (контроль), осуществляли в конических колбах на качалках ротационного типа в термостате в темноте при температуре 25°C.

Проведение процедуры иммобилизации включало использование альгината натрия в концентрациях 2 либо 3%, а также хлорида кальция в концентрациях 0,25 либо 0,5 М. Для определения сухой массы иммобилизованных клеток и внутриклеточного содержания фенольных соединений (ФС) в пересчете на феруловую кислоту производили их высвобождение из носителя, что достигалось растворением Са-альгинатного геля в 0,1 М растворе цитрата натрия.

Установлено, что иммобилизация приводила к сильному ингибированию ростовых процессов исследуемой суспензионной культуры. При этом испытанные концентрации альгината натрия и хлорида кальция не оказывали заметного влияния на величину ингибирующего эффекта. Следует отметить, что во всех 4 вариантах проведения процедуры иммобилизации Са-альгинатные гранулы сохраняли свою целостность в течение ростового цикла, а иммобилизованные клетки, несмотря на значительное ингибирование их роста, оставались жизнеспособными.

Иммобилизация клеток на основе 3%-го альгината натрия вызывала более выраженное стимулирующее воздействие на внутриклеточное содержание ФС по сравнению с 2%-ым альгинатом. Наиболее заметное увеличение содержания анализируемых вторичных метаболитов происходило при иммобилизации клеток суспензионной культуры эхинацеи в 3%-ом альгинате с использованием 0,5 М CaCl_2 .

Определение количества ФС в среде инкубации клеток показало значительное увеличение экскреции ФС иммобилизованными в Са-альгинатные гранулы клеток по сравнению со свободными клетками. Это свидетельствует о пригодности суспензионной культуры эхинацеи пурпурной в качестве объекта для иммобилизации в Са-альгинатном геле, поскольку использование клеточных культур, которые не способны осуществлять эффективную экскрецию вторичных метаболитов в иммобилизованном состоянии, малоэффективно для организации биотехнологического процесса получения и выделения целевых продуктов. Установлено, что количество экскретируемых ФС достаточно сильно зависит от концентрации хлорида кальция, используемой для формирования Са-альгинатных гранул. В вариантах с 0,5 М CaCl_2 содержание ФС в среде инкубации иммобилизованных клеток было практически вдвое выше по сравнению с 0,25 М CaCl_2 .

Таким образом, согласно полученным данным наиболее эффективным способом иммобилизации клеток суспензионной культуры эхинацеи пурпурной является

использование 3%-го альгина натрия и 0,5 М хлорида кальция, поскольку при этом отмечается не только наиболее высокое внутриклеточное содержание вторичных метаболитов фенольной природы, но и их выделение в среду инкубации иммобилизованных клеток.

ДОЛОТКАЗИНА А.В., РОМАНОВА М.А., АТЫКЯН Н.А.

Мордовский государственный университет им. Н.П.Огарёва, Саранск, Россия

ВЛИЯНИЕ АНТИСЕПТИКОВ НА ОБСЕМЕНЕННОСТЬ СУСЛА

Для борьбы с микробной контаминацией в спиртовой промышленности применяются различные методы: использование ультразвукового, инфракрасного и гамма-излучений. Недостатками этих способов является высокая стоимость, усложнение технологической схемы, низкая производительность облучающих установок. Наиболее эффективным способом является введение в зерновое сусло антисептика (например, антибиотиков).

Цель данной работы – определение степени дезинфицирующего действия антисептиков «Бетасепт А» и «Бетасепт Б» (на основе аминопенициллановой кислоты) на сусло.

Данное исследование включало в себя два этапа: определение общей обсемененности зернового сусла без добавления антисептиков и с добавлением антисептика.

Пробы отбирались после 30 минут водно-тепловой обработки и по истечению 60 минут осахаривания. В процессе приготовления сусла использовали ферментные препараты α -амилазы, ксиланазы и глюкоамилазы.

По методу последовательных разведений (метод Коха) пробы разводились в 10^{10} раз. Высев проводили на питательные среды Сабуро для выявления дрожжеподобных и грибных форм и питательный агар (среда № 1) для выявления бактериальных форм. Через сутки проводился подсчет колоний и морфологическая идентификация.

На чашках со средой №1 наблюдали колонию (№1), окраска по Граму которой показала наличие грамотрицательных кокков, объединенные в тетрады. Предположительно это микроорганизмы из рода *Sarcina* sp.

Высев на среду Сабуро не выявил обсеменения грибами.

Таким образом, степень обсемененности разваренной массы бактериями равна $1 \cdot 10^6$ колоний/мл.

Микробиологический анализ сусла после осахаривания показал наличие трех колоний. Окраска по Граму колонии №2 показала, что это грамположительные палочки с обрезанными концами. Предположительно это, стрептобактерии неспорообразующие. Окраска по Граму колонии №3 показала, что это грамотрицательные палочки спорообразующие. Можно предположить, что эти организмы относятся к порядку *Clostridiales*.

Окраска по Грамму колонии №4 показала, что это грамотрицательные микрококки. Таким образом, степень обсемененности микроорганизмами равна $3 \cdot 10^6$ колоний/мл.

Второй этап исследования включал определение степени действия антисептика «Бетасепт А» и «Бетасепт Б». Антисептик добавляли на стадии осахаривания после 30 минут водно-тепловой обработки. Общая продолжительность процесса приготовления сусла 90 минут. Разведение и высев на среды проводили аналогично первому этапу исследования. По истечению одних суток обнаружена одна колония на чашке со средой Сабуро. Под микроскопом были видны палочки с утолщением на концах. Окраска по Грамму показала, что это грамположительные микроорганизмы. Предположительно это стрептобациллы. Таким образом, степень обсемененности микроорганизмами равна $1 \cdot 10^5$ колоний/мл.

Проанализировав результаты можно сказать, что применение антисептика в низкотемпературной технологии обработки зернового сырья значительно снижает микробную контаминацию.

ДРАГАВЦЕВ В.А.

Агрофизический институт РАСХН, Санкт-Петербург, Россия

ЭКОЛОГО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПРИРОДА СВОЙСТВ ПРОДУКТИВНОСТИ РАСТЕНИЙ И ПУТИ СОЗДАНИЯ ИННОВАЦИОННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ СЕЛЕКЦИИ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ УРОЖАЕВ

В период 1984-2012 гг. группой исследователей была создана теория эколого-генетической организации количественных признаков (ТЭГОКП) [1, 2] и развиты теоретически и экспериментально 24 следствия из нее [3, 4, 5, 6]. Главное положение теории: при смене лимитирующего рост растений фактора внешней среды меняется спектр и число генов, детерминирующих один и тот же количественный признак (КП). Показано, что признаки «интенсивность транспирации» и «интенсивность фотосинтеза» в течение суток детерминируются поочередно двумя и тремя разными спектрами генов, соответственно. Механизм этого явления сейчас стал вполне очевиден. Известно [7], что общее количество генов, экспрессируемых в клетках человека, около 24000, из которых 11000 экспрессируются в клетках любого типа. Если этот принцип справедлив для растений, то очень легко объяснить результаты следующих опытов. Если два сорта пшеницы – один с геном Lr (устойчивости к бурой ржавчине), другой – без этого гена – высадить на делянке, зараженной бурой ржавчиной, то у первого сорта только продукт одного гена Lr – фитоантисипин – будет «подпирать» признаки продуктивности, а у второго сорта эти признаки будут развиты очень слабо. При скрещивании этих сортов на фоне бурой ржавчины в поколении F₂ мы получим расщепление по признакам продуктивности 3 : 1 – результат влияния продукта одного гена, хотя параллельно с ним экспрессируются тысячи других генов. На фоне без ржавчины моногенная детерминация признаков продуктивности исчезает, их наследование становится полигенным. Таким образом, лим-фактор среды «заставляет» влиять на признак продукты тех генов, которые обеспечивают наибольшую адаптивность данного генотипа к данному лим-фактору.

Кэксер [8] в своем докладе на симпозиуме в Бристольском университете в 1959 году подчеркнул: «Я, конечно, знаю, что вся генетика основана на предположении о высокой точности и воспроизводимости действия генов. Такое ложное предположение могло возникнуть из-за того, что нет никаких доказательств, подтверждающих, что в

генетических экспериментах измеряется именно первичное действие генов... Результаты развития могут определяться не генами, а кинетической структурой системы» (С.61). И далее: «В процессе индивидуального развития (а свойства продуктивности не наследуются, а развиваются в онтогенезе, В.Д.) гены следует рассматривать не как диктаторов, а скорее как государственных служащих, выполняющих свою работу в рамках определенных традиций» (С. 63).

ТЭГОКП подтвердила позицию Кэксера. Клетку растения можно сравнить с осажденной крепостью, в которой работают бригады скромных оружейных мастеров (генов). Одна бригада делает винтовки, другая – пулеметы, третья – пушки, четвертая – пули и снаряды. Но какие продукты этих оружейников будут применены при обороне крепости – это определяет противник (конкретный лим-фактор среды). Если на крепость наступает пехота – стреляют винтовки, если конница – пулеметы, если танки – то пушки. Блоки генов (оружейные бригады) – это не генералы, отдающие жесткие приказы какой величины должен быть признак продуктивности, а скромные мастера, делающие свой оружейный продукт, который либо «выходит» на борьбу с противником (лим-фактором среды), либо нет – это определяется только спецификой противника, т.е. спецификой лим-фактора среды.

Главные следствия из ТЭГОКП: расшифрованы механизмы формирования и созданы методы прогноза: 1) эффектов взаимодействия генотип-среда (ВГС), 2) трансгрессий, 3) экологически зависимого гетерозиса, 4) знаков и уровней генотипических и экологических корреляций, 5) сдвигов доминирования, 6) гомеостаза продуктивности, 7) нормы реакции. Созданы методы управления амплитудой генотипической изменчивости КП и числом генов, «выходящих» на КП. Показано, что эколого-генетическая природа сложного КП не может быть описана языками менделевской, биометрической и молекулярной генетик. Только язык ТЭГОКП строго описывает поведение сложных КП в эволюции и селекции.

Уровни продуктивности и урожая растений определяются не генами КП, а эффектами ВГС, которые являются эмерджентными свойствами высоких уровней организации жизни (онтогенетический, популяционный, фитоценотический) и отсутствуют на молекулярном уровне. Механизм ВГС подробно изучен с позиций ТЭГОКП и окончательно выяснен. ВГС - это смена наборов продуктов генов, влияющих

на признак, при смене лим-фактора внешней среды.

Вопреки прозвучавшим в 70-х годах призывам академика В.А. Энгельгардта о необходимости разворота биологии от редуccionизма к синергизму, история биологии распорядилась по другому: все главные организационные усилия и средства были брошены в молекулярную биологию и генетику. Это было слепое копирование научных трендов США и Европы, в результате чего в РАН в бюджете 2012 г. на программу «Молекулярная и клеточная биология» (МКБ) выделен 191 млн. рублей. Газета «Поиск» № 3 от 20.01.12, с. 3 пишет: «так сложилось исторически, и ни у кого рука не поднимается это положение менять». Академик Г. Месяц (там же) выражает «недоумение постоянными требованиями координатора МКБ академика Г.П. Георгиева еще больше увеличить финансирование программы. Нельзя же выделять на МКБ все конкурсные средства».

Сегодня многие государства дают огромные суммы на геномику и протеомику, но ни в одном НИИ (и в России и за рубежом) пока еще нет ни одной лаборатории, разрабатывающей тему: «Расшифровка механизмов ВГС и создание методов прогноза ВГС для выведения новых урожайных сортов растений». Между тем, самый мощный вклад в эколого-генетическое повышение урожаев могут дать только эффекты ВГС. Если сорт озимой пшеницы Безостая 1 (селекции акад. П.П. Лукьяненко) вырастить под Москвой, то он даст 10 ц/га. На Кубани он легко дает до 100 ц/га, т.е. ВГС способно повысить урожай на 1000 %. Традиционные генетические механизмы аналитической и синтетической селекции (каждый в отдельности) могут поднять урожай лишь на 5 – 10 %. Шведский сорт яровой пшеницы Ранг, интродуцированный в Тюменскую и Омскую области в 60е годы, обогнал по урожаю на 30-40 % стандартные сорта и был тут же районирован. Эвкалипт из Австралии, привезенный в Уругвай, ускорил свой рост почти в 2 раза. Это – эффекты ВГС. За счет ВГС на Сахалине реализуется гигантизм кормовых трав (в Европе они – по колено, на Сахалине скрывают всадника с лошадью).

ТЭГОКП показала, что традиционные подходы молекулярной генетики (MAS, QTL) вряд ли смогут серьезно помочь эколого-генетическому приращению урожая в процессе селекции, тем более, что генетики, развивая в течение 147 лет (от Г. Менделя) свою науку, так и не нашли специфических генов продуктивности, величины урожая, горизонтального иммунитета, гомеостаза урожая (пластичности сорта), засухо-, зимо-, жаро-, холодоустойчивости и т.д., не локализовали их, не выделили, не клонировали, не

секвенировали и не определили их продукты. Причины этого объяснил крупнейший молекулярный генетик Гюнтер Стент [9] еще в 1974 г.: «Поиски «молекулярного» объяснения сознания являются напрасной тратой времени, поскольку физиологические процессы, ответственные за это ощущение, задолго до того, как будет достигнут молекулярный уровень, распадутся до ординарных рабочих реакций, не более или менее удивительных, чем процессы, происходящие, например, в печени». Хотя с ним и не согласен директор Курчатовского Центра М. Ковальчук: «Для изучения природы сознания необходимо понимание молекулярных процессов», однако, все знания системной биологии сегодня говорят только в пользу Г. Стента. Недаром США выделили в 2012 г. на программу «Коннектом» (расшифровку полной структуры нейронных связей и их лабильных сдвигов между 100 млрд. нейронов в мозге человека) миллионы долларов. «Коннектом» - более амбициозный проект, чем «Геном человека», а ведь по сути – это изучение феномена ВГС – лабильной структуры связей между нейронами под воздействием внешних факторов и отнюдь не на молекулярном уровне («Поиск», № 4, от 27.01.12).

Подобно тому, как невозможно изучать сознание на молекулярном уровне, невозможно изучать на том же уровне самый мощный «рычаг» повышения урожая растений – ВГС, которое бесследно исчезает на молекулярном уровне, подобно сознанию, являясь эмерджентным свойством, возникающим при взаимодействии продуктов генов с лабильными в течение суток, недель, месяцев лим-факторами среды и только на высоких уровнях организации жизни: организменном, популяционном, экологическом, фитоценоотическом.

Все генетические операции с «большими» генами Г. Менделя, включая трансгеноз, способны помочь повышению продуктивности и урожая только в тех случаях, когда «большой» ген в строго определенной среде «выходит» на детерминацию свойства продуктивности. К сожалению, менделевских генов в геномах растений найдено очень мало – всего 1 – 3 % от суммарного объема генов родового генома. Продукты оставшихся 97 % генов находятся в сложнейших взаимодействиях друг с другом, но главное – с меняющимися лим-факторами внешней среды.

У трансгеноза, который сегодня может работать только с «большими» генами Г. Менделя, нет мощных стратегических перспектив создать надежные молекулярно-

генетические технологии управления сложными, экономически важными КП. Такие технологии создала ТЭГОКП, и они уже успешно работают в более чем 30 российских и зарубежных генетических и селекционных центрах.

Литература

1. Драгавцев В.А., Цильке Р.А., Рейтер Б.Г. и др. Генетика признаков продуктивности яровых пшениц в Западной Сибири. Изд. «Наука» СО АН, Новосибирск, 1984, 230 С.
2. Драгавцев В.А., Литун П.П., Шкель Н.М. и др. Модель эколого-генетического контроля количественных признаков растений. // Доклады АН СССР, 1984, Т. 274, № 3, С. 720-723.
3. Драгавцев В.А. Эколого-генетический скрининг генофонда и методы конструирования сортов с/х растений по урожайности, устойчивости и качеству. Изд. ВИР, СПб, 1998, 52 С.
4. Кочерина Н.В., Драгавцев В.А. Введение в теорию эколого-генетической организации полигенных признаков растений и теорию селекционных индексов. АФИ, СПб, изд. Центр «Дон Боско», 2008, 86 С.
5. Теория эколого-генетической организации количественных признаков. // Толковый словарь терминов по общей и молекулярной биологии, общей и прикладной генетике, ДНК-технологии и биоинформатике, М. «Академкнига», М, «Медкнига», 2008, Т. 2, С. 308.
6. Чесноков Ю.В., Почепня Н.В., Бёрнер А., Ловассер У., Гончарова Э.А., Драгавцев В.А. Эколого-генетическая организация количественных признаков растений и картирование локусов, определяющих агрономически важные признаки у мягкой пшеницы. // Доклады РАН, 2008, Т. 418, № 5, С. 1-4.
7. Alberts B., Bray D., Lewis Ralff M., Roberts K., Watson J. Molecular biology of the cells. Ed. By Robertson, Garland, New York, 1994, 369 P.
8. Кэксер Г. Кинетические модели развития и наследственности. //Моделирование в биологии, ИхЛ, М, 1963, С. 42-64.
9. Стент Г. Молекулярная генетика, ИхЛ, М, 1974.

ДУБОВСКАЯ Л.В.¹, ВАШКЕВИЧ И.И.¹, ГУСИНА Н.Б.²,
НАУМЧИК И.В.², СВИРИДОВ О.В.¹

¹ ГНУ «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси»,
Минск, Республика Беларусь

² ГУ «Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя»,
Минск, Республика Беларусь

НАБОРЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВОБОДНОЙ БЕТА-СУБЪЕДИНИЦЫ ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА И АССОЦИИРОВАННОГО С БЕРЕМЕННОСТЬЮ БЕЛКА-А ПЛАЗМЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА В ДИАГНОСТИКЕ СИНДРОМОВ ДАУНА И ЭДВАРДСА

Согласно статистическим данным частота врожденных и наследственных заболеваний среди новорожденных составляет 4-5%. Поэтому особое значение приобретает профилактика и пренатальная диагностика данной группы заболеваний. Наиболее важным является выявление синдрома Дауна, как наиболее часто встречаемой патологии, связанной с трисомией по 21 хромосоме, совместимой с живорождением и приводящей к тяжелой инвалидизации в постнатальном периоде. В недалеком прошлом основным методом пренатальной диагностики данного заболевания являлось кариотипирование плода после инвазивного вмешательства и получения плодного материала. Основным показанием для проведения данной процедуры является возраст беременной (35 и более лет). Но амниоцентез и биопсия хориона повышают риск спонтанных абортов. Анализ распределения беременных по возрастному критерию показал, что основная часть женщин входит в группу до 35 лет. Поэтому проведение кариотипирования в возрастной группе старше 35 лет позволяет выявить не более 30% случаев рождения детей с синдромом Дауна. Для максимально полного выявления группы риска беременных с хромосомными патологиями плода наиболее эффективным является комплексный пренатальный скрининг, включающий ультразвуковое обследование и определение биохимических маркеров при тотальном обследовании всех беременных.

Пренатальный скрининг во втором триместре беременности проводят, используя в качестве биохимических маркеров альфа-фетопротеин, общий хорионический гонадотропин или свободную бета-субъединицу ХГЧ (св.бета-ХГЧ), с учетом или без

учета неконъюгированного эстриола. Эффективность такого скрининга не превышает 70%. При проведении пренатального скрининга в первом триместре беременности определяют концентрацию св.бета-ХГЧ и ассоциированный с беременностью белок-А плазмы (ПАББ-А). Эффективность проведения пренатального скрининга в сроке 11-13 недель беременности достигает 80% при 3-5% ложноположительных результатов. Назрела необходимость в разработке экономически более доступных и более простых в использовании диагностических наборов для определения перечисленных выше биохимических маркеров.

Нами разработаны технологии производства двух наборов для определения методом лантанидного иммунофлуориметрического анализа в сыворотке крови человека св.бета-ХГЧ и ПАББ-А – «ЛИФМА-св.бета-ХГЧ» и «ЛИФМА-ПАББ-А». Данные диагностикумы позволяют определять маркеры в широком динамическом диапазоне (св.бета-ХГЧ от 2 до 200 нг/мл, ПАББ-А от 40 до 10000 мМЕ/л) с высокой эффективностью (коэффициент вариации не более 8%) и чувствительностью (св.бета-ХГЧ – не более 0,3 нг/мл, ПАББ-А – не более 10 мМЕ/л). Конструкция наборов разработана на основе метода «сэндвич» анализа с использованием пары мышинных моноклональных антител к двум независимым антигенным детерминантам на поверхности определяемого маркера. По одному из эпитопов анализируемый белок взаимодействует с моноклональным антителом, модифицированным биотином и биоспецифически иммобилизованным на внутренней поверхности лунки. По второму эпитопу определяемый белок взаимодействует со вторым моноклональным антителом, меченным органическим комплексом ионов европия. Определение св.бета-ХГЧ происходит в две стадии, ПАББ-А – в одну. Проведение анализа максимально упрощено и не требует предварительной подготовки сывороток (разведение) или иммуносорбента (иммобилизация биотинилированного моноклонального антитела). Содержание св.бета-ХГЧ и ПАББ-А, определенное в сыворотках крови 1500 женщин первого триместра беременности, разработанными наборами ЛИФМА-св.бета-ХГЧ, ЛИФМА-ПАББ-А в высокой степени коррелирует с данными, полученными наборами DELFIA PAPP-A, DELFIA hAFP/Free hCG β Dual фирмы PerkinElmer ($r > 0,94$, $r > 0,96$). Схожие результаты получены при характеристике сывороток с установленным диагнозом синдрома Дауна (св.бета-ХГЧ – $r > 0,945$, ПАББ-А – $r > 0,982$).

Таким образом, использование разработанных наборов эффективно для проведения пренатального скрининга в первом триместре беременности для выявления группы риска беременных с синдромами Дауна и Эдвардса у плода, наборы просты в использовании и имеют более низкую стоимость в сравнении с аналогами.

ДУРНЕВ Е.А., СИНЦОВ К.Н.

ФГБОУ Вятский государственный университет, Киров, Россия

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СКАНИРУЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ ПРИ СКРИНИНГЕ ЛИГНИНОЛИЗИРУЮЩИХ МИКРОМИЦЕТОВ

Лигниновые отвалы являются отходом гидролизно-спиртового производства. Они создают серьезную экологическую угрозу обширного загрязнения прилегающих к предприятиям территорий. На сегодняшний день актуальна задача поиска и селекции новых природных микробных продуцентов лигнинолитических и целлюлозолитических ферментов. Для идентификации микромицетов-деструкторов лигнина, установления специфики их строения и развития, а также некоторых цитохимических и физиологических особенностей проводят микроскопические исследования. Одним из способов изучения морфологических свойств микроорганизмов является сканирующая электронная микроскопия (СЭМ).

В работе были исследованы образцы культур микромицетов выделенные из отходов гидролизно-спиртового производства ООО "БиоХимЗавод".

С чашки Петри с 3-х суточной культурой грибов выращенных на плотной питательной среде (картофельный агар, селективные питательные среды) вырезали блок среды с образцом размером 10мм×10мм. С полученного блока делали поперечный срез размером 1мм×10мм и переносили его на подложку для СЭМ. Далее проводили высушивание образца в лиофильной сушилке.

Высушенный образец закрепляли на подложке с помощью двустороннего токопроводящего углеродного скотча, и проводили напыление платины. Режим нанесения напыления: без использования инертного газа; толщина наносимого слоя 8 нм; сила тока 30 мА; время напыления 30 секунд.

Подготовленный образец исследовали методом СЭМ при следующих контролируемых параметрах: ускоряющее напряжение – 15 кВ; рабочее расстояние – 18 mm; размер фокусного пятна – 30 %; режим вакуума – глубокий вакуум.

Исследованные микроорганизмы были идентифицированы как *Penicillium citreoviride* Biourge, *Phialophora repens* Davidson, *Paecilomyces Bainer*, *Penicillium citrinum* Thom, *Fusarium oxysporum* Snyder et Hansen.

Сочетание методов СЭМ, световой микроскопии и изучение культуральных свойств микромицетов позволило повысить точность их идентификации до вида.

ДУНИЧ А.А., ТАРАН О.П., ДАНИЛОВА Е.И., МИЩЕНКО Л.Т.

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

НОВОЕ ВИРУСНОЕ ЗАБОЛЕВАНИЕ РАСТЕНИЙ ТОМАТОВ

Изучению вирусных заболеваний овощных культур уделяется много внимания во всех странах мира. Это обусловлено широким распространением патогенов и их большой вредоносностью. Среди овощных культур одно из первых мест в обеспечении населения продуктами овощеводства принадлежит томатам. Вирусы ежегодно наносят большой ущерб этим растениям, уменьшая урожай и ухудшая их качество. Без защиты растений невозможно рассматривать вопрос о повышении продуктивности сельскохозяйственных растений. Высокая эффективность любого способа защиты растений может быть обеспечена за счет глубокого исследования процессов, которые обуславливают характер развития заболевания и, конечно же, детального изучения свойств его возбудителя.

В ходе наших исследований, проведенных ранее, нами выявлены растения томатов (*Lycopersicon esculentum* Mill.) сортов Дары Заволжья, Яблонька России, Новичек, Соляроссо F₁, Пародист, Любимый, Ouson, Амурская заря, Маэстро, Хурма, Подмосковные ранние, Донбасс, Фатима, Воронежский ранний, Регионы, Ликурич, Деборао, Early north, Дружба, Ранняя любовь, Колокола с симптомами скручивания листьев в виде «лодочки вверх», которые ранее не описывались в Украине. Растения были инфицированы Y-вирусом картофеля (YVK). Этот патоген вызывает эпидемии многих культур, в том числе и пасленовых (картофеля, перца, томатов). Известно, что изоляты

одного и того же вируса могут отличаться размерами вирионов, кругом чувствительных растений, точкой температурной инактивации, массой капсидного белка и другими свойствами.

Классификация штаммов YBK сложная, так как разные группы классифицируются в зависимости от хозяина, из которого они были выделены. Существует гипотеза, что растения табака и томатов поражаются большинством и даже всеми штаммами YBK, в отличие от изолятов из картофеля и перца, которые характеризуются четкой специфичностью. На сегодня предложено 7 патотипов для томатных штаммов YBK, которые базируются на свойствах инфицировать разные генотипы растений томатов в природе.

Целью работы было изучить биологические и некоторые физико-химические свойства томатного изолята YBK. В работе использовали следующие методы исследований: визуальная диагностика, выделение и очистка вирусов, метод биологического тестирования, трансмиссионная электронная микроскопия, твердофазный иммуноферментный анализ (сэндвич-вариант), электрофорез белков в полиакриламидном геле по Laemmli.

На первом этапе работы проводили изучение биологических свойств томатного изолята YBK (YBK-to). По данным зарубежных авторов растения томатов, инфицированные PVY^O или PVY^C, характеризуются появлением деформации молодых листьев, которая сопровождается некрозами жилок, плоды без симптомов поражения. Что касается PVY^N, то он на этой культуре вызывает сильную мозаику с желтыми точками на главной жилке и беловатыми точками на плодах. На растениях, обследованных нами, ни одного из перечисленных симптомов не отмечено. Основным симптомом заболевания, вызванного YBK-to в Украине, является скручивание листьев.

При исследовании морфологии было установлено, что размеры вирусных частиц составляет $780 \pm 20 \times 13$ нм, то есть YBK-to имеет характерную для потивирусов нитевидную форму и отличается от известных картофельных изолятов своими размерами.

Нами установлено, что томатный изолят YBK отличается от известного кругом диагностических растений-индикаторов. Среди всех протестированных в работе индикаторов ответ на инокуляцию появлением локальных некрозов проявили только растения *Chenopodium quinoa*, что свойственно также и картофельным изолятам. А вот

известные в литературе томатные изоляты не вызывают симптомов на этих растениях-индикаторах.

Анализ капсидного белка показал наличие полипептида молекулярной массой 28 ± 1 кДа. За данными литературы к YVK входит капсидный белок, молекулярная масса которого около 30 кДа. По результатам других авторов масса этого белка составляет 29,6 кДа. Таким образом, для томатного изолята YVK, выделенного нами из растений, выращенных в Украине, характерна несколько иная молекулярная масса структурного белка.

Таким образом, применяя комплекс методов, нами изучены некоторые биологические и физико-химические свойства томатного изолята Y-вируса картофеля и выявлены некоторые отличия от уже известных штаммов. Ввиду появления новых заболеваний или штаммов, изолятов, особенно на полевых растениях, необходим непрерывный вирусологический контроль, селекция томатов и их гибридов на комплексную стойкость к наиболее вредоносным патогенам.

ДЬЯЧЕНКО О.В.¹, ЧЕРЕВАТЕНКО А.М.¹, ТАРЛАЧКОВ С.В.¹,

МАРИНИЧ Д.В.², ШЕВЧУК Т.В.¹

¹*Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино, Россия*

²*Республиканский научно-практический центр гематологии и трансфузиологии Минздрава Республики Беларусь, Минск, Беларусь*

АНАЛИЗ ОСОБЕННОСТЕЙ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКОГО МЕТИЛИРОВАНИЯ МАРКЕРНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГЕНОМА ЧЕЛОВЕКА ПРИ ЛЕЙКОЗАХ

Возникновение и прогрессия онкологических заболеваний сопровождается различными эпигенетическими изменениями, затрагивающими регуляцию экспрессии множества генов. Несмотря на значительные успехи, достигнутые в лечении лейкоemий, существуют трудности в ранней диагностике и определении статуса заболевания в ходе

лечения. На сегодняшний день существует очень мало молекулярных диагностических маркеров, позволяющих оценить состояние лейкоемического процесса в определенный момент времени. Исследование роли энзиматического метилирования ДНК в процессе злокачественной трансформации клеток и опухолевой прогрессии важно для понимания молекулярно-генетической природы рака и может найти практическое применение в диагностике канцерогенных заболеваний.

Был проведен анализ уровня метилирования генома человека при развитии лейкозов различной этиологии и предлейкозных состояний. Образцы периферической крови пациентов с хронический миелоидным лейкозом на разных стадиях заболевания, а также здоровых доноров исследовали методом метилчувствительной полимеразной цепной реакции с использованием чувствительных и нечувствительных к метилированию CpG-сайтов эндонуклеаз рестрикции и высокоспецифичных праймеров к указанным сайтам исследуемого гена. Получены данные об особенностях метилирования отдельных генов: гена кальцитонина, гена множественной лекарственной устойчивости MDR-1, p21. Показана обратная зависимость между уровнем метилирования гена MDR-1 и степенью прогрессии хронического миелоидного лейкоза. Установлено повышение уровня метилирования промоторной области гена кальцитонина человека на фоне гипометилирования промотора гена MDR-1 при прогрессии заболевания. Показано гиперметилирование сайтов CCGG гена p21 при остром миелобластном лейкозе. Обнаружено, что при лейкозных заболеваниях уровень метилирования последовательностей CCWGG (W — A или T) промоторной области гена MDR-1 снижается, в то время как CCWGG-метилирование промоторной области гена кальцитонина остается неизменным. Формирование фенотипа лекарственной устойчивости опухолевых клеток более характерно для хронической формы лейкозных заболеваний, чем для острой.

Проведен анализ метилирования Alu-повторов, присутствующих в промоторной области гена MDR1. Исследование проводилось на образцах ДНК из культуры лимфоцитов здоровых доноров и пациентов, больных острым лимфобластным лейкозом и острым миелоидным лейкозом. Для обнаружения Alu-повторов в 5'-области промотора гена MDR1 применялся биоинформационный анализ. Данный фрагмент представляет собой одну из разновидностей Alu-повторов, обогащенную CCGG- и обедненную

CCGG-участками по сравнению с «каноническими» Alu-повторами. Сравнительный анализ метилирования 5'-области промотора гена MDR1, проведенный методом бисульфитного секвенирования, показал различия картины метилирования данной области между образцами с острым миелоидным и лимфоидным лейкозами. Обнаружено деметилирование CpG- и гиперметилирование CpHpG-сайтов в случае миелоидного лейкоза и противоположную картину в случае лимфоидного лейкоза.

Продукт гена MDR1 является одним из онкомаркеров. Формирование фенотипа множественной лекарственной устойчивости в настоящее время считается одним из важнейших факторов, препятствующих эффективной химиотерапии злокачественных заболеваний крови. Но генетические и эпигенетические причины возникновения этого фенотипа до сих пор неизвестны. Дальнейшие исследования роли сайт-специфического метилирования ДНК на различных стадиях канцерогенеза послужат базой для создания современных методов диагностики, контроля течения и эффективности терапии онкологических заболеваний на различных стадиях, при совокупной оценке прогноза лейкозиев и мониторинге заболеваний.

ДЬЯЧУК Т.И., АКИНИНА В.Н., ИТАЛЬЯНСКАЯ Ю.В.,
САФРОНОВА Н.Ф., ПОМИНОВ А.В., МЕДВЕДЕВА Л.П.

ГНУ НИИСХ Юго-Востока Россельхозакадемии, г. Саратов, Россия

КУЛЬТУРА ПЫЛЬНИКОВ У ЗЕРНОВЫХ ЗЛАКОВ: ВОЗМОЖНОСТИ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ МЕТОДА И ПРАКТИКА

Гаплоидные биотехнологии, основанные на использовании методов *in vitro* и обеспечивающие массовое получение растений, наиболее востребованы в селекционной практике. Основное селекционное преимущество использования диплоидизированных гаплоидов – одноэтапное получение гомозигот, что позволяет быстро фиксировать морфофизиологические параметры адаптивности и сокращать сроки создания сортов, отвечающих всем потребностям современного рынка. В официальных каталогах зарегистрированы сорта не только двудольных растений, которые долгое время были модельными в культуре тканей, но и зерновых злаков. Практическое применение в

селекции в НИИСХ Юго-Востока нашли два метода получения гаплоидных растений – культура пыльников и отдаленная гибридизация, сопровождающаяся селективной элиминацией хромосом вида-опылителя с последующим культивированием зародышей на искусственной питательной среде.

Гаплоидия в культуре пыльников индуцирована у мягкой и твердой пшеницы, тритикале и проса посевного. Изучены различные факторы, влияющие на эффективность гаплопродукции в культуре пыльников – генотипа, предобработок донорных растений, состава индукционных питательных сред. Ярко выраженная генотипическая специфичность и большая доля альбиносных растений – наиболее уязвимые места технологии культуры пыльников злаков. Выход альбиносных растений составил 23,4% у мягкой пшеницы, 79,1% - у твердой, 87,5% - у ячменя, у межвидовых гибридов мягкой пшеницы с тетраплоидами – более 80%.

Выявлено и цитологически доказано, что предобработка колосьев донорных растений пониженными положительными температурами не является триггером спорофитного развития микроспор – оно происходит и в пыльниках колосьев, не подвергавшихся действию этого стресса. Очевидно, само удаление колосьев с донорного растения является стрессом, который в сочетании с искусственным культивированием пыльников в условиях *in vitro* без других воздействий может вызывать репрессию гаметофитных генов и переключение программы на спорофитный путь развития.

Показана эффективность замены сахарозы на мальтозу в составе индукционных питательных сред для культивирования пыльников ячменя, пшеницы и тритикале, что привело к увеличению частоты регенерации зеленых растений у этих видов. Оптимизация технологии достигнута за счет использования жидких питательных сред, содержащих Фиколл-400. Сформировавшиеся на жидкой питательной среде эмбриониды являются точными копиями зиготических зародышей, их размер часто превышает размер самого пыльника, и регенерация растений начинается на 3-4 день на дифференцирующей питательной среде. Важным преимуществом жидких питательных сред является возможность культивирования целых цветков и даже колосков, что освобождает от трудоемкой процедуры вычленения пыльников.

Усовершенствованная технология культивирования пыльников позволила получить десятки тысяч гаплоидных растений различных видов, которые используются в селекционных программах.

На основе комплексного использования гаплоидной и традиционной селекции создан сорт яровой мягкой пшеницы Саратовская 64, находящийся в Госреестре охраняемых селекционных достижений с 2000 г. и по настоящее время. На Государственное сортоиспытание передан высокоурожайный, засухоустойчивый сорт озимого гексаплоидного тритикале Святозар, элитное растение которого получено в культуре пыльников. От получения ДН-линии и до передачи сорта на Государственное сортоиспытание затрачено всего 6 лет.

Электрофорез запасных белков сорта подтвердил стабильность и гомогенность сортов при длительном самоопылении. Гомогенные сорта гаплоидного происхождения характеризуются высокой засухоурожайностью в сочетании с другими хозяйственно-ценными признаками. Они конкурируют с традиционными селекционными сортами по адаптивности к засушливым условиям Юго-Востока Европейской части России.

ДЮЖИКОВА Н.А.¹, САВЕНКО Ю.Н.¹, БЕЛЯЕВ А.А.², ВАЙДО А.И.¹

¹ *Институт физиологии им. И.П.Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия*

² *Институт эволюции Университета Хайфы, Израиль*

МЕТИЛИРОВАНИЕ ПРОМОТОРА ГЕНА GRIN1 У КРЫС ЛИНИЙ С РАЗЛИЧНЫМ УРОВНЕМ ВОЗБУДИМОСТИ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ В УСЛОВИЯХ ДЛИТЕЛЬНОГО ЭМОЦИОНАЛЬНО-БОЛЕВОГО СТРЕССОРНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

В связи с все возрастающим интересом к исследованию эпигенетических механизмов регуляции экспрессии генов представляется актуальным выяснение значения метилирования ДНК в промоторной области генов с известной функцией (основной ген глутаматного NMDA рецептора – GRIN1) при реакции на психоэмоциональный стресс в зависимости от функционального состояния нервной системы. Ген GRIN1 (glutamate receptor ionotropic, N-methyl-D-aspartate (NMDA) subtype, subunit 1) кодирует ключевую

NR1 субъединицу NMDA рецептора, которому отводится особое значение в детерминации нейрональной возбудимости, синаптической пластичности (Cotman et al., 1987), реакции на стресс, а также в патогенезе ряда нервно-психических заболеваний (Charman, 1998; Bradford, 1995; Dingledine et al., 1990). Метилирование остатков цитозина в промоторной области генов приводит к стабильному подавлению их экспрессии. Возможно влияние на транскрипционные процессы за счет изменения эффективности связывания факторов транскрипции с регуляторными участками ДНК или ингибирования взаимодействия некоторых белков с ДНК в сайтах их связывания. Паттерн метилирования в промоторах детерминирует степень репрессии транскрипции. Влияние стресса на степень метилирования CpG в промоторной области гена GRIN1 не исследовалось. Цель работы: изучение метилирования ДНК на промоторе гена GRIN1 из зубчатой извилины гиппокампа крыс двух линий с высоким и низким порогом возбудимости нервной системы (ВП, НП) в норме и после действия длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия в соответствии со стохастической схемой К.Гехта (1972). Использовали бисульфитную модификацию ДНК (EpiTect Bisulfite Kit, QIAGEN) с последующей метил-специфической амплификацией (EpiTect MSP Kit, QIAGEN) с праймерами (GTTTAGGTGTTAAAGTAAGTAGCGT, ААТАААТТСААССААААААСГАА, TGGTTTAGGTGTTAAAGTAAGTAGTGT, ТТСТАСААТАААТТСААССАААААСАА) и электрофорез в агарозном геле. Показано, что стрессорное воздействие влияет на степень метилирования ДНК в промоторе гена GRIN1 в зависимости от уровня возбудимости нервной системы животных. Обсуждается необходимость последующего выделения, клонирования и секвенирования специфических метилированных фрагментов для определения их нуклеотидной последовательности и детализации молекулярно-генетических механизмов влияния психоэмоционального стресса на мозг и поведение.

ЕГОРОВА Д.О., ПЛОТНИКОВА Е.Г.

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук,
Пермь, Россия*

БИОКОНВЕРСИЯ ПОЛИХЛОРИРОВАННЫХ БИФЕНИЛОВ АЭРОБНЫМИ БАКТЕРИАЛЬНЫМИ ШТАММАМИ

Проблема загрязнения окружающей среды чужеродными для природы соединениями продолжает оставаться актуальной уже на протяжении нескольких десятилетий. Особо опасными являются вещества синтетического происхождения, обладающие высокими токсическими свойствами для живых организмов и устойчивые к разрушающему действию физических и химических факторов среды. К таким соединениям относятся вещества группы СОЗ (стойкие органические загрязнители), в том числе и полихлорированные бифенилы (ПХБ). Согласно Стокгольмской конвенции (2001г) ПХБ должны быть выведены из применения к 2015 году и полностью уничтожены к 2025 году. Однако, к моменту прекращения производства данных соединений, в окружающую среду поступило уже несколько сотен тонн ПХБ.

Очистка территорий, загрязненных ПХБ, осложнена как физико-химическими свойствами самих соединений, так и эколого-климатическими особенностями данных регионов. Известно, что химические и физические методы разрушения ПХБ высокочатратны с экономических и энергетических позиций. Любое нарушение технологии приводит к образованию еще более вредных и опасных соединений (полихлорированных дибензодиоксинов или дибензофуранов). К тому же, данные методы не применимы для восстановления загрязненных почв и донных осадков. Наиболее перспективными являются биологические методы рекультивации с использованием аэробных бактериальных штаммов. На эффективность биоремедиации оказывают негативное влияние экологические факторы окружающей среды. В связи с этим, особый интерес представляет поиск и изучение бактериальных штаммов, способных трансформировать ПХБ в условиях, приближенных к естественным.

В Институте экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН уже более 10 лет ведутся исследования по поиску и изучению аэробных бактерий, способных разлагать как

отдельные хлорбифенилы, так и их смеси в различных условиях культивирования. Создана лабораторная коллекция бактериальных штаммов (более 300 штаммов) различных таксономических групп, проявляющих активность как к отдельным хлорированным бифенилам с заместителями в *орто*- и *пара*- положениях, так и к их промышленным смесям («Совол», «Delog 103»). В коллекцию входят штаммы с уникальными деградационными характеристиками, в частности, *Rhodococcus ruber* P25 (патент РФ №2262531; Плотникова и др., 2012), *Rhodococcus* sp. В7а, *Microbacterium* sp. В51 (Егорова и др., 2003, 2010, 2011), осуществляющие минерализацию хлорированных бифенилов без накопления токсичных промежуточных продуктов.

Известно, что большинство аэробных бактериальных штаммов разлагают только низкохлорированные бифенилы. В наших исследованиях установлено, что наиболее активные штаммы-деструкторы, в том числе *Microbacterium* sp. В51, *R. ruber* P25, *Rhodococcus* sp. В7а, *Rhodococcus* sp. G12а (Егорова и др., 2011) эффективно разлагают хлорбифенилы с количеством заместителей в кольце выше трех и способны утилизировать смесь ПХБ с преобладанием тетра-ХБ (88%) в концентрации 100 мг/л за трое суток.

На основе коллекционных штаммов, выделенных из естественных источников (почвы, донные отложения) и не подвергавшихся генетической модификации, разработаны консорциумы, эффективно разлагающие ПХБ в модельных почвенных экспериментах. Так, консорциум штаммов *Microbacterium* sp. В51 и *Arthrobacter* sp. Н5 осуществляет минерализацию 2,4'-дихлорбифенила в концентрации 1 г/л (ПДК в питьевой воде – 1мкг/л, в почве – 0.03 мг/л) менее, чем за трое суток (Егорова и др., 2003). Консорциум штаммов *Rhodococcus* sp. В7а и *Rhodococcus* sp. G12а разлагают за два месяца в модельной системе (почва, температура культивирования +20°C) смесь тетра-ПХБ (280 мг/кг). Штаммы *Microbacterium* sp. В51 и *R. ruber* P25 при совместном культивировании осуществляют деструкцию 95% Совола (нач. конц. 100 мг/кг) в почве за три месяца (ПДК по Соволу для почвы 0.1 мг/кг).

Таким образом, выделенные бактерии-деструкторы ПХБ и разработанные на их основе бактериальные консорциумы перспективны для использования при биоремедиации ПХБ-загрязненных почв и при утилизации складированных не востребуемых промышленных смесей ПХБ.

Исследования поддержаны Программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» №01201256872, грантом РФФИ-Урал №11-04-96028-р_урал_а, междисциплинарным проектом УрО РАН №12-М-34-2036.

ЕГОРОВА З.Е.¹, КОЛОМИЕЦ Н.Д.²

¹*Белорусский государственный технологический университет, Минск, Беларусь*

²*Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь*

ПРИМЕНЕНИЕ АЛЬТЕРНАТИВНОГО МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО МЕТОДА ДЛЯ КОНТРОЛЯ ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ СРЕДЫ ПИЩЕВЫХ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ

В настоящее время особое значение приобретает контроль и оценка санитарно-гигиенических показателей различных объектов производственной среды (тара и укупорочные средства, цеховой транспорт и производственный инвентарь, руки и спецодежда персонала, воздух производственных помещений) предприятий пищевой и фармацевтической промышленности. Традиционно такой вид мониторинга основывается на результатах, полученных классическими микробиологическими методами. Однако длительность анализа и его высокая стоимость делают практически невозможным их применение в современных системах мониторинга, призванных обеспечить своевременное реагирование на возникшее отклонение от заданных требований. Ускоренный микробиологический контроль может быть произведен с помощью готовой к использованию лиофилизированной среды, нанесенной на тканевую (сетчатую) основу (например, «CompactDry»), которая является современной альтернативой традиционным чашкам Петри. Как показала международная практика, методы микробиологического контроля с использованием чашек «CompactDry» отличаются высокой скоростью, хорошей воспроизводимостью, высокой чувствительностью и являются более удобными по сравнению с классическими микробиологическими методами. Поэтому подтверждение достоверности результатов микробиологического контроля с помощью чашек с лиофилизированной средой «CompactDry» является актуальным вопросом для осуществления экспрессного микробиологического контроля производственных сред. В

данной работе представлены предварительные результаты стандартизации и валидации альтернативного метода микробиологического контроля.

Объектами исследования были поверхности технологического оборудования и воздух производственных помещений предприятий по переработке мяса, по розливу безалкогольных напитков и питьевой (минеральной) воды, комбината хлебопродуктов, хлебозавода, картофелеперерабатывающего и фармацевтического предприятий. В воздухе производственных помещений определяли количество мезофильных аэробных и факультативных микроорганизмов (КМАФАнМ), содержание плесеней и дрожжей, на поверхности технологического оборудования – КМАФАнМ и наличие бактерий группы кишечных палочек (БГКП).

Для определения микробиологических показателей применяли стандартизированные методы и чашки с лиофилизированной средой «CompactDry» (CompactDry TC, CompactDry EC, CompactDry CF, CompactDry YM). Определение чистоты воздуха производственных помещений с помощью чашек «CompactDry» осуществляли путем экспонирования открытой чашки в зоне обследования в течение 30-ти мин, затем вносили в ее центр 1 см³ стерильного физиологического раствора (0,9 %) и закрывали крышкой, соблюдая все правила асептики. Для количественного определения микробиоты поверхностей оборудования применяли ватные тампоны, которыми делали смывы с определенной площади оборудования. Использованные тампоны помещали в пробирку с 10 см³ стерильного физиологического раствора, тщательно встряхивали, отбирали 1 см³ исследуемого образца и помещали его в центр чашки с лиофилизированной средой «CompactDry». Термостатирование посевов на чашках с лиофилизированной средой «CompactDry» осуществляли в соответствии с указаниями изготовителя, затем подсчитывали все выросшие колонии, результат выражали в соответствии с требованиями СТБ ISO 7218-2010.

Результаты контроля чистоты воздуха и поверхностей технологического оборудования свидетельствовали о достаточно высокой сходимости данных, полученных стандартизированным и альтернативным методом микробиологического контроля, что подтверждает целесообразность применения на пищевых и фармацевтических предприятиях чашек «CompactDry» для мониторинга санитарно-гигиенического состояния производственной среды.

На основании полученных результатов (сравнении стандартизированных и альтернативного методов) разработан проект инструкции по количественному и качественному учету санитарно-показательных микроорганизмов с помощью сухих хромогенных сред «ComractDry» для пищевой промышленности.

ЕГОРОВА М.А., ХОРУНЖИЙ Г.Д.

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук,
Санкт-Петербург, Россия*

СВОЙСТВА ВЫЗВАННОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ ПЕРВИЧНОЙ СЛУХОВОЙ КОРЫ КАК ОСНОВА НЕЙРОНАЛЬНЫХ МЕХАНИЗМОВ КОРТИКАЛЬНОЙ ОБРАБОТКИ СЛУХОВОЙ ИНФОРМАЦИИ

Невзирая на неизменно высокий интерес к физиологическим исследованиям слуховой области коры млекопитающих, имеющиеся данные о ее функциональной организации на сегодняшний день представляются неполными. Тем не менее, в исследованиях слуховой области коры, проводившихся с применением разнообразных экспериментальных методик у представителей различных отрядов млекопитающих, была подтверждена обоснованность деления слуховой коры на структурно-функциональные субъединицы – первичные и вторичные слуховые поля (Rose, 1949; Rose, Woolsey, 1949; Woolsey, 1961; Merzenich et al., 1975; Imig, Reale, 1980; Gates, Aitkin, 1982; Aitkin et al., 1986; Stiebler, 1987; Redies et al., 1989; Stiebler et al., 1997; Wallase et al., 2000). В частности, у представителей всех исследованных видов было показано наличие первичного слухового поля (A1), отличающегося выраженными реципрокными связями с вентральными ядрами внутреннего колленчатого тела, существованием частотной настройки на тональные сигналы и тонотопическим представительством частот (Aitkin, 1990; Merzenich, Schreiner, 1992; Clarey et al., 1992). Для слуховой коры всех изученных видов высших млекопитающих было характерно наличие ещё одного первичного слухового поля, занимающего ростральное положение по отношению к полю A1, отличающегося чётко выраженной тонотопией и получившего название переднего слухового поля (AAF). Таким

образом, имеющаяся достоверная информация о функциональной специфике первичных полей слуховой коры связана, в основном, с особенностями топической организации частот в ней и основными характеристиками суммарной импульсной активности нейронов – характеристическими частотами, порогами и латентными периодами ответов на сигналы характеристической частоты, а также остротой частотной настройки. Свойства импульсной активности одиночных нейронов слуховой коры млекопитающих, а также строение их частотных рецептивных полей, на сегодняшний день остаются малоизученными. Имеющиеся данные о свойствах вызванной активности и особенностях частотных рецептивных полей нейронов первичной слуховой коры домашней мыши носят преимущественно феноменологический характер, хотя домашняя мышь на протяжении длительного времени является модельным объектом для изучения центральных механизмов обработки акустической информации.

Для создания целостной картины механизмов обработки слуховой информации нейронами слуховой коры нами было предпринято комплексное морфо-функциональное картирование частотно-временных свойств активности и параметров возбуждающих частотных рецептивных полей одиночных нейронов первичной слуховой коры (полей А1 и ААФ) домашней мыши в условиях поверхностной анестезии.

Полученные данные выявили принципиальные различия в фильтрующих свойствах и временных характеристиках разрядов нейронов слуховой коры и стволовых центров слуха. Среди исследованных нейронов первичных полей слуховой коры наблюдалось преобладание единиц с фазными характеристиками разряда (более 90% нейронов), отличавшихся широкой частотной настройкой; значительная часть популяции нейронов этого образования (32%) обладала мультипиковыми (комплексными) частотными рецептивными полями, отличавшимся наличием двух характеристических частот возбуждения (низко- и высокочастотной). Значения коэффициента Q_{10} , характеризующего остроту частотной настройки (добротность) нейрона, для слуховой коры составляли 0,4 – 7,3 (в среднем – 1,4). Достоверных отличий между нейронами полей А1 и ААФ по исследованным основным частотно-временным характеристикам их активности обнаружено не было. В то же время, ранее было показано (Вартанян и др., 2000; Егорова и др., 2002; Egorova et al., 2001), что в слуховом центре среднего мозга мыши (т.е. в центральном ядре заднего холма) практически отсутствуют нейроны с комплексными

частотными рецептивными полями (менее 6%) и преобладают единицы с тоническими характеристиками активности и узкой частотной настройкой. Значения Q_{10} этих нейронов варьировали от 1,3 до 43,8, составляя в среднем 9.

Таким образом, обнаруженное нами изменение основных частотно-временных характеристик активности у нейронов первичных слуховых полей, возможно, отражает смену принципов анализа слуховой информации в системе слуховые центры ствола мозга – слуховая кора.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 12-04-00969).

ЕРГУНОВА О.Т.

АНО ВПО «Региональный институт технологии и управления», Новочебоксарск, Россия

СПЕЦИФИКА МАРКЕТИНГОВОГО ПРОДВИЖЕНИЯ БИОРЕГИОНА НА ПРИМЕРЕ ЧУВАШСКОЙ РЕСПУБЛИКИ

В работе рассматриваются проблемы повышения конкурентоспособности биорегиона на основе применения принципов маркетинга, исследуются условия, необходимые для формирования маркетингоориентированного механизма управления биорегионом на современном этапе.

Становление и формирование экономики инноваций в регионах РФ, и следовательно, их инновационное развитие возможны только при условии перехода от инноваций как точечного явления к формированию национальной инновационной системы, создаваемой в процессе развития каждого региона. В условиях трансформационной экономики, инновационное развитие конкретного региона можно определить как прогрессивное развитие на основе преимущественного использования во всех сферах деятельности имеющихся или вновь создаваемых знаний и вытекающих из них инноваций, осуществляемое путем интеграции научно-технического потенциала во все процессы социально-экономического развития региона за счет реализации эффективной государственной политики стимулирования инновационной активности хозяйствующих субъектов как на федеральном, так и на региональном и местном уровнях путем реализации маркетинговых принципов. Однако отсутствие в настоящее время

конкретных направлений маркетингового стимулирования инновационной деятельности в законодательстве и практики применения маркетинговых инструментов существенно сдерживает развитие инновационного потенциала отечественной экономики, снижает уровень ее конкурентоспособности.

На современном этапе биотехнология признана приоритетным направлением развития инновационной экономики и в Российской Федерации. Это отмечено в Концепции долгосрочного социально-экономического развития Российской Федерации до 2020 года, в других программных документах и выступлениях руководителей страны. Несмотря на имеющееся отставание в биотехнологии, Россия обладает всеми необходимыми предпосылками и потенциалом, чтобы преодолеть его и войти в число мировых лидеров в области биоиндустрии. Кризисные явления в еще большей степени стимулируют развитие отечественной биоэкономики и позволяют решать такие проблемы, как развитие ресурсодефицитных территорий, повышение занятости, переход на использование возобновляемого сырья и др.

Чувашская Республика является одним из субъектов Российской Федерации, в котором активно поддерживаются и развиваются инновационные механизмы экономики, являющиеся основой для развития современной биотехнологии. За 2005 - 2011 годы в соответствии с программой "Развитие в Чувашской Республике био- и нанотехнологий" и стратегией «Чувашия – биорегион до 2020 года» создана база для развития фундаментальных и прикладных био- и нанотехнологий, коммерциализации разработок, обеспечивающих формирование в Чувашской Республике новых высокотехнологичных отраслей - био- и nanoиндустрии и позиционирование Чувашской Республики на рынке высокотехнологичной продукции.

В условиях жесткой конкуренции и роста издержек одной из предпосылок к формированию положительного имиджа инновационного комплекса территории является правильный выбор целей, задач и стратегий маркетинговой деятельности, присущих биорегиону. Именно в рамках регионального маркетинга становится возможным по результатам позиционирования на межрегиональном рынке результатов воспроизводственного процесса региональной экономики в целом — товаров и услуг инновационного комплекса биорегиона, определить уровень востребованности регионального биопродукта, его конкурентоспособность и его место в процессе

удовлетворения потребности потребителей посредством регионального биопродукта. Инновационно-технологический аспект регионального маркетинга предопределяет наличие энергосберегающего подхода в развитие экономики, глубокого использования имеющихся природных ресурсов, развития интеллектуального потенциала населения, уровня его образования, что в итоге приводит к повышению социально-экономического статуса региона и повышения уровня жизни населения.

Таким образом, можно заключить, что в рамках регионального маркетинга становится возможным формирование новых направлений в структуре биотехнологического производства, формирование которых становится возможным, исходя из исторически сложившейся производственной базы, кадрового потенциала, имеющихся биологических ресурсов и геополитического положения. Следовательно, маркетинг современного биорегиона в качестве основной своей задачи определяет развитие инновационных методов и подходов в развитии биорегиона, ориентированных на возможности внешней среды.

ЕРЕМЕЕВА Н.И.

Кемеровский государственный университет, Кемерово, Россия

ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ НАСЕЛЕНИЯ ПОЛУЖЕСТКОКРЫЛЫХ ПРОМЫШЛЕННОГО ГОРОДА

Полужесткокрылые насекомые известны как опасные вредители растений, некоторые хищные виды применяются в борьбе с вредными беспозвоночными. Они встречаются в экосистемах различной степени антропогенной деградации, в том числе урбанизированных, проявляют различные реакции на изменение экологической ситуации. Экологическую структуру населения полужесткокрылых изучали на различных разнотравно-злаковых лугах г. Кемерово – крупного промышленного центра Сибири. Рассматривали распределение видов по биотопическому преферендуму и спектры жизненных форм, что существенно дополняет фаунистические исследования.

В результате на территории города были обнаружены представители 5 биотопических групп. Преобладали луговые виды (33 вида) и эвритопы (22 вида). Группа

лесных видов представлена 16 видами, лугово-степных – 11 видами, степных – лишь одним видом. Подобное соотношение биотопических групп полужесткокрылых сохраняется и по численному обилию.

Отличия по видовому богатству биотопических групп на разных типах лугов связаны главным образом с наличием в населении луга редких и очень редких видов полужесткокрылых, т.к. состав массовых и большей части обычных видов различного биотопического преферендума на участках не отличался.

Среди полужесткокрылых выявлены специализированные (обитают только в травостое) и факультативные (обитают на деревьях и почве) хортобионты.

Для характеристики спектра жизненных форм полужесткокрылых на различных городских лугах были рассмотрены: 1) соотношение трофических групп; 2) набор жизненных форм; 3) соотношение спектров жизненных форм по видовому и численному обилию; 4) состав доминантных жизненных форм.

Установлено, что спектр жизненных форм полужесткокрылых в урбанизированных ценозах г. Кемерово представлен десятью группами 7 подклассов 3 классов: зоофаги, фитофаги и миксофитофаги; включает представителей от поверхностно обитающих форм до форм, освоивших травяной и древесно-кустарниковый ярусы. По видовому и численному обилию доминировали полужесткокрылые-фитофаги, составляющие по числу видов от 80,8 до 90 % на разных участках, а по численному обилию 85,5-91,7 % от общего числа особей. Из них преобладали облигатные хортобионты подкласса фитобиос (53 вида). В меньшей степени на разнотравно-злаковых лугах города встречались зоофаги (11 видов) и миксофитофаги (5 видов).

ЕРЕМЕЕВА Т.В., ВИНОГРАДОВА А.В.

*Пермский национальный исследовательский политехнический университет,
Пермь, Россия*

АККУМУЛЯЦИЯ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ Zn^{2+} И Cd^{2+} ШТАММОМ *CANDIDA UTILIS*

Интерес к аккумуляции металлов микроорганизмами увеличился в последние годы из-за беспокойства по поводу возможной передачи токсичных металлов из

микроорганизмов через пищевую цепь высшим организмам (включая человека), а также из-за большого потенциала микроорганизмов к удалению металлов из сточных вод.

Взаимодействие микроорганизмов с металлами зависит от окружающих условий, индивидуальных свойств металла или его соединений, их миграционных, сорбционных характеристик, комплексообразующей способности, токсичности и т. д.

Металлы оказывают двойственное влияние на живые клетки микроорганизмов. Многие из них участвуют в биохимических процессах внутри клетки и, поэтому, в определенных концентрациях являются необходимыми для нормального функционирования. В то же время металлы в избыточных концентрациях способны подавлять жизнедеятельность микроорганизмов: они блокируют ферментные системы, разрушают целостность клеточных стенок, смещают сбалансированные процессы метаболизма и т. д.

Учитывая, что *Candida utilis* являются продуцентами белка на различных средах, вопросы влияния и накопления металлов на биомассу являются актуальными с точки зрения эффективности биосинтеза и безвредности получаемой биомассы.

Дрожжи *Candida utilis* выращивались на синтетической питательной среде Ридер в качалочных колбах при температуре 36°C с числом оборотов качалки 180 об/мин. Ионы цинка и кадмия вносились в виде растворов солей $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $CdSO_4 \cdot 8H_2O$.

Построение кривых роста показало, что дрожжевая культура *C. utilis* на синтетической питательной среде Ридер имеет высокую удельную скорость роста, равную $0,48 \text{ ч}^{-1}$. Однако при внесении в питательную среду ионов цинка в концентрации 30 мг/л расчетная величина удельной скорости роста культуры *Candida utilis* снижается на 73,5%. При внесении ионов кадмия в концентрациях 10, 34 и 205 мг/л расчетная величина удельной скорости роста клеток снижается на 41,6%, 72,3% и 80,6% соответственно. Все это свидетельствует об отрицательном влиянии ионов тяжелых металлов на рост и размножение дрожжевых клеток.

Результаты экспериментов также показали, что кормовые дрожжи способны сорбировать ионы тяжелых металлов из водных растворов и культуральных сред.

Внесение ионов цинка и кадмия в дрожжевую суспензию, находящуюся в экспоненциальной фазе роста, показало, что металлы интенсивно сорбируются клетками в первые минуты контакта с постепенным снижением скорости их поглощения.

Так, за первые 30 мин контакта сорбируется 23,91 % от всего количества внесенного цинка и 42,65% от всего количества внесенного кадмия, всего же за 3 часа культивирования поглощение металлов составило 55,5 и 54,71 % соответственно.

Установлено, что в начальный период времени контакта металлы сорбируются компонентами клеточной стенки, а затем происходит их внутриклеточное накопление с участием мембранных переносчиков ионов.

Исследованы также вопросы аккумуляции этих металлов дрожжевыми клетками в присутствии других ионов и сахаров, влияния металлов на метаболизм дрожжей, отрабатываются вопросы снижения содержания металлов в готовом продукте.

ЕРКИН Ф.И.

Димитровградский инженерно-технологический институт – филиал Национального исследовательского ядерного университета «МИФИ», Димитровград, Россия

ЭВОЛЮЦИЯ И АГРОБИОГЕОЦЕНОЗЫ В XXI ВЕКЕ

В XXI веке вновь обострилась проблематика случайности и необходимости, в терминологии Ж. Моно отдельные виды являются картезианскими машинами¹. К их числу относятся колорадский картофельный жук (*Leptinotarsa decemlineata*), который является объектом внутреннего карантина. Он распространен в стране с 1972 года и единственным способом борьбы, как показывает практика человека, является система карантинных мер. Колорадский картофельный жук мутирует постоянно и сохраняется как картезианская машина а не гегелевская. Другими словами, аккультурные виды растений и насекомых являются в агробиогенозах стабильными и инвариантными.

Известно, что в процессе взаимодействия живого и неживого веществ образуется почва, обладающая особым свойством – плодородием, биопродуктивностью.

И поэтому, всегда особое значение имели системы земледелия, направленные на повышение почвенного плодородия, обеспечение роста и развития растений, производство

¹ См. Monod J. Le hazard et la necessite. Essai sur la philosophie naturelle moderne. Paris. 1970. s. 125

кормов для животноводства. Они осознавались, по мнению В.П. Нарцисова, как самые широкие системы ведения сельского хозяйства².

Между тем в Российской Федерации, принципиально изменилась организация территории и построение севооборота в сельском хозяйстве. Другими словами, агробиогеоценоз не стал воспроизводиться в системной форме. Эволюционно это обозначает замедление качественного преобразования природных систем в общественно-производственные - агробиогеоценозы. И поэтому культурные растения не могут в таких условиях проявить полностью свои возможности. Иными словами, нарушается принцип эквивалентности.

При этом, «зеленая революция» потребовала большого количества удобрений, гербицидов, высокого уровня общей профессионально-квалификационной подготовки крестьян в странах «третьего мира». Отсутствие необходимых профессиональных знаний, низкая культура земледелия земледельца – все это вместе взятое привело во многих странах к эрозии почв, к резкому росту вредителей культурных растений, к нарушениям экологической среды.

Однообразное возделывание ввезенных сортов зерновых культур привело к гибели ценнейших местных сортов, произошла эрозия ценного генетического материала – растений, произрастающих в «своих» природно-климатических условиях.

Другие ученые полагают, что развитие науки без изменения общественных отношений позволит решить глобальную продовольственную проблему.

К числу сторонников оптимистического научного направления решения продовольственной проблемы относится известный западный футуролог Э. Тоффлер.

По мнению Э. Тоффлера, генная инженерия будет широко использоваться в сельском хозяйстве. Она позволит уменьшить применение искусственных удобрений, получать высокие урожаи на песчаных или засоленных почвах, создавать новые пищевые продукты, равно, как и более простые, дешевые, не требующие больших затрат энергии, способа их переработки и хранения. Генная инженерия откроет перед нами возможность покончить с голодом на Земле.

Э.Тоффлер оговаривается, что к имеющимся проектам использования генетики в сельском хозяйстве нужно относиться с известной долей скепсиса. Но если даже они будут

² См. Нарцисов В.А. Научные основы системы земледелия. М. 1976. С. 20

осуществлены наполовину, это приведет к колоссальным изменениям. Био-агрокультурная революция могла бы изменить зависимость бедных стран от богатых.

Известно, что понятие «зеленая революция» отражает количественный рост урожайности сельскохозяйственных культур, благодаря внедрению в аграрное производство высокоурожайных сортов, созданных на карликовой основе. «Отцом» зеленой революции» является американский агроном лауреат Нобелевской премии Н.Э. Борлауг. Используя карликовый малорослый (50-60 см.) японский сорт пшеницы Норин-10, неполегаемый (урожайность 80-90 ц/га) Н.Э. Борлауг вывел принципиально новые сорта пшеницы карликового типа (длина растения 80-90 сантиметров, урожайность 40-60 ц/га). Всего он вывел в Мексике примерно 40 сортов пшеницы и риса принципиально нового интенсивного типа.

Таким образом, в XXI веке возникают сложные проблемы в динамике эволюции и агробиогеоценозов.

ЖАРДЕЦКИЙ С.С, ШУЛЬГА А.О., ХРАМЦОВА Е.А.

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РИЗОСФЕРНЫХ БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS*, СИНТЕЗИРУЮЩИХ АЦК-ДЕЗАМИНАЗУ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К СТРЕССОВЫМ ФАКТОРАМ СРЕДЫ

Увеличение продуктивности сельскохозяйственных культур и повышение их устойчивости и адаптации к неблагоприятным агроклиматическим условиям и антропогенным воздействиям являются актуальными для сельского хозяйства, а также для решения экологических проблем и охраны окружающей среды. Особенно важны в этом отношении микробиологические подходы, основанные на использовании потенциала растений и микроорганизмов, а также процессах их взаимодействия в растительно-микробных системах. Наиболее перспективными микроорганизмами для разработки на их основе агробиотехнологических способов повышения урожайности растений являются представители рода *Pseudomonas*, относящиеся к PGPR-группе (от *Plant Growth-promoting Rhizobacteria* – ризобактерии, способствующие росту растений), которые известны своей

способностью синтезировать комплекс разнообразных микробных метаболитов, не только оказывающих положительное влияние на рост и развитие растений, но и защищающих их от болезней и неблагоприятных факторов окружающей среды.

Одним из важнейших механизмов, который используется бактериями PGPR-группы для стимуляции роста растений, является снижение уровня гормона этилена, образующегося в растительных клетках в избыточных количествах в ответ на действие неблагоприятных факторов окружающей среды.

Снижение количества синтезируемого растением «стрессового» этилена могут осуществлять ризосферные бактерии, продуцирующие 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат-дезаминазу (АЦК-дезаминазу) путем дезаминирования непосредственного предшественника этилена 1-аминоциклопропан-1-карбоксилата (АЦК).

В связи с этим, одной из актуальных задач современной биотехнологии является создание, с помощью генетических и генно-инженерных подходов, высокоактивных штаммов ризосферных бактерий, способных к сверхсинтезу АЦК-дезаминазы, и разработка приемов их использования для стимуляции роста сельскохозяйственных растений, как в нормальной среде обитания, так и при наличии стрессовых факторов биотической и абиотической природы.

На основе ризосферных бактерий *Pseudomonas mendocina* и *Pseudomonas putida* были созданы штаммы-продуценты АЦК-дезаминазы, повышающие устойчивость растений к стрессовым факторам среды, таким как засолению почвы и загрязнению ее солями тяжелых металлов.

Гены, кодирующие АЦК-дезаминазу бактерий *Pseudomonas*, были клонированы в составе вектора широкого круга хозяев. Уровень активности АЦК-дезаминазы у полученных штаммов был более чем в два раза выше по сравнению с клетками дикого типа.

Исследование ростостимулирующих свойств полученных штаммов в отношении овощных (томаты), зерновых (пшеница, ячмень) и технических (рапс) культур показало, что растения, обработанные культурой этих бактерий по всем изученным параметрам (длина стебля, длина корня и биомасса растений) превышают контроли обработанными водой (К1) и бактериями дикого типа (К2).

Известно, что у растений, выращиваемых в присутствии бактерий, синтезируемых АЦК-деаминазу, наблюдается значительное снижение количества стрессового этилена, который вырабатывается в растении в ответ на стрессовые условия. Тяжёлые металлы, как известно, подавляют рост и развитие растений. Однако при внесении в почву суспензии полученных бактерий степень подавления роста уменьшалась, было хорошо заметно, что эти растения имеют лучший рост и развитие по сравнению с контролем. Так опытные растения имели почти в 2 и 3 раза большую длину стебля и корня по сравнению с растениями К2 и К1 соответственно, а также в 12 и 16 раз большую биомассу в случае загрязнения хромом и в 4 раза большую биомассу в случае загрязнения медью.

Аналогичная закономерность прослеживалась и при исследовании влияния полученных штаммов на повышение устойчивости растений к солевому стрессу. Так, в опыте биомасса растений томатов была почти в 2 раза выше по сравнению с контролями, тогда как использование полученных штаммов для защиты растений пшеницы от солевого было менее эффективно

Таким образом, показано, что созданные штаммы-продуценты АЦК-деаминазы способны к стимуляции роста сельскохозяйственных растений, как в нормальной среде обитания, так и при наличии стрессовых факторов биотической и абиотической природы.

ЖАРНИКОВА Е.В., ШАЛБУЕВ Д.В.

*Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления,
Улан-Удэ, Россия*

РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО СПОСОБА ПИКЕЛЕВАНИЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ ПРОДУКТОВ РАСТВОРЕНИЯ КОЛЛАГЕНА

В данной работе исследована возможность применения продуктов растворения коллагена (ПРК) на основе коллагенсодержащего сырья и кисломолочных композиций в процессе пикелевания меховой овчины.

В настоящее время проблема утилизации белоксодержащих отходов остро стоит перед многими предприятиями различных отраслей промышленности. Непереработанные коллагенсодержащие отходы могут стать источником образования различных вирусов.

Кроме того, складирование отходов приводит к загрязнению почвы и миграции загрязняющих веществ в грунтовые воды и в открытые водоемы. Учеными всего мира ведутся разработки методов рациональной переработки белоксодержащих отходов и выделения нативного коллагена из соединительной ткани, которые позволяют сохранить молекулярную структуру и биологическую активность коллагена наравне с очисткой его от биополимеров.

В работе используется новаторский подход к обработке кожевенного, овчинно-шубного и мехового сырья. Отходы кожевенной и молочной промышленности служат сырьем для производства продуктов растворения коллагена, которые используются в дальнейшем на стадиях производства мехового полуфабриката. Кисломолочные композиции, входящие в состав пикельной жидкости в процессе пикелевания мехового сырья, получены путем культивирования кислотного симбиоза курунговой закваски/кефирных грибков в пастеризованном обезжиренном молоке/творожной сыворотке. Кефирную грибковую закваску готовили из кефирных грибков, которые активизировали в стерильных условиях в обезжиренном, пастеризованном и охлажденном до температуры 18-20°C молоке. Культивирование закваски проводили при температуре 20-23°C в течение 18 ч. Естественную симбиотическую курунговую закваску готовили из кефирной грибковой закваски и заквасок на чистых культурах ацидофильной (*Lactobacillus acidophilus*), болгарской (*Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus*) палочек на пастеризованном обезжиренном коровьем молоке.

Микрофлора курунги является симбиотической ассоциацией различных видов лактобактерий и дрожжей и их видовой состав близок к таковому в кефирной грибковой закваске. При этом закваска кефирного грибка обладает уникальной способностью к саморегулированию составом микрофлоры в зависимости от влияния на нее внешних факторов среды.

Традиционный метод проведения процесса пикелевания овчинно-шубного сырья обуславливает образование высокотоксичных и минерализованных сточных вод. Данные воды практически не поддаются биodeградации из-за низких значений pH и высокого содержания хлорида натрия, что является причиной возникновения эффекта плазмолиза у прокариотических микроорганизмов, входящих в состав микробиоценоза сооружений биологической очистки.

Установлено, что для получения качественного полуфабриката необходимо проводить пикелевание кисломолочными композициями кислотностью не ниже 300°Т. Повышают кислотность путем внесения закваски кефирных грибков/курунговой закваски и подкрепляют каждые 24 ч 100 см³ пастеризованного обезжиренного молока/творожной сыворотки комнатной температуры. Экспонируют композиции в термостате при 37±0,5°С до достижения необходимой кислотности.

Процесс биотехнологического пикелевания проводят при следующих параметрах: продолжительность 24 ч, температура 22±2°С.

Биотехнологическое пикелевание проводят намазным способом, нанося композиции без введения хлорида натрия.

Применение биотехнологического пикелевания позволяет достичь оптимальной степени разупорядочения макромолекулы коллагена благодаря симбиотическому воздействию кислототолерантных микроорганизмов, входящих в состав микробиоценоза исследуемых композиций, а также за счет комплекса органических кислот и ферментов, продуцируемых этими организмами.

Результатом применения продуктов растворения коллагена в процессе пикелевания меховой овчины с помощью кисломолочных композиций и ПРК является получение мехового полуфабриката с улучшенными упругоэластическими свойствами кожной ткани; уменьшение антропогенной нагрузки на окружающую среду за счет исключения из пикельного раствора агрессивных кислот и рациональное использование отходов кожевенной и молочной промышленности. При использовании ПРК структура становится более наполненной, что подтверждается минимальными значениями влагопроницаемости. Введение ПРК в структуру меховой овчины приводит к незначительному снижению пористости и оказывает благоприятное воздействие на улучшение прочности связи волоса с кожной тканью.

ЖБАНОВ А.Е., ОСТРОУМОВ С.А.

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова,

Москва, Россия

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕДИ И КАДМИЯ С
БРИОФИТОЦИАНОБАКТЕРИАЛЬНЫМ СООБЩЕСТВОМ:
ПОДХОД К НОВОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ ОЧИЩЕНИЯ ВОДЫ**

Исследовали различные водные системы с водными организмами в условиях химического загрязнения среды. На примере сообщества бриофитов ОСТ-1 с растущими на поверхности цианобактериями *Phormidium* и *Oscillatoria* авторами были получены экспериментальные данные, свидетельствующие о возможности данного биообъекта существенно снижать содержание тяжелых металлов (на примере меди и кадмия) в водной среде. В ходе работы моделировали загрязнение водной среды медью и кадмием (одновременно). В водную среду вносили биомассу указанного сообщества организмов. После периода инкубации было показано снижение содержания вносимых элементов (меди, кадмия) в водной среде и иммобилизация этих металлов в биомассе. Одновременно измеряли содержание в биомассе нескольких элементов, которые, в отличие от меди и кадмия, не вносились в водную среду (железо, марганец, никель, мышьяк). Измерения показали, что после инкубации содержание последних (Fe, Mn, Ni, As) в биомассе не изменилось, что служит контролем для сравнения с данными измерений концентраций меди и кадмия. Поведенные исследования являются частью серии работ, проводимых в нашей группе по настоящее время. Эти работы приводят к получению дополнительной информации о том, как различные водные (в том числе растительные организмы) взаимодействуют с потенциально опасными факторами окружающей среды. Проводимые исследования позволили улучшить методологию и общую схему проведения подобных исследований от стадии подбора растительных материалов до лабораторных испытаний и обработки данных. Представляемая работа дополняет проводимые авторами в МГУ им. М.В.Ломоносова эксперименты по выявлению новых биотехнологических методов очистки, а также вносит вклад в расширение и развитие научных представлений о механизмах самоочищения вод.

ЖЕМЧУЖНИКОВ М.К.¹, ЛУНИЧКИН А.М.², КНЯЗЕВ А.Н.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

²Федеральное государственное учреждение высшего профессионального образования Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, Санкт-Петербург, Россия

НАСЕКОМЫЕ (*ORTHOPTERA*, *GRYLLIDAE*) КАК МОДЕЛЬНЫЙ ОБЪЕКТ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ АГОНИСТИЧЕСКОГО ПОВЕДЕНИЯ ЖИВОТНЫХ

Известно, что у животных разных таксономических групп поддержание структуры сообщества осуществляется на основе агонистического поведения (АП) и реализуется в процессе взаимодействия, по крайней мере, двух особей. С этой точки зрения АП, объединяет разнообразные формы поведения, связанные с конфликтными ситуациями как внутри, так и межвидовыми. Они характеризуются прямым столкновением (реакции нападения, драки), угрозами с одной стороны, и оборонительным поведением (бегство, «паническое бегство» и «затаивание») с другой. Разнообразные формы поддержания структуры сообществ описаны как у позвоночных, так и у беспозвоночных животных. Однако есть ряд общих вопросов, которые в настоящее время не поддаются решению в исследованиях позвоночных животных и человека. В этих случаях удобными модельными объектами являются беспозвоночные – насекомые.

У сверчков сем. *Gryllidae* (как и у многих позвоночных животных) АП включает специализированные акустические сигналы и, как правило, выражается в виде угроз. Крайне редко и в полевых и в лабораторных условиях удается наблюдать прямое столкновение особей (драку). Это говорит об относительно высоком уровне развития структуры сообщества у этих «необщественных» насекомых. Считается, что все формы акустического поведения и звуковых сигналов появляются у сверчков одновременно сразу после линьки на взрослую половозрелую стадию – имаго. Мы решили проверить это положение.

Работа была направлена на изучение формирования акустического поведения, включая звуковые сигналы, в ходе индивидуального развития сверчков трех видов – *Grylodes supplicans* Walk., *Gryllus argentinus* Sauss. и *Gryllus bimaculatus* Deg.

Для решения этой задачи использовано сочетание методов и подходов классической зоологии (изучение имагинального онтогенеза), экспериментальной этологии (описание основных форм акустического поведения взрослых животных, моделирование поведенческих ситуаций в эксперименте – изучение комплекса направленных двигательных реакций на звук с использованием компьютерной телеметрии в условиях «арены») и биоакустики (исследование звукового репертуара). В результате проведенного исследования получено описание АП у взрослых сверчков на ранних этапах имагинального онтогенеза самцов и определено время его появления входе индивидуального развития (в онтогенезе).

Показано, что сроки появления различных по своему биологическому значению сигналов в онтогенезе самцов сверчков отличаются. Из трех звуковых сигналов: призывного (=территориального), агрессивного и копулятивного, – были исследованы первые два. Агрессивный сигнал, который является одним из элементов АП, у всех исследованных видов появлялся достоверно раньше остальных еще в ходе предрепродуктивного периода (до «половой зрелости»). Позже в акустическом репертуаре самца появлялся призывной сигнал, и самец вступал в репродуктивный период развития. Такая картина наблюдалась у всех трех исследованных видов сверчков, что указывает на ее универсальный характер. Этот период представлен следующими отрезками онтогенеза взрослых самцов: *Grylloides supplicans* Walk. (n=17) – с 5 сут (здесь и далее – медиана) по 8 сут (достоверность отличия между временем появления агрессивного и призывного сигналов: $P \leq 0,01$, Т-критерий Уилкоксона), *Gryllus argentinus* Sauss. (n=10) – с 6 по 9 сут ($P \leq 0,05$), *Gryllus bimaculatus* Deg. (n=14) – с 3 сут по 6 сут ($P \leq 0,01$).

Постепенное созревание системы акустической сигнализации имаго делает возможным исследование АП в «чистом виде» еще до вступления самца в репродуктивный период развития (в период половой зрелости). Высока вероятность того, что более детальный анализ этого периода продемонстрирует ряд феноменологических и общих статистически достоверных закономерностей, которые характерны для АП как других групп насекомых, так и организмов эволюционно более молодых таксономических единиц. Предполагается, что сравнительное исследование АП у представителей различных систематических групп позволит более детально разобраться в механизме его функционирования и регуляции в процессе их индивидуального развития, а также и в

историческом (эволюционном) развитии этой социально значимой общей формы поведения животных и человека.

ЖИГАЧЕВА И.В.¹, МИШАРИНА Т.А.¹, ТЕРЕНИНА М.Б.¹,
КРИКУНОВА Н.И.¹, ГЕНЕРОЗОВА И.П.², ШУГАЕВ А.Г.²

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

²Учреждение Российской академии наук Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

НЕНАСЫЩЕННЫЕ ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ С ОЧЕНЬ ДЛИННОЙ ЦЕПЬЮ ПОВЫШАЮТ УСТОЙЧИВОСТЬ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА К НЕДОСТАТКУ ВЛАГИ

Одним из основных экологических факторов, ограничивающих расширение ареала и продуктивности сельскохозяйственных культур, является недостаток воды, вызывающий осмотический стресс. Дефицит воды модифицировал клеточные мембраны, что влияет на их функции и нарушает метаболизм клетки.

Водный дефицит снижает функциональную активность, как хлоропластов, так и митохондрий (А.Г. Шугаев с соавторами, 2007). В связи с этим интересно было выяснить, изменятся ли биоэнергетические характеристики митохондрий в условиях водного дефицита при обработке семян регуляторами роста и развития растений мелафеном, представляющим собой меламинавую соль бис(оксиметил)-фосфиновой кислоты (Фаттахов С.Г. с соавторами, 2002).

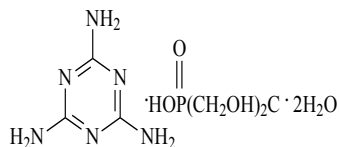


Рис.1. Мелафен

Недостаточное увлажнение приводило к росту содержания насыщенных и снижению содержания ненасыщенных жирных кислот (ЖК) в липидах мембран митохондрий проростков гороха. При этом относительное содержание линолевой кислоты

снижалось на 11%, линоленовой – на 29%. Содержание стеариновой кислоты возросло на 41%, что привело к снижению соотношения содержания суммы C_{18} ненасыщенных ЖК к содержанию стеариновой кислоты с 16.61 ± 0.30 до 10.59 ± 0.20 . Значительные изменения наблюдались и в содержании ЖК с 20 углеродными атомами. Пул 20:2 ω6 снижался в 2,7 раза, 20:1 ω9 – в 1,4 раза и 20:1 ω7 – в 1,3. В то же время содержание эйкозановой кислоты (20:0) возросло более чем в 2 раза. При этом наблюдалось падение индекса ненасыщенности ЖК с 20 углеродными атомами с $0,0431 \pm 0,0001$ до $0,0126 \pm 0,0007$. Обработка семян мелафеном, находящихся в условиях недостаточного увлажнения, предотвращала изменения в ЖК-составе липидов мембран митохондрий проростков. Содержание C_{18} -ненасыщенных ЖК, играющих важнейшую роль в устойчивости растений к действию неблагоприятных факторов внешней среды не отличалось от контрольных значений. Не отличалось от контрольных значений и содержание C_{20} -ЖК.

Изменения физико-химических свойств мембран митохондрий, возможно, влекут за собой и изменение липид-белковых взаимодействий, а, следовательно, и активности связанных с мембранами ферментов, в частности компонентов дыхательной цепи митохондрий. Действительно, недостаточное увлажнение имело следствием снижение максимальных скоростей окисления NAD-зависимых субстратов. Скорости окисления глутамата+малат в присутствии разобщителя (FCCP) падали с $70,0 \pm 4,6$ до $48,9 \pm 3,2$ нг атом кислорода/мг белка x мин и величина дыхательного контроля по Чансу снижалась с $2,27 \pm 0,01$ до $1,70 \pm 0,02$. Обработка семян мелафеном предотвращала вызванные недостатком влаги изменения эффективности окислительного фосфорилирования. Кроме того, такая предобработка восстанавливала скорости окисления NAD-зависимых субстратов в присутствии ADP или FCCP до контрольных значений.

На основании приведенных данных можно прийти к заключению, что рост содержания ненасыщенных жирных кислот, в частности C_{18} и C_{20} кислот в мембранах растительных тканей приводит к повышению устойчивости растений к недостаточному увлажнению. Действительно, между коэффициентом ненасыщенности C_{18} жирных кислот в мембранах митохондрий (Σ ненасыщенные C_{18} -ЖК/ $C_{18:0}$) и максимальными скоростями окисления NAD-зависимых субстратов наблюдается корреляция с коэффициентом $r = 0,76489$. Еще более тесная корреляция ($r = 0,96370$) наблюдалась между коэффициентом

ненасыщенности C_{20} кислот в мембранах митохондрий и максимальными скоростями окисления NAD-зависимых субстратов.

Антистрессовые свойства препаратов отразились и на физиологических показателях. Обработка семян гороха мелафеном приводила к стимуляции роста корней в условиях недостаточного увлажнения в 5 раз и в 3,5 раза - рост побегов в условиях недостаточного увлажнения. Обнаруженная стимуляция роста корней проростков в условиях недостатка влаги должна иметь большое адаптивное значение.

Таким образом, мелафен, предотвращая снижение содержания ненасыщенных жирных кислот с 18 и 20 углеродными атомами, приводит к восстановлению нарушенной временным водным дефицитом энергетики митохондрий, что особенно важно для прорастающих семян, нуждающихся в энергетических ресурсах.

ЖОРИНА Ю.Ю., КУЗНЕЦОВА А.В.

Пензенский государственный университет, Медицинский институт, кафедра общей и клинической фармакологии, Пенза, Россия

ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ В АНАЛИЗЕ ВИТАМИННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Тонкослойная хроматография широко используется в анализе витаминов. Этот метод обладает высокой селективностью, возможностью одновременного разделения нескольких образцов, воспроизводимостью, минимальными затратами времени, оборудования и реактивов. Тонкослойная хроматография была использована в работе для анализа поливитаминных препаратов Аевит и Ревит.

1. Анализ препарата Аевит

Лекарственный препарат Аевит содержит комплекс жирорастворимых витаминов – ретинола пальмитат и α -токоферола ацетат. Хлороформенную вытяжку из капсулы наносили на пластину и хроматографировали восходящим методом на пластинках «Сорбфил» (ТУ 26-11-17-89, ЗАО «Сорбполимер», г. Краснодар) с полимерной подложкой.

Показано, что с увеличением гидрофобности повышается сродство хроматографической системы к липофильным витаминам А и Е. Это приводит к увеличению R_f обоих витаминов, которые увлекаются системой растворителей вверх и не разделяются. С увеличением полярности системы (за счет увеличения содержания метанола) в двухкомпонентной системе метанол-хлороформ (4:1; 1:1) происходит уменьшение сродства системы к анализируемым образцам. В полярных системах с относительно высоким содержанием метанола витамины А и Е оставались на старте. Варьируя соотношения полярного метанола и неполярного хлороформа, была подобрана хроматографическая система метанол - хлороформ (7:3). В данной системе R_f компонентов (ретинола пальмитата – 0,26; α -токоферола ацетата – 0,05) существенно различаются, что удобно для их одновременного обнаружения и определения.

Для визуальной оценки пятен использовали детекцию в УФ свете (365 нм). Для обнаружения жирорастворимых витаминов хроматограмму опрыскивали высокочувствительным реагентом – фосфорно-молибденовой кислотой, которая с компонентами Аевита дает характерное серо-голубое окрашивание.

Мы обнаружили, что в системе метанол-хлороформ (7:3) существенно различались не только R_f витаминов А и Е, но и характер движения двух форм витамина А – ретинола ацетата и ретинола пальмитата.

2. Анализ препарата Ревит

Более сложный объект анализа - комплексный препарат Ревит наряду с жирорастворимым витамином А – ретинола пальмитатом, содержит витамины В1 - тиамин-хлорид, В2 - рибофлавин и С - кислоту аскорбиновую.

В качестве подвижных фаз для тонкослойной хроматографии четырех витаминов препарата Ревит были использованы следующие системы: н-бутанол-ледяная уксусная кислота-вода (БУВ) (4:1:1); н-бутанол-ледяная уксусная кислота-вода (БУВ) (60:15:25); вода-этанол ВЭ (20:120).

Разработаны условия детекции витаминов на хроматографической пластине. Для визуальной оценки пятен пластину просматривали в УФ-свете (254 и 365 нм). Рибофлавин проявлялся в виде яркого флуоресцирующего пятна в длинноволновом УФ-свете (365 нм). При облучении светом с длиной волны 254 нм флуоресценция оказывалась слабее. Витамин А проявлялся на пластине светящимся пятном, а кислота аскорбиновая в

виде темной зоны в видимой области и УФ-свете. Более наглядно для детекции витамина С можно использовать инкубацию пластины в йодной камере. При этом наблюдается желтая окраска зон, соответствующих кислоте аскорбиновой.

Для определения тиамин хлорида (витамин В1) использовали реакцию тиамин с гексацианоферратом (III) калия в щелочной среде. Продукт реакции дает интенсивную голубую флуоресценцию при УФ-облучении в длинноволновой области УФ-спектра (365 нм).

Для каждой элюирующей системы определены величины Rf – относительные скорости движения компонентов. В системе вода-этанол и БУВ (60:15:25) происходит очень сильное размывание пятна рибофлавина, возможно, из-за его деструкции в кислой среде в присутствии аскорбиновой кислоты. Поэтому величина Rf для этого витамина определена приблизительно.

Выводы. Разработаны способы подготовки препаратов Ревит и Аевит к анализу, подобраны составы подвижных фаз для разделения компонентов поливитаминных комплексов методом тонкослойной хроматографии и реакции идентификации витаминов. Предлагаемые способы определения витаминов могут быть использованы для экспресс-анализа лекарственных препаратов и серийных анализов биологически активных добавок.

ЖУРАВИН И.А.¹, ВАСИЛЬЕВ Д.С.¹, ВЛАСОВ Г.П.², ДУБРОВСКАЯ Н.М.¹,
МАКОВА Н.З.³, НЕЕЛОВ И.М.², ТУМАНОВА Н.Л.¹, НАЛИВАЕВА Н.Н.^{1,3}

¹ *Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия.*

² *Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, Россия,*

³ *Institute of Molecular and Cellular Biology, University of Leeds, Leeds, U.K.*

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТА БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЛИЗИНОВЫХ ДЕНДРИМЕРОВ НА НЕРВНУЮ ТКАНЬ И КЛЕТКИ НЕЙРОБЛАСТОМЫ

С развитием нанотехнологий в медицине для транспорта лекарственных средств, потенциально пригодных для лечения раковых, вирусных заболеваний и заболеваний

ЦНС, начались разработки наноразмерных носителей/контейнеров, к числу которых относятся дендримеры. Дендримеры представляют собой новый класс разветвленных полимеров с регулярной сферической структурой и большим числом терминальных групп, допускающих возможность направленного контроля их размера, формы, заряда и функциональности. Использование дендримеров позволяет выполнять как «пассивный», так и «активный» транспорт биологически активных веществ, обеспечивая их адресную доставку в соответствующие клетки, ткани и органы. Пока, однако, не ясны последствия действия самих полилизиновых дендримеров на нервную ткань.

В проведенном нами исследовании изучено распространение дендримеров в разных органах и тканях крыс и их влияние на состав и свойства нервных клеток *in vivo*. Также анализировались эффекты действия дендримеров на клетки нейробластомы человека SH-SY5Y в культуре. Дендримеры второй - пятой генерации (Д2-Д5, размером от 1 до 1,8 нм) на основе лизина были синтезированы с использованием твердофазного подхода пептидной методологии синтеза. Для обнаружения дендримеров в органах и тканях к ним была прикреплена флуоресцентная метка FITC. При внутрибрюшинном введении дендримеров (15 мг/кг) флуоресцентная метка наблюдалась в кровеносных сосудах печени, почек и желудочков головного мозга, однако в ткани мозга она практически не выявлялась. Дендримеры Д2-Д5 (1,2 мкМ, 10 мМ), конъюгированные с витальным красителем FITC, также вводили однократно взрослым крысам в теменную кору или в желудочки мозга. Ткань мозга анализировали с помощью конфокальной микроскопии через 50 минут, 3 часа и 19 часов после инъекций. Обнаружено, что через 50 минут после инъекции Д4 или Д5 флуоресцентная метка наблюдается в области трека на расстоянии не более 500 мкм для. Интенсивность флуоресцентного сигнала существенно снижалась от 50 минут к 3 часам, а через 19 часов окрашивалась лишь полоса ткани вокруг трека, шириною не более 100 мкм. В этой области наблюдались FITC-позитивные погибшие нейроны, которые не поддавались окрашиванию тионином. Флуоресценция также наблюдалась в кровеносных сосудах ипси- и контралатерального полушарий. После введения FITC-Д3 (10 мМ) в ткань мозга наблюдалось интенсивное свечение его метки вдоль трека и волокнистых структур и ее распространение на расстояние более 1 мм. Также мы наблюдали интенсивно окрашенные живые клетки в коре, гиппокампе и стриатуме. При анализе влияния FITC-Д3 (100 мкМ) на клетки SH-SY5Y обнаружено, что

они захватываются клетками и локализуются в вакуолях, вызывая в ряде случаев набухание и гибель клеток, что может быть объяснено токсичностью большой концентрации дендримеров, поскольку инкубация клеток нейробластомы человека SH-SY5Y в течение 24 часов в присутствии 5-10 мкМ дендримеров Д1-Д3 или гиперразветвленных полимеров НbpК и Нbp (КН) не вызывала гибели клеток и не изменяла их фенотип и холинэргические свойства. Более того, преинкубация клеток SH-SY5Y с дендримерами снижала цитотоксический эффект, вызываемый амилоидным пептидом А β ₁₋₄₂. Полученные данные свидетельствуют о перспективности дендримеров на основе лизина (в частности дендримера Д3) для коррекции цитотоксичности, вызванной амилоидным пептидом, а также возможности их применения для доставки биологически активных веществ к разным органам и тканям, хотя проблема прохождения лизиновых дендримеров через гемато-энцефалический барьер пока не решена и является первоочередной задачей дальнейших исследований.

Выполнено при поддержке программы Президиума РАН «Фундаментальные науки — медицине», гранта РФФИ 10-04-01156 и Medical Research Council, U.K.

ЗАГОРСКАЯ А.А., СИДОРЧУК Ю.В., ДЕЙНЕКО Е.В.

ФГБУН Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН,

Новосибирск, Россия

СОЗДАНИЕ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ С ВЫСОКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ СИНТЕЗА ГЕТЕРОЛОГИЧНОГО БЕЛКА В УСЛОВИЯХ СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ

Успехи в области генетической инженерии растений открыли новые возможности для получения рекомбинантных белков. Для этой цели широко используются клетки бактерий, дрожжей, млекопитающих и насекомых. Однако такие системы имеют ряд существенных недостатков. В клетках прокариот не происходит посттрансляционная модификация и правильная укладка многих эукариотических белков. Клетки дрожжей, млекопитающих и насекомых лишены подобных недостатков, но их использование ограничено высокой стоимостью. Растения имеют ряд преимуществ по сравнению с

другими системами экспрессии. В клетках высших растений происходит гликозилирование и фолдинг белков, сходный с таковым в клетках млекопитающих. В отличие от животных, растительные клетки не содержат в своем составе патогенных для человека вирусов и прионов, и таким образом, могут служить безопасным источником рекомбинантных белков медицинского назначения. По расчетам экспертов использование растительных систем для наработки биофармацевтических белков позволит в 5-7 раз снизить стоимость производства социально-значимых фармацевтических препаратов.

Суспензионные культуры генетически модифицированных клеток растений привлекают внимание исследователей как перспективные системы для продукции фармацевтических белков. Преимуществом клеточной культуры по сравнению с растением является возможность стандартизации их по ростовым характеристикам, размерам и типам клеток. Более того, культивирование в строго контролируемых условиях позволяет поддерживать скорость накопления продукта, неизменную от пассажа к пассажу. Поэтому представлялось актуальным создание клеточной линии с высоким биосинтетическим потенциалом для культивирования в мини биореакторах.

В настоящей работе проводилось введение в культуру тканей различных видов двудольных растений, индукция и отбор каллусов по способности к максимальной пролиферации клеток, введение каллусных культур в суспензию, оценка ростовых параметров суспензии, генетическая трансформация клеточных культур с использованием созданного вектора и оценка уровня экспрессии гетерологичного гена на примере гена *gfp*. На основании предварительного анализа уровня накопления белка в растениях *in vivo* предпочтение при формировании коллекции было отдано 12 сортам и формам, принадлежащим 7 видам растений: *Glycine max*, *Glycine soja*, *Medicago varia*, *Lupinus angustifolius*, *Amaranthus hypochondriacus*, *Nicotiana tabacum*, *Daucus carota*. Для введения в культуру *in vitro* было использовано 9 различных типов эксплантов (котиленоны, гипокотили, эпикотили, семядольные узлы, семядоли, листья, стеблевые диски, черешки и зрелые зародыши). Для индукции каллуса и отбора активно пролиферирующих клеток использовали две базовые среды (Мурашиге и Скуга, а также среду Гамборга) с 19 вариантами фитогормонов и трофических факторов. Проведена оценка ростовых характеристик каллусных линий, индуцированных из различных типов эксплантов. Отобраны каллусные линии с максимально высокой скоростью пролиферации клеток:

линии табака, амаранта и моркови. Каллусные линии данных видов растений переведены в суспензионные культуры и изучены ростовые параметры суспензий: ростовые индексы, плотность суспензии и жизнеспособность клеток. Установлено, что на 15-й день культивирования клетки моркови способны увеличивать биомассу в 6 раз, табака в 7 раз, а амаранта – в 10 раз по отношению к исходной массе клеток. Суспензии клеток охарактеризованы по составу клеточных популяций с применением цитологических методов. Оценена вирулентность четырех штаммов *A. tumefaciens* (C58C1; AGLO4404, ЕНА105 и А282) по способности к заражению клеток моркови, амаранта и табака. Проведена агробактериальная трансформация клеточных линий моркови, табака и амаранта, отобранных как наиболее перспективные для использования в качестве биопродуцентов. Показано, что содержание общего растворимого белка в клетках моркови и табака существенно не различалось ($0,310 \pm 0,025$ мг/г и $0,3596 \pm 0,042$ мг/г сырого веса соответственно), тогда как в клетках амаранта содержание белка втрое превышало данные значения ($1,010 \pm 0,071$ мг/г сырого веса). Анализ накопления гетерологичного белка GFP выявил аналогичные отличия. Наибольшим содержанием GFP-белка характеризовались линии амаранта $1,145 \pm 0,0047$ мкг/г. В клетках суспензии моркови и табака синтезировалось до $0,412 \pm 0,004$ мкг/г и $0,6513 \pm 0,0024$ мкг/г сырого веса соответственно. На основании сравнительного анализа трех исследуемых видов растений установлено, что клеточная суспензия амаранта существенно превосходит клеточные суспензии табака и моркови по способности накапливать общий и гетерологичный белок и может быть рассмотрена как кандидат для создания на ее основе линии-биопродуцента.

ЗАРЫТОВА В.Ф.¹, РЕПКОВА М.Н.¹, ШАЦКАЯ Н.В.¹, ПАВЛОВА А.С.¹,
АМИРХАНОВ Н.В.¹, АМИРХАНОВ Р.В.¹, ИСМАГИЛОВ З. Р.², ШИКИНА Н. В.²,
МАЗУРКОВА Н.А.³, БАЙБОРОДИН С.И.⁴, ЛЕВИНА А. С.¹

¹*Институт химической биологии и фундаментальной медицины, СО РАН,
Новосибирск, Россия*

²*Институт катализа СО РАН, Новосибирск, Россия*

³*ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», Новосибирская область,
р.п. Кольцово, Россия*

⁴*Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия*

ДОСТАВКА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ В КЛЕТКИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НЕОРГАНИЧЕСКИХ НАНОМАТЕРИАЛОВ

В мире остро стоит проблема доставки лекарственных средств в клетки. Для достижения терапевтического эффекта препараты с низкой степенью проникновения, как правило, используются в больших дозах, что часто приводит к серьезным осложнениям, вызванным токсичностью препаратов. Актуальной остается проблема транспорта лекарственных препаратов на основе антибиотиков, нуклеиновых кислот и их аналогов. Известно, что препараты на основе нетоксичных синтетических НК (антисмысловых НК и их более стабильных в биологических средах аналогов, таких как peptide nucleic acids - PNA) способны селективно воздействовать на генетический материал. Такие препараты перспективны для лечения практически всех заболеваний, в основе которых лежат измененные НК (например, генетических, онкологических, сердечно-сосудистых, вирусных). Однако из-за низкой способности проникать в клетки синтетические НК до сих пор не нашли применения в медицине.

Мы предлагаем создать уникальные **нанокомпози́ты**, состоящие из неорганических наноматериалов-транспортеров и доставляемых лекарств на основе антибиотиков и синтетических НК, способных подавлять функции определенных генов, но не способных самостоятельно проникать в клетки.

В качестве наноматериалов-транспортеров мы использовали наночастицы, полученные на основе слабо токсичных биосовместимых материалов, разрешенных к

применению в медицинской практике, а именно: диоксида титана, коллоидного золота, диоксида кремния.

В качестве транспортируемых лекарственных препаратов использованы антибиотики блеомицинового ряда и синтетические НК: антисмысловые олигонуклеотиды, дезоксирибозимы и РНА.

Показано, что созданные наноконпозиты проникают в клетки без использования трансфецирующих агентов и физических методов воздействия, а доставленные в клетки антибиотики и синтетические НК эффективно взаимодействуют с внутриклеточными нуклеиновыми кислотами.

Работа поддержана интеграционным грантом СО РАН № 61, грантами РФФИ: № 08-04-01045-а и № 11-04-01408-а и ГК № 16.512.11.2267.

ЗАХАРЕНКО А.Л.¹, САЛОМАТИНА О.В.², ЛУЗИНА О.А.², МАЙНАГАШЕВ И.Я.²,
ВОЛЧО К.П.², СУХАНОВА М.В.¹, КУТУЗОВ М.М.¹, ИЛЬИНА Е.С.¹, ХОДЫРЕВА С.Н.¹,
ШРЕЙБЕР В.³, ХОМЕНКО Т.М.², САЛАХУТДИНОВ Н.Ф.², ЛАВРИК О.И.¹

¹*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН*

(ИХБФМ СО РАН), Новосибирск, Россия

²*Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН*

(НАОХ СО РАН), Новосибирск, Россия

³*Университет Страсбурга, CNRS, Франция*

ФЕРМЕНТЫ РЕПАРАЦИИ ДНК КАК МИШЕНИ ДЛЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ

Одним из важнейших направлений медицинской химии в настоящее время является создание новых лекарственных средств, в том числе противоопухолевых, основанных на синтетических трансформациях природных биологически активных метаболитов, обладающих низкой токсичностью. Достаточно сказать, что половина лекарств, внедренных в медицинскую практику в период 1981-2006 г.г., базируется на природных соединениях (Newman J. Med. Chem., 2008, 51, 2589–2599). В настоящее время исследования сосредоточены на поисках лекарств для лечения хронических дегенеративных и других

заболеваний, в том числе приводящих к летальному исходу. Вместе с тем, текущая ситуация отражает дефицит новых соединений, которые могут быть оптимизированы в терапевтически пригодные лекарства.

Среди растительных метаболитов пристальный интерес исследователей привлекают тритерпеновые кислоты (глицирретовая и бетулоновая), полифенолы (усниновая кислота) и некоторые другие. Химические трансформации этих соединений приводят к усилению их природных свойств. Немаловажным фактором является то, что эти растительные метаболиты имеют надежную сырьевую базу в России.

Одной из важнейших проблем при использовании химиотерапевтических антираковых препаратов является блокирование работы клеточных систем, противостоящих действию лекарственных средств. Например, воздействие цитостатиков, повреждающих ДНК, нивелируется действием систем репарации ДНК, которые удаляют химические повреждения из ДНК и восстанавливают ее нативную структуру. В связи с этим поиск ингибиторов ключевых ферментов и факторов репарации ДНК относится к важнейшим направлениям медицинской химии и является одним из путей создания наиболее эффективной комплексной терапии. В России до сих пор не проводился направленный поиск селективных ингибиторов белков систем репарации ДНК.

Нашим коллективом разработаны схемы синтеза широкого ряда производных природных биологически активных соединений, а также методики для определения ингибиторных свойств соединений в реакциях, катализируемых очищенными ключевыми ферментами эксцизионной репарации оснований (ЭРО) [поли(АДФ-рибозо)полимеразой 1 и 2 человека (ПАРП-1 и ПАРП-2), ДНК-полимеразой β (β -пол) и апуриновой/апириμιдиновой эндонуклеазой 1 (APE1)].

Обнаружен ряд селективных ингибиторов отдельных ферментов ЭРО, а также универсальные ингибиторы этой системы, подавляющие сразу несколько ферментов.

Среди протестированных производных усниновой кислоты обнаружено несколько соединений, несущих ароматический заместитель, которые ингибируют ПАРП-1 в миллимолярном диапазоне и не влияют на остальные ферменты ЭРО.

Пиперазиновые производные бетулоновой кислоты – четвертичные амины – оказали ингибирующее воздействие на все протестированные ферменты (ПАРП-1, β -пол и APE1) в миллимолярном диапазоне.

Среди изученных производных глицирретовой кислоты обнаружены мягкий селективный ингибитор АРЕ1, класс соединений– ингибиторов β -пол, несущих кето-группу в 11-м положении, и мягкий селективный ингибитор ПАРП-2.

Аналоги вараинас ациклическим заместителем в боковой цепи селективно ингибируют ПАРП-1, в то время как циклические заместители в боковой цепи позволили получить ингибиторы β -пол и АРЕ1 в миллимолярном диапазоне.

Для усиления эффективности действия противоопухолевых агентов важно снизить активность системы ЭРО, которая исправляет значительную часть повреждений ДНК, возникающих при терапии рака, поэтому представляют интерес как ингибиторы, селективно действующие на ключевые реакции процесса ЭРО, такие как процессинг АР-сайтов и синтез ДНК, так и соединения, воздействующие на процесс ЭРО в целом посредством регуляции одной или нескольких стадий как это могут делать ингибиторы ПАРП-1 или вещества, воздействующие сразу на несколько ферментов.

Полученные данные позволяют предложить пути трансформации для синтеза более активных веществ.

Работа поддержана грантом РФФИ 11-04-12099 ОФИ-М и Междисциплинарным интеграционным проектом СО РАН №51.

ЗАХАРЕНКО Н.А., ЯРЕМЧУК А.С., ШЕВЧЕНКО Л.В., ПОЛЯКОВСКИЙ В.М
Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Украина

ПРОЦЕССЫ БИОФЕРМЕНТАЦИИ ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ ПРИ ПЕРЕРАБОТКЕ ОТХОДОВ ЖИВОТНОВОДСТВА

Создание новых и усовершенствование существующих технологий переработки отходов животноводческих предприятий – является сегодня одной из главнейших задач аграрного производства, от решения которых зависит экологическая безопасность значительных территорий суши, водных объектов и воздушного бассейна.

Главным приоритетным направлением в решении данной проблемы на крупных комплексах по производству молока, свинины, яиц и мяса птицы является

биотехнологический способ утилизации органического вещества отходов с использованием биогазовых установок.

Известно, что в основе работы данных установок лежит процесс превращения органического вещества отходов микроорганизмами в анаэробных условиях с образованием в качестве промежуточных продуктов летучих жирных кислот (ЛЖК) приводящих в конечном итоге к образованию значительного количества метана и CO_2 .

Процесс биоферментации органических веществ зависит прежде всего от химического состава сырья (отходов животноводства), его механических свойств и целого ряда физических параметров, в том числе температуры, скорости движения жидкости и особенно от видового состава микроорганизмов, превращающих сложные биомолекулы в мономеры и неорганические компоненты. Однако несмотря на значительное количество исследований проведенных в данном направлении и сегодня вопросы повышения эффективности работы биогазовых установок являются актуальными.

Многочисленными исследованиями, проведенными в лабораторных условиях с использованием специальной установки показано, что при значительной загрузке биореактора ($D=0,2$ и $0,1$ сутки⁻¹) и времени биоферментации отходов 5 или 10 суток удельный выход биогаза с единицы объема реактора составил $1,9-2,2$ м³/м³. При этом степень конверсии органического вещества отходов изменялась в пределах $20,0$ и $26,6\%$, а удельный выход биогаза с 1 кг биомассы – $0,55-0,65$ м³ соответственно.

Уменьшение степени загрузки биореактора и увеличение времени биоферментации приводило к снижению удельного выхода биогаза с единицы объема реактора, но повышало выход биогаза из расчета на 1 кг сырья.

Дальнейшее увеличение времени биоферментации отходов до $25-30$ суток при загрузке биореактора до значения $D=0,04$ и $0,033$ сутки⁻¹ не вызывало увеличения выхода биогаза, несмотря на то, что глубина конверсии органического вещества при этом составляла $38-40\%$.

Показано, что повышение температуры сырья в процессе анаэробной биоферментации с 22 до 52°C уменьшало в $6,5-7,0$ раз время запуска установки и ее выход на оптимальный режим работы. При этом степень конверсии органического вещества отходов увеличилась с $8,37$ до $61,8\%$, а содержание метана в газовой смеси возросла на $24,2\%$ и составила $71,4\%$.

Снижение температуры ферментируемого сырья в биореакторе до 15 °С приводило к существенному увеличению концентрации ЛЖК в смеси, что коррелирует с уменьшением уровня метана в газовой смеси.

На основании полученных результатов можно сделать вывод о зависимости процесса превращения органических веществ отходов животноводческих предприятий при их переработке с использованием биогазовых установок от ряда физических параметров, влияющих как на сам процесс образования газов, так и на санитарную безопасность полученных продуктов.

ЗАХАРКИН Д. О., АТЫКЯН Н. А., РЕВИН В.В.

*ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет имени Н. П. Огарёва»,
Саранск, Россия*

ВЛИЯНИЕ СТЕПЕНИ ДИСПЕРГИРОВАНИЯ ЗЕРНОВОГО СЫРЬЯ И ТЕМПЕРАТУРЫ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА

Увеличившаяся потребность в спирте пищевого назначения и необходимость общей модернизации спиртового производства невозможны без максимально полного использования выбранного сырья. Разработанная нами технология ультрадисперсного помола зернового сырья позволяет интенсифицировать производство спирта и снизить его материало- и ресурсоемкость за счет отказа от стадии разваривания сырья при использовании мезофильных ферментов и более быстрого протекания ферментативного гидролиза.

Целью проведенной работы является выявление зависимости между степенью измельчения зерна пшеницы и эффективностью протекания осахаривания сусла при использовании термофильной амилазы при температурах, соответствующих границам оптимума этого фермента.

В своей работе мы применяли несколько методов измельчения сырья. В качестве контроля эксперимента выбрано измельчение на лабораторной ножевой мельнице ЛЗМ-1М. Помол на ножевой мельнице осуществлялся в течение 5 минут, что соответствует 73,2% проходу через сито с размером ячеек 0,6 мм. Для достижения ультрадисперсного

помола была применена варио-планетарная шаровая мельница Retsch PM100 с режимами одностадийного помола 25 и 30 минут при 400 об/мин и 20 минут при 600 об/мин. При данных режимах помола проход через сито с размером ячеек 0,6 мм составляет 88, 97 и 94,6 % соответственно. По сравнению с контролем в выбранных образцах помола существенно выше доля частиц размером менее 5 мкм (до 31 % от всех частиц).

Для гидролиза были использованы следующие ферменты: #2020 Heat Stable Alpha Amylase AC 939 ед/мл, #2078 Глюконад Л (жидкий) ГЛС 6444 ед/мл (рН 4,7 30°C), AC 198 ед/мл и # 1556.4 Ху1-3 Ксиланазная активность 2300 ед/г. Осахаривание проводилось в течение 90 минут при непрерывном перемешивании при температуре 60°C и разовом внесении всех ферментов в расчетной концентрации и поэтапно в течение 30 минут при температуре 85° (обработка амилазой) с последующим охлаждением до 60°C и продолжением осахаривания в течение 60 минут с внесением остальных ферментов.

Измерение глюкозы глюкозооксидазным методом показало, что наиболее эффективно процесс гидролиза крахмала прошел при поэтапном гидролизе в образцах с высокой степенью диспергирования. В частности, осахаривание образца 30ти минутного помола при 400 об/мин позволило извлечь 98,3 мг/мл глюкозы при последовательном гидролизе и 91,2 мг/мл глюкозы при совместном внесении ферментов. Наибольший выход свободной глюкозы (110,3 мг/мл) выявлен для образца 20ти минутного помола (помол 600 об/мин) при поэтапном внесении ферментов. В контроле концентрация составила 78,3 мг/мл и 70,1 мг/мл для последовательного и разового внесения ферментов соответственно. При этом анализ образцов методом ВЭЖХ показал, что пробы, осахаренные при 60°C и 85 °C, содержат примерно одинаковое количество остаточной мальтозы и мальтотриозы.

Таким образом, мы установили, что увеличение степени измельчения позволяет повысить эффективность ферментативного гидролиза крахмала. При этом повышение температуры до 85°C с последовательным внесением ферментных препаратов приводит к углублению степени гидролиза и большему накоплению глюкозы в сусле.

ЗАХАРКИН Д.О., БАРАШКИН С.В., АТЫКЯН Н.А., РЕВИН В.В.
ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет имени Н. П. Огарёва»,
Саранск, Россия

ВЛИЯНИЕ СВЧ ОБРАБОТКИ МЕХАНОАКТИВИРОВАННОЙ ДРЕВЕСИНЫ СОСНЫ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОТЕКАНИЯ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА

В настоящее время во всем мире происходит увеличение спроса на биоэтанол и продукты на его основе, в частности, биотопливо. Это привело к поиску альтернативных источников получения этилового спирта, одним из которых являются отходы от обработки сосны. Поскольку традиционная схема кислотного и щелочного гидролиза древесины является неэкологичной и приводит к появлению вредных примесей в сусле и готовом продукте, активное развитие получила схема ферментативного гидролиза механоактивированной древесины.

Предлагаемый нами принцип гидролиза заключается в предварительном механическом измельчении древесины до ультрадисперсных размеров. Как показано в ряде научных работ и проводимых ранее наших исследованиях, для достижения более мелкодисперсного помола необходимо снижать влажность измельчаемого материала до значений, менее 6%. Этого можно добиться несколькими методами термических воздействий, наиболее быстротечным из которых выступает метод СВЧ-обработки. В проведенном исследовании мы применяли несколько вариаций сушки, которые позволили уменьшить влажность от 8,2% - в качестве контроля выступал образец с влажностью 5,5 %, высушенный с использованием сушильного шкафа с температурой 70°C в течение 480 минут, в качестве экспериментальных выступили образцы, высушенные с использованием СВЧ-обработки до 5,3% (0,5 мин 700W) и 3,9% (2 мин 700W). Далее опилки были измельчены при помощи варио-планетарной шаровой мельницы Retsch PM100 в течение 30 и 60 минут при 400 об/мин.

Как показали исследования размера частиц, проводимые с помощью Shimadzu SALD-3101, при уменьшении влаги в измельчаемом образце интенсифицируется измельчение образца и происходит увеличение выхода фракции размером менее 5 мкм. Увеличение продолжительности помола с 30 до 60ти минут приводит к увеличению на 5-

9% выхода фракции размером менее 5 мкм. ИК-фурье анализ контроля и СВЧ-обработанной древесины показал незначительное изменение в С-О и Н-О связях, что также было подтверждено химическими анализами и проявилось снижением количества общей и гидролизуемой целлюлозы в СВЧ-обработанных опилках (особенно в случае пробы с остаточной влажностью 3,9% и продолжительностью помола 60 минут).

Гидролиз осуществлялся в термостатируемой при 50°C дистиллированной воде при pH 5 в присутствии 0,1 mM Na-ацетатного буфера в течение 180 минут. Соотношение субстрата и воды составило 1:7. Для гидролиза были использованы следующие ферменты: #2073 Целлюлаза Целлюлад (содержание белка 190 мг/мл, активности – СМС-ase 2565 mg/g, β -glucanase 1850 mg/g, Xylanase 985 mg/g) и #1022.2 Целлобиаза (содержание белка 230 мг/г, активности - б-глюкозидаза 2920 мг/г, целлобиаза 4720 мг/г). Ферменты вносились из расчета на единицу субстрата.

Для анализа эффективности протекания гидролиза пробы был применен ВЭЖХ метод. Согласно полученным результатам, наибольший выход глюкозы (19,4 мг/мл) за 180 минут гидролиза выявлен для стандарта с продолжительностью помола 60 минут. В пробах контроля с 30ти минутным помолом выявлено 17,7 мг/мл глюкозы. В обоих вариантах контроля к 180й минуте осталось 10,2 и 9,1 мг/мл целлобиозы, которые могли быть прогидролизованы при большем внесении целлобиазы. В вариантах с СВЧ-обработкой наибольший выход глюкозы (18,1 мг/мл) выявлен в варианте с 0,5 минутной обработкой и 60ти минутным помолом. Из СВЧ-обработанных проб с 30ти минутным помолом большим извлечением глюкозы (16,9 мг/мл) также характеризуется проба с 0,5 минутной обработкой. Пробы после СВЧ характеризуются также меньшим количеством остаточной целлобиозы. Наименьший выход глюкозы (16,7 и 16,1 мг/мл) при 180 минутном гидролизе выявлен в пробах с 2х минутной СВЧ-обработкой.

Таким образом, несмотря на увеличение тонкодисперсной фракции при механическом помолу СВЧ-обработанных опилок, в них происходит потеря гидролизуемых полисахаридов, что приводит к ухудшению выхода продуктов ферментативного гидролиза.

ЗАХАРКИНА А.С., БУРОВА Ю.А., КОРОЛЕВ Д.С., БАБАКИНА Т.М.
ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет имени Н. П. Огарёва»,
Саранск, Россия

ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИЗАЦИИ СЕМЯН ПШЕНИЦЫ НА ИХ РОСТОВЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ

Большинство штаммов *Pseudomonas aureofaciens* и *Azotobacter vinelandii* используются при создании биопрепаратов для защиты растений («Гаупсин», «Агат-25К», «Елена», «Азолен» и т. д.). В связи с этим интересным представилось исследовать возможность создания комплексного биопрепарата с использованием живых бактерий *Pseudomonas aureofaciens*, выделенной из почвы и отселекционированной на кафедре биотехнологии ФГБОУ ВПО «Мордовский госуниверситет им. Н.П. Огарёва», и *Azotobacter vinelandii* штамм D-08.

Цель работы состояла в изучении влияния совместной обработки культуральными жидкостями исследуемых бактерий на ростовые показатели семян пшеницы.

Для обработки семян пшеницы сорта «Тулайковская-10» использовали следующие варианты: 1) вода (контроль); 2) вода : КЖ *Ps. aureofaciens* : КЖ *Az. vinelandii* в соотношении 100:1:1; 3) вода: КЖ *Ps. aureofaciens* : КЖ *Az. vinelandii* в соотношении 100:1:5. После чего семена переносили на влажную, смоченную водой, фильтровальную бумагу в чашки Петри. Энергию прорастания оценивали на 3 сутки, всхожесть - на 7 сутки.

В результате опыта максимальные ростовые показатели отмечены в третьем варианте. При этом значения энергии прорастания и всхожести семян превысили контрольные на 18 и 16% соответственно. Во втором варианте данные показатели были выше контрольных значений на 3 и 7% соответственно. Высота опытных ростков пшеницы составила в 1,5-2 раза больше контрольных, что обусловлено, согласно литературным данным, способностью исследуемых бактерий синтезировать ростостимулирующие метаболиты. Таким образом, бактеризация положительно влияет на развитие семян, при этом важное значение имеет соотношение концентрации используемых бактерий.

ЗАХАРЧЕНКО Н.С.¹, РУКАВЦОВА Е.Б.¹, ЛОКТЮШОВ Е.В.^{1,2}

¹ Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук, Пушино, Россия

² Пушинский государственный естественно-научный институт, Пушино, Россия

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ РАСТЕНИЙ, УСТОЙЧИВЫХ К ЗАБОЛЕВАНИЯМ

Антимикробные пептиды являются интегральной частью врожденной иммунной системы всех многоклеточных организмов и обладают широким спектром бактерицидной и фунгицидной активности. Интервал их начального действия находится в концентрации 0,1-5 мкМ. Пептиды проявляют литическую активность против различных микроорганизмов, но не по отношению к клеткам животных и растений, поэтому использование антимикробных пептидов для трансформации растений - перспективный метод повышения устойчивости растений к фитопатогенам.

Целью работы было проведение генетической трансформации томата, картофеля и табака генами антимикробных пептидов: цекропина P1 (*cecP1*) (31 а.к.) и бомбинина (*bom*) (27 а.к.). Трансформацию картофеля проводили с помощью агробактерий *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (pMP90PK), содержащих вектор pGA482::*cec P1*. Трансформацию табака осуществляли с помощью агробактерий *A. tumefaciens* CBE21, содержащих, вектор pBI121 с геном бомбинина, слитого с репортерным геном β-глюкуронидазы. Для трансформации томата использовали агробактерии *A.tumefaciens* GV3101 с безмаркерным вектором pBM::*cecP1*.

В работе использовали следующие сорта растений: томат - сорт «Джина», картофель - сорт «Дезире», табак - сорт «Самсун». Трансформацию растений проводили двумя методами: вакуумной агроинфильтрации семян и кокультивацией листовых эксплантов с агробактериями.

Для метода вакуумной агроинфильтрации стерильные семена томата в жидкой культуре агробактерий (О.П.₆₀₀ =0,7) выдерживали в условиях вакуума -0.8 Атм 5 мин. Затем семена перекладывали на твердую среду Мурасиге-Скуга. Отбор безмаркерных растений, не содержащих в своем геноме маркерных и селективных генов, проводился по

детекции целевого продукта – пептида цекропина P1. Для этого проводили вестерн-блот анализ образцов, состоящих из растительного материала нескольких групп растений. При наличии положительного сигнала в исследуемых группах, проводили анализ индивидуальных растений. Эффективность трансформации методом агроинфильтрации составила 20%. Таким образом, были получены трансгенные растения томата, не содержащие в своем геноме селективных и маркерных генов, которые обычно используются для получения трансгенных растений и, становятся не нужными растению после селективного отбора. Этот метод важен для получения современных биобезопасных биотехнических растений.

Трансформацию картофеля и табака проводили методом кокультивации листовых дисков с агробактериями. Отбор трансформантов, при использовании маркерного вектора, проводили на селективной среде, содержащей антибиотик канамицин (50 мг/л). Наличие и экспрессия гена цекропина P1 и бомбинина в полученных растениях картофеля и табака была показана молекулярно-генетическими методами: ПЦР с использованием праймеров к генам цекропину P1 и бомбинину, вестерн-блот анализом с использованием специфических антител, а также методами саузерн и нозерн-блот анализов. Уровень экспрессии антимикробных пептидов в растениях составлял 0,002-0,03% от общего содержания белка листьев. Экстракты из трансгенных растений проявляли повышенную антибактериальную активность по отношению к патогену *Erwinia carotovora*. Заражение растений бактериальными и грибными фитопатогенами - *Pseudomonas syringae*, *Erwinia carotovora*, *Phytophthora infestans*, *Sclerotinia sclerotiorum* показало повышенную устойчивость трансгенных растений по сравнению с контрольными (не трансформированными).

Таким образом, использование генов антимикробных пептидов для трансформации растений, может быть надежным методом повышения устойчивости растений к болезням, вызываемыми фитопатогенными микроорганизмами. Полученные векторные конструкции с синтетическими генами *cecP1* и *bot* можно в дальнейшем использовать для исследования эффектов этих генов в различных трансформированных растениях и при получении растений-продуцентов пептидов для медицины.

Работа поддержана грантами РФФИ № 11-08-00413 и № 12-08-00131

ЗЕЛЁНЫЙ Ю.М.¹, ВИШНЕВСКАЯ Ю.А.¹, БАЛЮТА А.А.²

¹Международный государственный экологический университет им. А.Д.Сахарова,
Минск, Беларусь

² Институт микробиологии НАН РБ, Минск, Беларусь

МОДИФИКАЦИЯ МИТОГЕННЫХ СВОЙСТВ БЕЛКОВ ГРИБА *ASPERGILLUS NIGER* В ПРИСУТСТВИИ БИОЦИДОВ

Одним из основных методов борьбы с плесневыми поражениями является химический метод, основанный на применении биоцидов. Однако безопасность этого метода является спорной, т.к. под действием противогрибковых химических препаратов может происходить усиление продукции плесневыми грибами агрессивных метаболитов, меланинообразования и продукции мутантных белков с высокими митогенными свойствами.

Целью работы было изучение модификации митогенных свойств белков гриба *Aspergillus niger*, в присутствии биоцидов бензалкониум хлорида (КатАБ) и полигексаметиленгуанидин гидрохлорида (ПГМГ).

В работе были использованы методы глубинного и твердофазного культивирования грибов в лабораторных условиях, химической экстракции белков и спектрофотометрического определения их концентрации, а также постановки реакции бласттрансформации лимфоцитов *in vitro*.

Выделение белков производили с помощью различных экстрагирующих систем: 1) буферной системы и ионного денатурирующего детергента (1% додецилсульфат натрия); 2) буферной системы и неионного детергента (4% Tween 60); 3) буферной системы и 4М мочевины.

Было установлено, что выраженность митогенных свойств белков, экстрагированных из пеллет гриба *A. niger*, с использованием различных экстрагирующих систем, была различна. Белки с наиболее выраженными митогенными свойствами были экстрагированы с применением неионных детергентов, в частности Tween 60. При этом они проявляли митогенные свойства в отношении лимфоцитов периферической крови человека *in vitro* в диапазоне концентраций 0,15 – 0,29 мг/мл.

При культивировании гриба *A. niger* в присутствии КатАБ происходило достоверное увеличение его митогенных свойств в 3,2 раза, а при культивировании гриба в присутствии ПГМГ происходило достоверное снижение его митогенных свойств в 1,4 раза. Разнонаправленные изменения митогенных свойств белков гриба *A. niger* при внесении в культуральную среду КатАБ и ПГМГ может быть связано с механизмами их действия.

Было также отмечено, что митогенные свойства белков, экстрагированных с применением Tween 60 из пеллет гриба, полученных при культивировании в присутствии 0,0005% КатАБ, приближаются к эффекту классического митогена – фитогемагглютина.

Анализируя концентрационные зависимости наблюдаемых митогенных эффектов, для всех исследуемых белков было отмечено следующее: все белки гриба *A. niger* в различных концентрациях могут оказывать различные эффекты на иммунный ответ: индуцировать иммунный ответ (сопровождается увеличением доли бласттрансформированных клеток в культуре) или ингибировать. При этом форма зависимости «доза - эффект» носит куполообразный характер. Такая форма зависимости, позволяет утверждать, что выделенные белки обладают не только митогенными (провоцируют клетку к вступлению в митоз), но и антигенными свойствами, т.е. действуют через Т-клеточный рецептор.

Полученные результаты могут быть использованы для оптимизации корректной и эффективной борьбы с нежелательными проявлениями жизнедеятельности плесеней в жилых помещениях, а также предотвращения или уменьшения их отрицательного воздействия на здоровье человека.

ЗЕМКОВ Г.В., МАГЗАНОВА Д.К.¹, КАНИЕВА Н.А.²

¹ФГБОУ ВПО «Астраханский государственный университет», Астрахань, Россия

²ФГОУ ВПО «Астраханский государственный технический университет»,
Астрахань, Россия

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ФОРМЕННЫХ ЭЛЕМЕНТОВ КРОВИ РЫБ ПРИ ИНТЕНСИВНОМ ВСКАРМЛИВАНИИ С ДОБАВКАМИ БИОЛОГИЧЕСКИ - АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ (БАВ)

На данном этапе развития биотехнологии широко проводятся исследования по выделению биологически - активных веществ (БАВ), используемых в качестве добавок в продукты питания и в корма для животных, что повышает их устойчивость к заболеваниям организма и продуктивность животных. В качестве источников БАВ используются микроорганизмы, низшие грибы и другие биообъекты. Используя современные способы ферментации нами опробованы способы культивирования дрожжевых клеток, цианобактерий, уксусно - кислых и др. бактерий.

Целью настоящих исследований являлось получение композита БАВ, выделяемых в виде вторичных метаболитов в процессе ферментации бактериально - микотрофных симбиотов.

Опыт проводили на сеголетках белого амура. Рыб содержали в аквариумах объемом 50 л, при постоянной температуре 22 градуса по Цельсию. В опыте и в контроле рыб кормили 3 раза в день. В качестве корма использовали высушенные и предварительно измельченные молодые побеги тростника. В контроле использовали корм без добавок БАВ, а в опыте высушенный корм обогащали раствором БАВ, которые получены в процессе ферментации бактериально - микотрофных организмов. Экспериментальные работы проводили в течении 30 дней.

При завершении экспериментов для оценки эффективности воздействия БАВ у рыб брали кровь из хвостовой вены и далее приготавливали мазки, которые окрашивали гематоксилин+эозином по методу Романовского. Всего было взято на анализ по 5 экземпляров рыб в опыте и в контроле. Мазки крови микроскопировали при увеличении X 100 под иммерсией, отмечая морфологические нарушения форменных элементов крови.

Установлено, что в контроле у рыб наблюдались незначительные признаки агглютинации и кариорексиса эритроцитов. Основная масса этих клеток зрелой формы, но иногда встречались и нормобласты. В ряду лейкоцитов главным образом встречались одиночные лимфоциты, а иногда были обнаружены группы в которых насчитывалось от нескольких единиц до десятков клеток. Все лимфоцитарные клетки голоядерные. В основном преобладали микролимфациты, в отдельных случаях наблюдали макролимфациты.

По сравнению с контролем в опыте заметны отличительные признаки в морфологии как красной, так и белой формы клеток. Обнаружены агглютинация эритроцитов различной тяжести, что выражалось в виде склеенных клеток, а в отдельных случаях отмечены явные признаки расплавления цитоплазматической мембраны и кариорлизис. Также зарегистрированы тени эритроцитов и нормобластов, что является причиной эктопии ядра. В ряде случаев некоторые клетки в состоянии шизоцитоза. Нормобласты встречались в количестве пять, десять процентов поля зрения.

По итогам исследований, изложенных выше, доказано, что интенсивное кормление подопытных рыб композитом БАВ, полученного нами, вызывает заметные изменения в эритроцитах периферической крови в виде агглютинации вплоть до разрушения клеток, шизоцитоза, кариорексиса. Все эти изменения относятся к средней степени тяжести патологии пигментных клеток крови классифицируются как критерий гипоксии.

Изложенное выше материалы убедительно показывают заметное влияние композита БАВ на организм рыб в случае интенсивного кормления животных, что представляется важным для дальнейшей разработки оптимального режима кормления с добавками БАВ.

ЗЕМЛЯНСКАЯ Е.В., ДЕГТЯРЕВ С.Х.

НПО «СибЭнзим», Новосибирск, Россия

ИЗУЧЕНИЕ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ 5mC-ЗАВИСИМОЙ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ДНК-ЭНДОНУКЛЕАЗЫ BISI

Сайт-специфические ДНК-эндонуклеазы являются интереснейшим объектом для исследования ДНК-белкового взаимодействия. В нашей лаборатории впервые обнаружены

и охарактеризованы 5-метилцитозин-зависимые сайт-специфические ДНК-эндонуклеазы (МССЭ) – ферменты, которые расщепляют только 5-метилцитозин-содержащую ДНК, причем расщепление субстрата происходит сайт-специфически и однозначно. Биохимические свойства этих ферментов близки к свойствам эндонуклеаз рестрикции второго типа [1-6]. Интерес к этой группе ферментов обусловлен потенциальной возможностью их использования для анализа метилирования ДНК млекопитающих, в том числе для ранней диагностики онкологических заболеваний в клинической практике [7, 8]. Для разработки эффективных методов применения МССЭ для эпигенетических исследований и диагностики необходимо очень подробное изучение свойств этих новых ферментов. Одной из ключевых задач является детальная характеристика субстратной специфичности.

В нашей работе проводилось изучение субстратной специфичности МССЭ *BisI*. В результате проведенных экспериментов установлено, что данная эндонуклеаза узнает метилированную нуклеотидную последовательность 5'-G(m5C)[^]NGC-3' и расщепляет ДНК в строго фиксированной позиции внутри сайта узнавания, как указано стрелкой. Более детальное изучение субстратной специфичности фермента показало, что для расщепления ДНК МССЭ *BisI* достаточно присутствия хотя бы одного 5-метилцитозина в любой позиции в одной из цепей в сайте узнавания 5'-GC↓NGC-3', при этом позиция расщепления ДНК остается неизменной. Максимальная скорость расщепления субстрата достигается в случае симметричного метилирования внутренних цитозиновых оснований в сайте узнавания. При этом *BisI* не расщепляет ДНК при замене 5-метилцитозиновых оснований на N4-метилцитозин.

Установленная нами способность эндонуклеазы *BisI* специфически расщеплять модифицированную ДНК в сайте узнавания с любым из возможных вариантов метилирования свидетельствует о различии в механизмах узнавания нуклеотидной последовательности МССЭ и эндонуклеазами рестрикции второго типа.

Литература

1. Дегтярев С.Х., Чмуж Е.В., Абдурашитов М.А., Каширина Ю.Г., Дедков В.С., Томилова Ю.Э., Мезенцева Н.В., Гончар Д.А. 2006. Штамм бактерий *Bacillus subtilis* – продуцент эндонуклеазы рестрикции *BisI*. Патент РФ №2270859 С1.

2. Чернухин В.А., Наякшина Т.Н., Мезенцева Н.В., Томилова Ю.Э., Дегтярев С.Х., Дедков В.С. 2006. Штамм бактерий *Glacial ice bacterium* I – продуцент эндонуклеазы рестрикции Gla I. Патент РФ №2287012 С1.
3. Чернухин В.А., Томилова Ю.Э., Чмуж Е.В., Соколова О.О., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. 2006. Штамм бактерий *Bacillus simplex* – продуцент сайт-специфической эндонуклеазы Bls I. Патент РФ №2322494 С1.
4. Чернухин В.А., Чмуж Е.В., Томилова Ю.Э., Наякшина Т.Н., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. 2006. Штамм бактерий *Glacial ice bacterium* – продуцент сайт-специфической эндонуклеазы Glu I. Патент РФ №2322492 С1.
5. Чернухин В.А., Наякшина Т.Н., Тарасова Г.В., Голикова Л.Н., Акишев А.Г., Дедков В.С., Михненкова Н.А., Дегтярев С.Х. 2009. Штамм бактерии *Paracoccus carotinifaciens* ЗК – продуцент сайт-специфической эндонуклеазы Pcs I. Патент РФ №2377294 С1.
6. Чернухин В.А., Журавлева Р.О., Тарасова Г.В., Болтенгаген А.А., Акишев А.Г., Михненкова Н.А., Дегтярев С.Х. 2010. Штамм бактерии *Kocuria rosea* – продуцент сайт-специфической эндонуклеазы KrgI. Патент РФ №2394099 С1.
7. Гончар Д.А., Акишев А.Г., Дегтярев С.Х.. 2010. BlsI- и GlaI-ПЦР анализ – новый метод исследования метилированных участков ДНК. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова*, т. 6, № 1, с. 5-12
8. Акишев А.Г., Гончар Д.А., Абдурашитов М.А., Дегтярев С.Х. 2011. Эпигенетическое типирование малигнанных клеточных линий человека с помощью BlsI- и GlaI ПЦР анализа. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю. А. Овчинникова*. т. 7, № 3, с. 5-16.

ЗЕМСКИЙ П.Ю.

*Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
РАН (ИБХ), Москва, Россия*

НОВЫЕ ТОКСИНЫ ИЗ ЯДОВ ЗМЕЙ СЕМЕЙСТВА ELAPIDAE В КАЧЕСТВЕ ЛИГАНДОВ CYS-ПЕТЕЛЬНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

Одной из основных задач современной молекулярной биологии и нейробиологии является изучение лиганд-рецепторных взаимодействий. Эти взаимодействия занимают ключевое место во многих процессах, таких как межклеточная сигнализация, передача нервного импульса, транспорт биомолекул и проч. Никотиновый ацетилхолиновый рецептор (nAChR) является лиганд-зависимым ионным каналом, встроенным в постсинаптическую мембрану синапсов. Это один из основных рецепторов центральной и периферической нервных систем млекопитающих. В зависимости от локализации рецепторы семейства nAChR подразделяются на два больших класса: мышечные и нейрональные.

Симптомы интоксикации в результате укусов змей позволяют предположить, что их компоненты воздействуют на различные системы организма, в частности, на центральную нервную, сердечно-сосудистую и мышечную. Широкий спектр мишеней связан с многообразием веществ, содержащихся в ядах. Большинство из них обладают потенциальной терапевтической активностью, благодаря чему традиционно используются в медицине. С появлением методов разделения сложных биогенных смесей не только возросла эффективность фармакологического воздействия этих веществ, но и расширилась область их использования. Изучение механизмов, лежащих в основе взаимодействия этих компонентов с nAChR, представляет интерес не только с фундаментальной точки зрения, но и необходимо для создания лекарственных препаратов, направленных на лечение заболеваний нервной системы. Широкое развитие этой отрасли требует новых молекулярных инструментов, которые будут эффективно взаимодействовать с Cys-петельными рецепторами, и в частности, с nAChR. Целью данной работы был поиск таких компонентов в яде ленточного крайта *Bungarus fasciatus* — родственника *Bungarus multicinctus*, из яда которого выделен α -бунгаротоксин, являющийся классическим инструментом исследований nAChR.

Яд змей содержит около сотни компонентов с молекулярными массами в довольно широком диапазоне. Хорошо известен тот факт, что состав ядов змей различается не только между видами, но и между популяциями, а зачастую и между разными особями одной популяции. Исходя из этого, в данной работе велась параллельная очистка ядов змей, обитающих как в северной части Вьетнама (провинция Виньфук (VSh)), так и в южной (провинция Лонган (DT)). Выделение индивидуального соединения со степенью чистоты, пригодной для дальнейшего анализа, невозможно без применения комбинации нескольких видов жидкостной хроматографии. Так, посредством гель-фильтрации происходит разделение компонентов яда по размеру молекул, ионообменной хроматографии — по плотности заряда и обращеннофазовой хроматографии — по степени гидрофобности. Все эти виды хроматографии использовались для фракционирования ядов.

Молекулярные массы выделенных токсинов определяли методом MALDI масс-спектрометрии. Биологическую активность устанавливали в экспериментах по конкурентному связыванию с nAChR из электрического органа *Torpedo californica* и $\alpha 7$ nAChR. Анализ полученных данных свидетельствует о том, что практически все выделенные токсины обладают высоким сродством к nAChR *Torpedo*. Также были найдены два токсина, проявившие способность взаимодействовать с $\alpha 7$ nAChR. Для дальнейшего структурного анализа токсины восстанавливали, подвергали пиридилэтилированию и анализировали полученные производные методом MALDI масс-спектрометрии. При этом оказалось, что один из токсинов содержит только 8 остатков цистеина, которые могут образовать только четыре дисульфидных связи. Таким образом, нами впервые обнаружен токсин, содержащий четыре дисульфидных связи и способный взаимодействовать с нейрональным nAChR $\alpha 7$ типа.

В результате работы из яда ленточного крайта *Bungarus fasciatus* в индивидуальном состоянии выделено 17 токсинов и исследованы их свойства, а также показано, что трехпетельный токсин, содержащий четыре дисульфидных связи способен взаимодействовать с нейрональным никотиновым ацетилхолиновым рецептором $\alpha 7$ типа.

ЗЕМЧЕНКОВА О.В., ПОЗДНЯКОВА С.И., БАШАРИНА О.В., АРТЮХОВ В.Г.

Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

**ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ Ca^{2+} -АТФазы
ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН УФ-ОБЛУЧЕННЫХ ЛИМФОЦИТОВ У
ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ ПАНКРЕАТИТОМ**

В настоящее время в медицине широко используется метод аутотрансфузии УФ-облученной крови (АУФОК), который способствует повышению бактерицидной активности крови, улучшению питания тканей кислородом, нормализации свертывающей способности и иммунитета. Изменение функционирования иммуноцитов должно быть обусловлено изменением их метаболизма.

Известно, что ионы Ca^{2+} играют важную роль в регуляции функциональной активности большинства клеток и тканей.. Повышение концентрации Ca^{2+} запускает каскад биохимических реакций, в результате которых клетки адекватно реагируют на внешний сигнал. Удаление Ca^{2+} из клетки и, таким образом, снятие сигнала, осуществляется Ca^{2+} -АТФазой. В связи с этим возникает интерес к изучению активности Ca^{2+} -АТФазы мембран лимфоцитов под влиянием УФ-света (240-390) нм в терапевтическом диапазоне доз, применяемых при АУФОК (151 и 755 Дж/м²).

Показано, что активность Ca^{2+} -АТФазы незначительно увеличивается непосредственно после облучении клеток в дозе 755 кДж/м². Использование меньшей дозы облучения не приводит к статистически достоверному изменению активности фермента. В фотомодифицированных в дозе 755 кДж/м² лимфоцитах выявляется снижение активности Ca^{2+} -АТФазы на 40 % при инкубации в течение 4 часов (относительно облученных клеток до инкубации). Возможно, это связано с активацией процессов фотоиндуцированного пероксидного окисления, при котором происходит окисление SH-групп, входящих в состав активного центра фермента. В результате, концентрация ионов Ca^{2+} в цитоплазме повышается, что приводит к интенсификации окисления глюкозы. Это подтверждается повышением активности ферментов дихотомического пути окисления глюкозы — ЛДГ, СДГ, цитохром *c* оксидазы. После суточной инкубации облученных лимфоцитов наблюдается увеличение активности Ca^{2+} -АТФазы на 25 % (относительно 4-часовой инкубации). Возможно, что увеличение активности Ca^{2+} -АТФазы направлено на

нормализацию концентрации в клетке ионов Ca^{2+} . Таким образом, можно предположить, что одной из причин перестройки метаболизма УФ-модифицированных лимфоцитов является изменение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} .

Как известно, УФ-свет применяется при лечении различных воспалительных патологий, поэтому далее мы исследовали активность Ca^{2+} -АТФазы у больных с воспалительным заболеванием (панкреатит). Активность данного фермента у больных в 2 раза выше, чем у здоровых доноров. Воспалительный процесс сопровождается окислительным стрессом, что способствует повышению ПОЛ а, следовательно, и увеличению пассивной проницаемости мембраны, в том числе и для ионов Ca^{2+} . Вероятно, повышение активности фермента направлено на нормализацию концентрации кальция в клетке. После инкубации нативных лимфоцитов в течение 4 часов наблюдается снижение активности Ca^{2+} -АТФазы на 29 %. После суточной инкубации лимфоцитов активность фермента увеличивается, в отличие от здоровых доноров – у них она остается в пределах исходных значений. Активность Ca^{2+} -АТФазы в клетках больных непосредственно после облучения изменяется также, как и у здоровых доноров. В ходе инкубации УФ-облученных иммуноцитов направленность изменений активности фермента у больных и здоровых одинакова, но степень выраженности изменений у больных выше. Это, вероятно, связано с более высоким уровнем пероксидного фотоокисления липидов у больных (и, видимо, с более значительным повышением при этом пассивной проницаемости для ионов), однако, фермент сохраняет свою активность, и, следовательно, клетки способны регулировать концентрацию Ca^{2+} .

ЗОЛОТУХИН А.И., ЗАНИНА М.А., ШАПОВАЛОВА А.А.

Балашовский институт Саратовского государственного университета

им. Н.Г. Чернышевского, Балашов, Россия

КОНЦЕПЦИЯ УСТОЙЧИВОГО РАЗВИТИЯ И СОХРАНЕНИЯ БИОРАЗНООБРАЗИЯ ПОЙМЕННЫХ ЛЕСОВ ПРИХОПЕРЬЯ

В работе приводятся результаты многолетних исследований состояния, динамики структуры, биоразнообразия и основных направлений обеспечения стабильности

пойменных дубрав после их массового отмирания и интенсивного хозяйственного освоения. В дубовых пойменных лесах Прихоперья и в опушечных фитоценозах, обнаружено 204 вида растений: 14 — деревьев, 12 — кустарников и 178 видов травянистых растений, которые относятся к 139 родам и 39 семействам. Видовая насыщенность составила 7-35 видов. Максимальное флористическое разнообразие установлено в средне нарушенных лесных сообществах. Определены дифференцирующие виды дубрав с разным уровнем антропогенной трансформации.

Лесопатологическая и антропогенная дигрессии пойменных дубрав сопровождалась неравномерным отмиранием дуба в прошлом. Более интенсивной гибель дуба была в чистых дубовых и дубово-осиновых древостоях, приуроченных к понижениям. Все негативные изменения лесных экосистем нарастают по градиенту близости к населенным пунктам, местам отдыха, транспортной сети. Относительно устойчивыми к повреждениям и болезням оказались дубово-липовые насаждения на повышениях поймы. На значительной территории сформировалась мозаичная структура лесных сообществ. Окна мозаики составляли от 30 до 60% лесных площадей.

В насаждениях с нарушенной полнотой, окнах мозаики, редколесьях образовались вторичные кустарниковые сообщества из клена татарского и других видов высотой до 6 - 7 м. В настоящее время клен татарский под влиянием древесных конкурентов отмирает и происходит замена его позднесукцессионными видами — липой мелколистной и ильмовыми. Мощность и состояние подлеска имеет индикационное значение в оценке степени антропогенной трансформации пойменных дубрав. Установлено принципиально новое направление смены дуба клёном ясенелистным и ясенем пенсильванским на вырубках. Распространение древесных интродуцентов и плотность их популяций имеют индикационное значение в оценке степени антропогенной трансформации пойменных дубрав.

Учитывая основные направления сукцессий и динамики биоразнообразия, а также принципиально новый феномен экспансии древесных адвентов в пойменные дубравы Прихоперья, мы предлагаем следующую стратегию действий.

1. Управление экотопами путем поддержания мозаичной горизонтальной структуры, проводя рубки подлеска в окнах мозаики. Ограничение строительства гидроэлектростанций на малых реках. В связи с нарастающими засухами усилить охрану

лесов от пожаров, которые уничтожают биоценозы и коренным образом изменяют лесорастительные условия.

2. Управление фитоценозами путем корректирования их возрастной структуры и видового состава. Для этого увеличить площадь молодняков дуба, проводить санитарные рубки древесных адвентов в сочетании с химическими методами ограничения их численности. Участки старовозрастных дубовых лесов семенного происхождения выделять в качестве особо охраняемых природных территорий. Создавать лесные культуры дуба на вырубках и освободившихся от кустарников и чужеродных видов деревьев участках частичные культуры дуба коридорным (когда участки 0,5-1 га) или куртинно-групповым способами (площадь участка 0,1-0,2 га) путем посадки семян дуба. Перспективными компонентами в состав лесных культур дуба являются липа мелколистная, клен остролистный и ясень обыкновенный. Ограничить сбор раннецветущих растений.

Проводить рубки омоложения по типу группово-выборочных. Центрами для первых приемов рубок выбирать имеющиеся пятна мозаики с благонадежным подростом дуба, которые сформировались в результате деградации дубрав в предыдущие годы. При этом поддерживать мозаичную горизонтальную структуру, которая благоприятна для восстановления дуба и сохранения биоразнообразия. Регулировать рубками направление сукцессий, отдавая предпочтение дубу, липе, клену остролистному. Считать ильмовые как неперспективные компоненты пойменных дубрав (возможна повторная эпифитотия «голландской» болезни из-за экстремальных засух).

3. Управление зооценозами. Рекомендуется мониторинг динамики популяций насекомых-фитофагов, регулирование их численность при вспышках массового размножения различными методами. Ограничивать численность лосей и диких кабанов, которые могут влиять отрицательно на восстановление дуба. Исключить выпас домашних животных в приопушечных зонах пойменных лесов шириной 50 м, где имеется подрост дуба и богатое биоразнообразие растений.

ЗУБАРЕВА К.Ю., КОНОШИНА С.Н., ПРУДНИКОВА Е.Г.

ФГБОУ ВПО «Орловский государственный аграрный университет», Орел, Россия

ВЛИЯНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА ФОРМИРОВАНИЕ И РАЗВИТИЕ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

В современной науке больше внимание уделяется изучению взаимодействия между растениями. Между тем эффекты биологического взаимодействия могут проявляться и опосредованно, через почву. Почвенная среда богата разнообразными физиологически активными веществами, являющимися продуктами нормального метаболизма растений или разложения их тканей после отмирания. Благодаря этому почва обладает определённой физиолого-биохимической активностью, которая может иметь как фитоингибирующее, так и фитостимулирующее проявление.

По данным, содержание фенолов в различных типах почвы Орловской области неодинаково. Их содержание возрастает от черноземов, через серые лесные почвы к дерново-подзолистым, что может быть объяснено особенностями генезиса каждого типа почв. С увеличением глубины содержание фенолов увеличивается в серых лесных почвах незначительно, тогда как этот процесс у чернозёмов выражен более ярко (разница между слоем 0-10 см и 90-100 см составляет приблизительно 300 мкг/100г почвы). У дерново-подзолистого типа почв наблюдается обратная тенденция – с увеличением глубины содержание фенолов уменьшается с 452 до 397 мкг/100г сухой почвы. Содержание фенолов в серых лесных почвах изменяется соответственно с 474 до 497 мкг/100г сухой почвы соответственно.

Определённое содержание органического вещества в почве оказывает влияние на рост и развитие тест-культуры, то есть на плодородие почвы. Всхожесть семян ячменя на почвенных пластинах различалась в зависимости от типа почвы. Наименьшая всхожесть отмечалась в вариантах с использованием дерново-подзолистых почв (в среднем 52% по всем вариантам к контролю), наибольшая в вариантах с использованием серых лесных (70,53%). Чернозёмы занимают промежуточное положение (60%). С увеличением глубины взятия образцов изменяется их токсичность – максимальное значение в слое 90-100 см, минимальное в пахотном слое всех типов почвы.

Увеличение количества фенолов в различных типах почвы имеет обратную связь с динамикой накопления вегетативной массы.

Фенольные соединения представляют собой один из наиболее распространенных и многочисленных классов природных соединений, обладающих биологической активностью. В ходе метаболизма, а также при воздействии негативных внешних факторов на растительный организм в нем появляются сигнальные соединения фенольной природы, выделяемые растением-хозяином на разных уровнях растительно-патогенного взаимодействия.

Исследования показали, что высокое содержание фенолов в створках бобов и в семенной кожуре в фазу начала налива семян, по-видимому, связано со степенью устойчивости-восприимчивости гороха к *Bruchus pisorum* L.

Следует отметить, что мощность защитного барьера на пути проникновения личинки не совпадает с последовательностью выгрызания каналов в генеративных структурах гороха.

Содержание фенолов в зерне не связано с устойчивостью к *Bruchus pisorum* L. возможно еще и потому, что, являясь целью для личинки, оно не служит препятствием к развитию последней. Первым барьером на пути личинки являются створки бобов. Хотя по содержанию фенольных соединений между устойчивыми и неустойчивыми образцами наблюдаются четкие различия, тем не менее, следует указать на тот факт, что в год с меньшим количеством осадков, устойчивые образцы по содержанию фенолов в створках бобов приближались к неустойчивым. Лишь содержание фенолов в семенной кожуре хотя и было подвержено изменениям в зависимости от года, однако существенно отличалось по группам устойчивых и неустойчивых сортообразцов.

Что касается защитного действия фенольных соединений, можно предположить, что от створок бобов к семенной кожуре происходит возрастающий кумулятивный эффект.

Одной из непосредственных причин различной избираемости сортов гороха к *Bruchus pisorum* L. является низкая концентрация фенольных соединений в семенной кожуре зерна и створках бобов в фазу начала налива семян.

ЗУБКОВ А.В., СВИРИДОВ В.В., КУЗЬМИНА Н.С.

Федеральное государственное бюджетное учреждение научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН, Москва, Россия

АУТОАНТИТЕЛА К ЛИНЕЙНЫМ И КОНФОРМАЦИОННЫМ ЭПИТОПАМ ПЕРОКСИДАЗЫ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ АУТОИММУННОМ ТИРЕОИДИТЕ И ДИФФУЗНОМ ТОКСИЧЕСКОМ ЗОБЕ

В настоящее время исследования аутоиммунных заболеваний щитовидной железы сосредоточены на выявлении роли отдельных эпитопов аутоантигенов: тиреоглобулина, тиреопероксидазы (ТПО) и рецептора тиреотропного гормона, к которым направлены специфические аутоантитела. Результаты работы независимых исследователей убедительно свидетельствуют о том, что у пациентов с аутоиммунным тиреоидитом и диффузным токсическим зобом патологии образуются аутоантитела с различной эпитопной специфичностью.

В работе изучалась эпитопная направленность аутоантител к линейным и конформационным эпитопам тиреоидной пероксидазы у пациентов с аутоиммунным тиреоидитом и диффузным токсическим зобом в конкурентном иммуноферментном анализе с использованием коллекции из 36 моноклональных антител к ТПО.

ТПО выделяли методом аффинной хроматографии с использованием МкАт. Конъюгаты МкАт с пероксидазой из корня хрена готовились по методу Nakane et al., 1975. Эпитопную специфичность аутоантител из сыворотки крови пациентов изучали в конкурентном ИФА с использованием конъюгатов МкАт с пероксидазой из корня хрена.

Гетерогенность эпитопов антитиреопероксидазных аутоантител человека, выявляемых при ДТЗ и ГТ, изучалась с использованием МкАт к ТПО. Показано, что в конкуренции за центры связывания ТПО с аутоантителами из сыворотки крови больных ДТЗ и ГТ участвуют 8 МкАт к эпитопам 1, 70, 82, 88, 2, 3, 77 и 79. Максимальное подавление связывания отмечено для аутоантител, направленных к конформационному эпитопу 3, при ДТЗ – $60,3 \pm 12,7$ %, при ГТ – $61,8 \pm 32,2$ %. Причем степень подавления связывания не зависела от концентрации Ат к ТПО в сыворотке крови больных с ДТЗ в отличие от образцов сыворотки больных с ГТ. Аутоантитела в сыворотке больных ГТ

подавляли связывание МкАт к эпитопу 77 значительно сильнее, чем в сыворотке больных с ДТЗ: $36,3 \pm 17,2 \%$ и $54,3 \pm 9,6 \%$, соответственно ($p \leq 0,05$).

Полученные результаты свидетельствовали о специфичности аутоантител к определенным участкам молекулы ТПО и согласовывались с данными литературы. Можно предположить, что дальнейшее изучение конкурентных взаимодействий с аутоантителами других моноклональных антител, не включённых в проведённое исследование, а также расширение панели сывороток крови больных с различными формами патологии щитовидной железы, позволит выявить новые иммунодоминантные участки на молекуле ТПО, ответственные за формирование аутоантител при различных заболеваниях, и будет способствовать улучшению диагностики и лечения пациентов.

ЗЫРЯНОВА Ю.В.

Сибирский государственный технологический университет, Красноярск, Россия

АДВЕНТИВНОЕ ПОЧКООБРАЗОВАНИЕ У JUNIPERUS SIBIRICA

В работе рассматривается один из способов микроразмножения можжевельника сибирского в условиях *in vitro* – адвентивное почкообразование.

Объектом исследования был выбран можжевельник сибирский, произрастающий в Ермаковском районе Красноярского края. Этот кустарник представляет значительный интерес для озеленения: очень декоративен благодаря двухцветной хвое, рекомендуется для оформления каменистых горок и создания низких групп. Практически все части фитомассы используются человеком. Охраняется в заповедниках.

Наиболее генетически консервативным методом размножения в культуре тканей *in vitro* является культивирование апикальных и латеральных почек. Развитие растений из почек короче, чем при использовании других методов. Значительный интерес представляют адвентивные почки, которые возникают *de novo* прямо из эксплантов или косвенно, через промежуточный каллус. Не смотря на то, что существуют стандартные методы для получения адвентивных почек (они успешно получены для многих покрытосеменных растений), голосеменные менее отзывчивы к ним. В литературе имеются скудные данные по этому вопросу для можжевельника. А. Negussie получены

адвентивные почки из изолированных семядолей *Juniperus excelsa* на средах MS и Эрикссона. На среде Эрикссона оптимальными концентрациями гормонов для формирования максимального числа побегов оказались: 0,02 мг/л α -НУК и 0,5 мг/л 6-БАП, а на среде MS концентрация ауксина та же, а цитокинина 1 мг/л. Ауксины играют важную роль в процессе адвентивного почкообразования на начальном этапе вместе с цитокининами, но в дальнейшем подавляют морфогенетическую реакцию эксплантов, поэтому их своевременно надо исключать из питательной среды. После формирования побегов для их дальнейшего развития гормоны исключались из среды. Ризогенез побегов был достигнут A. Negussie при добавлении в среду ИМК (1 мг/л) и α -НУК (0,5 мг/л).

В настоящей работе в качестве эксплантов использовали зародыши семян *Juniperus sibirica*. Семена извлекали из шишкоягод, затем удаляли семенную кожуру. Очищенные семена стерилизовали в 70% этиловом спирте в течение 5 минут, промывали в трех порциях стерильной дистиллированной воды, после чего в условиях бокса были извлечены зародыши, которые помещали на агаризованную питательную среду с макро- и микролями по Мурасиге-Скугу, дополненную α -НУК (0,4 мг/л), 6-БАП (4 мг/л), тиамин (1 мг/л), пиридоксин (10 мг/л); содержание сахарозы в питательной среде составило 30 г/л, агара – 7 г/л. Культивирование проводили при температуре 25°C, фотопериоде 16 часов день и 8 часов ночь при освещенности 3 тыс. лк. На 30-й день культивирования наблюдалось образование четко дифференцированных ярко-зеленых микропочек и незначительное образование каллуса. На 56 день культивирования полученные микропочки были помещены на безгормональную питательную среду MS. В период культивирования наблюдали развитие и дифференциацию микропочек, рост каллусной ткани и формирование побегов. Для активации роста в дальнейшем экспланты были помещены на среду MS с 6-БАП в концентрации 6 мг/л. В настоящее время ведется работа по развитию и укоренению побегов.

Помимо адвентивных почек были получены пазушные почки из семядольных эксплантов. Зародыши можжевельника сибирского помещали на питательную среду, содержащую макро- и микроли по Уайту, дополненную α -НУК (0,4 мг/л). Через 10-15 дней культивирования наблюдалось разрастание фотосинтезирующих семядолей. Надо отметить, что на безгормональной среде развития семядолей не происходило. Далее семядольные экспланты помещали на среду DCR, дополненную 2,4-Д (1 мг/л) и 6-БАП (0,5

мг/л). Через 20 дней наблюдали формирование первичных листовых почек между семядолями. В дальнейшем планируется получение и укоренение микропобегов.

Таким образом, были подобраны условия для получения адвентивных и пазушных почек из зародышей можжевельника сибирского *in vitro*.

ИВАНИЦКАЯ Л.Н., ЛЕДНОВА М.И., ПУСТОВАЯ О.В.

*Учебно-научно-исследовательский институт валеологии
Южного федерального университета, Ростов-на-Дону, Россия*

МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА ДЛИТЕЛЬНОГО ЭЭГ МОНИТОГИНГА В ОБЛАСТИ НЕЙРОФИЗИОЛОГИИ

Электроэнцефалография (ЭЭГ) - метод, позволяющий судить о функциональном состоянии головного мозга, механизмах, реализующих высшую нервную деятельность, физиологической зрелости, наличии мозговых дисфункций и их характере. К преимуществам данного нейрофизиологического метода относятся безвредность, неинвазивность и безболезненность.

За многие десятилетия существования, метод регистрации электрической активности головного мозга претерпел значительную модернизацию, что позволило значительно расширить сферу применения электроэнцефалографии, увеличить возможности современной нейрофизиологии как с научно-исследовательской, так и диагностической точки зрения. На сегодняшний день это один из основных методов применяющихся в области нейрофизиологии. Современная компьютерная ЭЭГ позволяет выполнять визуальный, спектральный, корреляционный, когерентный анализ. Развитие современных технологий позволило расширить возможности и повысить качество получаемых электрофизиологических данных, проводить длительную непрерывную регистрацию ЭЭГ с регистрацией дополнительных физиологических показателей (электроокулограммы, электрокардиограммы, электромиограммы, вызванных корковых потенциалов) и синхронизацией ЭЭГ с видеозаписью, которая также значительно расширяет возможности нейрофизиолога.

В последние годы длительная регистрация биоэлектрической активности головного мозга во сне завоевывает все большую популярность в нейрофизиологической среде (как в клинической, так и экспериментальной). В клинической нейрофизиологии она имеет особую ценность для диагностики эпилептической активности, которая выявляется гораздо чаще, чем при рутинной короткой записи ЭЭГ. При этом большую роль играет деривация сна, которая является мощным провоцирующим фактором для выявления эпилептической активности. Мониторинг ЭЭГ во сне повышает вероятность постановки правильного диагноза и назначения своевременного адекватного лечения и является основным методом исследования нейрофизиологии сна, особенностей протекания разных стадий сна.

ЭЭГ в состоянии физиологического дневного сна - эффективный метод раннего выявления патологических знаков, отклонений и отставания в развитии у детей, особенно первых лет жизни, поскольку в таком возрасте имеются сложности, связанные с невозможностью проведения функциональных проб, и большим количеством артефактов. Закономерные онтогенетические изменения показателей электроэнцефалограммы бодрствования и сна позволяют оценивать степень незрелости и адекватность развития головного мозга.

Несмотря на вышеперечисленные преимущества и распространенность длительного ЭЭГ мониторинга, большой проблемой на сегодняшний день является отсутствие единых стандартов для его проведения и интерпретации. Требования клинической практики заставляли различные специализированные общества создавать свои практические рекомендации к проведению полисомнографических исследований. Но это не решало проблему стандартизации методов в этой области.

Анализ структуры сна у взрослых осуществляется в настоящее время согласно рекомендациям А. Rechtschaffen и А. Kales, установленным еще в 1968г. За историю своего существования они неоднократно подвергались критике и пересматривались. Помимо отсутствия единых стандартов по проведению и оценке ЭЭГ сна, существует проблема обучения специалистов. Адекватно интерпретировать данные ЭЭГ может только специалист, имеющий хорошую подготовку и большой опыт в этой области нейрофизиологии.

Таким образом, проблемы поиска и утверждения единых стандартов для проведения и оценки полисомнографических записей и обучения

высокопрофессиональных специалистов, на сегодняшний день являются наиболее важными методологическими проблемами в области использования длительного ЭЭГ мониторинга сна.

ИВАНОВА А.О.

Уфимский государственный нефтяной технический университет, Уфа, Россия

ВЛИЯНИЕ БИОУДОБРЕНИЯ «АЗОЛЕН» НА ПОВЫШЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ПШЕНИЦЫ К СТРЕСС-ФАКТОРАМ

Для защиты растений от болезней наряду с химическими фунгицидами широко используются биопрепараты на основе живых культур микроорганизмов. Бактерии р. *Azotobacter* обладают значительным потенциалом для создания биоудобрения на их основе, поскольку бактерии этого рода отвечают практически всем требованиям, предъявляемым к PGPR – Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. Интродукция азотфиксирующих бактерий в ризосферу положительно влияет на рост и развитие растений, что обусловлено не только улучшением азотного питания, но и действием физиологически активных веществ.

Не исключено, что биоудобрение «Азолен» может повышать устойчивость растений и к абиотическим стрессовым факторам. Поэтому целью работы было выявление способности биоудобрения «Азолен» повышать устойчивость растений к действию абиотических стресс-факторов.

В экспериментах с засолением среды в контроле инокулированные и обработанные бактерией проростки пересаживали в чашки Петри на раствор 1%-ной сахарозы, в опыте - на ту же среду, дополнительно содержащую 1% NaCl. В опыте с действием дефицита влаги проростки высаживали на 10%-ный раствор полиэтиленгликоля (ПЭГ, молекулярная масса 6000) в 0,5%-ном растворе сахарозы, контрольные проростки находились на растворе сахарозы.

При засолении среды торможение роста корня у инокулированных растений было примерно в 2,5 раза сильнее, чем у инокулированных. Инокулированные «Азоленом» проростки быстрее преодолевали кратковременное воздействие водного дефицита; корни

неинокулированных проростков не росли даже через 48 часов опыта, тогда как обработанные проростки проявили способность к росту через 20 часов после стресса. Темпы роста корня и coleoptilya обработанных «Азоленом» растений оставались более высокими, в сравнении с необработанными (7,7% и 13,8%, 2,8% и 11% соответственно).

Так как при действии различных стресс - факторов растения могут включать одни и те же сигнальные пути и активировать одинаковые классы защитных белков, неудивительно, что инокуляция растений бактерией *Azotobacter vinelandii* ИБ 4 повышает также их устойчивость к хлоридному засолению среды, а также к дефициту влаги, имитированному ПЭГ.

ИВАНОВА В.П.

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М.Сеченова Российской академии наук,
Санкт-Петербург, Россия*

К ВОПРОСУ ОБ ЭВОЛЮЦИИ МУЛЬТИДОМЕННЫХ БЕЛКОВ

Сложность архитектуры генетических сетей организма зависит от числа белок-ДНК и белок-белковых взаимодействий у компонентов, входящих в состав различных клеток, тканей и органов у многоклеточных животных. Именно появление мультидоменных белков обеспечило формирование множественных связей у различных соединений и тем самым высокую упорядоченность внутриклеточной и внеклеточной среды в организме. Индивидуальные домены мультидоменных белков представляют собой компактные, стабильные единицы, которые часто выполняют специфическую функцию. Следовательно, мультидоменные белки – это объединение структурных модулей, способных связывать белки и нуклеиновые кислоты, и/или объединение функциональных модулей, определяющих каталитическую или регуляторную специфичность, что делает такие белки идеальными компонентами регуляторных или структурных сетей, где множественные связи белков являются необходимым условием для выстраивания подобных сетей в клетке.

Мультидоменные белки, особенно у многоклеточных организмов, часто содержат множественные копии структурных доменов одного типа. В основе такого построения белков лежат тандемные дубликации генных сегментов внутри гена. В геноме млекопитающих кроме внутренних дубликаций происходили дубликации генов, уже содержащих повторы. Быстрая экспансия повторов у эукариот объясняется тандемной дубликацией единиц, содержащих несколько повторяющихся доменов. Например, у человека 98 % всех белковых доменов являются результатом дубликаций генных элементов различного строения. Многие мультидоменные белки содержат несколько доменов различного типа. В этом случае эволюция генов достигается слиянием генов или перемещением определенных сегментов различных генов, кодирующих те или иные специфические белковые домены, с образованием новых композитных генов, определяющих иную функциональность нового белка.

Увеличение размера генома у многоклеточных животных шло параллельно с уменьшением компактности генома и увеличением в нем количества и размера интронов. Наличие интронных нуклеотидных последовательностей увеличило скорость генных перестроек внутри генома и сыграло решающую роль в создании новых генов внеклеточных мультидоменных белков. Установлено, что для дубликации экзонов и их вставок в геном пригодны только симметричные нуклеотидные модули, т.е. модули, фланкированные интронами одной фазы. Большинство модулей, используемых для построения внеклеточных мультидоменных белков, относятся к модулям класса 1-1, т.е. оба интрона, фланкирующего экзонный модуль, относятся к фазе 1. Наиболее четкая корреляция между доменной организацией белка и экзон-интронной структурой гена отмечена для генов, кодирующих так называемые «молодые» белки позвоночных животных (например, белки каскада свертывания крови, селектины, фибронектины, тенасцины и др.). У более древних мультидоменных белков многоклеточных животных нет столь четкой корреляции между структурой гена и доменной структурой белка. В ряде случаев межмодульные интронные участки в генах отсутствуют (например, у наиболее древнего представителя внеклеточного матрикса – ламинина), что может быть связано с частичной утратой в генах исходных интронов фазы 1 в ходе эволюции. Постепенное исчезновение межмодульных интронов ведет к утрате у генов способности к дальнейшей межмодульной эволюции, т.е. происходит стабилизация доменной структуры белка. Гены,

у которых межмодульные интроны остаются, сохраняют свою пластичность и способность участвовать в дополнительных межмодульных перестройках. Таким образом, в ходе эволюции осуществляется контроль степени компактности генома посредством регуляции размера и частоты встречаемости интронных зон. Менее компактный геном способствует рекомбинации интронов и перемещению экзонов, тем самым обеспечивая ускорение процессов конструирования новых многомодульных белков из уже имеющихся в геноме модулей.

ИВАНОВА К.Б.

Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИИ *GIARDIA LAMBLIA*

Возбудителем лямблиоза являются простейшие *Giardia lamblia*, паразитирующие в тонком кишечнике. Заболевание протекает с функциональным расстройством кишечника и имеет бессимптомное носительство.

Лямблиоз является одной из наиболее распространенных паразитарных инвазий: по данным ВОЗ, в мире им страдают примерно 20% детей. Симптомы болезни не имеют специфичности, сходны с таковыми при других вариантах патологии гастродуоденальной зоны, кишечника, желчевыводящих путей. Поэтому успех лечения зависит прежде всего от точной диагностики лямблиоза.

Несмотря на то что лямблиоз известен уже давно, существуют серьезные проблемы в его диагностике. Традиционно диагноз устанавливают по обнаружению цист или трофозоитов в образцах фекалий или дуоденальном содержимом. Эффективность простой микроскопии кала составляет около 50% из-за характерной прерывистости в цистовыделении, связанной с особенностями размножения трофозоитов лямблий. Чувствительность и специфичность иммунологических методов варьируют в зависимости от состава и качества использованных диагностических наборов. В частности, существует проблема перекрестных реакций антигенов лямблий с другими паразитарными и соматическими антигенами, которые дают ложноположительные результаты. Поэтому для

повышения надежности и достоверности диагностики лямблиоза рекомендуется комплексное применение тестов на антитела и антигены.

Таким образом, целью работы являлась разработка новой универсальной тест-системы для точной молекулярно-генетической детекции *Giardia Lamblia*, для этого применили метод полимеразной цепной реакции и адаптации ее для ведения в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

При проведении исследования были использованы клинические изоляты, полученные в инфекционных отделениях больниц г. Уфы после предварительной инактивации патогенна тепловой обработкой.

Основные методы при создании тест-системы – это полимеразная цепная реакция и ее вариант в режиме реального времени с использованием интеркалирующего красителя, которые проводились на термоциклерах iCycler5 (BioRad) и RotorGene (Corbett). Дизайн праймеров осуществлялся с использованием пакета программ LaserGene (DNASTAR).

Таким образом, подобраны специфичные праймеры Gia28F/GiaR и Gia12F/Gia12R на гены паразита, которые не способны реагировать на ДНК человека.

В результате осуществления намеченных задач создали эффективную тест-систему для выявления зараженности *Giardia lamblia*, сопоставимой или даже превосходящей по чувствительности и специфичности с имеющимися коммерческими наборами.

ИВАНОВА Л.А., ГАСКАРОВА Е.Ф., ГОМАНКОВА А.И.

Московский государственный университет пищевых производств, Москва, Россия

НОВЫЙ ПРОДУЦЕНТ ЛИПАЗЫ ZYGOSACCHAROMYCES ROUXII БЛ-06

Производство ферментных препаратов является одним из ведущих направлений в развитии биотехнологии во всем мире. К числу ферментов, имеющих большое народнохозяйственное значение, относятся липазы, получаемые с помощью микробного синтеза. Известные в зарубежной и отечественной практике липолитические ферментные препараты являются, как правило, бактериального происхождения и проявляющие наибольшую липолитическую способность (ЛС) в слабощелочной области рН. В этой связи, большое значение и актуальность приобретает поиск высокоактивных продуцентов

липаз дрожжевого происхождения, проявляющих ЛС в слабокислых областях рН, с целью использования в пищевой промышленности.

При изучении ряда дрожжевых культур было установлено, что некоторые из них обладают экзолипазной активностью. Для этого все образцы штаммов высевали на чашки Петри с плотной селективной средой. После 48 часов роста культур у 7 из 10 исследуемых образцов было обнаружено наличие ЛС.

Определение ЛС в культуральной жидкости проводили с помощью титрометрического метода. Исходные культуры выращивали на питательной среде следующего состава (%): глюкоза – 0,2; дрожжевой экстракт – 0,2; CaCO₃ – 0,04; MgSO₄·7H₂O – 0,02; KН₂PO₄ – 0,02; мочевины – 0,01; оливковое масло – 0,6. Культивирование проводилось при температуре 30°C в течение 48 ч. В результате исследования был отобран штамм, обладавший наибольшей ЛС - *Zygosaccharomyces rouxii* БЛ - 06. Исходная ЛС данной культуры составила 20 ед/см³.

ЛС штаммов может значительно меняться в зависимости от условий выращивания дрожжей. Было исследовано влияние длительности культивирования исходных культур на активность экзоферментов. Выяснено, что ЛС менялась в процессе развития культуры, повышаясь в первые двое-трое суток на 75% и снижаясь по мере старения клеток до 50% от максимального значения ЛС.

ЛС продуцентов зависит не только от времени культивирования, но и от состава питательной среды.

С целью увеличения ЛС была проведена оптимизация состава питательной среды для штамма *Zygosaccharomyces rouxii* БЛ - 06. В результате исследования был выявлен наиболее эффективный состав питательной среды (%): глюкоза – 0,4; дрожжевой экстракт – 0,4; CaCO₃ – 0,06; MgSO₄·7H₂O – 0,05; KН₂PO₄ – 0,04; мочевины – 0,02; оливковое масло – 1. В состав питательной среды в качестве дополнительного источника органического азота была введена соевая мука в количестве 0,05%. Повышение содержания глюкозы в питательной среде свыше 2% ингибировало синтез дрожжевой липазы. Добавление в среду оливкового масла на фоне глюкозы приводило к более интенсивному росту культуры. Недостаток магния и фосфора так же снижали липазную активность культур. В результате проведенных исследований ЛС штамма *Zygosaccharomyces rouxii* БЛ - 06 была увеличена в 3 раза с 20 ед/см³ до 60 ед/см³.

ИВАНОВА Л.А., ГЛАЗОВА А.А., РЕПНИК В.А.,

ШЕЛУДЬКО Ю.В., ЗДОРОВИЛО Н.В.

Московский государственный университет пищевых производств, Москва, Россия

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРОМЫШЛЕННЫХ И БЫТОВЫХ ОТХОДОВ В КАЧЕСТВЕ СЫРЬЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ГРИБНЫХ ЦЕЛЛЮЛАЗ

Проводилось исследование культивирования микроскопических грибов на питательных средах, содержащих в своем составе целлюлозосодержащие бытовые отходы. В качестве продуцента целлюлолитических ферментов (ЦФ) использовали штамм *Aspergillus sp.* Ч-2, выделенный из почвы в результате скрининга 28 грибных культур.

Как известно, ЦФ являются индуцибельными, поэтому в качестве основного источника углерода в питательных средах для глубинного культивирования использовалась картонная составляющая упаковок «Тетра-Пак» (содержание целлюлозы 82 %), ранее использованных для розлива жидких пищевых продуктов. Картон отделялся от полиэтилена и алюминия и измельчался в дезинтеграторе.

Для изучения влияния количества картона в питательной среде на целлюлолитическую способность (ЦС) ферментов в культуральной жидкости гриба *Aspergillus sp.* Ч-2, содержание картона в питательной среде варьировали в интервале 0-5%. В качестве жидкой фазы и источника ростовых факторов использовали пастеризованную молочную сыворотку с содержанием сухих веществ 5,1%, предоставленную ЗАО «Лактис», богатую лактозой, витаминами, минеральными солями и органическими кислотами. Культивирование штамма-продуцента проводилось в колбах Эрленмейера емкостью 750 см³ со 100 см³ питательной среды pH 5,8-6,0 на качалочной установке при $n = 180-200$ об/мин в течение 7 сут при $30 \pm 1^\circ\text{C}$. ЦС определяли модифицированным фотоколориметрическим методом с применением реактива Шомодьи-Нельсона. За единицу ЦС принимали такое количество фермента, которое катализирует расщепление хроматографической бумаги с образованием 1 мкмоль глюкозы в 1 см³ за 1 мин.

Наивысшая ЦС ферментов в культуральной жидкости (18,5 ед/см³) наблюдалась при внесении 1,5% картона. При использовании свыше 2% картона затруднялось перемешивание, что явилось причиной снижения роста культуры и её ЦС.

Использованная сыворотка содержала 4,6 % легкоусваиваемых углеводов, способных ингибировать синтез целлюлаз, поэтому была изучена зависимость ЦС от количества внесенной сыворотки при содержании картона в среде 1,5%. Сыворотку в количестве 1-100% смешивали с водопроводной водой. По результатам проведенных исследований было отмечено, что внесение 1% сыворотки (лактозы 0,036%) повышало ЦС (19,8 ед/см³) в 20 раз относительно культуры, выращенной на суспензии картона в воде без добавления сыворотки. Это свидетельствует о выраженной индукции синтеза целлюлолитических ферментов лактозой, что подтверждается многочисленными литературными данными. Однако внесение сыворотки сверх указанного количества приводило к незначительному понижению ЦС гриба. Проведенные исследования по изучению ингибирования синтеза ЦФ показали, что уже в концентрации 0,1% лактоза замедляет накопление целлюлаз в культуральной жидкости гриба *Aspergillus sp.* Ч-2 на 30%.

При разбавлении сыворотки водой уменьшается не только содержание сахаров в среде, но и других питательных веществ, поэтому вместо воды использовали солевой раствор, содержащий 0,3% мочевины, 0,2% дигидрофосфата калия, 0,02% сульфата магния, 0,02% хлорида кальция. Исследования проводились аналогично предыдущим. Наивысшая ЦС составила 33,9 ед/см³ в варианте, где сыворотка составила 1% питательной среды. При культивировании *Aspergillus sp.* Ч-2 на среде, не содержащей сыворотки, ЦС достигла 82% от максимальной. В то же время отмечено, что при использовании солевого раствора в качестве компонента питательной среды, ЦС повысилась на 71% относительно полученной при культивировании этого штамма гриба на аналогичной среде с водопроводной водой.

Таким образом показана возможность глубинного культивирования штамма *Aspergillus sp.* Ч-2 на солевой среде, содержащей 0,3% мочевины, 0,2% дигидрофосфата калия, 0,02% сульфата магния, 0,02% хлорида кальция, с добавлением 1,5% картона и 1% молочной сыворотки с целью получения целлюлолитических ферментов.

ИВАНОВА Л.А., УСТИНОВА Ю.В., БЕЛОВОЛОВА А.С., ПРИЩЕПО А.Ю.
ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет пищевых производств»,
Москва, Россия

БИОТЕХНОЛОГИЯ ФЕРМЕНТА ГИСТИДИНДЕКАРБОКСИЛАЗЫ НА ОСНОВЕ НОВОГО ШТАММА *BACILLUS LICHENIFORMIS*

Биотехнология ферментных препаратов – одно из перспективных направлений современной науки. Энзимы находят широкое применения в ряде отраслей промышленности. Так, например, лиазы (четвертый класс) и продукты, полученные в результате катализируемых ими реакций, применяют в пищевой индустрии, практической медицине, лабораторных исследованиях.

Научный интерес представляет разработка биотехнологии фермента гистидиндекарбоксилазы, который ускоряет отщепление молекулы CO₂ от аминокислоты гистидин, в результате чего получают гистамин. Последний применяют при лечении ряда заболеваний (полиартрит, суставный и мышечный ревматизм, радикулит, аллергические заболевания и др), а также при исследовании качества пищевых продуктов (контроль содержания гистамина). В настоящее время гистамин получают в основном синтетическим путем, что оказывает значительное влияние на стоимость готового препарата.

Целью работы явилось изучение возможности создания рентабельной биотехнологии фермента гистидиндекарбоксилазы.

На начальном этапе исследований был проведен скрининг микроорганизмов, потенциально являющихся продуцентами гистидиндекарбоксилазы. Более 60 изолятов бактерий было проверено на наличие соответствующей активности. В результате эксперимента был выбран продуцент, выделенный из почвы Московской области. Исследование морфологических признаков указанного микроорганизма показало, что клетки культуры грамположительные, палочковидной формы, подвижны, имеют эндоспору. Последующее изучение культуральных и физиолого-биохимических свойств продуцента позволило отнести его к бактериям рода *Bacillus*. Анализ секвенсов переменных участков 16S рНК тестируемого штамма подтвердил его максимальную близость к виду *Bacilluslicheniformis* (99%).

При выращивании выбранного штамма *Vlicheniformis* КЛ13 на исходной питательной среде (ГРМ-бульон) в течение 48-72 ч на качалочной установке при температуре $37\pm 2^\circ$ С активность гистидиндекарбоксилазы в фильтрате культуральной жидкости (КЖ) составляла $1,0-1,5 \text{ ед/см}^3$, а концентрация накопленного гистамина – $9,0-10,0 \text{ мкг/см}^3$. С целью повышения активности ферментного препарата был проведен многофакторный эксперимент по выбору наиболее эффективного состава питательной среды (ПС) для культивирования *V. licheniformis* КЛ13. В результате были выявлены следующие условия культивирования продуцента, позволяющие достичь в фильтрате КЖ активности фермента $14,0-16,0 \text{ ед/см}^3$: питательная среда – ГРМ-бульон с добавлением гистидина и ионов Mg^{2+} , рН 7,0, возраст посевного материала – 36-48 ч, посевная доза – 10^6-10^8 кл, длительность культивирования – 72-96 ч. При этом концентрация гистамина в фильтрате КЖ составляла $50,0-60,0 \text{ мкг/см}^3$.

Проведенные на следующем этапе эксперименты позволили достичь увеличение активности фермента в 1,8 раз в фильтрате КЖ за счет предварительного выращивания посевного материала на агаризованной питательной среде с гистамином. Дополнительно было изучено влияние УФ-индуцированного мутагенеза *V. licheniformis* КЛ13 на активность гистидиндекарбоксилазы. В результате прямого воздействия УФ-облучения на культуру был получен посевной материал, при использовании которого для глубинного культивирования активность фермента гистидиндекарбоксилазы в фильтрате КЖ возросла более чем в 2,5 раза.

Осаждение фермента гистидиндекарбоксилазы из фугата культуральной жидкости *V. licheniformis* КЛ13 проводили органическими осадителями. Для этих целей использовали этанол, бутанол-1 и изопропанол в соотношениях осадитель:КЖ 1:1; 1,5:1; 2:1; 2,5:1; 3:1; 3,5:1; 4:1; 4,5:1; 5:1 и интервале рН 2-10. По результатам сравнительного эксперимента было выявлено, что наиболее эффективное осаждение достигается изопропанолом в соотношении 4:1-5:1 и рН 8,0-9,0, при этом активность гистидиндекарбоксилазы в препарате составила $600,0-700,0 \text{ ед/г}$.

Таким образом, была показана возможность получения фермента гистидиндекарбоксилазы, необходимого для катализа реакции превращения гистидина в гистамин, микробиологическим путем.

ИВАНОВА М.А., БУТВИЛОВСКИЙ В.Э., ДОЦЕНКО К.Э., КУХТА Е.А.
Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

ОБОСНОВАНИЕ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РАЗВИТИЯ ТОКСОПЛАЗМЕННОГО ЭНЦЕФАЛИТА ПУТЕМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРЕДИКТОРОВ РЕАКТИВАЦИИ T.GONDII В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ

Токсоплазмоз, возбудителем которого является *Toxoplasma gondii*, является одной из самых распространенных в мире паразитарных инвазий. Инвазированность людей в возрасте 10–19 лет в мире достигает 30 %, у лиц старше 50 лет — до 70 %.

Выделяется ряд форм заболевания: токсоплазмоз у иммунокомпетентных, токсоплазмозный хориоретинит, токсоплазмоз у беременных и токсоплазмоз у ВИЧ-инфицированных.

У ВИЧ-инфицированных пациентов одним из осложнений длительного благоприятно протекающего приобретенного токсоплазмоза является токсоплазменный энцефалит. В связи с этим актуальными являются поиск и обоснование способов прогнозирования развития данного осложнения.

Цель исследования: определение предикторов реактивации *T. gondii* в головном мозге ВИЧ-инфицированных пациентов для прогнозирования развития токсоплазменного энцефалита.

Материалы и методы. В исследование были включены ВИЧ-инфицированные пациенты, находящиеся на диспансерном учете в УЗ «Минская инфекционная клиническая больница». Тип исследования – ретроспективное, случай-контроль. Критерии включения: иммунодефицит при CD4 лимфоцитах ниже 100 клеток/мкл, инфицирование *T.gondii* (сероконверсия в ИФА IgG).

Данные для анализа копировались из медицинской документации и заносились в электронную базу данных. Были выбраны факторы риска развития токсоплазменного энцефалита: возраст, пол, профилактика котримоксазолом, уровень CD4 лимфоцитов, инфицирование вирусом гепатита С, наркомания, позднее выявление ВИЧ-инфекции. Выраженный процесс реактивации *T. gondii* во много раз ниже показателей инфицированности.

Связь различных факторов с вероятностью развития токсоплазменного энцефалита оценивалась с помощью модели логистической регрессии. Метод логистической регрессии позволил выявить и ранжировать все факторы в порядке их значимости и определить вероятность развития или отсутствия токсоплазменного энцефалита в зависимости от значений переменных-предикторов.

Статистический анализ проводился с использованием программного пакета SPSS 17,0 (SPSS Inc. Chicago, IL. USA).

Результаты. Всего обследовано 54 пациента, среди них 22 женщины (40,7%) и 32 мужчины (59,3%). Токсоплазменный энцефалит развился у 23 пациентов, средний возраст $34,6 \pm 6,7$ лет, средний уровень CD4 $35,6 \pm 12,4$ клеток/мкл.

В группе пациентов без энцефалита (31 человек) средний возраст составил $37,9 \pm 9,8$ года, средний уровень CD4 $53,4 \pm 32,5$ клеток/мкл.

Пять переменных были включены в анализ при проведении логистической регрессии: 1) профилактика котримоксазолом, 2) употребление наркотических веществ, 3) уровень CD4+ лимфоцитов, 4) инфицирование вирусом гепатита С, 5) позднее выявление ВИЧ-инфекции. В результате исследования 4 проанализированные переменные были определены как возможные факторы риска - предикторы реактивации *T.gondii* в головном мозге ВИЧ-инфицированных пациентов.

При проведении мультивариатного анализа только две переменные были определены как независимые предикторы развития токсоплазменного энцефалита: 1) отсутствие профилактического приема котримоксазола (95% доверительный интервал 10,457-928,652; $p < 0,001$); 2) наркомания (95% доверительный интервал 1,185-113,627; $p = 0,035$).

Выводы. Реактивация *T. gondii* в головном мозге ВИЧ-инфицированных пациентов с иммунодефицитом определяется не только его выраженностью, но и другими факторами. Лекарственный контроль над *T. gondii* с помощью котримоксазола является мощным сдерживающим фактором, его применение для профилактики токсоплазменного энцефалита оправдано и эффективно. Реактивация паразита у наркоманов происходит значительно чаще, механизм такого влияния нуждается в дальнейшем изучении.

ИЛЬИНА В.Н.

Поволжская государственная социально-гуманитарная академия
(ранее Самарский госпедуниверситет), Самара, Россия

К ВОПРОСУ О СИСТЕМАТИЧЕСКОМ ПОЛОЖЕНИИ СРЕДНЕВОЛЖСКИХ КОПЕЕЧНИКОВ

Род *Hedysarum* L. (сем. *Fabaceae*, *Leguminosae*) насчитывает около 200 видов. Во «Флоре СССР» (1948) для территории бывшего СССР указано 90 представителей. Из них в бассейне Средней Волги, и в Самарской области в частности, достоверно произрастает только три: копеечник крупноцветковый (*Hedysarum grandiflorum* Pall.), копеечник Разумовского (*H. razoumovianum* Fisch. et Helm) и копеечник Гмелина (*H. gmelinii* Ledeb.). В некоторых источниках (Флора Юго-востока..., 1931; Маевский, 1964; Красная книга Оренбургской области, 1998) для территории Самарской области указан копеечник меловой (*H. cretaceum* Fisch.). Тщательные многолетние исследования не подтвердили этих сведений (Ильина, Рябова, 1995; Плаксина, 1998, 2001). Еще раньше, И.И. Спрыгин (1934) отмечал, что сведения о произрастании этого вида в Жигулях не соответствуют истине.

Во «Флоре Европейской части СССР» (1987) копеечники подразделяются на три секции: 1. *Gamotion* Basin. 1845. – Членики боба по бокам плоские, по краям с крыловидной перепончатой каймой, по поверхности с тонким сетчатым жилкованием, голые или рассеянно-прижатоопушенные, стебли развитые; 2. *Multicaulia* (Boiss.) V. Fedtsch., 1899. – Членики боба без крыловидного окаймления по краям, по поверхности ребристые, обычно с бугорками, короткими шипиками или тонкими щетинками, опушенные или голые, стебли развитые. К этой секции относятся два наших модельных вида - *H. razoumovianum* Fisch. et Helm и *H. gmelinii* Ledeb.; 3. *Subacaulia* (Boiss.) V. Fedtsch., 1899. – Растения бесстебельные или с укороченным стеблем, листья прикорневые, соцветия на безлистных стрелках, членики боба по поверхности ребристые, с бугорками, шипиками или без них, войлочноопушенные; лектотипом секции является третий из изучаемых видов *H. grandiflorum* Pall.

Это подразделение осуществляется по внешним особенностям (опушенность, расположение листьев, признаки стебля, жизненная форма), а также по строению цветков

и плодов. Эта система не учитывает биохимические и кариологические данные, доступные современной науке.

В целом виды рода *Hedysarum* подразделяются на 2 группы, различающиеся по системам скрещивания, особенностям кариотипа и географическому происхождению. В первую из них входят виды с $2n=14$. Среди видов 2-й группы встречаются представители с кариотипом $2n=16$ (Черкасова, 2008).

Нами было определено число хромосом для всех трех представителей средневожской флоры. Подсчет числа хромосом проводился в корешках проростков. Просмотр и фотографирование препаратов осуществлялось с помощью микроскопа AxioLab A, видеокамеры Sony 920, программного обеспечения Axio Vision 3.1. Число хромосом для *H. gmelinii* (секция *Multicaulia*, травянистый стержнекорневой каудексный многолетник) оно совпало с приведенным ранее в справочной литературе (Росков и др., 1998; Черкасова, 2008) - $2n = 28$ или 14 (кратно 14). У *H. razoumovianum* (секция *Multicaulia*, полукустарничек) средневожских популяций $2n = 16$, у *H. grandiflorum* (секция *Subacaulia*, травянистый стержнекорневой каудексный многолетник) определено $2n = 16$.

Такое разнообразие типов жизненных форм и набора хромосом у представителей внутри секций требуют уточнения родственных связей между ними и систематической принадлежности видов рода *Hedysarum* L.

Благодарю за помощь в проведении эксперимента сотрудников лаборатории ценных растений Центрального Сибирского Ботанического сада СО РАН м.н.с., к.б.н. Е.С. Черкасову и с.н.с., к.б.н. Н.А. Карнаухову.

ИЛЮХИН С.А., НОВИКОВ В.Е.

Смоленская государственная медицинская академия, Смоленск, Россия

БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СЫВОРОТКИ КРОВИ ПРИ ОСТРОМ ВОСПАЛЕНИИ И ЕГО КОРРЕКЦИИ АНТИГИПОКСАНТАМИ

Цель: Изучить влияние метапрота, амтизола, гесперидина и их комбинаций с кислотой ацетилсалициловой кислотой (АСК) на основные биохимические показатели сыворотки крови при развитии острого воспалительного процесса у животных.

Материалы и методы: Исследование было проведено на 90 крысах линии Wistar массой 190-210 г. Острая воспалительная реакция воспроизводилась субплантарным введением 0,1 мл 2 % раствора формалина в заднюю левую лапу крысы. Интактной группе вводился 0,1 мл 0,9% хлорида натрия. Выраженность воспалительной реакции оценивалась через 3 часа после индукции воспаления. Исследуемые вещества в виде водных растворов вводились зондом в желудок- АСК в дозе 100 мг/кг за 1 час до индукции воспаления формалином или за 1 час до введения антигипоксантов, метапрот, амтизол, гесперидин в дозе 50 мг/кг массы крысы. После этого животных декапитировали, осуществляли забор крови для исследования биохимических показателей, таких как общий белок, аланиновая аминотрансфераза (АлАТ), аспарагиновая аминотрансфераза (АсАТ), лактатдегидрогеназа (ЛДГ) и щелочная фосфатаза (ЩФ). Исследованию подвергалась сыворотка крови, отделяемая путем центрифугирования в течение 15 мин при 3000 об/мин. Исследования были выполнены на биохимическом анализаторе «Ultra» фирмы Копе (Финляндия), с использованием реактивов фирмы Olvex (Россия).

Результаты: В группе интактных животных биохимические показатели соответствовали нормальным значениям (Ананич И.В., 2008) В контрольной группе наблюдалось значимое снижение уровня АлАТ (на 44,7%) и ЩФ (на 144%) по сравнению с интактом. При введении АСК, комбинации амтизола и АСК, гесперидина, комбинации гесперидина и АСК наблюдалось повышение уровня АлАТ по сравнению с контролем (на 105%, 45%, 192%, и 210% соответственно). В то же время этот показатель уменьшался при введении метапрота (на 27%), метапрота и АСК (на 14%). Показатель АсАТ значительно возрастал по сравнению с контрольной группой, больше всего при применении гесперидина (на 211%). Увеличение показателя ЛДГ наблюдалось во всех группах кроме

той, которой вводился метапрот. Активность ЩФ в контрольной группе снижалась более чем в 2 раза, так же происходило снижение и в остальных группах по сравнению с интактной. Показатель общий белок изменялся не значительно во всех группах. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1

Активность ферментов сыворотки крови при формалиновом отеке и его коррекции

Группы животных (n=10)	Биохимические показатели крови крыс				
	Общий белок, г/л	АлАТ, Е/л	АсАТ, Е/л	ЛДГ, Е/л	ЩФ, Е/л
Интакт. группа	71,1±2,6	91,9±21,4	201,1±33,0	1316,5±579,8	547,7±169,8
Контр. группа	70,9±4,3	63,5±16,0**	206,4±34,3	1186,3±283,6	224,3±67,2**
АСК	73,8±4,8	130,2±44,9*	486,3±234,2*	3489,7±2035,4*	289,8±24,1**
Метапрот	64,2±2,5	49,9±6,0**	253,2±29,5*	1162,5±148,0	211,1±29,6**
Метапрот+ АСК	63,0±3,4	55,9±7,5**	367,4±68,9*	1696,5±333,8*	265,8±78,9**
Амтизол	75,4±4,3	64,3±13,4**	359,1±67,2*	1735,0±355,7*	164,6±49,1**
Амтизол+ АСК	71,9±5,1	92,4±15,3*	406,2±62,5*	1518,5±287,5*	233,9±55,1**
Гесперидин	71,8±2,5	185,5±52,4*	643,3±107,4*	1565,0±183,6*	297,8±87,4**
Гесперидин+ АСК	69,6±6,8	197±61,1*	452,4±55,4*	731,2±83,0*	360±91,7*

Примечание: *- различие с контролем статистически значимо (p<0,05)

** - различие с контролем статистически значимо (p<0,05)

Заключение: Комбинированное применение метапрота и АСК, амтизола и АСК, гесперидина и АСК влияет на биохимические показатели сыворотки крови, снижая их по сравнению с применением только АСК, в большей степени снижение наблюдается при использовании комбинации метапрота и АСК.

Вывод: Антигипоксанты уменьшают негативное влияние АСК на активность ферментов сыворотки крови.

ИОНИЧЕВ Д.С., ГНЕЗДИЛОВА Л.А.

ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина», Москва, Россия

ЛЕЧЕНИЕ БОЛЬНЫХ САЛЬМОНЕЛЛЕЗОМ ТЕЛЯТ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОБИОТИКА ЛАКТОБИФАДОЛ

Приводятся результаты эффективности использования пробиотика лактобифадол® в схемах лечения телят при сальмонеллезе.

Материалы и методы. Исследования проводились на телятах голштинской породы на базе ООО «Ямкинский молочный завод» Ногинского района Московской области.

В хозяйстве регистрируется диарея у телят в ранний постнатальный период жизни. Также встречались телята с диареей, поражением легких и суставов. На основании эпизоотологических, клинических, патолого-анатомических данных был сделан вывод о заболевании телят сальмонеллезом. В ходе лабораторных исследований, было выявлено наличие у телят ассоциированной инфекции, в том числе сальмонеллеза.

Для проведения научного эксперимента было создано 2 группы из заболевших телят в возрасте от 10 до 14 дней. Лечение в первой группе проводилось с использованием 5-ти валентной сыворотки против сальмонеллеза, эшерихиоза, пастереллеза, ПГ-3 и ИРТ, во второй группе - 5-ти валентной сывороткой и пробиотиком Лактобифадол®, который в дозе 10-15 г выпаивался телятам вместе с молоком один раз в сутки в течении 30 дней.

Критериями оценки эффективности действия препарата служили: показатели сохранности телят, продолжительность и характер течения заболевания, изменении некоторых показателей крови, среднесуточный привес живой массы.

У больных животных до и в ходе лечения исследовали общее состояние, температуру тела, наличие аппетита, реакцию на внешние раздражители, частоту дефекаций, характер испражнений, продолжительность болезни, среднесуточный прирост массы тела. Пробы крови брали до начала опыта и через 30 суток после начала лечения. Взвешивание телят производили до начала опыта и на протяжении 40 суток после начала лечения (через каждые десять дней). Первая группа телят служила контролем.

Результаты промежуточного эксперимента.

В результате проведенного лечения в контрольной группе улучшение состояния у 1 теленка наблюдалось на 4 день, у 3 телят - на 6-7 день лечения, 1 теленок пал на вторые сутки. В опытной группе падежа животных не было, признаки выздоровления зарегистрированы на 3 и 4 день от начала лечения у 4 телят (80%), у 1 теленка улучшение состояния наступило на 7 день.

При взвешивании животных установлено, что через 10 дней после начала лечения увеличение массы тела телят в контрольной и опытных группах было одинаковым и составляло в среднем 100 г в день. Через 20 дней после начала лечения среднесуточный привес в контрольной группе составил в среднем 350 г, а в опытной - на 57% больше (550 г). Тенденция более интенсивного прироста массы в опытной группе телят сохранялась и в последующие дни эксперимента. Так, через 30 дней после начала лечения увеличение массы в контрольной группе составило в среднем 420 г, в опытной - на 43% больше (600 г), через 40 дней от начала лечения среднесуточный привес в контрольной группе составил в среднем 570 г, а в опытной - 670 г.

При исследовании крови у телят имели место изменения стабилизация гематологических и биохимических показателей.

Выводы.

Применение больным телятам пробиотика Лактобифадол® в сочетании с 5-ти валентной сывороткой против сальмонеллеза, эшерихиоза, пастереллеза, ПГ-3 и ИРТ дает значительный положительный эффект:

- период улучшения состояния телят в опытной группе сократился практически в два раза. Выздоровление животных наступило в два раза быстрее, лечебный эффект составил 100%;

- интенсивнее наблюдалась стабилизация гематологических и биохимических показателей крови;

- после окончания лечения и улучшения пищеварения за счет быстрого заселения желудочно-кишечного тракта нормальной микрофлорой в опытной группе телят на протяжении эксперимента наблюдался более интенсивный среднесуточный прирост массы.

КАБДЕНОВА А.Т., БЕПЕЕВА А.Е., МЫРЗАГУЖИНОВА Д.К.

Семипалатинский государственный университет имени Шакарима, Семей, Казахстан

РОЛЬ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ В РЕШЕНИИ ПРОБЛЕМ ЭКОЛОГИИ

Сегодня, все чаще мировое сообщество говорит о том, что человечество, в ходе развития хозяйственной деятельности, нарушило равновесие в природе, уничтожая крупных животных, выжигая леса, пастбища, а также загрязняя почвы и водоёмы в местах поселения и др. И поэтому, остро стоит проблема защиты окружающей среды. В результате промышленной, сельскохозяйственной и бытовой деятельности человека возникают различные изменения состояния и свойств окружающей среды, в том числе очень неблагоприятные. С развитием и интенсификацией промышленной и сельскохозяйственной деятельности в XXI веке еще острее стали ощущаться пределы естественной продуктивности биосферы — истощаются природные ресурсы, источники энергии, всё более заметен дефицит пищи, чистой воды и воздуха. Загрязнение окружающей среды во многих регионах достигло критического предела. Во многом все эти проблемы порождены научно-техническим прогрессом общества и должны решаться также с использованием его новейших достижений.

Проблему экологии нельзя решать в масштабах одной страны или группы стран. Вредные антропогенные загрязнения, вырабатываемые в индустриально развитых регионах и странах, в результате естественной циркуляции водных и воздушных масс распространяются по всей территории Земли.

Важнейшая роль в вопросах защиты и охраны окружающей среды принадлежит биологии. Сама экология в традиционном понимании является биологической дисциплиной и изучает взаимоотношения организмов, включая человека, между собой и с окружающей средой. Дальнейшее развитие биологии и внедрение её достижений в практику — один из главных путей выхода из надвигающегося экологического кризиса. Большую роль играет при этом и биотехнология. Биотехнология позволяет решать ряд экологических проблем, включая защиту окружающей среды от промышленных, сельскохозяйственных и бытовых отходов, деградацию токсикантов, попавших в среду, а также сама создаёт малоотходные промышленные процессы получения пищевых и

лекарственных веществ, кормов, минерального сырья, энергии. Экология и биотехнология взаимодействуют как через продукты, так и через технологии. В целом это способствует экологизации антропогенной деятельности и возникновению более гармоничных отношений между обществом и природой.

Всё возрастающая роль биологии в целом и биотехнологии в частности в решении природоохранных задач привела к тому, что в последние годы на стыке биологии и экологии сформировался и активно развивается новый раздел фундаментальной науки и новая промышленная отрасль — *экологическая биотехнология*.

Экологическая биотехнология — это специальное применение биологических систем и процессов для решения задач охраны окружающей среды и рационального природопользования.

Такие актуальные проблемы, стоящие перед человечеством XXI века, как дефицит чистой воды, воздуха, загрязнение окружающей среды и многие другие, с успехом решает экологическая биотехнология.

Перспективность и эффективность применения методов биотехнологии в решении проблем экологии обуславливается также созданием малоотходных и абсолютно безотходных технологий. Поэтому, биотехнология в целом и ее отдельные разделы находятся в ряду наиболее приоритетных направлений научно-технического прогресса и являются ярким примером «высоких технологий», с которыми связывают перспективы развития многих производств.

КАБЛОВ В.Ф.¹, КОСТИН В.Е.¹, СОКОЛОВА Н.А.¹,

ГАМАГА В.В.², РОДИОНОВ С.Н.²

¹ *Волжский политехнический институт (филиал) ФГБОУ ВПО «Волгоградский государственный технический университет», Волгоград, Россия*

² *ФГБОУ ВПО «Волгоградский государственный аграрный университет», Волгоград, Россия*

ИССЛЕДОВАНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА БИССУСА, ВЫДЕЛЯЕМОГО МОЛЛЮСКОМ DREISSENA POLYMORPHA

Общеизвестна негативная роль обрастания в хозяйственной деятельности человека. Для работников гидроэлектростанций, тепловых электростанций и других предприятий, использующих в системе охлаждения воду, обрастание водоводов прикрепленными организмами, делает порой эксплуатацию труб и оборудования невозможной. Авторами исследован механизм и места закрепления моллюска на сооружениях и оборудовании гидроэлектростанции, изучены особенности моллюска дрейссены в акватории волгоградского гидроузла, исследованы механические свойства биссусных нитей, воздействие на них отдельных химических веществ, а также определен аминокислотный состав биссуса. В акватории, где расположен Волгоградский гидроузел, большое распространение получил вид Дрейссена речная - *Dreissena polymorpha*. Обрастание дрейссеной происходит, когда на стенках трубопроводов и аппаратов технологического оборудования ГЭС закрепляются живые раковины дрейссены. Следствием этого является необходимость внеплановых остановок агрегатов и проведение дорогостоящих ремонтных работ. Периодическая очистка сооружений мало помогает, так как дрейссена скоро снова размножается. Закрепляются моллюски на различных поверхностях благодаря особым выделениям – так называемому биссусу.

Закрепление раковин дрейссены на поверхностях гидросооружений происходит с помощью биссусных нитей. По строению биссус – естественный полимер белкового происхождения, близкий по составу к натуральному шелку. Цвет биссусных нитей варьируется от светло-золотистого до черного, наиболее распространенный цвет биссусных нитей у раковин дрейссены из акватории Волжской ГЭС - буро-коричневый. В пучке биссуса дрейссены насчитывается от 60 до 200 нитей. В процессе лабораторных

исследований, проведенных нами в лаборатории экологической безопасности ВПИ (филиал) ВолгГТУ, установлено, что диаметр нити биссуса дрейссены составляет 15-20 мкм, длина – до 10-12 мм. Благодаря биссусу дрейссены закрепляется практически на любых материалах и поверхностях.

Изобретение средства, разрушительно действующего на биссус или на всего моллюска, составляет важную хозяйственную задачу, над разрешением которой работает ряд исследователей как в России, так и за рубежом. Авторами определен аминокислотный состав биссуса дрейссены. Аминокислоты определялись методом капиллярного электрофореза на системе капиллярного электрофореза "Капель 105".

В результате проведенных исследований выяснили, что биссусная нить моллюска дрейссены, обитающего в районе Волгоградского гидроузла, имеет следующий аминокислотный состав (в воздушно-сухом состоянии, %): аргинин – 1,187; лизин – 0,866; тирозин – 1,746, фенилаланин – 0,831; гистидин – 0,317; лейцин + изолейцин – 3,050; метионин – 0,289; валин – 1,786; пролин – 1,826; триптофан – 1,350; серин – 1,150; аланин – 0,573; глутаминовая кислота – 2,507; глицин – 6,014. Аспарагин был обнаружен только в одной пробе – 0,601 %. Всего аминокислот на воздушно-сухую смесь биссуса – 24,090%. Наибольшее содержание таких аминокислот как глутаминовая кислота, лейцин и изолейцин и особенно глицин. Кроме того, следует обратить внимание на аминокислоту фенилаланин, так как именно производное фенилаланина – дигидроксифенилаланин, по мнению ряда авторов, участвует в образовании водородных связей, которые, возможно, и играют определяющую роль в процессе закрепления. В дальнейшем планируется определить последовательность аминокислот, входящих в белковые молекулы биссуса дрейссены и сравнение аминокислотного состава с аминокислотным составом биссуса других двухстворчатых моллюсков, а также исследование по воздействию разнообразных химических реагентов, в том числе и ферментов-пептидаз, способных разрушить структуру биссуса моллюска, и таким образом позволит бороться с обрастание моллюском различных поверхностей с меньшими затратами.

КАДЫРОВ Д.И.

ОАО «Биотехнология», Москва, Россия

О МЕТОДАХ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОЙ УТИЛИЗАЦИИ ОТХОДОВ

Энергетическая утилизация отходов - одно из направлений современной альтернативной энергетики. Использовать отходы для получения энергии целесообразно в случаях, когда рециклинг, т.е. переработка отходов с получением востребованных товарных продуктов, оказывается экономически невыгодным.

Получать энергию из отходов можно либо непосредственно сжигая их, либо получая из них энергоносители, которые можно хранить и транспортировать.

Сжигание - наиболее простой и радикальный способ уничтожения отходов и получения энергии. Объем отходов уменьшается в 10 и более раз. Однако в целом метод полного сжигания отходов оказывается дорогим в силу необходимости строительства дорогостоящих систем очистки дымовых газов и эксплуатации мусоросжигательных заводов с соблюдением всех санитарных норм.

К методам утилизации отходов с получением энергоносителей относятся технологии метанового брожения (биогазовые технологии), газификации (пиролиза) отходов, спиртового брожения, технологии получения твердого топлива.

Биогазовые технологии основаны на анаэробном сбраживании органических отходов с получением горючего газа, содержащего до 60% метана, калорийностью 5000-6000 ккал/м³. Активно используются в Европе для выработки тепла и электроэнергии из органических отходов. Переработанные отходы идут либо в отвал, либо на удобрение. Экономически утилизация отходов биогазовыми методами выгодна только при выработке электроэнергии не менее 1,5-2 МВт. К сожалению, биогазовые процессы практически не уменьшают объемы отходов. В частности, объем выкачиваемого из метантенка жидкого продукта в 3-5 раз больше загружаемых в него свежего навоза или помёта из-за необходимости добавления в него растительных компонентов и воды в 3-5 кратной пропорции.

Газификация (высокотемпературный пиролиз) отходов с последующим использованием произведенного газа (синтез-газа) для выработки электрической энергии и тепловой энергии, а также химических синтезов, является реальной альтернативой

биогазовым технологиям. Получаемый синтез-газ содержит горючие (окись углерода, водород, метан) и балластные (азот, двуокись углерода) газы и влагу. Процентный состав содержащихся синтез-газа определяется температурой процесса и природой перерабатываемой массы.

Метод газификации позволяет утилизировать практически безотходно и экологично все виды органических отходов.

В ряде случаев весьма практичной может оказаться переработка отходов в **твердое топливо**. Предполагается предварительная подготовка отходов для сжигания на стандартном либо специально сконструированном оборудовании. Без конструктивных изменений отопительного оборудования могут сжигаться брикеты из лигниновых отходов и другой древесно-растительной массы калорийностью ~ 5000 Ккал/кг. Высушенная и измельченная пометно-подстилочная масса калорийностью ~2100 Ккал/кг может использоваться как удобрение или эффективно сжигаться в вихревых топках. Для большей части России отопительный период составляет более полугода, поэтому часто в первую очередь важна выработка тепловой энергии. Твердое топливо можно накапливать в летний период и сжигать в осенне-зимний-весенний. Сушка и прессование более чем втрое уменьшают массу сырья, что облегчает решение логистических проблем.

Производство **этилового спирта из биомассы** для использования в качестве топлива рассматривается как один из перспективных методов альтернативной энергетики. Производство этанола сконцентрировано в США (54%) и Бразилии (34%). Основным сырьём для производства этанола являются сахарный тростник, кукуруза, сахарная свекла, пшеница. Разрабатываются технологии производства спирта из некоторых видов отходов макулатуры, древесных отходов, отходов сельского хозяйства. Однако пока что нет эффективных промышленных технологий разложения и осахаривания волокнистых веществ. Есть проблемы при предварительной обработке сырья из отходов, в отделении веществ, препятствующих брожению, в повышении экономичности.

Выбор конкретной технологии утилизации отходов в конкретном месте определяется в первую очередь рентабельностью и временем окупаемости. Необходимо учитывать также зависимость от внешних энергоресурсов, лимитов на газ, доступность местного сырья, транспортные расходы, возможность использования серийного оборудования и многое другое.

КАКИМОВА Ж.Х., БЕПЕЕВА А.Е., КИМ А.Ю.

Семипалатинский государственный университет имени Шакарима, Семей, Казахстан

ИССЛЕДОВАНИЕ КОЗЬЕГО МОЛОКА КАК СЫРЬЯ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА МЯГКИХ СЫРОВ

На сегодняшний день на рынке представлено множество разнообразных продуктов питания. Современный потребитель хочет видеть в пище не только источник энергии, но и залог здоровья и продления активного периода жизни. Здоровое питание становится особенно важным в условиях напряженного ритма работы и учебы, которые приводят к ослаблению и снижению защитных функций организма.

В связи с этим активно развивается производство продуктов функционального назначения, т. е. продуктов сохраняющих и улучшающих здоровье за счет введения в их состав физиологически функциональных пищевых ингредиентов. Большую часть рынка функциональных продуктов питания занимают молочные продукты. До недавнего времени для их производства использовалось коровье молоко, но в последнее время все чаще обращают внимание на козье молоко, как сырье для молочного производства, и это вполне оправданно.

К основным преимуществам козьего молока можно отнести следующее:

- козье молоко более богато минеральными веществами, витаминами и микроэлементами, чем коровье;
- белки козьего молока образуют менее плотный сгусток, благодаря чему легче перевариваются;
- жир козьего молока практически на 100% усваивается организмом человека, т.к. жировые шарики в 10 раз меньше, чем в коровьем;
- козье молоко содержит меньше лактозы, поэтому может быть рекомендовано людям с лактозной недостаточностью;
- козье молоко не содержит аллергенного белка альфа-с-1-казеина, поэтому может употребляться в пищу людьми, страдающими пищевыми аллергиями.

Принимая во внимание вышеизложенное, актуальной является разработка новых продуктов на основе козьего молока.

На кафедре «Стандартизация и биотехнология» СГУ имени Шакарима было исследовано молоко коз зааненской породы (безрогой молочной) из двух районов города Семей – поселка Водный и поселка Бобровка. С поселка Водный было взято 2 образца молока от разных коз.

В научном центре радиэкологических исследований СГУ имени Шакарима были проведены исследования элементного состава взятых образцов козьего молока на низковакуумном растровом электронном микроскопе (РЭМ) JSM – 6390 LV JEOL (Япония) с системой энергодисперсного анализа INCA ENERGY 250.

Полученные результаты исследования приведены в нижерасположенной сравнительной таблице химического состава.

Таблица 1

Химический и элементный состав молока коз

Показатели	Образец №1 (молоко от коз поселка Водный)	Образец №2 (молоко от коз поселка Бобровка)	Образец №3 (молоко от коз поселка Водный)
Жир, %	2,00	5,65	5,62
Сухих веществ, %	9,11	9,8	9,5
Общего белка, %	4,3	5,9	5,74
Кислотность, °Т	24	21	24
рН	6,74	6,77	6,47
Плотность, кг/см ³	1,032	1,031	1,032
Витамин С, мг	1,5	1,8	1,4
Элементный состав, (все результаты в весовых %):			
С	71,3	70	65,87
О	27,41	46	32,9
Р	0,63	0,68	0,56
Mg	0,14	0,16	0,13
Ca	0,44	0,73	0,35
К	0,06	0,17	0,14

Таким образом, было проведено исследование химического состава и свойств трех образцов козьего молока, взятых из двух районов города Семей, проведен сравнительный анализ полученных результатов и выбран образец, который на последующий этапах данной работы будет использоваться как сырье для производства комбинированного мягкого сырного продукта.

КАЛИНОВСКИЙ В.П.¹, ТКАЧЕНКО Е.И.², ЩЕРБАКОВ А.М.¹,

ГОЛОФЕЕВСКИЙ В.Ю.³, ШУМАКОВ А.Р.⁴, ГУЛЯЕВ А.В.¹

¹*НИИ онкологии им. проф. Н.Н.Петрова, Санкт-Петербург, Россия,*

²*Северо-Западный Государственный медицинский университет им. И.И.Мечникова,*

Санкт-Петербург, Россия,

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

⁴*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М.Сеченова РАН,*

Санкт-Петербург, Россия

ПОДХОДЫ К ПРИМЕНЕНИЮ НОВЫХ БИМЕДИЦИНСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ В ОНКОЛОГИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

Сложившаяся в современной медицине ситуация, когда требуется не только быстро и своевременно оказать надлежащий объем помощи больному, но и не допустить возможного последующего развития осложнений и сопутствующих патологических процессов, не всегда может привести к оптимальным результатам лечения и реабилитации больных. Очевидно, что для дальнейшего качественного улучшения показателей, касающихся оказания медицинской помощи населению, требуется развитие и внедрение новых технологических подходов, которые основываются на методах молекулярной медицины, высокоточной экспресс-диагностики и целого ряда других передовых видов медицинской помощи.

Онкологическая практика требует повышенного внимания к состоянию больного, максимального использования современных достижений диагностики и терапевтических приемов для оказания надлежащей помощи и повышению качества жизни пациентов.

В медицинских учреждениях Санкт-Петербурга уделяется внимание развитию и совершенствованию подобных инновационных подходов. Следует учитывать, что показатели онкологической заболеваемости поддерживаются, прежде всего, за счет наличия некоторого уровня т.н. «предопухолевых» заболеваний, хотя такое название и не всегда может являться верным. Тем не менее, мы считаем, что первичной задачей в онкологии является ранняя диагностика опухолевых и предопухолевых патологических процессов, что позволит зачастую значительно снизить объем вмешательства и предотвратить в ряде случаев прогрессирование опухолей. Еще одним важным критерием

является минимизация объема таких исследований, развитие неинвазивных диагностических технологий. В настоящее время технические возможности современной аппаратуры позволяют проводить качественную оценку микроколичеств биологического материала, что удобно и для самого больного.

Проведенная оценка комплекса диагностических и прогностических показателей у больных раком желудка показывает, что это заболевание может быть следствием прогрессирования неопухолевых патологических изменений желудочно-кишечного тракта, которые не были своевременно выявлены. Заболевания желудка и других органов ЖКТ достаточно широко распространены и не всегда могут быть диагностированы, часто могут протекать бессимптомно. Это приводит к той ситуации, что при гастродуоденальной патологии имеется комплекс патофизиологических изменений, касающихся, в первую очередь, морфологических, биохимических и иммунологических признаков. Высокий уровень заболеваний органов ЖКТ привел в ряде стран к разработке критериев для внедрения массового скрининга среди населения, что способствовало снижению уровня онкологической заболеваемости. Поэтому внедрение в клиническую практику современных диагностических критериев и чувствительных маркеров позволят в дальнейшем существенно улучшить ситуацию с ранней выявляемостью опухолей ЖКТ.

Немаловажным является и внедрение эффективных методических подходов для коррекции выявленных нарушений, сопровождающих развитие патологических изменений. Иногда наблюдаются побочные эффекты при проведении химиотерапии. Применяемая в ряде случаев резекция желудка также влияет на качество жизни больных. Перспективными здесь можно считать использование методов коррекции и улучшения состояния внутренней среды ЖКТ, например, применение естественных или биологически измененных микроорганизмов для нормализации защитных сил после операций и других вмешательств. Такого рода исследования проводятся и уже имеются некоторые результаты, которые позволяют говорить о правильности такого подхода. Проведение биокоррекции в ряде случаев может позволить повысить резистентность организма, ускорить восстановление физиологически значимых процессов после тяжелого заболевания.

Приведенные направления являются, по мнению авторов, важными, как в целом для развития отечественной медицины, так и непосредственно в рамках онкологической службы.

КАМАНИН С.С., АРЛЯПОВ В.А.

ФГБОУ ВПО Тульский государственный университет, Тула, Россия

ПЕЧАТНЫЕ ЭЛЕКТРОДЫ, МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ГЛЮКОЗОКСИДАЗОЙ ДЛЯ АНАЛИЗА БРОДИЛЬНЫХ СРЕД

Одним из перспективных направлений развития биосенсорных технологий является использование электродов, полученных методом трафаретной печати (screen-printed электроды, печатные электроды). Такие электроды миниатюрны, многофункциональны, а современные разработки позволяют создать одноразовые электроды с низкой себестоимостью. Подобные биосенсорные системы можно использовать в пищевой промышленности и спиртовом производстве для мониторинга ферментативных процессов, при выполнении клинических анализов, в частности, для определения уровня глюкозы в крови. Большинство доступных биосенсоров, использующихся для определения содержания глюкозы, основаны на электрохимическом определении пероксида водорода, генерируемого глюкозооксидазой (ГО) при катализе реакции превращения глюкозы.

Для снижения рабочего потенциала измерения и повышения чувствительности в глюкозных сенсорах используют медиатор электронного транспорта. В коммерческих глюкометрах в качестве медиатора используется гексацианоферрат калия (например, глюкометры Accu-Chek). Производное этого соединения – берлинская лазурь ($K_3Fe[Fe(CN)_6]$) – имеет низкий редокс-потенциал, не зависящий от pH среды, химически устойчива в растворе и является неорганическим катализатором разложения пероксида водорода при потенциале 0 В, что позволяет использовать ее для регистрации перекиси, выделяющейся в реакции превращения глюкозы.

Наряду с применяемым медиатором параметры печатных электродов определяются методом иммобилизации биоматериала. Одним из наиболее современных и перспективных методов иммобилизации ферментов в печатных электродах является включение в

полимерные золь-гель матрицы. Метод иммобилизации в слой золь-геля обладает рядом преимуществ: высокой экспрессностью, простотой исполнения, нетоксичностью, доступностью прекурсоров и высокой механической прочностью матриц.

В данной работе проведен сравнительный анализ методов иммобилизации фермента на поверхность графитовых печатных электродов, модифицированных берлинской лазурью, и представлены результаты разработки печатных электродов, модифицированных берлинской лазурью, с иммобилизованной ГО для определения низких концентраций глюкозы.

Сигнал регистрировали при помощи гальваностата-потенциостата IPC2000 (ООО НТФ «Вольта», Россия), интегрированного с персональным компьютером. В работе использовали печатные электроды, модифицированные берлинской лазурью (ООО «Русенс», Россия), рецепторный элемент располагали на поверхности рабочего электрода. Обработка сигнала производилась с помощью специализированного программного обеспечения IPC-2000 (ООО НТФ «Вольта», Россия).

В результате выполнения работы были разработаны модифицированные электроды с ферментом, иммобилизованным в гибридную композицию кремнийорганический золь-гель/ПВС и в агаровый гель для анализа низких концентраций глюкозы в пробах. Диапазон определяемых концентраций для модифицированного электрода на основе ГО, иммобилизованной в гибридную композицию кремнийорганический золь-гель/ПВС составил 1,0 – 5,9 мкмоль/л, а для модифицированного электрода на основе ГО, иммобилизованной в агаровый гель – 3,6 – 6,3 мкмоль/л. Таким образом, полученные электроды позволяют определять количества глюкозы в 500 раз меньше, чем с использованием биосенсора на основе кислородного электрода и в 1000 раз меньше, чем способны определять коммерческие глюкометры на основе печатных электродов.

Проведен анализ образцов вин и бродильной массы с использованием разработанных модифицированных электродов. Результаты анализа совпадают с данными, полученными референтным методом анализа (высокоэффективная жидкостная хроматография) с учетом доверительных интервалов.

Разработанные модифицированные электроды могут применяться при мониторинге бродильных процессов и для определения содержания глюкозы в продуктах и

полупродуктах брожения. Низкий предел обнаружения позволяет оценить полноту протекания бродильного процесса с высокой точностью.

Работа выполнена при поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы, госконтракт № 16.740.11.0766.

КАМАНИНА О.А., СЫТНИКОВА Н.В., РОГОВА Т.В.

Тульский государственный университет, Тула, Россия

ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭТАНОЛА В КОММЕРЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ С ПОМОЩЬЮ АМПЕРОМЕТРИЧЕСКОГО БИОСЕНСОРА

Иммобилизованные живые клетки микроорганизмов широко используются в различных биотехнологических процессах, в аналитических приборах при формировании биорецепторных элементов биосенсоров. Метод иммобилизации биоматериала должен обеспечить долговременную устойчивость к вымыванию, стабильность под воздействием экстремальных условий эксперимента, сохранение активности биоматериала.

Наиболее перспективным для иммобилизации биоматериала является метод инкапсулирования в бимодальные золь-гель матрицы, который характеризуется простотой исполнения, нетоксичностью, более высокой электропроводностью получаемой матрицы по сравнению с традиционно используемыми органическими, постоянством занимаемого носителем объема вне зависимости от состава среды, сохранением биологической активности ферментов и жизнеспособности клеток, низкой стоимостью и доступностью прекурсоров

В большинстве литературных источниках описано применение золь-гель матриц для инкапсулирования ферментов. Однако использование бактериальных клеток в качестве рецепторного элемента в биосенсорах устраняет необходимость выделения индивидуальных ферментов, и позволяет активному биоматериалу работать в условиях, близких к их естественной среде, а, следовательно, с более высокой эффективностью. Иммобилизованные в бимодальные золь-гель матрицы бакрети *Gluconobacter oxydans* является перспективным для создания на их основе рецепторных элементов биосенсоров.

Целью работы является определение содержания этанола в коммерческих спиртосодержащих продуктах с помощью биосенсора на основе клеток микроорганизмов *Gluconobacter oxydans*, иммобилизованных в бимодальную кремнийорганическую золь-гель матрицу.

В настоящей работе были получены биорецепторные элементы на основе микроорганизмов *Gluconobacter oxydans*, иммобилизованных в золь-гель матрицы на основе тетраалкоксисилана и алкилалкоксисилана с добавлением полиэтиленгликоля (ПЭГ) в качестве порообразователя. С использованием модельных смесей, содержащих этанол, определены параметры биосенсора с различными биорецепторными элементами. Показано, что введение расчетного количества гидрофобной добавки алкилтриалкоксисилана в качестве прекурсора при формировании кремнийорганической матрицы из тетраалкоксисилана и ПЭГ не только обеспечивает максимальную чувствительность и долговременную стабильность рецепторного элемента, но и повышает селективность биосенсора на ее основе по отношению к первичным спиртам за счет снижения проницаемости матрицы для молекул спиртов с разветвленным углеродным скелетом. Для анализа коммерческих спиртосодержащих продуктов был выбран рецепторный элемент, обеспечивающий максимальную чувствительность и воспроизводимость работы биосенсора. Клетки микроорганизмов *Gluconobacter oxydans*, иммобилизованные в выбранную бимодальную золь-гель матрицу, дают высокие отклики на этанол (100%), пропанол-1 (50%) и бутанол-1 (70 %).

Проведено определение содержания этанола с помощью биосенсора с рецепторным элементом, на основе иммобилизованных в золь-гель матрицу клеток микроорганизмов *Gluconobacter oxydans* в 6 образцах водок. Присутствие в них только одного метаболизируемого субстрата — этанола, позволяет проводить его селективное определение. Следовые количества метанола $3 \cdot 10^{-2}\%$ и сивушных масел (1-пропанола, 2-пропанола, 1-бутанола, 2-бутанола и 3-метилбутанола-1) $1 \cdot 10^{-3}\%$, допустимые согласно ГОСТ Р 51355-99 в водках, не оказывают влияния на определение этанола с помощью биосенсора. Для каждого образца водок было проведено сравнение выборок из 7 параллельных определений этанола с помощью биосенсора и двумя референтными методами: рефрактометрическим (ГОСТ 28869-90) и пикнометрическим (ГОСТ 3639-79). При статистической обработке полученных выборок экспериментальных данных

показано, что результаты, полученные референтными методами и с помощью биосенсора во всех случаях различаются незначимо между собой. Кроме того показано, что полученные результаты с помощью биосенсора не значимо отличаются от 40,0 %, что нормативно закреплено в ГОСТах на водки.

Работа выполнена в рамках гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержке молодых российских ученых – кандидатов наук, договор №16.120.11.4341-МК.

КАМЗОЛОВА С.В., ЛУНИНА Ю.Н., ЧИГЛИНЦЕВА М.Н., МОРГУНОВ И.Г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, Пуццино, Россия

ПЕРСПЕКТИВЫ ПОЛУЧЕНИЯ ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДРОЖЖЕВЫХ ОРГАНИЗМОВ

Янтарная кислота (ЯК) широко используется в химической промышленности в качестве исходного сырья для производства различных четырехуглеродных соединений; на её основе получают биodeградируемые полимеры, применяемые при производстве пищевых плёнок и упаковок, средств личной гигиены и одноразовой посуды. В пищевой промышленности ЯК применяется в качестве пищевой добавки, подкислителя и консерванта. Соли ЯК используют как реагент против обледенения, для производства синтетических красителей, искусственных и синтетических волокон и нитей. В последние годы разработан ряд биологически активных добавок и фармакологических средств на основе ЯК для регуляции энергетического обмена и лечения социально-значимых заболеваний (диабет, алкоголизм, различные виды гипоксии, в т.ч. перинатальная гипоксия, стрессовые состояния). На сегодняшний день мировая потребность в ЯК и химических соединениях, полученных на ее основе, составляет более 245×10^3 тонн в год с годовым приростом производства 4% от существующего уровня.

В настоящее время ЯК получают методом химического синтеза из малеиновой кислоты или ее ангидрида, с использованием дорогостоящего катализатора ванадия. Известно, что малеиновая кислота и соединения ванадия являются клеточными ядами, и

даже небольшие их примеси резко снижают качество ЯК. Также для получения ЯК используется процесс термического разложения янтаря и его очистки путем многократной перекристаллизации; однако этот процесс является дорогостоящим. В последние годы в качестве альтернативы химическому синтезу рассматривается микробиологический синтез ЯК, при котором произведенный продукт характеризуется высокой чистотой.

В настоящей работе проводится анализ перспективы получения ЯК с использованием дрожжевых организмов.

Показано, что многие виды родов *Candida*, *Pichia*, *Yarrowia* образуют, наряду с другими органическими кислотами, ЯК из этанола в условиях лимитирования роста азотом. Использование этанола обеспечивает образование продукта, который может применяться в пищевой и медицинской промышленности.

Разработан оригинальный способ получения ЯК, сочетающий микробиологический синтез α -кетоглутаровой кислоты (КГК) и ее дальнейшее окисление до ЯК под воздействием перекиси водорода. В качестве продуцента специально селекционирован штамм *Yarrowia lipolytica* VKM Y-2412, характеризующийся высокой активностью изоцитрат-лиазы, ключевого фермента глиоксилатного цикла. Подобраны условия культивирования продуцента, обеспечивающие максимальную продуктивность биосинтеза КГК – продукта первой стадии процесса. Они включали: ограничение роста дрожжей тиаминном; повышенные требования в цинке и железе; стабильное поддержание pH на уровне 3,5-4,0; интенсивная аэрация среды (на уровне 0,30-0,56 ммольO₂/л/мин), содержание этанола и азота в среде на уровне 1.6-40 г/л и 0.54 г (NH₄)₂SO₄ на г клеток, соответственно. Оптимизировано количество вводимой энергии для массопередачи кислорода и углекислоты путем регулирования режимов аэрации, скорости перемешивания ферментируемого субстрата и управления процессом пеногашения. Усовершенствован способ введение этанола (дробно) в среду синхронно со снижением дыхательной активности клеток в периодическом режиме (подпитка) и в условиях отъемно-доливного культивирования.

При проведении процесса в ферментере достигнут синтез ЯК (свыше 100 г/л) с незначительным образованием побочных продуктов (менее 5%). Произведенный препарат ЯК может применяться в сельском хозяйстве, медицине и пищевой промышленности, где предъявляются высокие требования к чистоте используемых продуктов.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант № 12-08-01157.

КАМЫНИНА А.В.¹, КОРОЕВ Д.О.¹, ВОЛЬПИНА О.М.¹, АБРАМОВ А.Ю.²

¹*Институт Биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
Москва, Россия*

²*Институт Нейрологии, Университетский колледж Лондона, Лондон, Великобритания*

**МЕХАНИЗМ ПРОТЕКТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ АНТИТЕЛ
К СИНТЕТИЧЕСКИМ ФРАГМЕНТАМ АЛЬФА7-СУБЪЕДИНИЦЫ
АЦЕТИЛХОЛИНОВОГО РЕЦЕПТОРА И ПРИОННОГО БЕЛКА ПРОТИВ
БЕТА-АМИЛОИДНОЙ ТОКСИЧНОСТИ**

Один из предполагаемых механизмов развития болезни Альцгеймера (БА) заключается в связывании патогенного пептида бета-амилоида с каким-либо белком на поверхности нейронов мозга, что вызывает ряд процессов, приводящих к гибели клеток. В литературе описаны 2 белка, являющихся мишенями для действия бета-амилоида, - $\alpha 7$ -тип ацетилхолинового рецептора (АХР) и прионный белок. Токсическое действие бета-амилоида на нейроны и глиальные клетки мозга сопровождается такими патологическими изменениями, как значительное повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} и запуск производства активных форм кислорода (АФК) посредством активации мембранного фермента НАДФН-оксидазы, что в конечном итоге приводит к гибели клеток. Мы предположили, что специфические антитела, направленные к альфа7-субъединице АХР и прионному белку, будут препятствовать взаимодействию бета-амилоида со своими мишенями и развитию вышеописанных изменений в клетках, предотвращая их гибель.

В настоящей работе было исследовано действие аффинноочищенных моноспецифических антител к фрагменту 173-193 альфа7-субъединицы (АХРат) и к фрагменту 95-123 прионного белка (PrРат) на первичной культуре нейронов и астроцитов гиппокампа или коры мозга, зараженной бета-амилоидом. Проведенные исследования показали, что обработка культур клеток АХРат и PrРат предотвращала индуцированную бета-амилоидом клеточную гибель. Преинкубация клеток с АХРат или к PrРат также значительно замедляла индуцированную бета-амилоидом скорость активации каспазы 3

(активатор клеточной гибели). Таким образом, было установлено, что АХРат и PrРат обладают ярко выраженным защитным эффектом против действия бета-амилоида в первичных культурах клеток.

Было сделано предположение, что протективный эффект антител, направленных к $\alpha 7$ -типу АХР или к прионному белку, может быть вызван блокированием индуцированных бета-амилоидом изменений внутриклеточной концентрации Ca^{2+} (Ca^{2+} -сигнала) в клетках мозга. Были проведены эксперименты по выявлению влияния АХРат или PrРат на индуцированный бета-амилоидом Ca^{2+} -сигнал в смешанной культуре нейронов и астроцитов коры мозга крыс. Показано, что предварительная обработка нейронов и астроцитов АХРат и PrРат не блокировала Ca^{2+} -сигнал в астроцитах, стимулированный бета-амилоидом.

Дальнейшие исследования показали, что обработка культур кортикальных клеток АХРат или PrРат приводила к снижению индуцированного бета-амилоидом образования АФК в астроцитах. Таким образом, мы показали, что протективное действие антител на клетки, обработанные бета-амилоидом, обусловлено снижением АФК в клетках. В случае с $\alpha 7$ -типом АХР были проведены более детальные исследования с использованием агониста и антагониста рецептора и показано, что, воздействие на $\alpha 7$ -тип АХР регулирует работу мембранного фермента НАДФН-оксидазы астроцитов и, как следствие, продукцию АФК.

Таким образом, было показано, что антитела к $\alpha 7$ -типу АХР или к прионному белку предотвращали клеточную гибель в культуре клеток, зараженной бета-амилоидом, понижая производство АФК в астроцитах. Следовательно, индукция антител к мишеням бета-амилоида является перспективным направлением развития терапии БА.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ №10-04-01256 и FEBS Collaborative Experimental Scholarship for Central and Eastern Europe.

КАРАБАНОВ Д.П., КОДУХОВА Ю.В.

Институт биологии внутренних вод им. И.Д.Папанова РАН, пос. Борок, Россия

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ ХРОМОСОМНОЙ ИНЖЕНЕРИИ В БОРЬБЕ С ЧУЖЕРОДНЫМИ ВИДАМИ РЫБ

Применение методов хромосомной инженерии открывает большие возможности в нарушении полового состава популяции чужеродных видов рыб, при этом не нанося урона аборигенным видам. Одним из наиболее простых и эффективных методов служит получение и выпуск в водоемы триплоидных рыб. Технология массового получения триплоидов позволяет создавать значительные экспериментальные партии стерильных рыб, которые можно без опасения выпускать в естественные водоемы с целью повышения внутривидовой конкуренции и ослабления популяции вселенцев.

На наш взгляд наиболее перспективным способом в подавлении репродуктивного баланса в популяциях чужеродных видов может служить метод внедрения триплоидных суперсамцов, несущих генотип ХУУ. Для этого возможно применение нескольких технологий. В первом случае требуется создание маточного стада тетраплоидных самцов с генотипом ХХУУ. Их можно получить из диплоидной зиготы, если подавить первое митотическое деление зиготы повышенным гидростатическим давлением или тепловым шоком. Однако выживаемость икры и созревание тетраплоидов довольно низка. При скрещивании тетраплоидных самцов на обычных самок половина получаемых в потомстве самцов будут представлены триплоидными суперсамцами с генотипом ХУУ. Хотя получение, содержание и использование в скрещиваниях тетраплоидных рыб довольно обременительно, однако именно этот метод позволяет получить наибольший процент выхода триплоидов.

В другом подходе при скрещивании с нормальной самкой используются суперсамцы с генотипом УУ. Их получение возможно как методом, описанным в работе (Gutierrez, Teem, 2006), так и путем искусственного андрогенеза. Несмотря на кажущуюся громоздкость, метод получения андрогенетических рыб хорошо разработан и позволяет получать достаточное количество потомков. В этой технологии для получения суперсамцов требуются два этапа воздействия на яйцеклетку. Первоначально происходит инактивация ядра ооцита ультрафиолетовым или ионизирующим (для крупных икринок)

излучением. Затем производят оплодотворение икринок, лишенных ядер, молоками нормальных самцов либо самцов-тетраплоидов. В последнем случае требуется содержать отдельное стадо тетраплоидных производителей либо получить андрогенетическое потомство. Для этого следует провести оплодотворение искры с разрушенными ядрами гаплоидными сперматозоидами, а затем произвести шоковое воздействие (термошок или гидростатическое давление) на зиготу с целью удвоить гаплоидный отцовский геном - подавить первое митотическое деление. Таким образом будет произведено удвоение гаплоидного отцовского генома и все полученные самцы будут нести удвоенную Y-хромосому. При дальнейшем скрещивании суперсамцов с инвертированными самками используют тот же метод подавления второго мейотического деления ооцита, что и при обычном методе получения триплоидов. Как видно, данный метод имеет свои преимущества: он менее трудоемкий и может сочетаться с работами по получению особей с «тройной» Y-хромосомой.

Предлагаемые технологии еще следует опробовать в экспериментальных условиях, для определения, какой из предлагаемых подходов получения триплоидных суперсамцов более рентабельно внедрять в практику. В любом случае, по нашему мнению, наибольшие перспективы для подрыва популяций чужеродных видов имеет именно выпуск триплоидных суперсамцов. Возможно, что триплоидные суперсамцы будут обладать и повышенной агрессивностью, в результате чего в популяции интродуцента создастся крайне неблагоприятный половой баланс, что может привести к депрессии популяции. Хотя специальных исследований, направленных на изучение поведения особей с хромосомным полиморфизмом, на рыбах не проводилось, но есть множество аналогичных работ, выполненных на высших млекопитающих. Удвоение числа мужских половых хромосом у триплоидных суперсамцов, вероятно, также приведет к увеличению выработки андрогенов. В свою очередь именно андрогены, и прежде всего тестостерон, отвечает за агрессивное поведение у рыб. Косвенно такое предположение подтверждается данными из поведенческой генетики человека. Так, при синдроме XYY наиболее частым признаком у больного является высокий рост, часто обнаруживается повышение уровня андрогенов и лютеинизирующего гормона, а наличие добавочной Y-хромосомы как правило коррелирует с агрессивным поведением.

Авторы выражают глубокую благодарность к.б.н. А.А. Махрову и к.б.н. В.С. Артамоновой (ИПЭЭ РАН) за консультации и поддержку на всех этапах исследования. Работа выполнена в рамках проекта МК-1793.2011.4 Совета по грантам Президента РФ для государственной поддержки молодых российских ученых.

КАРАМАН Ю.К.

НИИ медицинской климатологии и восстановительного лечения СО РАМН,

Владивосток, Россия

**ИЗУЧЕНИЕ ХАРАКТЕРА БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТА НА
ОСНОВЕ ЛИПИДОВ ГЕПАТОПАНКРЕАСА КАМЧАТСКОГО КРАБА,
СОДЕРЖАЩЕГО 1-О-АЛКИЛ-ДИАЦИЛГЛИЦЕРИДЫ И
ω3 ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫЕ ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ**

Морские гидробионты являются традиционными источниками ω3 полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), используемых для профилактики и лечения целого ряда заболеваний (Эндакова Э.А., Новгородцева Т.П., Козычева Е.В. // *Вопр. питания.* 2000. Т.69. № 1/2. С. 37-40; Archer S.L., Green D., Chamberlain M. et al. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1998. Vol. 18. № 7. P.1119-1123). В то же время в состав липидной фракции внутренних органов некоторых морских гидробионтов (акула, кальмар, краб) входят 1-О-алкил-диацилглицериды, обладающие высокой биологической активностью, отличной от свойств ПНЖК ω3 (Гаджиева З.М., Поздняков А.Л., Кулакова С.Н. // *Вопр. питания.* 2002. № 6. С. 35-37; Караман Ю.К., Касьянов С.П. // *Наука. Мед. экология. Здоровье.* № 1(25). 2006. С.84-87; Pugliese P.T., Jordan K., Cederberg H. // *J. Altern. Complement. Med.* 1998. Vol.4. №.1. P.87-99). Изучено влияние суммарной липидной фракции камчатского краба *Paralithodes camtschatica* - биологически активная добавка (БАД) «Крусмарин», содержащей 10% 1-О-алкил-диацилглицеридов, 10% ω3 полиненасыщенных жирных кислот и комплекс биоантиоксидантов (альфа-токоферол, бета-каротин), на работу систем «перекисное окисление липидов – антиоксидантная защита» (ПОЛ-АОЗ), липидтранспортной, на состояние иммунного статуса организма в эксперименте на 30-ти крысах-самцах с моделированной гиперлипидемией. БАД

«Крусмарин» предоставлена Тихоокеанским научно-исследовательским рыбохозяйственным центром, г. Владивосток. Введение БАД осуществлялось интрагастрально в течение 30 дней в дозе 0,6 мл/кг массы тела крысы. Показано, что Крусмарин обладает липидкорректирующими свойствами, проявившиеся в уменьшении концентрации триглицеридов, общего холестерина и увеличении уровня холестерина липопротеидов высокой плотности. Состояние оксидативных процессов под влиянием курсового введения БАД «Крусмарин» выходит на нормальный физиологический уровень функционирования, о чем свидетельствует уменьшение продуктов ПОЛ в печени и в крови, нормализации общей антиоксидантной активности. Иммунотропные и противовоспалительные свойства препарат проявляет в способности модулировать работу клеток белой крови. Выявлено увеличение количества лимфоцитов, снижение уровня лейкоцитов и провоспалительных цитокинов (TNF- α , INF- γ) в крови. Таким образом, комплекс биологически активных компонентов БАД «Крусмарин» обладает гиполипидемическими, антиоксидантными, иммуномодулирующими и противовоспалительными свойствами. Установленные эффекты препарата липидов гепатопанкреаса камчатского краба позволяют рекомендовать БАД «Крусмарин» в качестве вспомогательного средства профилактики и лечения заболеваний, сопровождающихся воспалительными процессами, нарушениями в обмене липидов и системы иммунитета, интенсификацией процессов липопероксидации.

КАРАНОВА М.К.

Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия

РАЗРАБОТКА СПОСОБОВ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИИ В МАТЕРИАЛЕ МИКОПЛАЗМ РЕДКИХ ВИДОВ

Заболевания человека, вызываемые микоплазмами, объединяют в группу микоплазмозов человека, вызываемых микроорганизмами рода *Mycoplasma*. Основную этиологическую роль играет *Mycoplasma pneumoniae*. Однако существуют виды, роль которых неясна, в частности, *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma penetrans*, *Mycoplasma pirum*, *Mycoplasma spermatophilum* и некоторые другие, но они нередко обнаруживаются в

синовиальной жидкости при заболеваниях суставов при ревматоидном артрите и при СПИДе. Недостаток сведений об указанных микроорганизмах во-многом обусловлен отсутствием информативных методов, классические микробиологические методы малопригодны для выявления. В этой связи существует необходимость разработки новых способов диагностики, среди которых наиболее перспективной является ПЦР, характеризующаяся высокой специфичностью и чувствительностью.

Поэтому целью исследования явилось: повышение эффективности диагностики выявления микоплазм редких видов путем разработки новых методов детекции ДНК с помощью ПЦР.

В результате исследования был проведен сравнительный анализ последовательностей ДНК микоплазм редких видов и подобраны диагностические пары праймеров. При их использовании проанализировано 85 образцов (55 образцов мокроты, 30 – сывороток крови). В 54 образцах мокроты *Mycoplasma fermentans* была обнаружена в 7 образцах, *Mycoplasma pirum* - в 5. При этом *Mycoplasma fermentans* была выявлена в крови в 4 случаях из 30 образцов сывороток.

Таким образом, впервые выявлены в клиническом материале достаточно редко встречающиеся виды микоплазм. Этому способствовала разработка новой диагностической системы на основе ПЦР и доказана эффективность данной методики. Идентификация указанных возбудителей полученными нами тест-системами могут стать основой при постановке диагноза и дальнейшего лечения. Результаты проделанной работы могут быть применимы в медицине в лабораторной диагностике для выявления возбудителей.

КАРЛОВ П.М., ЯКОВЛЕВ Л. Ю.

Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ АНТИБИОТИКОВ В СУБСТАНЦИЯХ И БИОМАТЕРИАЛЕ

Злокачественные новообразования в настоящее время являются одной из основных причин смертности в РФ.

Среди способов их лечения основное место занимает фармакотерапия; ведущую роль в которой играет применение противоопухолевых антибиотиков, которые включены в большинство стандартов оказания медицинской помощи как в России, так и за рубежом.

Однако существенными недостатками их применения являются множественные побочные эффекты, обусловленные системной токсичностью.

Перспективным путём решения данной проблемы является использование технологий направленного транспорта лекарственных средств, позволяющих значительно снизить их токсичность, удлинить время полувыведения, уменьшить терапевтическую дозу и кратность приёма. Контролируемая и целенаправленная доставка в организм антибактериальных препаратов основана на использовании различных носителей или векторов, обладающих тропностью к определенным органам или их клеткам. Наиболее выгодными с точки зрения биологической совместимости считаются системы доставки, в которых используются собственные клетки организма, в частности, эритроциты и лейкоциты.

Для получения клеточных форм препаратов с дозированным содержанием действующего вещества необходима точная, экспрессная, легко воспроизводимая и экономически выгодная методика их стандартизации. Большое внимание исследователей привлекают оптические методы анализа, одним из которых является спектрофотометрия. К достоинствам данного метода можно отнести высокую воспроизводимость и экспрессность.

Противоопухолевые антибиотики, представителями которых являются доксорубин и даунорубин, играют важную роль в терапии злокачественных опухолей.

В целях идентификации и разработки методик количественного определения исследованы спектральные характеристики препаратов УФ - области.

Используя серии последовательных разведений, построены калибровочные графики и рассчитаны уравнения калибровочных графиков.

По полученным данным разработаны методики количественного спектрофотометрического определения исследуемых веществ в субстанциях и лиофилизированных порошках.

Разработка методик анализа препаратов в биологических жидкостях, в частности, в плазме и клеточной массе, явилась логичным продолжением работы.

Плазма крови и гемолизат клеток крови представляют собой сложные гетерогенные системы, содержащие большое число эндогенных органических соединений, концентрации которых часто соизмеримы с концентрациями исследуемых лекарственных средств. В связи с этим анализ препаратов в них, как правило, проводят в два этапа.

На первом этапе гемолиз клеток крови проводили путём добавления к клеточной массе двукратного количества воды, а для наиболее полного гемолиза проводили замораживание и размораживание клеточной массы.

Плазму крови и гемолизат подвергали очистке от белка различными осадителями. Полноту осаждения компонентов крови оценивали по величине остаточной оптической плотности. Установлено, что оптимальным осадителем является 30% раствор кислоты трихлоруксусной.

Исследования показали, что, как для плазмы крови, так и для гемолизата клеток крови оптимальное соотношение осадителя и биоматериалов было 1:1.

Для выбора оптимального режима центрифугирования отделение осаждённого белка проводили центрифугированием от 3 до 15 мин при 8000 об/мин. Как видно из представленной таблицы, оптимальное время составляет 5 мин.

Исследования показали, что действием 30% раствора трихлоруксусной кислоты не удаётся полностью избавиться от эндогенных компонентов биоматериалов, мешающих определению антибиотиков. В связи с этим нами была исследована возможность дополнительной очистки плазмы крови и гемолизата клеток методом гель-хроматографии.

В эксперименте использовали сефадексы различных марок, которые выдерживали в воде очищенной в течение определённого времени при комнатной температуре. Так как сефадекс проявляет свойства слабого анионита и абсорбирует препараты из водных растворов в качестве элюента использовали раствор кислоты хлороводородной. Для полного элюирования изучаемых веществ достаточна её 0,01 М концентрация.

На втором этапе содержание лекарственных препаратов в полученном элюате определяли спектрофотометрически по разработанной нами методике.

Следующим этапом работы планируется получение клеточных форм антибиотиков и разработка методик их стандартизации по количеству действующего вещества.

КАТИНА М.Н.^{1,2}, ХАЯТОВА З.Г.¹, РИЗВАНОВ А.А.², ГАЙФУЛЛИНА Р.Ф.^{1,2}

¹ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» МЗ РТ,
Казань, Россия

²ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»,
Казань, Россия

СПОСОБЫ МОДЕЛИРОВАНИЯ ИНФАРКТА МИОКАРДА У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Инфаркт миокарда и развивающаяся вследствие него сердечная недостаточность, несмотря на все усилия по лечению ишемической болезни сердца и успехи реваскуляризационной техники, остаются ведущими причинами смерти в развитых странах мира. В исходе инфаркта миокарда пораженные сократительные кардиомиоциты заменяются фиброзной тканью, не способной сокращаться и поддерживать необходимый сердечный выброс. Большинство существующих методов лечения направлены на усиление работы оставшегося миокарда, снятие преднагрузки на сердечную мышцу и устранение такого последствия сердечной недостаточности, как отечный синдром. Ввиду того, что способность миокарда взрослого человека к самообновлению крайне ограничена, единственным существующим на данный момент способом восстановления утраченной сократительной способности миокарда является пересадка сердца. Однако применение этого метода лечения резко ограничено недостатком донорских органов, высокой стоимостью операции, плохой ее переносимостью, необходимостью длительного приема иммунодепрессантов. Именно поэтому большие надежды возлагаются практически на все вновь открываемые лекарственные препараты и методики лечения.

Прежде чем новый препарат или метод лечения войдет в широкую врачебную практику, он должен пройти целый ряд доклинических исследований, в том числе и на животных. Инфаркт миокарда чаще всего является следствием атеросклеротического поражения коронарных артерий, однако большинство часто используемых лабораторных животных не подвержены этому заболеванию, или же атеросклеротическая бляшка у них не дестабилизируется и не достигается необходимая для инфаркта степень сужения просвета сосуда.

Цель данного исследования – обзор наиболее адекватных моделей инфаркта миокарда на лабораторных животных.

Наиболее исследованной и часто используемой на практике является предложенная еще в конце 19 века хирургическая модель инфаркта миокарда, заключающаяся в перевязке нисходящей ветви левой коронарной артерии. Эта модель имеет высокую степень воспроизводимости, однако связана с частой гибелью животных (около 30% по литературным данным) при оперативном вмешательстве, требующем торакотомии и операции на открытом сердце.

Предлагаются и фармакологические модели инфаркта миокарда с введением адреналина и изопротеренола, которые проще в воспроизведении, однако также часто приводят к гибели лабораторных животных. Так, при введении 0,1% раствора адреналина из расчета 4мг/кг массы тела, что обеспечивает развитие инфаркта миокарда у 50% животных, наблюдается 50% смертность подопытных животных.

Недавно предложена патогенетическая модель инфаркта миокарда, которая, как считают авторы, гораздо лучше имитирует изменения в организме при данной патологии. Так, они предлагают выполнять одностороннюю нефрэктомию без удаления надпочечника с последующим содержанием животных на диете, обедненной калием и магнием, но обогащенной натрием и кальцием. Инфаркт миокарда инициируется введением гидрокортизона и холодным стрессом.

Все предложенные модели инфаркта миокарда не являются в достаточной степени физиологичными, требуют большого расхода животных вследствие их высокой летальности, так же для их воспроизведения необходимо дорогостоящее оборудование и специально обученный персонал, что несомненно ведет к удорожанию и усложнению эксперимента. Таким образом, требуется дальнейшая оптимизация уже существующих моделей инфаркта миокарда у животных и поиск новых более адекватных моделей.

КАЧАЕВ З.М., ВОРОБЬЕВА Н.Е., ШИДЛОВСКИЙ Ю.В.

Институт биологии гена РАН, лаборатория регуляции экспрессии генов,

Москва, Россия

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ НОВОГО ФАКТОРА, РЕГУЛИРУЮЩЕГО ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ

Экспрессия генов – важный процесс, который контролируется большим количеством различных факторов. Центральную роль в регуляции экспрессии генов играют факторы транскрипции. Изучение их функций важно как в фундаментальных исследованиях, так и в практических приложениях (в медицине, биотехнологии).

Фактор транскрипции Supporter of Activation of Yellow Protein (SAYP) у *Drosophila* кодируется геном *e(y)3*. Его гомологом у млекопитающих является белок PNF10. Молекулярная масса SAYP составляет 250 кДа. Показано, что данный белок способен собирать суперкомплекс BTFly массой около 2 МДа, состоящий из хроматин-ремоделирующего фактора Brahma и основного фактора транскрипции TFIID. BTFly привлекается на промоторы генов и активирует их транскрипцию.

SAYP взаимодействует с ядерным рецепторным белком DHR3, компонентом эдизонового каскада. Также показано, что SAYP взаимодействует с транскрипционным активатором Stat, компонентом Jak/Stat сигнального пути. Продемонстрирована важная роль SAYP в развитии дрозофилы.

SAYP состоит из N-концевого домена, двух цинковых пальцев типа PHD и нового эволюционно-консервативного домена SAY. SAY-домен выполняет функции транскрипционного активатора и служит основой для сборки BTFly. Функциональная роль PHD доменов белка SAYP изучается в настоящее время.

Таким образом, в работе изучаются структура и функции консервативного фактора транскрипции, играющего важную роль во многих биологических процессах.

КИЛАДЗЕ А.Б.

Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва, Россия

МАССОВАЯ ДОЛЯ СТЕКЛОВИДНОГО ТЕЛА ГЛАЗНОГО ЯБЛОКА АФРИКАНСКОГО СТРАУСА

Стекловидное тело глазного яблока африканского страуса формирует светопреломляющую систему зрительного анализатора. Известно, что стекловидное тело представляет собой гидрофильный гель, 98–99% которого составляет вода, связанная с коллагеновыми волокнами и мукополисахаридами, основу которых формирует гиалуроновая кислота, определяющая потребительную стоимость стекловидного тела как органопрепарата (Гуров, 1976), который в настоящее время используют для производства таких лекарственных форм, как стекловидное тело для инъекций и луронит. Наиболее близким нормативным прототипом, содержащим технические условия к товарной оценке данного органопрепарата, являются ТУ 10-02-01-01–86 «Стекловидное тело глаз крупного рогатого скота, свиней, овец и коз замороженное», которые состоят из нескольких разделов, регламентирующих порядок определения качества этого биоматериала. Очевидно, что при пересмотре нормативной документации необходимо предусмотреть требования к стекловидному телу глаз африканского страуса либо разработать новые технические требования на данный вид биоматериала.

По нашим данным, массовая доля стекловидного тела от общей массы глазного яблока африканского страуса составляет 63,6%. Расчет массовой доли стекловидного тела ($W_{Corpus_vitreum}$, %), отражающего его выход с одного глаза, предлагаем вычислять по следующей формуле:

$$W_{Corpus_vitreum} = \frac{m_{Oculus} - m_{Oculus_Vacuum}}{m_{Oculus}} \times 100, \quad (1)$$

где m_{Oculus} — масса глаза, г; m_{Oculus_Vacuum} — масса пустого глаза, г.

Полученное значение практически составляет 2/3 массовой доли глазного яблока африканского страуса. Приведенные данные позволяют оценить масштабы ресурсов данного органопрепарата, которыми располагает страусоводство. Так, по нашим данным, масса стекловидного тела с одного глаза в абсолютном выражении составляет 30,7 г, при этом с одной особи можно получить более 60 г стекловидного тела.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ для ведущих научных школ (проект НШ-5928.2012.4).

КИЛАДЗЕ А.Б.

Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва, Россия

НОМЕНКЛАТУРА ВТОРИЧНОЙ ПРОДУКЦИИ СТРАУСОВОДСТВА: РЕСУРСОСБЕРЕГАЮЩИЙ АСПЕКТ

Экоинновационный характер ведения страусоводства подразумевает внедрение рециклинговых технологий, обеспечивающих полноценное использование вторичного сырья, что существенным образом повысит рентабельность и расширит номенклатуру выпускаемых товаров. К основной группе продуктов страусоводства, формирующих доминирующий экономический эффект, следует отнести мясные товары, неоплодотворенные яйца, а также кожевенное сырье и перья. Вместе с тем огромный массив вторичного сырья, накапливающийся в рамках фермерских хозяйств, а также перерабатывающих предприятий, создает не только негативный прессинг на окружающую среду, но и не позволяет максимально полно реализовать потенциал отрасли за счет вовлечения дополнительного технического сырья. В этой связи актуализируется проблема наиболее эффективной адаптации вторичного сырья в ресурсосберегающую технологическую цепочку.

Цель работы — рассмотреть потребительские свойства номенклатуры вторичного сырья с учетом морфолого-технологического аспекта. Содержание работы базируется на основе исследований, проведенных нами (Киладзе, Чернова, 2011) на базе ООО «Русский страус» (Серпуховский р-н Московской обл., дер. Старые Кузьменки). Рассмотрим важнейшие дополнительные виды продукции страусоводства.

Когти африканского страуса (далее — страус) можно использовать не только для производства абразивов, украшений и швейной фурнитуры, но и в качестве сырья для выработки железисто-синеродистых солей и азотных удобрений (Кузнецов, 2005). Целевое использование когтей обусловлено химическим составом кератина, который является более твердым, чем кератин перьев, но менее твердым, чем кератин клюва (Bonser, 1996).

Масса рогового чехла, по нашим данным, варьирует в пределах 5,96–6,72 г, при этом длина достигает 5 см, однако, по данным литературы, длина когтя может достигать 7 см (Туревич, 2000). *Перья век* страуса находят применение для выработки накладных ресниц, используемых в косметических целях. Целесообразно рассмотреть возможность производства кистевого волоса из перьев век. По нашим данным, длина ($15,42 \pm 0,44$ мм) и толщина ($420,02 \pm 13,44$ мкм) стержней перьев верхнего века примерно в два раза превышает аналогичные свойства стержней перьев нижнего века ($8,19 \pm 0,50$ мм и $210,23 \pm 10,18$ мкм), что, по-видимому, имеет объяснение с точки зрения морфофизиологической адаптации. *Подкожный жир* страуса получают в качестве мездры, которую целесообразно использовать для выработки мездряного клея, кормовой добавки и технического масла. Необходимо отметить, что толщина подкожного жира, имеющего светло-желтый или кремовый оттенок, может превышать толщину самой шкуры, при этом степень развития жирового компонента подчиняется закономерностям топографии кожного покрова. Установлены физические и химические константы, а также жирнокислотный состав подкожного жира страуса (Горбачева, 2009; Горбачева и др., 2011). По нашим данным, содержание липидов в шкуре страуса довольно высокое (9,93–30,62%), что целесообразно учитывать при подборе оптимального режима обезжиривания и используемых поверхностно-активных веществ. *Скорлупу яиц* страуса (средняя масса — $281,09 \pm 12,88$ г; средняя площадь поверхности — $547,07 \pm 14,70$ см²; средняя толщина — $1,88 \pm 0,03$ мм) традиционно используют в декоративно-прикладных целях, а также в качестве трансплантата нижней стенки орбиты в ветеринарной офтальмологии (Yadao et al., 2004), при этом подскорлуповые мембраны необходимо рассматривать как потенциальный источник гиалуроновой кислоты, используемой в медицине и косметологии (Long et al., 2004). *Пищевод* страуса, средняя толщина стенки которого составляет $4,3 \pm 0,3$ мм, а также *двенадцатиперстную, тощую, подвздошную, ободочную и слепую кишки* (Горбачева, 2012), необходимо рассматривать в качестве потенциального кишечного сырья для производства колбасных оболочек. *Трахею* страуса, где в гистологическом плане доминирует гиалиновый хрящ (толщина — $452,80 \pm 9,48$ мкм), целесообразно использовать в качестве кормовой добавки для собак. *Глазное яблоко* страуса является источником таких офтальмологических трансплантатов для пересадки человеку, как *роговица* (толщина варьирует в пределах 0,80–1,10 мм) и *хрусталик*, средние параметры

которого составили: масса — $1,52 \pm 0,04$ г; объем — $1,36 \pm 0,04$ см³; площадь поверхности — $6,08 \pm 0,12$ см². Мозг страуса, масса которого составляет 36 г, используют для изготовления препаратов от болезни Альцгеймера. Кроме того, целесообразно использовать *кровь* (экспериментальные препараты от СПИДа) и *сухожилия* (трансплантаты) страуса (Туревич, 2000).

Таким образом, комплексное использование вторичной продукции страусоводства позволит не только расширить ассортиментный ряд используемого сырья, но и обеспечить дополнительный приток прибыли.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ для ведущих научных школ (проект НШ-5928.2012.4).

КИМ Я.В., ГАСПАРЯН М.Э.

*Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
РАН (ИБХ РАН), Москва, Россия*

ЭКСПРЕССИЯ И ОЧИСТКА МОНОМЕРА РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА ТРАНСФОРМИРУЮЩЕГО ФАКТОРА РОСТА–БЕТА1 (TGF-β1) ЧЕЛОВЕКА В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI*

Трансформирующий фактор роста бета (TGF-β) относится к большому семейству структурно и функционально связанных между собой белков, которые участвуют в регуляции широкого спектра клеточных процессов, включая пролиферацию, дифференциацию и апоптоз. Нарушения уровня продукции TGF-β клетками может вызвать многочисленные патологии, включая атеросклероз и фиброзные заболевания почек, печени и легких. Изоформы лиганда TGF-β играют двоякую роль в процессе канцерогенеза, выступая в качестве супрессора опухолевого роста на ранних стадиях развития рака. А на поздних стадиях раковые клетки приобретают резистентность к его ингибирующему эффекту. Большинство злокачественных опухолей, включая меланому и рак груди, толстой кишки, пищевода, желудка, печени, легких, поджелудочной железы и простаты, характеризуются повышенной продукцией TGF-β, который способствует росту опухоли, индуцирует ангиогенез и опосредует эпителиально-мезенхимальный переход.

Существует множество стратегий, которые используются для нейтрализации суперэкспрессированного TGF- β в окружении метастазирующих опухолей. К ним относятся ингибирование киназной активности рецепторов к TGF- β , нарушение передачи сигнала внутриклеточными медиаторами - белками SMAD, подавление экспрессии и секреции TGF- β клетками.

Одной из успешных стратегий нарушения сигнальных путей TGF- β является блокирование сайтов связывания рецептора II типа с лигандом с помощью молекул-антагонистов. Ранее было показано, что мономерная молекула TGF- β так же эффективно связывается с рецептором II типа T β RII, как и природный димер. Однако биологическая активность мономера более чем на 2 порядка хуже по сравнению с димером TGF- β . Следовательно, препараты мономеров TGF- β могут быть применены при терапии метастазирующих опухолей для нейтрализации сигнальных путей запускаемых природными димерными молекулами TGF- β .

Для белков семейства TGF- β характерно наличие 9 консервативных остатков цистеина, которые образуют 4 внутримолекулярных дисульфидных связей и одну межмолекулярную связь, участвующую в образовании димера. В данной работе были разработаны методы экспрессии и очистки рекомбинантного белка TGF- β 1, в котором аминокислотный остаток цистеина Cys77, участвующий в образовании межмолекулярной дисульфидной связи был заменен на серин (Ser). Последовательность ДНК, кодирующая TGF- β 1 человека была синтезирована из 20-ти перекрывающихся олигонуклеотидов с помощью полимеразной цепной реакции. Синтетический ген TGF- β 1 был клонирован в плазмиду pET-32a вслед за геном слитного белка-партнера тиоредоксина непосредственно после ДНК-кодирующей последовательности сайта узнавания энтеропептидазой. Высокий уровень экспрессии (1г/л) слитного белка тиоредоксин/TGF- β 1/C77S (Trx/TGF- β 1/C77S) был получен в клетках *E. coli* штамма BL21(DE3) в нерастворимой форме в составе тельцов включения. После растворения тельцов включения в 6 М гуанидине, была разработана методика ренатурации слитного белка Trx/TGF- β 1/C77S в системе окисленного и восстановленного глутатиона в присутствии детергента CHAPS (1 %). После 72 часовой инкубации в буфере при 4 °C слитный белок очистили на Ni-NTA агарозе и расщепили рекомбинантной легкой цепью энтеропептидазы. Далее целевой белок был отделен от тиоредоксина на Ni-NTA агарозе. Окончательную очистку мономера TGF- β 1/C77S

проводили с помощью аффинной хроматографии на сорбенте Affi-Gel 15, связанной с рекомбинантным внеклеточным доменом рецептора TGF- β 1 типа II T β RII (полученного ранее в нашей лаборатории). С помощью метода иммуноферментного анализа (ELISA) было показано, что очищенный препарат мономера TGF- β 1/C77S отличается высокой аффинностью к рецептору T β RII.

Таким образом, разработанные нами методики позволили получить высокоочищенный и активный препарат мономерного белка TGF- β 1/C77S с выходом около 10 мг с 1 литра культуры клеток. Высокий выход и относительная дешевизна полученного рекомбинантного белка TGF- β 1/C77S позволяет использовать препарат в преclinical и клинических исследованиях для лечения ряда фибропролиферативных нарушений и опухолевых заболеваниях, где нерегулируемая экспрессия TGF- β играет ключевую роль.

КИРГИЗОВА С.Б.

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ПРЕПАРАТОВ ИНДУКТОРОВ ЭНДОГЕННОГО ИНТЕРФЕРОНА НА ФАКТОРЫ ПЕРСИСТЕНЦИИ STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Использование антибактериальных препаратов уменьшило число инфекционных заболеваний, но широкое применение антибиотиков привело к неблагоприятным последствиям, связанным со снижением индигенной микрофлоры и появлению штаммов микроорганизмов, характеризующихся множественной устойчивостью к применяемым антибиотическим препаратам. В настоящее время создаются новые перспективные препараты, относящиеся к группе индукторов эндогенного интерферона, обладающие универсально широким диапазоном фармакологической активности, выраженным иммуномодулирующим эффектом и успешно применяемые для терапии широкого круга как вирусных, так и бактериальных инфекций.

Staphylococcus aureus, благодаря наличию целого набора биологических, в том числе персистентных свойств, способен колонизировать слизистые оболочки носовой полости, что может приводить к развитию целого ряда гнойно-воспалительных

заболеваний различной локализации. Подавление персистентных свойств возбудителя затрудняет его паразитирование внутри организма хозяина и, тем самым, повышает эффективность лекарственных воздействий.

Целью исследования явилась попытка оценить способность препаратов индукторов эндогенного интерферона оказывать влияние на факторы персистенции *Staphylococcus aureus*.

Объектом исследования служили штаммы *S.aureus*, выделенные от стафилококковых бактерионосителей. В эксперименте *in vitro* использованы коммерческие препараты - индукторы эндогенного интерферона (ИИ): «Полудан» - синтетический высокомолекулярный ИИ (лиофилизат для приготовления назальных капель - концентрация 20 ЕД/мл), «Циклоферон» - синтетический низкомолекулярный ИИ (раствор для инъекций 125мг/мл, доведенный изотоническим раствором хлорида натрия до концентрации 50 мг/мл).

Действие препаратов изучали на распространенность и экспрессивность антилизоцимной и антикарнозиновой активности *S.aureus*. Препарат полудан *in vitro* оказывал ингибирующее влияние на антилизоцимную и антикарнозиновую активности у 15,0 \pm 4,3% штаммов золотистого стафилококка. Циклоферон подавлял персистентные свойства: антилизоцимную активность у 15,0 \pm 4,3%, а антикарнозиновую - у 30,0 \pm 8,6% штаммов.

При тестировании лекарственных веществ на уровень экспрессии факторов персистенции *S.aureus* получены следующие результаты. Под действием полудана на персистентный потенциал исследованных изолятов *S. aureus*, установлено, что у бактерий, инкубированных с препаратом, по сравнению с контролем, наблюдалось снижение уровня антилизоцимной активности на 57,9 \pm 9,0% (средний показатель - 1,04 \pm 0,06 мкг/мл \times ОП) и антикарнозинового признака на 67,4 \pm 8,6% (средняя величина - 0,91 \pm 0,08 мг/мл). Соинкубирование *S.aureus* с циклофероном приводило к снижению уровня антилизоцимной активности среди всех исследованных штаммов до среднего значения 0,89 \pm 0,07 мкг/мл \times ОП, что составляло 63,8 \pm 8,8% от исходного уровня антилизоцимной активности. Сходные данные были получены при анализе влияния циклоферона на антикарнозиновую активность изолятов *S. aureus*: под действием препарата средняя

величина данного признака среди всех исследуемых опытных штаммов, по сравнению с контролем, снизилась на $74,6 \pm 7,9\%$ и составила $0,71 \pm 0,09$ мг/мл.

Полученные результаты по влиянию индукторов интерферона на персистентный потенциал *S. aureus* показывают, что биологически активные вещества в применяемых концентрациях могут оказывать угнетающее действие на распространенность и выраженность факторов персистенции. Двойная направленность действия: с одной стороны на повышение механизмов естественной иммунологической защиты организма, а с другой – на биологические свойства микроорганизмов, может усилить результат терапевтического воздействия, что позволит использовать индукторы интерферона для более эффективной борьбы с возбудителями бактериальных инфекций и разработать новые подходы к коррекции дисбиотических нарушений в микробиоценозах тела человека

КИРЕЕВА Н.А., ГРИГОРИАДИ А.С.

Башкирский государственный университет, Уфа, Россия

БИОПРЕПАРАТ НА ОСНОВЕ АССОЦИАТИВНЫХ МИКРОМИЦЕТОВ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПОЧВЫ ПОД ПОСЕВАМИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР

В настоящее время вопросам экологизации сельского хозяйства уделяется большое внимание. В первую очередь научные разработки направлены на получение качественной, экологически безопасной и чистой растительной продукции, не содержащей тяжелых металлов, радионуклидов, пестицидов, микотоксинов и других токсических поллютантов. Однако данной цели сложно добиться при использовании химических методов защиты растений от вредителей и ускорения их роста. Решением проблемы может быть использование биологических препаратов, на основе микроорганизмов и их метаболитов, которые естественным образом стимулируют не только ростовые процессы растительного организма и биологическую активность почвы, что важно для нормального развития растения.

В данной работе представлены результаты исследования влияния препарата Метаболит на биологическую активность почвы под посевами сахарной свеклы. Опыты

проводили на площадках размером 25м² в 3-х кратной повторности. Почва выщелоченный чернозем (гумус- 8,7%; рН_{водн.} – 6,1; N_{общ.}- 2510 мг/кг). В качестве объектов исследования использовали семена и растения сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L, var. *saccharifera.*, сорт Милан). Семена перед посевом обрабатывали 0,001% раствором Метаболита, который представляет собой природный экстракт биологически активных веществ, микромицета-ассоцианта, *Scopulariopsis acremonium* (Delacr.) Vuill., выделенного из корней трехлетней культуры облепихи (*Hippophae rhamnoides*). В контрольных вариантах опыта семена замачивали в дистиллированной воде. Каталазную активность определяли газометрическим методом, активность дегидрогеназы, полифенолоксидазы и пероксидазы - колориметрическим методом, целлюлазы - аппликационным методом, липазы – титрометрическим методом. Анализы проводили через 45, 60 и 130 сут с момента прорастания семян.

Одним из важных показателей общей биологической активности почвы является ее ферментативная активность, которая является показателем деятельности микроорганизмов в почвенной экосистеме. Исследовалось влияние биопрепарата на целлюлазную активность, связанную с деятельностью как аэробных, так и анаэробных целлюлозоразрушающих микроорганизмов. Обработка семян, а в дальнейшем, и растений сахарной свеклы, способствовала постепенной интенсификации процессов разложения клетчатки под ее посевами, что коррелировало ($r = 0,78$; при $p \geq 0,95$) с увеличением численности целлюлозоразрушающих микроорганизмов. Через 130 сут показатель в почве, под обработанными растениями в 1,8 раз превышал контрольный вариант.

В обмене веществ и энергии в почве важное место принадлежит окислительно-восстановительным ферментам (ОВФ). Одними из наиболее широко распространенных в почвах ОВФ являются каталазы, дегидрогеназы и фенолоксидазы. При обработке семян и растений сахарной свеклы биопрепаратом каталазная активность чернозема выщелоченного в ризосфере и под посевами возрастала в 1,5 раза. Это является положительным фактором, так как при этом усиливаются процессы детоксикации различных поллютантов под посевами сахарной свеклы и улучшается питательный режим.

Аналогичным образом, обработка семян и растений активизировала процессы анаэробного дегидрирования, как в ризосфере, так и под посевами. Очевидно, под влиянием экзометаболических ассоциативного гриба происходила стимуляция корневых

выделений растений, активирующих окислительно-восстановительные процессы, происходящие с участием этих ферментов.

Как пероксидазная, так и полифенолоксидазная активность чернозема под посевами растений была выше, чем в ризосфере. При обработке препаратом активность этих ферментов, участвующих в процессах трансформации гумуса, повышалась. Определение коэффициента гумификации, являющегося отношением активности полифенолоксидазы к активности пероксидаз, свидетельствует о том, что в ризосфере под влиянием Метаболита происходит незначительное ослабление процессов минерализации гумусовых веществ. Наоборот, в эдафосфере эти процессы активизируются.

Таким образом, обработка биопрепаратом Метаболит семян и растений сахарной свеклы активизирует микробиологические и биохимические процессы в черноземе выщелоченном под посевами, что в свою очередь, оказывает положительное влияние на рост этой сельскохозяйственной культуры и может с успехом использоваться в технологиях экологического земледелия.

КИСЕЛЕВА Е.П., МИХАЙЛОПУЛО К.И.

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

МЕТОДИЧЕСКИЙ ПОДХОД К УСТАНОВЛЕНИЮ ЛОКАЛИЗАЦИИ УЧАСТКОВ СВЯЗЫВАНИЯ БИОПОЛИМЕРОВ НЕИЗВЕСТНОЙ ПРИРОДЫ В МОЛЕКУЛЕ ИММУНОГЛОБУЛИНА КЛАССА G

Ранее нами был опубликован ряд работ, посвященных обнаружению и хроматографической очистке биополимеров пробиотических микроорганизмов (ПМ) *Bifidobacterium bifidum* 791, *Lactobacillus plantarum* В-01 и *Saccharomyces cerevisiae* Y-195, избирательно взаимодействующих с антителами (АТ) человека, специфичными к тироантигенам (тиропероксидазе (ТПО) и тироглобулину (ТГ)) и белкам злаков глиадином. Указанные АТ являются серологическими маркерами аутоиммунных заболеваний (АЗ) щитовидной железы и целиакии, соответственно. Для выяснения роли указанных биополимеров в молекулярных механизмах иммунного ответа, характерного

для двух АЗ человека, необходимо установить локализацию участков их связывания в молекулах АТ к тироантигенам и АТ к глиадинам.

Нами разработана универсальная методология, позволившая решить эту проблему и пригодная для решения аналогичных задач, касающихся других биополимеров, взаимодействующих с иммуноглобулинами IgG любой специфичности. Стратегия исследования включает два этапа. На этапе 1 используют очищенные нативные IgG заданной специфичности, определенные участки молекулы которых блокированы специфическими реагентами, на этапе 2 - продукты ферментативного протеолиза тех же IgG. В качестве контроля используют естественный антиген (АГ), взаимодействующий с переменной областью Fab IgG. **Этап 1** включает три стадии, относящиеся к выяснению роли олигосахаридных цепей (1.1), C_H2 домена (1.2) и переменной части Fab (1.3) IgG в связывании биополимеров. **Стадию 1.1** выполняют методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). **1.1.1.** IgG дегликозилируют с использованием эндогликозидазы Endo S из *Streptococcus pyogenes*. **1.1.2.** Эффективность дегликозилирования оценивают по способности IgG, обработанных EndoS, к взаимодействию с рекомбинантной EndoS (E235Q), лишенной ферментативной активности. **1.1.3.** Дегликозилированные IgG вносят в лунки полистирольного планшета для ИФА (ПП) с иммобилизованными (а) биополимером или (б) АГ, инкубируют, определяют количество IgG на твердой фазе с использованием меченого ферментом рекомбинантного белка G (Sigma, USA). **Стадию 1.2** выполняют методом плазмонного резонанса с использованием прибора BIACore. Используют чип с ковалентно иммобилизованным белком G. **1.2.** В результате последовательных инъекций IgG и белка А из *Streptococcus aureus* формируют на чипе тройной комплекс, в составе которого C_H2 домен IgG блокирован белком G и белком А. Осуществляют инъекцию (а) биополимера или (б) АГ, детектируют их взаимодействие с IgG. **Стадию 1.3** выполняют методами плазмонного резонанса (1.3.1) и конкурентного ИФА (1.3.2). **1.3.1.** В результате одной инъекции IgG и трех последовательных инъекций АГ на чипе BIACore с белком G формируют комплекс, в составе которого переменная область Fab IgG блокирована АГ. Осуществляют инъекцию биополимера, детектируют его взаимодействие с IgG. **1.3.2.** В лунках ПП адсорбируют (а) биополимер или (б) АГ. Инкубируют адсорбированные вещества с растворами (n₀ – n_i), содержащими АТ (n₀) или АТ плюс АГ в возрастающей

концентрации (n_i); определяют количество IgG на твердой фазе в соответствии с п. 1.1.3. **Этап 2** выполняют методами ферментативного протеолиза IgG папаином (**2.1**) или пепсином (**2.2**), фракционирования продуктов гель-фильтрацией и ИФА. **2.1.** В результате протеолиза IgG папаином получают Fab и Fc. Фракционируют продукты протеолиза на Superose 12 HR 10/30 (Pharmacia, Швеция). Фракции, соответствующие белковым пикам, вносят в пустые лунки ПП (серии 1L и 1G), и после адсорбции продуктов протеолиза уточняют локализацию Fab и Fc их детекцией с использованием меченых ферментом белка *L. Peptostreptococcus magnus* (Pierce, USA) (серия 1L) и белка G (серия 1G), соответственно. Фракции, содержащие Fab и Fc, инкубируют с биополимером или АГ, адсорбированными в лунках ПП серий 2L и 2G, 3L и 3G, соответственно. Детектируют связавшиеся продукты протеолиза как указано выше. **2.2.** В результате протеолиза IgG пепсином получают (Fab)'₂. Фракционируют продукты протеолиза, уточняют локализацию (Fab)'₂ и исследуют его взаимодействие с биополимером или АГ как указано выше.

Использование данной методологии позволило исключить олигосахаридный компонент и C_H2 домен АТ к ТПО, АТ к ТГ и АТ к глиадинам в качестве участков связывания биополимеров ПМ. Установлено, что биополимеры ПМ конкурируют за связывание указанных АТ с естественными антигенами и взаимодействуют с (Fab)'₂, но не взаимодействуют ни с Fab, ни с Fc. Сделан вывод о локализации участков связывания биополимеров в Fab АТ к ТПО, АТ к ТГ и АТ к глиадинам. Участки связывания биополимеров частично совпадают, но не перекрываются с эпитопами связывания соответствующих АГ, и включают шарнирную область каждого из исследуемых IgG или конформационно зависимы от структуры этой области.

КНЯЗЕВА И.В., ОГУЛЯ А.П.

ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»), Белгород, Россия

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ВНУТРИ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ РОДА *LUPINUS*

Для Юга-Запада Черноземья особый интерес для кормового и пищевого использования представляет возделывание люпина белого, люпина узколистного

являющимися высокобелковыми культурами, поэтому пищевая ценность в значительной мере определяется составом и свойствами белков. В семенах люпина содержится больше белка, чем в сое (до 45%), белок лучше сбалансирован по аминокислотному составу, не содержит ингибиторов трипсина.

Контроль посредством электрофореза белков отдельных семян очень эффективен для решения таких вопросов, как определения гибридности семян, (сортов), прогнозирования эффекта гетерозиса, оценки частоты сортового посевного материала.

Целью работы было оценить полиморфизм по вариантам белков семян белого и узколистного люпина и определить, насколько зависимо наследуются локусы, контролирующие их синтез.

В работе анализировались образцы семян люпина белого (сорт *Дега*) и люпина узколистного (сорт *Кристалл*), данные сорта являются стандартами, представляющие по запасным белкам семян самоопыляющуюся популяцию $F_{\rightarrow\infty}$. Для разделения запасных белков семян применяли метод электрофореза, экстрактов из предварительно обезжиренного размола части семядоли. Поскольку семена данного вида достаточно крупные, поэтому для более четкого обнаружения полипептидных спектров, мы отщипывали $\frac{1}{4}$ часть семени, удаляли оболочку, а внутреннюю часть размалывали в керамической ступке до образования муки. Полученную муку помещали в центрифужную пробирку на 1,5 мл и подвергали обезжириванию. Данный процесс проходил в два этапа: первоначально измельченную массу заливали петролейным эфиром, после встряхивания и настаивания в течение 1 час содержимого пробирки, проводили центрифугирование 5 минуты при 14000 об./мин., затем надосадочную жидкость отбрасывали и заливали ацетоном для дополнительного обезжиривания. Полученную белковую смесь настаивали в течение суток, затем велось повторное центрифугирование. Надосадочная жидкость удалялась, остатки ацетона промакивались с помощью фильтровальной бумаги. После проведения этапов обезжиривания измельченную смесь каждого семени заливали экстрагирующим белки раствором. Содержимое пробирки перемешивалось и после настаивания в течение 0,5 час. центрифугировалось. Полученную надосадочную жидкость затем наносили в стартовые ячейки геля для выявления полипептидных фракций с помощью электрофореза в кислой среде. После выгонки двух меток пиронина G электрофорез прекращали, проводили окрашивание белков в геле в течение 12 часов в

красителе на основе кумаси бриллиантового голубого R250. После этого гели отмывали водопроводной водой в течение суток.

Электрофорез белков отдельных семян сорта *Дега* и *Кристалл* показал, что они гетерогенны по вариантам, обозначенным нами CON A и CON B. Учитывая, что белый люпин и люпин узколистный являются, самоопылителями данные сорта представляют собой самоопыляющуюся популяцию $F_{\rightarrow\infty}$. В этих популяции встретилось четыре сочетания (CON: A1 B1, A2 B1, A1 B2, A2 B2) вариантов данных белков, с разной частотой для каждого сорта в отдельности. У обоих видов наблюдается сходство в распределении компонентов полипептидов на электрофоретических спектрах. Отличительными особенностями люпина белого является насыщенность электрофоретических спектров полипептидами, наличие вариантов белков из сочетаний (CON A1 B2) встречалось наиболее часто. Остальные имели существенно более низкую встречаемость. Диспропорция во встречаемости обнаруженных сочетаний вариантов белков может быть вызвана с одной стороны сцеплением локусов, контролирующих их синтез, с другой – разным коэффициентом размножения выявленных генотипов.

Методом электрофореза в полиакриламидном геле изучена изменчивость и специфичность по полипептидным спектрам семян в популяциях близкородственных видов рода *Lupinus* (сем. Бобовые): л. белого и л. узколистного.

Таким образом, в настоящей работе освоен метод генетического анализа разных сортов люпина с помощью электрофореза; был выявлен полиморфизм по вариантам белков семян на 2 сортах люпина узколистного и белого. Установлено, что полиморфизм белков семян белого и узколистного люпина и различия в частотах встречаемости обнаруженных у них вариантов сорта *Дега*, *Кристалл*, связаны с аллелями двух сцеплено наследуемых локусов. Планируется продолжить работу с включением новых видов и сортов люпина.

КОДУХОВА Ю.В.

Институт биологии внутренних вод им. И.Д.Папанова РАН, пос. Борок, Россия

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПРИРОДНЫХ ГИБРИДОВ ЛЕЩА *ABRAMIS BRAMA* (L.) И ПЛОТВЫ *RUTILUS RUTILUS* (L.) В РЫБИНСКОМ ВОДОХРАНИЛИЩЕ

Явление отдаленной гибридизации широко распространено среди рыб. Причинами гибридизации часто называют естественные и антропогенные изменения окружающей среды. Появление гибридных особей в водоемах и их количество служит одним из показателей экологического состояния экосистем, сигналом о нарушениях в воспроизводстве родительских видов рыб. В связи с этим все более актуальным становится диагностика гибридов.

Нами проведено исследование 104 гибридных особей леща (*Abramis brama* L.) и плотвы (*Rutilus rutilus* L.), самого распространенного гибрида в акватории Рыбинского водохранилища. Подборка признаков для диагностики гибридов проводилась на искусственно полученных реципрокных гибридных особях, также с использованием выборок леща и плотвы (все выборки по 50 экз.).

Распознавание с достаточно большой точностью искусственно полученных гибридов и родительских видов возможно при комплексном анализе меристических и пластических признаков с применением многомерного анализа (в пространстве главных компонент можно выделить три области с различной степенью перекрытия). Однако достоверно установить комбинацию прошедшего скрещивания невозможно.

Опираясь на данные, полученные при изучении искусственных гибридов, была проведена идентификация гибридов из естественных условий. При этом применяли признаки со стабильным характером наследования, низкой изменчивостью и вносящих наибольший вклад при идентификации искусственных гибридов. В итоге были использованы следующие меристические признаки: разветвленные лучи в спинном (Db) и анальном (Ab) плавниках, число жаберных тычинок на 1-й жаберной дуге ($sp.br.$), число позвонков в хвостовом (Vc) отделе, общее число позвонков ($Vert$), число отверстий в канале $parietale$ (CST_{par}), число чешуй в боковой линии ($l.l.$), число рядов чешуй над (S_D) и под (S_A) боковой линией. Также в анализ были включены пластические признаки, выраженные в процентах длины тела (l): длина головы (c), длина основания анального

плавника (lA), длина основания спинного плавника (lD), антеанальное расстояние (aA), постанальное расстояние (pA), антедорсальное расстояние (aD), наибольшая высота тела (H), наименьшая высота тела (h).

При первичном определении природных гибридов леща и плотвы в первую очередь следует обратить внимание на пропорции тела рыбы.

Окраска тела серебристо-серая или серо-коричневая, иногда с золотистым отливом (в основном у особей старше пяти лет).

Радужная оболочка глаз в верхней части с оранжевым пигментом различной насыщенности, нижняя половина – беловатая.

Чешуя крупная.

Число чешуй в боковой линии ($l.l.$) 44 – 54.

Число рядов чешуй над (S_D) боковой линией 8 – 12.

Число рядов чешуй под (S_A) боковой линией 4 – 7.

Спинной плавник III 8 – 10. Присутствует красный пигмент различной насыщенности.

Анальный плавник III 14 – 24. Начало основания анального плавника располагается за основанием спинного плавника или на одной оси с последним ветвистым лучом спинного плавника. У молоди плавник бледно оранжевый или почти бесцветный, прозрачный. У взрослых гибридов несколько вариантов окраски: *а.* плавник от светлого до темного серого цвета, иногда с небольшим красноватым пятном в передней его части; *б.* у некоторых особей наблюдается черная окантовка наружного края по всей длине бледно оранжевого плавника; *в.* бледно-оранжевый плавник.

Хвостовой плавник. Присутствует красный пигмент различной степени насыщенности.

Грудные плавники I 15. Присутствует красный пигмент различной насыщенности.

Брюшные плавники I 8. Присутствует красный пигмент различной насыщенности.

Рот конечный или полунижний.

«*Киль*» неярко выраженный позади брюшных плавников или отсутствует.

Число жаберных тычинок на 1-й жаберной дуге ($sp.br.$) 13 – 24.

Число позвонков в хвостовом отделе (Vc) 14 – 19.

Общее число позвонков ($Vert$) 39 – 44.

Глоточные зубы однорядные (6-5 или 5-5, реже 5-6), редко двурядные (1.5-5.0, 1.5-5.1).

Работа выполнена в рамках проекта МК-1793.2011.4 Совета по грантам Президента РФ для государственной поддержки молодых российских ученых.

КОЖУРО Ю.И., СЕМЕНЧИК Е.А., МАКСИМОВА Н.П.

Белорусский государственный университет, Минск, Белоруссия

СОРТОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ СТРЕСС-РЕАКЦИИ РАСТЕНИЙ ЯЧМЕНЯ, ВЫЗЫВАЕМОЙ ВОЗБУДИТЕЛЕМ КОРНЕВОЙ ГНИЛИ ИЗ РОДА *FUSARIUM*

Полученные к настоящему времени данные показывают, что устойчивость растительных организмов к разнообразным воздействиям во многом определяется состоянием их окислительно-восстановительной системы. Например, известно, что более устойчивые формы растений обладают более высоким содержанием антиоксидантных ферментов. Замечательным свойством растений является их способность к индукции активности антиоксидативного комплекса. В некоторых случаях в результате такой индукции растения приобретают устойчивость не только к действующему агенту, но к другим стрессовым факторам. Имеются данные, что активные формы кислорода являются триггерными молекулами, которые регулируют активность ферментов и вызывают изменения в экспрессии генов. Изучение этих процессов может дать важную информацию об адаптивных реакциях растительных клеток, а установление конкретных характеристик антиоксидантной системы у различных видов и сортов растений даст возможность ближе подойти к расшифровке механизмов многих физиологических процессов.

Целью работы являлось выяснение особенностей ответной реакции растений ячменя *Hordeum vulgare* L. сортов белорусской селекции «Гонар», «Дзівосны» и «Сталы» при воздействии возбудителя корневой гнили из рода *Fusarium*. Изолят *Fusarium sp.* был выделен из инфицированных сортообразцов ячменя Минского района Республики Белоруссия и отобран по результатам теста на гиперчувствительность. Оценивали реакцию антиоксидантной системы растений по изменению пероксидазной активности, внутриклеточному содержанию восстановленной формы глутатиона и уровню малонового

диальдегида (МДА) в клетках первичных корешков проростков обработанных пятисуточным 25 % фильтратом культуральной жидкости (ФКЖ) изолята патогена. Для оценки общей фитотоксичности выделенного штамма *Fusarium sp.* в отношении изучаемых сортов был проведен анализ изменения морфометрических показателей корневой системы растений.

Проростки ячменя сортов «Гонар» и «Дзивосны» проявили чувствительность к использованному в работе штамму *Fusarium sp.* В присутствии ФКЖ данного патогена у трех- и четырехдневных растений этих сортов наблюдалось замедление роста корневой системы в 1,4-2,0 раза соответственно ($p < 0,001$). Динамика роста корневой системы ячменя сорта «Сталы» в присутствии ФКЖ патогена не изменилась, что свидетельствует об устойчивости данных растений к использованному штамму *Fusarium sp.*

Показано, что у трех- и четырехсуточных растений ячменя сортов «Гонар» и «Дзивосны» после обработки ФКЖ изолята происходило увеличение активности ферментов пероксидазного комплекса в 1,4-1,7 и 1,9-2,0 раза соответственно ($p < 0,05$). Отмечено также увеличение в 1,5-1,7 раза ($p < 0,05$) уровня МДА у трех- и четырехсуточных растений данных сортов при воздействии патогена. В условиях индуцированного возбудителем корневой гнили стресса у проростков ячменя сортов «Гонар» и «Дзивосны» значительного изменения уровня восстановленной формы глутатиона не наблюдалось. Однако, обработка ФКЖ изолята патогена вызывала увеличение содержания восстановленной формы глутатиона в 1,3-1,4 раза у трех- и четырехсуточных растений сорта «Сталы» ($p < 0,05$). Кроме того, следует отметить, что концентрация восстановленной формы глутатиона у изученных сортов варьировала в значительной степени: у растений сорта «Сталы» более чем в 3 раза превышала таковой показатель для сорта «Гонар», и в 1,5-3 раза – сорта «Дзивосны».

Таким образом, особенности реакции антиоксидантной системы растений ячменя сорта «Сталы» свидетельствуют об их меньшей чувствительности к использованному в работе возбудителю корневой гнили из рода *Fusarium*. Это доказывается отсутствием индукции пероксидазной активности и изменения уровня перекисного окисления липидов, а также более высоким внутриклеточным содержанием восстановленной формы глутатиона в клетках корней проростков обработанных ФКЖ патогена.

Растения сорта «Сталы» могут быть рекомендованы как исходный селекционный материал для получения устойчивых к действию возбудителей корневой гнили из рода *Fusarium* форм ячменя. Установленные особенности ответной реакции растений могут быть использованы в селекционном процессе для отбора форм устойчивых к действию биотических стрессовых факторов.

КОЗЛОВ Д.Г.¹, МАЛАНИЧЕВА И.А.¹, ЕФИМЕНКО Т.А.¹, ЗЕНКОВА В.А.¹,
КАТРУХА Г.С.¹, РЕЗНИКОВА М.И.¹, БОРЩЕВСКАЯ Л.Н.², ТАРАСОВА О.Д.²,
СИНЕОКИЙ С.П.², ЕФРЕМЕНКОВА О.В.¹

¹ Учреждение РАМН Институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе РАМН,
Москва, Россия

² ФГУП Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции
промышленных микроорганизмов, Москва, Россия

НОВЫЕ АНТИБИОТИКИ, ОБРАЗУЕМЫЕ ШТАММАМИ *BACILLUS SUBTILIS*

В последнее время в медицине все острее встает проблема неэффективности антибиотиков из-за лекарственной устойчивости микроорганизмов – возбудителей заболеваний. При изыскании продуцентов новых антибиотиков нами исследуются не только представители редких и малоизученных видов – потенциальных продуцентов новых биологически активных веществ, но и представители широко распространенных видов, выделенных из нетрадиционных экологических ниш. К числу таких источников выделяемых штаммов бактерий относятся плодовые тела высших грибов.

Из плодового тела базидиомицетного гриба чешуйчатки обыкновенной (*Pholiota squarrosa*) выделены два штамма бактерий, обладающих широким спектром антибактериальной активности, в том числе в отношении устойчивых к антибиотикам штаммов метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus* ИНА 00761 (MRSA) и устойчивого к гликопептидным антибиотикам штамма *Leuconostoc mesenteroides* ВКПМ В-4177, а также противогрибковой активностью. Была установлена принадлежность выделенных штаммов бактерий к виду *Bacillus subtilis* на основании физиолого-

морфологических признаков и ПЦР-амплификации гена 16S рРНК с последующим секвенированием. Оба штамма, 3316 и 3952, образуют незначительные количества полиеновых антибиотиков – гексаена и пентаена, соответственно. Кроме того, штамм 3952 образует циклический полипептидный антибиотик, содержащий аминокислоты Asp, Gly, Leu, Pro, Tyr, Thr, Trp, Phe, а антибиотик штамма 3316 отличается наличием помимо перечисленных аминокислот двух дополнительных неидентифицированных небелковых аминокислот. Оба полипептидных антибиотика являются новыми природными антибиотиками, эффективными в отношении грамположительных бактерий и преодолевающими лекарственную устойчивость бактерий.

КОЗЛОВ Е.Н.

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

ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ БЕЛКОВ КАПСИДА ВИРУСА BgDNV

Денсовирус рыжего таракана *Blattella Germanica* (BgVNV) был впервые обнаружен в 2000 г. Д.В. Муха и К. Шалом. Данный вирус может представлять большую практическую ценность, так как вирусы денсонуклеоза поражают ценные хозяйственные виды, а так же синантропных паразитов. На данный момент геном вируса, цитопатологические эффекты и стратегия экспрессии изучены достаточно хорошо. Однако вопросы развития инфекции, перемещение вириона, структурных и неструктурных белков в клетках хозяина до конца не выяснены. Целью нашей работы было выяснение внутриклеточной локализации белков капсида BgVNV и предложение возможного механизма миграции вновь синтезированных вирусных частиц.

Белки капсида данного вируса синтезируются с двух мРНК: белки VP1 и VP3 транслируются с двух последовательных AUG- кодонов сплайсированной РНК. Белок VP2 транслируется с несплайсированной РНК, стартовый кодон находится в месте, которое вырезается при сплайсинге. Таким образом, данные белки имеют общий С- конец и уникальные N- концы. По этой причине для выяснения локализации белки экспрессировались в гетерогенной системе (линия клеток Hela). Вектор, используемый для

трансфекции, имеет в своем составе последовательность белка GFP, который образует слитый белок с N- концевой частью целевого белка. Препараты клеток окрашивались антителами к GFP и исследовались с помощью конфокальной микроскопии.

Было установлено, что белки VP1 и VP3 локализуются только в ядре, белок VP2 находился и в ядре, и в цитоплазме. С помощью биоинформатического анализа мы выяснили, что в аминокислотной последовательности всех трех белков присутствуют сигналы ядерной локализации в общей C- концевой части. В белке VP2, кроме того, имеется сигнал выхода из ядра (NES), который кодируется участком РНК, вырезаемым при сплайсинге.

На основании полученных результатов можно сделать предположение о возможном механизме внутриклеточного трафика вирусных частиц. Белки капсида синтезируются в цитоплазме и с помощью имеющихся у них NLS проникают в ядро, где происходит упаковка вирусных частиц. Затем NES белка VP2 взаимодействует с ядерным поровым комплексом и покидают ядро, не разрушая его. Таким способом обеспечивается более долгое функционирование клетки- хозяина и продуцируется большее количество вирионов. Возможно, с этим связана высокая смертность зараженных организмов. Предложенный механизм требует дальнейшей тщательной экспериментальной проверки, которая планируется в ходе последующей работы с вирусом VgDNV.

КОЗЯЕВА В.В., ДЗЮБА М.В.

ФГУБН Центр «Биоинженерия» РАН, Москва

ФГУБН Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Москва

ИЗУЧЕНИЕ РАЗНООБРАЗИЯ МАГНИТОТАКТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ РЕКИ АКСАЙ-КУРМОЯРСКИЙ И ОЗЕРА СЕЛИГЕР МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЭКОЛОГИИ

Одной из актуальных задач современной экологии микроорганизмов является изучение магнитотактических бактерий. Магнитотактические бактерии (МТБ) – группа водных микроорганизмов, способных ориентироваться вдоль линий магнитного поля Земли. Магнитная ориентация объясняется наличием магнетосом – внутриклеточных

кристаллов, состоящих из магнетита (Fe_3O_4) или грейгита (Fe_3S_4). В различных местах обитания были идентифицированы разнообразные морфологические типы магнитотактических бактерий: кокки, спириллы, вибрионы, палочкообразные бактерии. Несмотря на то, что в большинстве сообществ преобладают магнитотактические кокки, эта группа микроорганизмов является слабоизученной. В настоящее время в чистую культуру выделены всего три штамма магнитотактических кокков: MC-1, MO-1 и SS-1. Тем не менее благодаря способности к магнитотаксису МТБ могут быть легко сепарированы с помощью магнита из природных образцов ила и изучены методами молекулярной экологии, одним из инструментов которой является анализ последовательностей генов 16S рРНК.

В настоящей работе представлены результаты исследования видового состава магнитобактерий в пробах воды и ила, взятых из оз. Селигер (Тверская обл.) и реки Аксай-Курмоярский (Волгоградская обл.). Из воды и ила прибрежной зоны сформировали микрокосмы, которые хранили при комнатной температуре. С помощью магнита была получена фракция МТБ, из которых затем была выделена суммарная геномная ДНК. С помощью системы универсальных праймеров получили суммарный амплификат генов 16S рРНК, который клонировали, затем секвенировали. Размер клонотек составил не менее 50 клонов. Полученные последовательности были использованы для филогенетического анализа. В результате было показано что 84% последовательностей генов 16S рРНК исследованных клонов микрокосма «Аксай –Курмоярский» и 52% последовательностей генов 16S рРНК исследованных клонов микрокосма «Селигер» принадлежат магнитотактическим коккам. Все остальные последовательности близки к таким родам как *Rickettsia*, *Limnobacter*, *Galionella*, *Polynucleobacter*, *Trachelomonas*, *Ideonella*, *Acidovorax*, *Cloroflexi*, которые являются типичными представителями водных экосистем. На основе филогенетического анализа выявлено 3 флотипа магнитотактических кокков микрокосма «Аксай-Курмоярский» и 2 флотипа магнитотактических кокков микрокосма «Селигер». Сходство последовательностей генов 16S рРНК представителей этих флотипов и культивируемых кокков, последовательности которых были взяты из международной базы данных GenBank, составляет 90%. При помощи сервиса Classifier RDP (Ribosome Database Project) полученные последовательности были отнесены к неклассифицированным *Proteobacteria* (с пороговым значением сходства 95%). Тем не

менее относительная близость к культивируемым коккам, которые принадлежат классу *Alfaproteobacteria*, позволяет отнести исследуемую группу к этому же классу. Полученные результаты свидетельствуют о большом филогенетическом разнообразии магнитотактических кокков в пресных водоемах, которое нуждается в дальнейших исследованиях.

КОКШАРОВА О.А., ВАСЕТЕНКОВ А.Е.

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

ЭВОЛЮЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ ДЕЛЕНИЯ ЦИАНОБАКТЕРИЙ

Цианобактерии – это фотоавтотрофные бактерии, которые содержат хлорофилл *a* и осуществляют фотосинтез сходным образом с высшими растениями. Цианобактерии представляют собой значительный, но еще малоиспользуемый, ресурс для получения огромного количества различных веществ. Помимо того факта, что цианобактерии являются удобными модельными организмами для фундаментальных исследований молекулярных механизмов фотосинтеза; механизмов устойчивости к стрессовым факторам окружающей среды; клеточной дифференцировки и фиксации атмосферного азота; метаболизма углерода и водорода; клеточного деления, молекулярной эволюции, все яснее становится необходимость разработки прикладных проектов с использованием этих древнейших микроорганизмов. Наличие эффективных генетических методов позволяет найти применение цианобактериям в биотехнологии для производства специфических продуктов, включая фотосинтетические пигменты, молекулярный водород и наночастицы; для биodeградации органических загрязнений на поверхности вод и для решения многих других практических задач. Изучение генетического контроля клеточного деления цианобактерий может помочь при исследовании молекулярных механизмов деления растительных пластид, их эволюции, а также эволюции эукариотической клетки. Знание механизмов и регуляции клеточного деления цианобактерий важно для экологических и биотехнологических аспектов использования этих фотоавтотрофов. Анализ цианобактериальных мутантов лежит в основе стратегии изучения генетики клеточного деления. Высокоэффективный

транспозонный мутагенез позволяет идентифицировать новые гены, вовлеченные в процесс клеточного деления. Доступность информации о полных геномных последовательностях многих цианобактерий, бактерий, некоторых растений и водорослей способствует проведению сравнительного геномного анализа. Сравнительный геномный анализ позволил установить, что некоторые цианобактериальные гены, вовлеченные в контроль клеточного деления, имеют гомологов среди цианобактерий, зеленых водорослей и высших растений, другие гены специфичны только для цианобактерий, третьи имеются только у бактерий. Для изучения деления цианобактериальной клетки могут быть применены методы молекулярной генетики и сравнительной геномики. Использование транспозонного мутагенеза позволило выявить новые важные гены, *fin2* и *fin6*, ответственные за ключевые этапы клеточного деления цианобактериальной клетки (Koksharova O.A., Wolk S.P., 2002). Ген *fin2* кодирует белок, состоящий из 631 аминокислоты и имеет наибольшее сходство с предсказанными продуктами других цианобактерий и растений, тогда как ген *fin6* кодирует 152-аминокислотный белок, специфичный только для цианобактерий. Растительный ортолог Ftn2 в *Arabidopsis*, Arc6, имеет хлоропластный транзитный пептид (и его роль в делении хлоропластов была впоследствии показана (Vitha et al., 2003)). Использование сравнительной геномики позволило обнаружить некоторые новые общие цианобактериальные и пластидные гены, вовлеченные в деление. Пластиды произошли от цианобактериального симбионта свыше 1.2 миллиарда лет назад. В течение установления эндосимбиотических отношений большинство генов было потеряно цианобактериальным геномом и многие из них получили новое место локализации в ядерном геноме посредством эндосимбиотического генного переноса. Среди них были обнаружены некоторые гены/белки, отвечающие за деление хлоропластов: Arc6; ARTEMIS и GC1 (также называемый AtSulA), белки pтCpn60 α и pтCpn60 β . Более глубокому пониманию молекулярной биологии цианобактериального клеточного деления будет способствовать комплексный подход, включающий в себя сочетание методов генетики, биохимии, геномики, транскриптомики и протеомики.

Работа поддержана Российским Фондом Фундаментальных Исследований (грант 11-04-00774).

КОЛАЧЕВСКАЯ О.О.¹, АЛЕКСЕЕВА В.В.², ЛОМИН С.Н.¹, СЕРГЕЕВА Л.И.¹,
БУРЬЯНОВ Я.И.², РОМАНОВ Г.А.¹

¹ *Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия*

² *Филиал Института биоорганической химии РАН, Пущино, Россия*

ИЗУЧЕНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК КЛУБНЕОБРАЗОВАНИЯ У ТРАНСФОРМАНТОВ КАРТОФЕЛЯ С ИЗМЕНЕННЫМ ГОРМОНАЛЬНЫМ СТАТУСОМ

Картофель относится к наиболее важным пищевым культурам, в связи с чем актуальными направлениями его исследований являются повышение урожайности и устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды. В рамках проекта по исследованию роли фитогормонов в регуляции конкурентных отношений акцепторных органов мы создаем новые формы трансгенного картофеля с измененным гормональным статусом для изучения возникающих в результате изменений в ходе развития растений, в первую очередь формирования и роста клубней. Результаты предшествующих работ нашей лаборатории (Romanov et al., 2000; Аксенова и др., 2000) показали, что такие гормоны, как ауксины, цитокинины, гиббереллины, влияют на процесс клубнеобразования.

Для создания растений картофеля с измененным гормональным статусом проводили агробактериальную трансформацию культивируемых *in vitro* 2-месячных растений сорта Дезире целевыми генами под контролем клубнеспецифичного промотора гена пататина В33, что обеспечивало экспрессию встроенного гена главным образом в клубне. Для получения растений с повышенным содержанием ауксинов растения трансформировали с помощью плазмиды с конструкцией гена *tms1* биосинтеза ауксина под контролем В33-промотора (*В33::tms1*). Трансформацию листьев проводили по методу Прат (инкубация с бактериями в жидкой среде). После 48 ч инкубации в темноте экспланты переносили на среду MS с 5 мг/л НУК и 0.1 мг/л БАП и далее культивировали на длинном дне при 26°C, пересаживая каждые 10-14 дней на свежие среды с антибиотиками канамицином (50 мг/л) и цефотаксимом (250 мг/л). Через 2.5 недели после трансформации на листовых эксплантах отмечали развитие каллуса, а через месяц на ряде каллусов появились побеги. Через 7 недель после трансформации каллусы с побегами пересаживали на среду для укоренения (без гормонов), но с антибиотиками. Через 10

недель после трансформации ряд регенерировавших побегов дал корни. Полученные линии были проверены методом ПЦР на наличие целевого гена с промотором В33.

Для исследований отобраны 2 линии, имеющие фенотипические отличия от контрольных: линия А1-2 с корнями «ауксиновой» формы (утолщённые, особенно на концах, и относительно короткие), и линия А4-15 с нарушением апикального доминирования побега. В опытах по изучению способности к клубнеобразованию (5% сахарозы в среде культивирования) в темноте обе линии формировали первые клубни на неделю раньше контроля, а при выращивании на свету у 25% растений линии А1-2, в отличие от контроля, вначале образовывались пазушные клубни, в дальнейшем израстающие в побеги. Выращивание на агаризованных средах с различным содержанием сахарозы (1, 3, 5 или 8%) показало, что трансформированные растения по сравнению с контрольными способны формировать клубни раньше и при более низком содержании сахарозы, а количество образованных клубней через 8 недель от начала культивирования превосходило контроль в среднем в 2-3 раза. Наиболее ярко эти отличия проявлялись в условиях длинного дня, тогда как в темноте и на коротком дне преимущества трансформированных растений проявлялись, в основном, в массе, но не в числе клубней. Содержание свободной ИУК, определенное методом ЖХВД-МС/МС, было выше в 1.5 раза в клубнях трансформантов по сравнению с контролем, тогда как по содержанию АБК существенных различий не обнаружено. Полученные результаты показывают новые возможности применения ауксин-синтезирующих генов при их тканеспецифичной экспрессии для повышения урожайности картофеля.

По этой же методике растения картофеля были трансформированы плазмидами с конструкциями, повышающими (pK7WG-B33:gIPT3) или понижающими (pK7WG-B33:gCKX1) содержание цитокининов; а также повышающими (pK7WG-B33:gGA3ox3 и pK7WG-B33:gGA20ox1) или понижающими (pK7WG-B33:gGA2ox1) содержание гиббереллинов в клубнях. Полученные линии проверены методом ПЦР на наличие целевого гена с промотором В33, и в настоящее время включены в цикл физиологических и биохимических исследований.

Работа выполняется при поддержке Программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и Российским фондом фундаментальных исследований (грант №10-04-00638).

КОЛЕСНИКОВА И.С, БАЖЕНОВА Б.А, БАДМАЕВА Т.М.

Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления,

Улан-Удэ, Россия

ОРГАНОЛЕПТИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ВЕТЧИНЫ С ЛАМИФАРЭНОМ

В настоящее время наблюдается дефицит витаминов, макро- и микроэлементов в питании человека особенно в экологически неблагоприятных регионах, таких как Дальний Восток, Забайкальский край, Республика Бурятия и Якутия. Одним из путей решения вопроса дефицита микроэлементов является создание обогащенных мясопродуктов. При совершенствовании технологии мясных изделий важно не только расширить ассортимент и обеспечить максимальную выработку продукта с каждой тонны перерабатываемого сырья, но и повысить пищевую ценность и товарные показатели продукции. Для увеличения объемов колбасного производства, повышения и стабилизации качества продукта, а также рационального использования основного сырья применяют добавки растительного и животного происхождения.

Одним из перспективных видов растительной добавки является натуральный пищевой продукт «Ламифарэн», предназначенный для диетического, лечебного и профилактического питания. В нем содержится большое количество йода, селена, витаминов А, С, В₁, В₂, В₁₂, Д, полисахаридов. Пищевой гель «Ламифарэн» способствует нормализации обмена веществ и профилактике заболеваний (заболевания щитовидной железы, йоддефицитные состояния, ишемическая болезнь сердца, заболевания желудочно-кишечного тракта и др.).

Пищевая ценность компонентов мясопродуктов определяется содержанием легкоусвояемых белков, их сбалансированностью и химическим составом. Для повышения питательной ценности мясопродуктов и создания хорошей структуры с нежной консистенцией широко применяют различные комбинированные белковые системы, использование которых является перспективным. Белковые добавки обладают высокой степенью растворимости в водной фазе фарша, а также эмульгирующими и желеобразующими свойствами, влагосвязывающей, водо- и жиродерживающей способностями, способствуют увеличению объема выработки продукции. Многими исследователями доказана перспективность использования белковых систем в виде эмульсий и суспензий.

Целью работы явился анализ органолептических показателей ветчинного продукта из свинины с добавлением ламифарэна в составе белково-жировой эмульсии (БЖЭ).

Количество «Ламифарэна» в составе БЖЭ обосновали оптимальным соотношением в эмульсии белка к жиру и воде, затем выработали ветчинный фарш с добавлением 5, 10, 15, 20 % опытной и контрольной вариантов БЖЭ и изучали органолептические показатели готового продукта.

Результаты эксперимента показали, что использование белково-жировой эмульсии с ламифарэном в количестве до 15 % в рецептуре ветчинного фарша положительно влияет на органолептические показатели продукта: улучшаются внешний вид, консистенция, сочность из-за повышения водоудерживающей способности мясной системы и улучшения процесса структурообразования. Белково-жировая эмульсия за счет предварительного эмульгирования жировой составляющей и гидратации соевого белка способствует упругости, консистенции и сочности ветчины.

Однако, органолептический анализ показал, что введение белково-жировой суспензии в количестве более 20 % снижает цветовые и вкусовые характеристики, поэтому оптимальной дозой введения белково-жировой суспензии выбрана доза 15 %.

На следующем этапе были выработаны образцы ветчины с введением 15 % контрольной и опытной с ламифарэном белково-жировой эмульсии и исследованы качественные показатели готовых продуктов.

Данные показывают, что консистенция ветчины упругая, плотная, вкус и аромат без постороннего привкуса и запаха, батоны без бульонно-жировых отеков. Ветчина розового цвета, без серых пятен, пустот, кусочки мышечной ткани неопределенной формы с включениями соединительной ткани, прослоек межмышечного жира белого цвета. Опытные образцы ветчины на разрезе имеют мелкие и редкие вкрапления ламифарэна, что не сказывается на общем внешнем виде продукта.

Анализ химического состава выявил, что использование ламифарэна в опытных образцах ветчины повышает содержание селена до 8 мкг %, а содержание йода после тепловой обработки составило 44,5 мкг %.

Таким образом, органолептический анализ качества ветчины, обогащенной «Ламифарэном» показал, что оптимальной дозой внесения белково-жировой эмульсии является 15%. Такое количество белково-жировой эмульсии с ламифарэном позволяет

сохранить высокие органолептические показатели и обогатить готовый продукт микро- и макроэлементами.

КОЛЕСНИКОВА М.В., БЕЗЛЕР Н.В.

*ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свёклы
имени А.Л. Мазлумова Россельхозакадемии, Рамонь, Россия*

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МИКРОМИЦЕТА-ЦЕЛЛЮЛОЗОЛИТИКА С ПОЧВЕННОЙ МИКРОФЛОРОЙ ПРИ РАЗЛОЖЕНИИ СОЛОМЫ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ

Целлюлозоразрушающие микромицеты почв, как один из элементов биоценоза, выполняют важную роль в трансформации соломы зерновых культур, что создает условия для поступления большого количества углерода в почву и способствует активизации синтеза гумуса, накоплению элементов питания, повышению плодородия.

В лаборатории эколого-микробиологических исследований почвы ВНИИСС выделили из чернозема выщелоченного аборигенный штамм микромицета-целлюлозолитика (которому был присвоен индекс 0). С его помощью установили режим разложения соломы озимой пшеницы. Опыты заложили в моделируемых условиях. Микромицет использовали исходя из нагрузки на единицу субстрата эквивалентной естественной численности целлюлозолитиков в почвах, в дозе 43 шт. спор в 1 мл, увеличивая её до 430 и 4300.

Результаты 30-дневной экспозиции показали, что солома с естественным полевым содержанием зачатков микроорганизмов при увлажнении до 60 % от полной влагоёмкости субстрата практически не подвергается деструкции (2 % разложившегося сухого вещества). Добавление к субстрату минерального азота (50 мг д.в./5 г соломы) способствовало ускорению разложения соломы, что выразилось в снижении её массы на 18 % от начальной. При использовании микромицета в дозе 4300 шт. спор в 1 мл совместно с азотом (50 мг д.в./5 г, что соответствует 40 кг/га) и питательной добавкой (1:1000) скорость разложения соломы увеличилась на 50 %.

При разложении соломы озимой пшеницы образуются вещества фенольной природы, которые, накапливаясь в почве, оказывают токсическое действие, что приводит к

угнетению роста сельскохозяйственных культур и снижению их продуктивности. Поэтому было необходимо определить фитотоксичность полученного субстрата.

Результаты исследований показали, что в контроле, в качестве которого мы использовали фильтровальную бумагу, смоченную дистиллированной водой, процент проросших семян составил 96,7 %. После компостирования соломы без компонентов количество проросших семян сократилось на 10 %. Использование микромицета-целлюлозолитика, питательной добавки и азота способствовало повышению всхожести семян до 93,3 %, что выше на 6,6 %, чем непосредственно на соломе.

Результаты лабораторного опыта подтвердили многочисленные данные о токсическом действии соломы: длина корешка тест-культуры сократилась в 2,5 раза и составила 8,9 см. При максимальной степени разложения соломы под воздействием микромицета-целлюлозолитика (4300 шт. спор в 1 мл), азота и питательной добавки токсическое действие снижалось, длина корешка увеличилась до 15,8 см, то есть в 1,8 раза. Это свидетельствует о том, что микромицет-целлюлозолитик не только не оказывает отрицательного действия на тест-культуру, но даже снижает токсичность субстрата.

Наблюдения за изменениями, происходящими в микробном сообществе чернозёма выщелоченного, показали, что при заашке соломы озимой пшеницы (4т/га) совместно с азотом (40 кг д.в./га), микромицетом-целлюлозолитиком 0 и питательной добавкой прослеживается образование микробных ассоциаций на основе различных видов взаимодействий, и как следствие этого повышение численности агрономически полезной микрофлоры почвы. Так, численность микроорганизмов, принимающих участие в синтезе гумуса (зимогенная микрофлора), превысила контроль (без органических и минеральных удобрений) в 2,5 раза. Наличие синтрофии между целлюлозолитиками и азотфиксаторами (дiazотрофами) привело к повышению численности последних в почве. За счёт их бинарного консорциума, внесение микромицета совместно с минеральным азотом и питательной добавкой стимулировало развитие diaзотрофов на протяжении всего периода вегетации: в мае их численность повысилась на 0,8 млн. КОЕ, или на 66,7 %, в середине вегетационного периода в 8 раз, а к концу – была выше контроля на 0,4 млн. КОЕ в 1 г абсолютно сухой почвы, или на 40,0 %.

В результате увеличения численности diaзотрофов, повысилось содержание щелочногидролизуемого азота в почве в течение всего вегетационного периода: в мае на 2,6 мг на 1 кг почвы, в июле – на 2,0 мг/кг, а в сентябре – на 5,0 мг/кг.

Установлено положительное воздействие микромицета-целлюлозолитика на развитие фосфобактерий, численность которых увеличилась в среднем в 7 раз.

Таким образом, использование микромицета-целлюлозолитика для разложения соответствующих субстратов в почве способствует увеличению численности микроорганизмов, участвующих в формировании эффективного и потенциального плодородия, а также поддержанию экологических функций почв.

КОЛЕСНИКОВА Н.Н., КОРОЛЕВА А.В., ЛУКАНИНА Ю.К.,
ПАНТЮХОВ П.В., ПОПОВ А.А., ХВАТОВ А.В.
Институт биохимической физики РАН, Москва, Россия

БИОРАЗРУШАЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИЭТИЛЕНА С ДРЕВЕСНОЙ МУКОЙ

В настоящее время актуальной экологической задачей является создание композиций хорошо освоенных крупнотоннажных промышленных полимеров с природными биоразлагаемыми добавками с целью решения проблемы «полимерного мусора». В то же время на предприятиях деревообрабатывающей промышленности ежегодно образуется значительное количество отходов, и рациональное их использование приобретает большое значение. Одним из возможных выгодных использований отходов деревообработки при низких капитальных затратах может быть создание композиционных материалов со специальными свойствами.

В данной работе исследовали возможность применения измельченных древесных отходов (древесной муки) в качестве добавки к полиэтилену низкой плотности для создания биоразлагаемой композиции.

Объектами исследования были пленочные образцы чистого полиэтилена (ПЭ), а также композиции ПЭ с 40 мас. % древесной муки (ДМ) - ПЭ/ДМ (60/40) и с 40 мас. % древесной муки и 5 мас. % стеарата цинка в качестве компатибилизатора, увеличивающего

совместимость компонентов смеси, ПЭ/ДМ/Ст (55/40/5). Размер частиц фракции просеянной древесной муки составлял < 200 мкм. Проведено исследование водопоглощения, воздействия микромицетов и почвенной микробиоты на изучаемые смесевые композиции.

Вода является необходимым компонентом для поддержания жизнедеятельности микроорганизмов и одним из метаболитов процесса. Кроме того, проникая через поверхностные слои материала и диффундируя вглубь, вода может вызывать как пластифицирующее, так и расклинивающее действие (эффект Ребиндера). ПЭ практически не поглощает воду, тогда как при добавлении к нему древесной муки происходит значительное поглощение воды образцом. Введение компатибилизатора – стеарата цинка, способствующее более равномерному распределению частиц наполнителя в полимерной матрице, приводит к дальнейшему росту этого показателя.

Исследования обрастания материалов плесневыми грибами проводились согласно ГОСТ 9.049-91. Метод заключается в помещении пленочных образцов материалов во влажную камеру и заражении их водной суспензией спор грибов. Использовали суспензии в воде четырех видов грибов: *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Trichoderma viride* и *Chaetomium globosum*.

Оценка биоразлагаемости материала по степени роста и развития плесневых грибов проводилась согласно ГОСТ 9.048-91 в баллах по пятибалльной шкале на 28 суток. Образцы изучались с помощью оптического микроскопа при увеличении 1000х. Полученные в ходе эксперимента данные характеризуют процесс биоразложения на начальной стадии.

Для пленочных образцов смеси ПЭ/ДМ(60/40) наблюдается начальный рост культур с образованием отдельно расположенных конидиеносцев. Для композиционного материала, содержащего стеарат цинка, происходит развитие мицелия и спороношение, а в некоторых случаях (*Trichoderma viride*, *Chaetomium globosum*) зарастание мицелием всей площади при активном спороношении.

Испытания по комплексному биоразрушению выполняли путем компостирования пленочных образцов в почве. Влагоемкость почвы поддерживали на уровне 60%, что является оптимальным для биологической активности микроорганизмов в соответствии с

ГОСТ 9.060-75. Степень разложения оценивали по изменению массы образцов в динамике: 2, 3,5 и 8 месяцев.

В процессе биодеструкции в почве на начальном этапе (до 2х месяцев) происходят несколько конкурирующих процессов: водопоглощение, вымывание добавки и деструкция. Первый приводит к увеличению массы образца, второй и третий – к уменьшению. Полученные в этот период данные указывают только на то, какой процесс преобладает в случае каждого образца, но не могут являться основанием для прогнозирования дальнейшего воздействия почвы. Масса образца чистого ПЭ в ходе экспонирования в почве не изменялась. Для образца с древесной мукой через 3,5 месяца экспонирования наблюдается начало процесса потери массы, а введение стеарата цинка способствует ускорению процесса деструкции - уже через 2 месяца от начала эксперимента наблюдается потеря массы образцов.

Результаты исследования показали, что добавление к полиэтилену древесной муки приводит к увеличению водопоглощения и повреждению образцов под воздействием плесневых грибов и микробиоты почвы. На основе полученных данных можно сделать вывод о перспективности применения отходов древесины в качестве модификатора синтетических полимеров для придания им биоразлагаемых свойств.

КОЛЕСОВА О.В.

*Пермский национальный исследовательский политехнический университет,
Пермь, Россия*

ВЛИЯНИЕ НЕОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ НА РАСТВОРИМОСТЬ И УСТОЙЧИВОСТЬ ОЗОНА В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

Озон является мощным окислителем в водных растворах и используется в процессах очистки сточных вод от ряда органических и неорганических загрязнений. В зависимости от значений рН растворов, озон может вступать в реакции с большим количеством органических соединений. Окисление веществ может происходить как путем непосредственного взаимодействия с молекулярным озоном, так с вторичными

окислителями или гидроксильными радикалами, которые озон образует при своем разложении или в ходе химических реакций.

Как правило, большинство разработанных на данный момент моделей озонирования подробно не рассматривают влияние неорганических ионов на процессы массопереноса и стабильность озона в растворах. Однако, соли и моющие средства часто присутствуют в составе вод, подвергающихся озонированию. Например, в целлюлозно-бумажной промышленности, где озонирование используется для обесцвечивания технической воды, содержится большое количество кальция, сульфатов и карбонатов (до нескольких граммов на литр). Сброс хозяйственно-бытовых сточных вод и сток с полей, на которых применяются нитратные удобрения, насыщают подлежащую очистке воду ионами NO_3^- .

Соли могут влиять на процесс окисления веществ озоном за счет разных механизмов. Так присутствие неорганических солей в виде ионов влияет на растворимость озона и процессы его массопереноса между газовой фазой и жидкостью. Растворение соли при концентрациях в области 0,5 М может приводить к уменьшению растворимости озона на 50%.

Кроме того, присутствие неорганических солей может влиять на размеры пузырей газов в жидкости и их поведение внутри колонны. Увеличение концентрации электролитов в значительной степени препятствует процессу слияния пузырей, в результате чего происходит уменьшение их среднего диаметра, и увеличение удельной поверхности контакта фаз. Это приводит к росту параметров массопереноса озона, в результате чего может происходить увеличение скорости процесса озонирования.

Неорганические соли влияют также на стабильность озона в водных растворах. Например, фосфаты при низких значениях рН катализируют разложение озона, а при рН 7-8,5 ингибируют этот же процесс. При высоких значениях рН аналогично ведут себя карбонаты и сульфаты, повышая стабильность озона в водных растворах. Ионы железа и марганца так же оказывают каталитическое влияние на процессы озонирования. Хлориды напротив влияют лишь на процессы разложение озона. Влияние нитратов до сих пор не изучено.

Таким образом, растворимость и стабильность озона в водных растворах сложным образом зависит от ряда факторов, что требует дальнейших исследований в этом направлении.

Работа направлена на изучение процесса массопереноса озона в водных системах, а именно на изучение влияния катионов и анионов различных неорганических солей, а также полидисперсных частиц. Исследование интенсивности транспорта O_3 в суспензии проводили с использованием барботажного абсорбера с механическим перемешиванием жидкости Biostat A plus (Sartorius, Германия) при $30^{\circ}C$. Общий объем суспензии составлял 400 мл.

КОЛОБОВА О.С., ВЕЛИШАЕВА Н.С., ШИЛОВ И.А.

*ГНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии Россельхозакадемии,
Москва, Россия*

ПРИМЕНЕНИЕ ТЕХНОЛОГИИ МИКРОСАТЕЛЛИТНОГО АНАЛИЗА В ГЕНОТИПИРОВАНИИ РАСТЕНИЙ РОДА *SOLANUM*

Применение технологий генотипирования в сельском хозяйстве открывает новые возможности для эффективного решения различных задач современной селекции, таких как поддержание генетических коллекций, подбор родительских форм для скрещивания, составление родословных, контроль интрогрессии генетического материала, паспортизация и сертификация сортов, создание «генетических паспортов» сельскохозяйственных растений, представляющих собой основу защиты интеллектуальной собственности селекционеров. Методы геномной идентификации, на которых будет базироваться сортовая идентификация, должны обладать: достоверностью, воспроизводимостью, быстротой и невысокой стоимостью анализов, а получаемые результаты не должны зависеть от условий выращивания и стадии развития растительного материала. Среди методов молекулярного анализа наиболее перспективными представляются методы, основанные на анализе полиморфизма ДНК (полиморфизма микросателлитных последовательностей ДНК или простых повторяющихся последовательностей (SSR – simple sequence repeats)).

Задачей нашего исследования является генотипирование культивируемых и дикорастущих форм томатов методом микросателлитного анализа, а также контроль интрогрессии генетического материала родительских форм в гибриды/сорта.

Томат (семейство *Solanaceae* Juss., род *Lycopersicon* Mill.) - одно из важнейших овощных растений, а также одно из наиболее охарактеризованных культурных растений. Имеющиеся литературные данные показывают, что микросателлитные области генома томата представлены динуклеотидными мотивами типа: $(AT)_n/(TA)_n$ и $(GA)_n/(GT)_n$; среди тринуклеотидных мотивов распространены $(ATT)_n$ - и $(GCC)_n$ -повторы; некоторые тетрануклеотидные мотивы типа $(GATA)_n$, $(TATG)_n$ и $(AGTG)_n$ также относительно часто встречаются в геноме томата. При выборе праймеров для исследования полиморфизма микросателлитных локусов растений *Solanum* учитывались следующие критерии. Во-первых, диапазон длин амплифицируемых фрагментов генома исследуемого объекта, содержащего микросателлитные последовательности, должен составлять от 100 до 300 п.н. Поскольку различие длин аллелей микросателлитного локуса определяется числом повторяющихся единиц, представляющих собой ди-, три-, тетра-, пента- и гексануклеотиды, то с помощью высокоразрешающего электрофореза ПЦР-фрагменты, отличающиеся всего на несколько нуклеотидов, разделяются надежнее, если они имеют не очень большую длину. Во-вторых, при выборе праймеров большое значение представляют сведения о количестве аллелей и природе повторяющихся единиц, содержащихся внутри того или иного микросателлитного локуса. На основе базы данных SOL Genomic Network и результатов исследований ряда авторов нами были выбраны и синтезированы 44 пары праймеров для анализа микросателлитных маркеров и протестированы на 78 образцах различных сортов томата. Часть праймеров была модифицирована с целью оптимизации длины ПЦР-продуктов и повышения специфичности. Все выбранные пары праймеров проявляли разную степень информативности в изучении генетического разнообразия сортов томата отечественной и зарубежной селекции, среди которых нами отобраны 12 оригинальных пар праймеров, позволяющие выявлять от 2 до 5 аллелей на одноименный микросателлитный локус. В результате совокупного анализа 12 микросателлитных локусов исследуемых сортов томата выявлено 39 дескрипторов генетического разнообразия.

Таким образом, ДНК-технологии позволяют получить индивидуальную характеристику отдельного генотипа – ДНК-профиль. Сравнительный анализ полученных ДНК-профилей позволяет различать и идентифицировать виды, подвиды, сорта, инбредные линии и клоны. Проявление ДНК-маркеров нейтрально по отношению к фенотипу, не тканеспецифично, детектируется на любой, в том числе на самой ранней стадии развития и не зависит от влияния факторов внешней среды. Технологии ДНК-генотипирования позволяют оперировать неограниченным количеством дескрипторов, необходимым для надежной идентификации генотипов. Предлагаемая в нашей работе технология анализа микросателлитов позволит в будущем приблизиться к внедрению методов контроля продуктов растениеводства и введению в действие автоматизированной информационной системы, обеспечивающей быстрый сбор, обработку, хранение и использование данных о генетических ресурсах («генетический паспорт» растения).

КОМАРОВА Ю.В., ШАЛИМОВА О.А.

ФГБОУ ВПО «Орловский государственный аграрный университет», Орел, Россия

**МОДИФИКАЦИЯ РАЦИОНОВ СВИНЕЙ С ЦЕЛЬЮ КОРРЕКЦИИ
ФУНКЦИОНАЛЬНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МЯСА
СВИНИНЫ С ПОРОКАМИ PSE**

Качество мяса – важнейший фактор в работе любого агропредприятия, поставляющего сырье для мясоперерабатывающего производства. Чтобы улучшить качество мяса выращиваемых животных применяются самые современные технологии. На качество мяса огромное влияние оказывают прижизненные факторы. Специалисты нередко сталкиваются с тем, что у части свиней после забоя выявляется мясо с недостаточными техническими свойствами. Это вызвано не качественным кормом, плохими условиями содержания, стрессами и повышенной возбудимостью животных.

Проблемой современного свиноводства остается повышение продуктивности, а главное, удешевление продукции за счет высокой эффективности использования питательных веществ корма. Этого можно достичь путем увеличения трансформации питательных веществ корма в продукцию за счет применения прогрессивных технологий

подготовки кормов к скармливанию, а также добавок, стимулирующих переваримость и использование питательных веществ рационов.

В настоящее время качество корма повышают за счет увеличения белков и минеральных добавок - это сказывается отрицательно на качестве продукции, снижается РН, мясо становится PSE. Такое мясо при переработке вызывает сложности, ухудшается качество продукции.

Поэтому нужно оптимизировать корма так чтобы продукция не ухудшалась и улучшались технологические свойства мясного сырья.

В связи с вышесказанным в Инновационном научно-исследовательском испытательном центре Орловской области были начаты исследования по разработке новых технологий прижизненного формирования свинины, в том числе с разработкой рациона адаптированного к свиноводческим хозяйствам которые созданы в Орловской области.

В задачу исследований входила оценка физико-химического состава и функционально-технические свойства мяса свиней породы Ландрас выращиваемых в селекционно - гибридном центре “Знаменское” Орловской области.

Основной задачей исследований является такой подбор рациона, который позволит при увеличении энергии роста исключить проявление пороков мясного сырья относящиеся к группе PSE.

КОМАРЬКОВ И.Ф., ШИДЛОВСКИЙ Ю.В.

Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ НОВОГО ФАКТОРА ТРАНСКРИПЦИИ В ОНТОГЕНЕЗЕ

SAYP – специфичный для многоклеточных организмов транскрипционный коактиватор РНК-полимеразы II. Гене $(y)3$, кодирующий SAYP (Supporter of Activation of Yellow Protein), был первоначально найден у дрозофилы как ген, необходимый для энхансер-промоторного взаимодействия гена *yellow*.

Транскрипты гена $e(y)3$, как и сам SAYP, были найдены во многих тканях на всех стадиях развития дрозофилы. В эмбрионах, имагинальных дисках личинок и ооцитах

взрослых особей наблюдается наибольшая экспрессия $e(y)3$. Высокий уровень SAYP наблюдается в полярных клетках эмбриона с момента их появления. В целом, клетки с высокой пролиферативной способностью имеют повышенный уровень SAYP.

Описано 2 основные мутации гена $e(y)3$. В результате мутаций гена $e(y)3$ происходит десинхронизация клеточного цикла ядер на стадии синцитиальной бластодермы, наблюдаемая в различных частях зародыша на данной стадии эмбриогенеза. Кроме того, мутации гена $e(y)3$ приводят к появлению укороченных эмбрионов с уменьшенным количеством сегментов. Был обнаружен запуск апоптоза и сокращение числа ядер в переднем конце эмбриона на ранних этапах развития. Одновременно у мутантов обнаруживается повышенная пролиферация полярных клеток.

Мутация $e(y)3^{ul}$ в гомозиготном состоянии приводит к стерильности женских особей, общему снижению жизнеспособности и нарушению развития лапок у взрослых особей. Генетические данные позволяют отнести SAYP к семейству коактиваторов транскрипции, регулирующих развитие. Показана необходимость SAYP для развития нервной системы эмбриона и глаз взрослых особей.

Гомологом SAYP у млекопитающих является фактор PHF10. У взрослых людей этот фактор присутствует в значительном количестве только в некоторых тканях, причем в мозге его обнаружено больше всего. PHF10 был описан как фактор, необходимый для пролиферации стволовых клеток мозга мышей.

Таким образом, SAYP/PHF10 – важный регулятор нормального протекания онтогенеза у высших эукариот.

КОМИССАРОВА Л.Х., ФЕОФАНОВ В.С., КУЗНЕЦОВ А.А.

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

АДСОРБЦИЯ ГЕМОГЛОБИНА НА МИКРОЧАСТИЦАХ ФЕРРОКАРБОНА

Магнитные нано- и микрочастицы, предназначенные для использования в биологии и медицине качестве сорбентов, должны иметь высокие значения сорбционной ёмкости к удаляемым веществам. Кроме того, поверхность частиц должна быть модифицирована для придания свойств биосовместимости и селективности.

Целью работы является разработка новых методов модификации поверхности микрочастиц железо-углеродных (ферокарбон) композитов белками (альбумином и желатином) и изучение адсорбции гемоглобина на композитах с модифицированной поверхностью. Использовались образцы ферокарбона с различным содержанием железа и углерода. Диаметр частиц композитов, полученных плазмохимическим методом, составляет: 0,05–0,5 мкм. Суспензию магнитных частиц в воде готовили методом ультразвукового диспергирования. Покрытие поверхности микрочастиц желатином и альбумином проводили путем инкубации в растворах белков. Модификацию аминокрупп в белках осуществляли глутаровым и форм-альдегидами. Средний размер частиц в суспензии определяли на приборе Sumicron Particle Sizer Nicomp-380.

Показано, что средний размер частиц в свежеприготовленной суспензии составляет 2000 ± 500 нм. Сорбционная эффективность композитов (% адсорбции и сорбционная емкость) к гемоглобину была изучена в физиологическом растворе и в модельной биологической жидкости (0,6% альбумин) при разных весовых отношениях композит/гемоглобин (рН 7.2). Количество адсорбированного гемоглобина определяли спектрофотометрически. Показано, что максимальные значения процента адсорбции гемоглобина (Hb) на железоуглеродных композитах, покрытых желатином и альбумином, в физиологическом растворе наблюдаются при весовом отношении композит/Hb=50, а сорбционной емкости при отношении композит/Hb=10. После модификации аминокрупп альбумина и желатина глутаровым альдегидом отмечается некоторое снижение сорбционных показателей к гемоглобину, что, очевидно, обусловлено стероохимическим фактором. Аналогичный характер изменения сорбционных показателей образцов ферокарбона с модифицированной белками поверхностью к гемоглобину обнаружен в растворе 0,6% альбумина. При этом сорбционная эффективность микрочастиц ферокарбона к гемоглобину превышает соответствующие значения для угольных сорбентов. Показано, что адсорбция альбумина на микрочастицах ферокарбона с модифицированной поверхностью не превышала 10%, в то время как на непокрытых частицах составляла не менее 30%. Таким образом, микрочастицы ферокарбона с модифицированной белками поверхностью могут быть рекомендованы для использования в качестве сорбентов для очистки биологических жидкостей от свободного гемоглобина методом магнитной сепарации, в том числе, для очистки ликвора.

КОМРАТОВ А.В.¹, САЯПИНА Л.В.¹, АБДРАШИТОВА А.С.²,
МАЛАХАЕВА А.Н.², ОСИНА Н.А.², ЩЕРБАКОВА С.А.²

¹ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравсоцразвития России, Москва, Россия

²ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ «АМПЛИСЕНС®» ДЛЯ ИНДИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО» ВРЕМЕНИ

Проведены технические и медицинские испытания наборов реагентов для индикации возбудителей сибирской язвы, бруцеллеза и холеры.

Цель испытаний – определение диагностической ценности (чувствительность, специфичность, воспроизводимость) наборов реагентов для решения вопроса о целесообразности регистрации их в качестве изделий медицинского назначения.

Были изучены:

- «Набор реагентов для выявления ДНК *Bacillus anthracis* в биологическом материале и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» «АмплиСенс® *B. anthracis*-FRT», в основе которого лежит амплификация фрагментов *pagA* гена (плазмида рХО1) и *capA* гена (плазмида рХО2);

- «Набор реагентов для выявления ДНК бактерий *Brucella spp.* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Brucella spp.*-FL», в основе которого лежит амплификация фрагмента *wbopA* гена бруцелл;

- «Набор реагентов для выявления ДНК *Vibrio cholerae* и идентификации патогенных штаммов *Vibrio cholerae* в биологическом материале и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Vibrio cholerae*-FL».

Исследования чистых культур штаммов микроорганизмов, и искусственно инфицированных проб биологического материала и объектов внешней среды, проводились в строго контролируемых и шифрованных опытах. Учет результатов осуществляли автоматически по накоплению специфической флуоресценции в режиме «реального

времени» и по «конечной точке» без проведения дополнительного этапа постановки электрофореза. С целью предотвращения получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов использовали внутренний контрольный образец, введенный в исследуемые наборы реагентов, амплификация которого осуществляется одновременно с исследуемыми пробами. Использование такого контроля обеспечило возможность учета эффективности проведения всех этапов ПЦР-анализа, что в значительной степени повышает точность исследований. Для определения чувствительности исследуемых наборов реагентов использовали чистые культуры штаммов возбудителей особо опасных инфекций в концентрациях 1×10^2 м.к./мл, 1×10^3 м.к./мл, 1×10^4 м.к./мл и СОП ПКО ДНК, для определения специфичности – штаммы гетерологичных микроорганизмов.

В исследованиях чистых культур *B. anthracis*, имеющих различный плазмидный состав, проведенных с использованием набора реагентов «АмплиСенс® *B. anthracis*-FRT», количество выявляемых проб составило для концентраций 10 спор/мл – 17 %, 1×10^2 спор/мл – 38 %, 1×10^3 спор/мл – 96 %. При исследовании объектов окружающей среды и биологического материала, инфицированных *B. anthracis* (pXO1+ pXO2+) выявлено 98 % и 100 % проб в концентрациях 1×10^3 спор/мл и 1×10^4 спор/мл, соответственно.

При определении чувствительности набора реагентов «АмплиСенс® *Brucella spp.*-FL» было выявлено 54 и 62 % проб в концентрации 1×10^2 м.к./мл; 99 % и 100 % проб – в концентрациях 1×10^3 м.к./мл и 1×10^4 м.к./мл для обоих вариантов детекции, соответственно. В биологическом материале с помощью испытуемого набора реагентов обоих вариантов *Brucella spp.* выявлялась в концентрациях 1×10^3 м.к./мл и 1×10^4 м.к./мл в 100 % случаев.

Показано, что набор реагентов «АмплиСенс® *Vibrio cholerae*-FL» выявляет штаммы *V. cholerae* и идентифицирует патогенные штаммы в концентрации 1×10^3 м.к./мл и СОП ПКО ДНК *V. cholerae CtxA* в концентрации 1×10^3 ГЭ/мл; при исследовании искусственно инфицированного биологического материала (испражнения, желчь) и объектов окружающей среды (вода, смывы) – *V. cholerae* в концентрации 1×10^3 м.к./мл и не выявляет другие виды рода *Vibrio*, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri* в концентрации 1×10^7 м.к./мл. Специфичность и воспроизводимость всех исследуемых наборов реагентов составила 100 %.

Таким образом, установлено, что исследуемые наборы реагентов обладают высокой чувствительностью (1×10^3 м.к./мл), специфичностью и воспроизводимостью, что явилось основанием для регистрации их в установленном порядке. Высокая диагностическая эффективности наборов реагентов позволяет существенно повысить уровень диагностики возбудителей особо опасных инфекций в биологическом материале и объектах окружающей среды.

КОНДРАТЬЕВ М.Н., ЛАРИКОВА Ю.С., БУДАРИН С.Н.

Российский государственный аграрный университет – Московская сельскохозяйственная академия им. К.А.Тимирязева, Москва, Россия

БОРЩЕВИК СОСНОВСКОГО (*Heracleum sosnowskyi* MANDEN) И ПРОБЛЕМЫ АГРОБИОЦЕНОЗОВ

В 60-70-ых годах XX столетия отечественное растениеводство обогатилось рядом стихийно интродуцированных видов естественной флоры с достаточно привлекательными хозяйственными признаками (высокими темпами роста и развития, большим выходом биомассы, значительным накоплением белков, углеводов и других биохимических компонентов). В указанный период, естественно, проверки на фитотоксичность, возможность внедрения в естественные экосистемы не проводились. Когда в ходе хозяйственного использования таких видов выявились их резко отрицательные характеристики, например, негативное воздействие на почвенную микрофлору агробиоценозов, качество животноводческой продукции и даже здоровье человека, то эти виды были просто выведены из культурооборота и превратились в «беглецов из культуры», получивших название *эргазиофитов*. Наиболее яркой иллюстрацией данного положения является ситуация, сложившаяся в настоящее время с борщевиком Сосновского.

Названный вид весьма успешно адаптировался практически во всех почвенно-климатических зонах европейской части России и внедрился в агробиоценозы не обрабатываемых полей, «заселил» все пустоши, выгоны, пастбища, уверенно заселяет разреженные лесные фитоценозы. Формируемая борщевиком Сосновского мощная

надземная сфера позволяет ему успешно конкурировать с любым представителем травянистых растений и даже с подростом таких лесных пород, как ива (*Salix*), берёза (*Betula*), дуб (*Quercus*), сосна (*Pinus*). Весьма важным обстоятельством при разработке технологий ограничения распространения данного эргазиофита является необходимость выявления возможности проявления аллелопатических свойств у его корневых выделений или сока, содержащегося в надземных органах.

Исследования проводились методом биотестов с использованием 5-10 – дневных проростков семян культурных растений: злаковых – пшеницы (*Triticum*), ячменя (*Hordeum*), зернобобовых – гороха (*Pisum*), овощных – салата (*Lactuca*), редиса (*Raphanus*) культур, лекарственных растений, обладающих специфическим химическим составом клеток, - валерианы (*Valeriana*), календулы (*Calendula*), почвенных микроорганизмов (*Bacillus mycoides*, *Sarcina*, *Streptomyces*).

В качестве эффекторов на названные объекты использовались концентрированные и разбавленные вытяжки сока, полученные из корней, зрелых и молодых листьев борщевика Сосновского в фазу цветения растений. Способы воздействия на опытные объекты заключались в проращивании семян в вытяжках разного уровня разбавления, совместном проращивании семян культурных растений и борщевика, опрыскивании вытяжками из листьев борщевика вегетативных органов молодых растений, добавление вытяжек борщевика в среду культивирования почвенных микроорганизмов. Полученные результаты характеризуют три типа ответных реакций исследованных видов культурных растений.

Добавление в среду проращивания семян или опрыскивание молодых растений концентрированным (без разбавления) соком борщевика в подавляющем числе случаев оказывало негативное воздействие на рост, морфофизиологические характеристики и время жизни растений. Особенно сильно эффект обработок проявлялся на проростках культур, выращенных из мелких семян (салат, редис, валериана, календула). По мере увеличения разбавления вытяжек угнетающий эффект снижался, а при сильном разбавлении (1:8, 1:16) наблюдалось усиление роста корней и ускорялось развитие листьев.

Наличие в среде проращивания концентрированных вытяжек из борщевика слабо отражалось на морфофизиологических характеристиках проростков гороха, а все

последующие разбавления (по мере их увеличения) вызывали усиленный рост зародышевого корня. Слабую ответную реакцию проростков гороха мы объясняем наличием большого количества запасных веществ в семядолях и чётко выраженным белковым обменом в процессе прорастания, что позволяет образующимся в результате распада белковым компонентам связывать соединения борщевика, обладающие аллелопатическими свойствами.

И, наконец, вытяжки из листьев борщевика не оказывали воздействие на развитие почвенной микрофлоры. Это позволяет предположить, что, если и происходит вымывание аллелопатических агентов дождевыми каплями из надземных органов борщевика, они не участвуют в негативном воздействии на почвенную микрофлору. Другими словами, отрицательное влияние аллелопатических компонентов клеточного сока листьев на педосферу ценозов борщевика Сосновского, скорее всего, минимально.

КОНДРАТЬЕВ М.С.¹, КАБАНОВ А.В.¹, ЧЕРЕНКОВ Д.А.², САМЧЕНКО А.А.¹,
КОМАРОВ В.М.¹, ХЕЧИНАШВИЛИ Н.Н.¹

¹ *Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия*

² *Воронежский государственный университет инженерных технологий,
Воронеж, Россия*

КОМПЬЮТЕРНОЕ ОБОСНОВАНИЕ АМИНОКИСЛОТНЫХ ЗАМЕН, ПОВЫШАЮЩИХ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ ЛИПАЗ

Управление свойствами макромолекул является одной из основных задач биоинженерии. Данное направление науки имеет непосредственное прикладное значение, поскольку улучшенные природные соединения или искусственно созданные на их основе миметики могут быть внедрены в производственные циклы на предприятиях широко круга отраслей, а также использоваться в медицине – после необходимого тестирования. Наше исследование выполнено на стыке молекулярной инженерии и теоретической протеомики – работа посвящена повышению стабильности и активности биокатализаторов, белков-ферментов. Расщепление жиров ферментами-липазами имеет несомненные преимущества по сравнению с химическим разложением. Однако массовому

распространению липаз мешает их высокая стоимость и "капризность" ферментов в условиях повышенных температур, которые сопровождают многие технологические процессы. Исследования в рамках работ, направленных на повышение устойчивости тех или иных белков к разрушающему действию высоких температур, ведутся с применением большого количества методов, в том числе, компьютерного моделирования. В этой связи представляется актуальным уточнение существующих подходов к описанию и предсказанию термостабильности малых белков, которые полезны как для фундаментальных исследований, так и для прикладных разработок.

Объектом нашего исследования был выбран бактериальный фермент-липаза LipA из *Bacillus subtilis* (код pdb **2QXU**, последовательность содержит 181 аминокислотный остаток). Известно, что свойства молекулы белка можно корректировать путем внесения аминокислотных замен, однако поиск мест для такого точечного мутагенеза представляет собой отдельную нетривиальную задачу. Обычно для определения параметров необходимых мутаций используются подходы, основанные на анализе гомологии мезофильных и термофильных белков, или же методы направленной эволюции. Однако, с развитием расчетных методов компьютерного моделирования, в том числе молекулярной динамики (МД), стало возможным оценивать эффективность планируемых замен еще до их осуществления в эксперименте. Важнейшим моментом таких теоретических подходов оказывается проблема достоверности получаемых результатов и вопросы калибровки расчетных методик. Вопрос «изменение какого параметра оценивать, чтобы характеризовать термостабильность белков при расчетах?» до сих пор остается предметом дискуссий.

В нашей работе первым этапом исследования явилась именно калибровочная часть, состоящая в моделировании динамического поведения пар малых белков (например, **1C9O** и **1I5F**), отличающихся на один аминокислотный остаток и имеющих хорошее экспериментальное описание их термостабильности. Основой же для интерпретации данных послужила концепция повышения стабильности малых глобулярных белков, предложенная несколько лет назад в Лаборатории структуры и динамики биомолекулярных систем института Биофизики клетки РАН [Хечинашвили и др. 2006]. Её авторы показали, что рост термостабильности таких молекул имеет энтропийную природу

и связан с увеличением количества альтернативных водородных связей между боковыми группами аминокислотных остатков на поверхности глобулы.

Оценив изменение расстояний между потенциально донорными и акцепторными (для образования водородной связи) боковыми группами аминокислотных остатков на периферии глобулы, а также построив зависимости среднеквадратичных отклонений боковых групп от времени, при различных температурах, мы подтвердили, что выбранные подходы к анализу результатов расчета траектории ускоренной молекулярной динамики (с использованием GPU NVIDIA) являются адекватными. Впоследствии по аналогичной схеме были проанализированы замены, считающиеся перспективными для увеличения термостабильности липазы LipA. Ген этого рекомбинантного (всего 4 замены) белка уже встроен нами в *E.coli*, фермент успешно нарабатывается и изучается при помощи сканирующей микрокалориметрии. Параллельно ведутся исследования в отношении фермента из дрожжей *Cryptococcus* sp., который является очень привлекательным в отношении утилизации загрязнителей не только липидной природы, но и расщепления пластмасс на основе полимолочной кислоты. В 2010 году данные исследования были отмечены премией Intel и Роснано.

Авторы работы благодарят НИВЦ МГУ и компанию NVIDIA за предоставление доступа к высокопроизводительным вычислительным ресурсам на базе профессиональной платформы Tesla.

КОНДРАТЬЕВ М.С., САМЧЕНКО А.А., КАБАНОВ А.В., КОМАРОВ В.М.

Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия

КРЕМНИЕВЫЕ АНАЛОГИ АМИНОКИСЛОТ: ОТ ФИЛОСОФИИ И ГИПОТЕЗ – К РАСЧЕТАМ БАЗЫ ДЛЯ АЛЬТЕРНАТИВНОЙ БИОХИМИИ

Вопрос об уникальности жизни, существующей на нашей планете, обсуждается в литературе уже не одно десятилетие. За это время было установлено, что даже в межзвёздной среде, при всём разнообразии молекул, которые были там обнаружены, 84 основаны на углероде, а 8 - на кремнии, в том числе четыре из них являются гибридными, т.е. в их состав входит как кремний, так и углерод. По приблизительным подсчётам, в

космосе соотношение углерода к кремнию составляет 10 к 1, хотя земная кора на 87% состоит как раз из кремния, правда, в виде его оксидов.

Как известно, составом и структурой веществ на основе углерода занимается органическая химия, в рамках которой подробно разработана классификация соединений; предложен целый арсенал методов анализа состава и структуры органических веществ, а также создан теоретический базис, описывающий природу разнообразных химических связей, в которых участвуют атома углерода. Между тем, уже довольно давно высказана и обсуждается идея о вероятном существовании соединений, подобных органическим, но на основе атомов кремния. В Периодической системе кремний находится в той же IV группе, что и углерод. Эти два элемента во многом схожи по строению своих валентных электронных оболочек, причем ранее было постулировано, что соединения кремния не настолько разнообразны по строению, как белки. Несмотря на то, что атомы кремния имеют бóльшую массу и радиус, они, тем не менее, образуют двойную и тройную ковалентные связи. Поэтому вопрос структурах, подобным биологическим, и даже о гипотетических «биохимических» процессах, в которых могут принимать участие соединения, являющимися неуглеродными аналогами аминокислот, углеводов, белков, липидов и других, привычных для нас биомолекул, остается предметом дискуссии в научной и научно-популярной литературе. Особо отметим, что современные методы вычислительной химии позволяют весьма эффективно провести оценочные расчеты некоторых таких соединений. Например, ранее сначала в расчетах, а потом и экспериментально была исследована ароматичность у циклических производных кремния.

В данной работе теоретически изучены особенности некоторых структурных и термодинамических параметров молекул, которые могут рассматриваться полными кремниевыми аналогами L-аминокислот, а также их гибридных форм (когда имеются только карбонильный и C α -углероды, а остальные заменены на атомы кремния). В качестве контроля были рассчитаны некоторые свойства простейших кремниевых производных – силанов, гексосилабензола и метакремниевой кислоты.

Термодинамические, конформационные и электростатические свойства изучаемых модельных систем рассчитывались с использованием квантово-химического полуэмпирического метода PM3 и неэмпирического метода *ab initio* в варианте параметризации B3LYP/6-311G(d,p).

Выполненные нами исследования показали, что «замена» атомов углерода на кремний сразу для нескольких классов молекул не ведет к драматическому изменению их пространственного строения, однако сильно влияет на их термодинамическую стабильность. При этом «кремниевые аминокислоты» обладают увеличенными значениями дипольных моментов, а также характеризуются более выраженными электроно-донорными свойствами (отражением чего являются пониженные величины потенциала ионизации). Значительное внимание в работе уделено обсуждению вопроса о существовании и стабильности «альфа-спиралей» из кремниевых и гибридных аминокислот, поскольку в молекулах Si-аналогов аспартата и глутамата нами было обнаружено эффективное образование внутримолекулярной водородной связи (за счет боковой группы), которая у природных L-аминокислот оказалась важной для образования альфа-спиралей. В целом, альфа-спираль из кремниевого «аланина» характеризуется более выраженной термодинамической стабильностью, чем её углеродный аналог.

КОНОН А.Д., ПИРОГ Т.П., ШЕВЧУК Т.А.

Национальный университет пищевых технологий, Киев, Украина

**ИНТЕНСИФИКАЦИЯ СИНТЕЗА ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ
ВЕЩЕСТВ *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* ИМВ В-7241
НА НЕУГЛЕВОДНЫХ СУБСТРАТАХ**

Микробные поверхностно-активные вещества (ПАВ) являются препаратами с мультифункциональными свойствами и могут быть использованы как в различных отраслях промышленности (нефтедобывающей, химической, фармацевтической, пищевой), так и в сельском хозяйстве и медицине. Кроме того, ПАВ микробного происхождения нетоксичные и биodeградебельные.

Организация промышленного производства микробных ПАВ требует предварительной оценки экономической эффективности этого процесса. На сегодняшний день себестоимость ПАВ микробного происхождения все еще превышает таковую химических аналогов, что обусловлено высокими затратами на биосинтез и выделение

целевого продукта. Поэтому исследования, направленные на решение этих проблем, являются ключевыми и приоритетными в биотехнологии микробных ПАВ.

Для повышения эффективности технологий микробного синтеза практически ценных метаболитов, в том числе микробных ПАВ, исследователи используют такие приемы как внесение экзогенных предшественников в среду культивирования продуцента, а также использование смешанных субстратов.

Ранее было показано, что *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 (ИМВ В-7241), выделенный нами из загрязненных нефтью образцов почвы, образует низкомолекулярные поверхностно-активные вещества при росте на гидрофобных (гексадекан, жидкие парафины) и гидрофильных (этанол, глюкоза) субстратах. Цель данной работы – исследовать возможность повышения синтеза ПАВ при культивировании *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 на моно- и смешанных субстратах.

Учитывая химическую природу синтезированных штаммом ИМВ В-7241 ПАВ (комплекс нейтральных, amino- и гликолипидов, гликолипиды представлены трегалозомиколатами) предположили, что внесение в среду с этанолом цитрата (регулятор синтеза липидов), а также C₄-дикарбоновых кислот (фумарат, предшественник глюконеогенеза) будет сопровождаться интенсификацией синтеза ПАВ. Установлено, что одновременное внесение фумарата (0,01 %) и цитрата (0,01 %) в конце экспоненциальной фазы роста штамма ИМВ В-7241 на среде с этанолом приводило к увеличению количества синтезированных ПАВ на 195 % по сравнению с показателями синтеза на среде без органических кислот. Повышение синтеза ПАВ в присутствии фумарата и цитрата обусловлено увеличением в 1,7–7,0 раз активности ферментов биосинтеза глико- (фосфоенолпируват(ФЕП)-синтазы и трегалозофосфатсинтазы) и аминоклипидов (НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы), а также одновременным функционированием двух анаплеротических путей (глиоксилатного цикла и ФЕП-карбоксилазной реакции).

Еще одним из путей усовершенствования технологий микробного синтеза является использование смешанных субстратов для культивирования продуцентов. Такой подход позволяет избежать непродуктивных потерь углерода и энергии, имеющих место при использовании моносубстратов, а также повысить эффективность трансформации углерода субстратов в продукты микробного синтеза.

На основе теоретических расчетов энергетических потребностей синтеза поверхностно-активных трегалозомониколатов и биомассы на энергетически дефицитном субстрате (глицерин) установлена концентрация энергетически избыточного гексадекана, позволяющая повысить эффективность конверсии углерода используемых субстратов в ПАВ. При молярном соотношении концентраций гексадекана и глицерина 1:7 и соотношении C/N, равном 30, количество синтезируемых внеклеточных ПАВ повышалось в 2,6–3,5 раза по сравнению с таковым на моносубстратах. Повышение образования ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 на смеси гексадекана и глицерина обусловлено увеличением в 1,3–2,4 раза активности ферментов их биосинтеза, а также одновременным функционированием двух анаплеротических путей (глиоксилатного цикла и ФЕП-карбоксилазной реакции).

Таким образом, в результате проведенной работы установлена возможность интенсификации синтеза ПАВ в 1,9–3,5 раза при культивировании *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 на моно- и смешанных субстратах. Предложенные в данной работе подходы, в частности внесение экзогенных предшественников и культивирование продуцента на смеси ростовых субстратов, могут быть использованы для разработки не только технологий микробных ПАВ, но и других технологий микробного синтеза.

КОНОН А.Д., СОФИЛКАНИЧ А.П., ПАРФЕНЮК С.А.,
ФИЛЮК И.В., ПИРОГ Т.П., ШЕВЧУК Т.А.

Национальный университет пищевых технологий, Киев, Украина

**БИОДЕСТРУКЦИЯ КОМПЛЕКСНЫХ НЕФТЯНЫХ ЗАГРЯЗНЕНИЙ ВОДЫ И
ПОЧВЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВ
RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS ИМВ АС-5017 И *ACINETOBACTER
CALCOACETICUS* ИМВ В-7241**

В результате добычи, транспортировки и переработки нефти часто происходят аварийные выбросы токсических веществ в окружающую среду, следствием которых является колоссальная нагрузка на природу, приводящая к нарушению экологического равновесия систем, что проявляется в ингибировании жизнедеятельности многих живых

организмов. Кроме того, в окружающую среду попадает значительное количество тяжелых металлов (свинец, медь, кадмий, никель, кобальт, ртуть), которые достаточно хорошо сорбируются частичками почвы и растворяются в воде. Наличие металлов существенно усложняет и замедляет процессы ремедиации окружающей среды. На сегодняшний день наиболее эффективными для очистки экосистем от нефти и тяжелых металлов являются биологические методы, основанные на использовании микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности, в том числе и поверхностно-активных веществ (ПАВ).

В предыдущих исследованиях из загрязненных нефтью образцов почвы нами были выделены нефтеокисляющие бактерии, идентифицированные как *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017 и *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241, установлена способность этих штаммов синтезировать метаболиты с поверхностно-активными и эмульгирующими свойствами при культивировании на различных гидрофобных (гексадекан, жидкие парафины) и гидрофильных (глюкоза, этанол) субстратах.

Цель настоящей работы – изучить возможность применения препаратов поверхностно-активных веществ *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 и *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 в процессах биоремедиации нефтяных загрязнений воды и почвы в присутствии Cu^{2+} .

Для исследования биодеструкции нефти в почве и воде использовали препараты ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 в виде постферментационной культуральной жидкости (концентрация 5 % по объему).

Установлено, что на 21 сутки степень деструкции нефти (2,6 г/л) в присутствии препаратов ПАВ *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 и 0,01–0,05 мМ Cu^{2+} составляла 75–95 %, в то время как в варианте без Cu^{2+} разложилось 50 % нефти. При исследовании роли ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 в деструкции комплексных загрязнений концентрацию Cu^{2+} в воде увеличили до 0,1 и 0,5 мМ, а нефти – до 3,6 г/л. В присутствии препаратов ПАВ степень деструкции нефти на 21 сутки составляла 93–95 %.

Контроль природной нефтеокисляющей микрофлоры воды, осуществляемый в течение эксперимента, показал значительное увеличение (даже на порядки) общего количества микроорганизмов во всех образцах, обработанных препаратами ПАВ. Мы предполагаем, что это обусловлено увеличением биодоступности нефти для нативной микрофлоры воды в результате эмульгирования ее препаратами ПАВ, а также их защитными функциями от токсического действия катионов меди. Установлено, что в

присутствии препаратов ПАВ *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 выживание клеток природной нефтеокисляющей микрофлоры, обработанных 0,01–0,05 мМ Cu^{2+} , повышалась на 30–100 %.

Следующий этап исследований был посвящен изучению роли ПАВ в биоремедиации загрязненной нефтью (16 г/кг) и катионами меди почвы. В этом случае максимальная степень деструкции нефти (до 91 %) на 28 сутки была достигнута в вариантах, содержащих Cu^{2+} (0,01–0,1 мМ).

Мы предполагаем, что положительная роль Cu^{2+} в биодеструкции нефти обусловлена стимулирующим влиянием катионов меди на активность алкангидроксилаз – первых ферментов катаболизма углеводов. Эксперименты показали, что в присутствии 0,01 и 0,05 мМ Cu^{2+} активности алкангидроксилаз штаммов ИМВ В-7241 и ИМВ Ас-5017 повышалась в 1,5–3 раза.

Таким образом, в результате проведенной работы показана возможность использования невысоких (5 %) концентраций препаратов ПАВ *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 и *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 в виде постферментационной культуральной жидкости для биоремедиации почвы и воды, загрязненных как нефтью, так и катионами меди.

КОСТИНА Е.Е., ТКАЧЕНКО О.В., ЛОБАЧЕВ Ю.В.

*Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова,
Саратов, Россия*

ЭФФЕКТЫ ГЕНОВ КОРОТКОСТЕБЕЛЬНОСТИ ПШЕНИЦЫ И ПОДСОЛНЕЧНИКА НА КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ТКАНЕЙ IN VITRO

Гены короткостебельности произвели революцию в селекции злаков во второй половине XX века. Они стали основой существенного повышения продуктивности наиболее значимых сельскохозяйственных культур. Большая часть современных сортов пшеницы несет гены системы Rht. Для подсолнечника проблема создания низкорослых сортов и гибридов обсуждается в связи с возможностью получения форм пригодных для

выращивания в уплотненных посевах и уменьшения непродуктивной биомассы гетерозисных гибридов.

Изучение *in vivo* наборов почти изогенных линий, несущих гены короткостебельности, показало, что эти гены оказывают существенное влияние не только на архитектуру и продуктивность растения, но, через изменение гормонального статуса растения, на все биохимические и физиологические процессы. На основании данных об эффектах генов короткостебельности *in vivo* было сделано предположение о вероятном влиянии этих генов на морфогенетические процессы, протекающие в культуре клеток и тканей *in vitro*.

В течение ряда лет нами изучались особенности каллусогенеза и регенерации растений в культуре пыльников и соматических тканей у почти изогенных по генам короткостебельности линий пшеницы и подсолнечника. Оригинальный набор линий был создан профессором Ю.В. Лобачевым.

Культивирование соматических тканей подсолнечника сопряжено с рядом трудностей, не позволяющих у любых генотипов эффективно вести регенерацию растений из каллуса. В наших исследованиях особенности культивирования короткостебельных линий подсолнечника установлено, что на морфогенез оказывает влияние не только гормональный состав, но в значительной степени консистенция среды. Изучение экспериментальных линий, содержащих гены короткостебельности, показало достоверное различие в их влиянии на эффективность и направление морфогенеза в культуре пыльников и соматических тканей *in vitro*.

В связи с особенностями протекания морфогенетических процессов в соматических тканях короткостебельных линий пшеницы, изучалась возможная связь между присутствием в генофоне изучаемых линий Rht-генов и накоплением меристематического белка - маркера пролиферации клеток (ПАИ). Установлено влияние генетической системы Rht на синтез и содержание ПАИ в клетках соматических каллусов пшеницы.

Результаты проведенных исследований позволяют констатировать существенную роль генов короткостебельности пшеницы и подсолнечника в регулировании процессов дедифференциации, пролиферации, вторичной дифференциации клеток и регенерации растений. Установлено, что направление и сила влияния различных генов, принадлежащих к одной генетической системе и даже одному локусу, могут сильно отличаться. Это, с

одной стороны, позволяет прогнозировать вероятную эффективность культивирования *in vitro* соматических тканей на основе известных особенностей генотипов сортов донорных растений, вводимых в культуру. С другой стороны, это открывает перспективу повышения морфогенетической способности культивируемых образцов.

КОРНЕЕВА М.М.¹, СТАРКОВ А.А.², ПОПОВ В.Н.¹

¹*Воронежский Государственный Университет, Воронеж, Россия*

²*Weill Cornell Medical College, New York, USA*

АНТИОКСИДАНТНАЯ ЗАЩИТА МИТОХОНДРИЙ ПРОТИВ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА

Агонисты рецепторов пролиферации пероксисом (peroxisome proliferation activation receptors, PPARs) –фибраты широко используются в лечении диабета 2го типа, и имеют возможность оказывать гепатопротекторное действие. Так же их использование в лабораторных условиях позволяет создать модель диабета, такого как аллоксановый. Однако, несмотря на несколько десятилетий клинической практики и лабораторных исследований, механизм защитного действия фибратов на инсулин-секретирующие бета клетки и паренхимальные клетки печени остается неясным.

Фибраты являются пан-активаторами PPAR. Активация PPAR, в частности PPAR γ , значительно стимулирует транскрипцию генов метаболизма, ассоциированных с митохондриями: ферментов ц.Кребса, дыхательной цепи, и митохондриального β -окисления, что во многих тканях приводит к стимуляции биогенеза митохондрий и увеличения их количества и повышению окислительной активности. Таким образом, фибраты стимулируют окислительный метаболизм клеток. На первый взгляд, этим и можно объяснить их гепатопротекторное действие. Но тогда остается неясным влияние окислительного стресса, что неразрывно связано с митохондриальным метаболизмом. С одной стороны, твердо установлено, что окислительный стресс является одним из основных патофизиологических факторов сопутствующих многим заболеваниям печени. Пероксисомальное β -окисление жирных кислот генерирует в том числе и активные формы кислорода (АФК), тогда как митохондрии также генерируют значительное количество

АФК, и их считают основным источником АФК в клетках. Тогда можно ожидать, что фибраты, путем стимуляции активности и увеличения количества митохондрий и пероксисом, будут усиливать окислительный стресс, что несовместимо с их известным гепатопротекторным действием. Мы предположили, что это противоречие может быть разрешено, допуская возможность стимулирования фибратами биогенеза митохондрий, что значительно усиливает антиоксидантную защиту клеток. Известно, что митохондрии обладают комплексной системой антиоксидантной защиты, и это совсем мало изучено.

Целью настоящей работы было а) разработать методологию оценки мощности антиоксидантной защиты митохондрий печени и б) выяснить, каким образом фибраты влияют на экспрессию отдельных ее компонентов и общую активность. В данной публикации мы представляем результаты, относящиеся к первому этапу работы.

Методы. Митохондрии выделяли из печени мышей стандартным методом дифференциального центрифугирования. Печень после гомогенизации в буфере MSEG TABSA центрифугировали при 1000g x 10мин, супернатант повторно центрифугировали при 8000g x 10мин. Осадок ресуспендировали в буфере MSEGTA и центрифугировали при 8000g x 10мин. Полученные митохондрии ресуспендировали в том же буфере и хранили на льду. АФК оценивали как H_2O_2 флуориметрически при помощи системы детекции, состоящей из пероксидазы и AmplexRedUltra (флуоресц. субстрат пероксидазы).

Результаты. А) В соответствие с ранее опубликованными данными, генерация H_2O_2 митохондриями печени наблюдалась только в присутствии системы детекции одновременно с митохондриями. В митохондриях, инкубированных без системы детекции, аккумуляция H_2O_2 не наблюдалась, что указывает на значительную мощность митохондриальной системы детоксикации H_2O_2 . Общий уровень продукции перекиси митохондриями печени был весьма незначительна даже в присутствии системы детекции, не более чем 0.02-0.05% от общего количества потребляемого кислорода (100-200 пикомоль H_2O_2 в мин/мг белка, при потреблении кислорода 40-50 наномоль/мин/мг). Потребление кислорода в условиях эксперимента определялось при помощи кислородного электрода типа Кларка, система Oxymeter, Hansatech, UK).

Б) Мы также оценили способность митохондрий печени к катализу разложения H_2O_2 . Обнаружилось, что скорость разложения H_2O_2 митохондриями зависит от

количества исходно добавленной перекиси. При этом добавленное количество убывает экспоненциально по времени, в присутствии митохондрий. Эти данные существенно отличаются от опубликованных ранее (Starkov A. “The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling), где была показана линейная зависимость убывания перекиси от времени (т.е., реакция нулевого порядка). В силу экспоненциального характера функции, некорректно выражать скорость разложения H_2O_2 в нмоль/мин/мг, как это сделано нами в предыдущей указанной выше работе, так как скорость будет зависеть от концентрации добавленной перекиси водорода.

Выводы. Полученные данные четко указывают на то, что мощность антиоксидантной защиты митохондрий намного превышает их способность к генерации АФК, особенно при физиологических значениях концентрации АФК. Таким образом, биогенез митохондрий вызванный фибратами должен приводить к значительному увеличению емкости антиоксидантной защиты клеток печени, а не к усилению окислительного стресса.

КОРНЕВА Н.А.^{1,2}, ДМИТРИЕВ В.Г.²

¹ ФГБУН Институт Аналитического Приборостроения РАН, Санкт-Петербург, Россия

² ООО «Грин Плэнет», Санкт-Петербург, Россия

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ УСТАНОВКИ ГАЗОВОГО (ОЗОНОВОГО) ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЯ ТРУБОПРОВОДОВ И ВОДОВОДОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕСТ-ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ

Обеззараживание трубопроводов и тары является актуальной задачей для ряда производств пищевой, алкогольной промышленности, а также сельского хозяйства и предприятий водоканала. Более того, для нужд водоканала требуется периодическая дезинфекция протяженных водопроводов после прохождения по ним сточных вод. Крайняя необходимость обеззараживания обусловлена предотвращением неконтролируемого распространения бактерий по трубопроводу, а также замедлением процессов гниения, вызванные патогенными бактериями. В настоящее время для обеззараживания используется метод промывки бактерицидными средствами, однако, это

затратно с точки зрения реагентов и малоэффективно из-за большой протяженности водоводов.

Целью настоящей работы являлось определение эффективности использования озонкислородной газовой смеси для обеззараживания элементов трубопроводов и водоводов. Для оценки антимикробной (бактерицидной) активности озонкислородной газовой смеси были проведены испытания с использованием двух тест-штаммов микроорганизмов: *Escherichia coli* (кишечная палочка) и *Staphylococcus aureus* (золотистый стафилококк) из коллекции лаборатории кишечных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера. В качестве оборудования были использованы кислородный концентратор AirSep NewLife и генератор озона ОГНК-20.

Испытанные тест-штаммы микроорганизмов имели типичные морфологические, культуральные и ферментативные свойства, хорошо росли на питательных средах. Выбор для исследования этих микроорганизмов обусловлен тем, что они широко распространены в природе, воде, окружающей среде, они входят в группу «санитарно-показательных микроорганизмов», по наличию которых судят о фекальном загрязнении объектов окружающей среды (*Escherichia coli*). *Staphylococcus aureus* является индикаторным микроорганизмом, содержание которого нормируется в воздухе, пищевых продуктах и других эпидемиологически важных объектах. Выбор доз адекватен небольшим (10^2 КОЕ/мл) и значительным (10^6 - 10^8 КОЕ/мл) загрязнениям, характерным для сточных вод (КОЕ - колонии образующая единица).

Бактериологическому исследованию были подвергнуты пробы тест-штаммов, нанесенные на подложку из нержавеющей стали 12Х18Н10Т, до воздействия озонкислородной газовой смеси или атмосферного воздуха и сразу после воздействия в течение 30 или 10 минут озонкислородной газовой смеси при концентрации 50 мг/л или атмосферного воздуха (контроль).

После прекращения подачи озонкислородной смеси производилась дегазация камеры кислородом. В пробах, нанесенных на подложки, определяли число живых микроорганизмов тест-штаммов, используя количественный бактериологический метод.

В каждом эксперименте в опытных и контрольных пробах суспензии тест-штаммов количество живых бактерий подтверждали количественным посевом на питательные среды и микробное число выражали в КОЕ на 1,0 мл исследуемой пробы.

После воздействия озонкислородной газовой смесью на пробы, контаминированные микроорганизмами в концентрациях от 10^2 до 10^5 КОЕ каждого тест-штамма (*E. coli*, *S. aureus*) вне зависимости от морфологических свойств микроорганизмов (грамположительные или грамотрицательные, палочки или кокки) происходила гибель всех микроорганизмов, о чем свидетельствовало отсутствие роста жизнеспособных тест-штаммов микроорганизмов при посеве на питательные среды 1,0 мл пробы, по сравнению с контрольными пробами, в которых тест-штаммы сохранялись в первоначальной концентрации. Выявленный бактерицидный эффект озонкислородной газовой смеси закономерно отмечался при последующих (3-х кратных повторных) исследованиях.

Результаты исследований показали, что озонкислородная газовая смесь обладает антимикробной активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, которые относятся к группе санитарно-показательных микроорганизмов, в том числе возбудителей инфекционных заболеваний человека:

1. Воздействие озонкислородной газовой смеси дезинфицировала испытуемые пробы от микроорганизмов, содержание которых составляло 10^2 - 10^5 КОЕ в 1,0 мл

2. Озонкислородная газовая смесь проявляла антимикробное действие в пробах, содержащих большие дозы микроорганизмов тест-штаммов (10^6 - 10^8 КОЕ в 1,0 мл), что выражалось в уменьшении уровня жизнеспособных клеток в 50 - 100 раз.

Выражаем благодарность д.м.н., профессору Кафтыревой Лидии Алексеевне и коллективу лаборатории кишечных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера за помощь в проведении испытаний и предоставленные тест-штаммы микроорганизмов.

КОРНЕВА Н.А.², КЛЮЕВА Н.З.¹, ПЕТРОВА Е.И.¹, АЛЬДЕКЕЕВА А.С.^{1,2}

¹УРАН Институт Физиологии им.И.П.Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия,

²ФГБУН Институт Аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург, Россия

ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКА NAP-22 В ПОЧКАХ КРЫС СО СПОНТАННОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ (ЛИНИЯ SHR) В РАННЕМ ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ И ВЛИЯНИЕ НА НЕЕ УРОВНЯ ПОТРЕБЛЕНИЯ КАЛЬЦИЯ У РОДИТЕЛЬСКИХ ПОКОЛЕНИЙ

Для животных со спонтанной гипертензией характерны генетически детерминированные нарушения механизмов, поддерживающих уровень внутриклеточного не связанного кальция. У них нарушается работа кальциевых каналов и транспортеров клеточной мембраны, изменяется активность рианодиновых рецепторов и других кальций-транспортирующих структур эндоплазматических мембран в таких клетках, как кардиомиоциты, ГМК сосудистой стенки и нейроны. Как было показано С.К.Чуриной и ее сотрудниками в этих условиях заметно возрастает роль экзогенного кальция, особенно если его недостаточность поддерживается на протяжении жизни нескольких поколений. Мы показали, что в раннем онтогенезе у крыс линии SHR в нейронах различных отделов коры головного мозга меняется экспрессия белка NAP-22, мажорного субстрата кальций-зависимой протеинкиназы С, образующего комплекс с кальций-связывающим белком кальмодулином, а так же, что на ее уровень влияет дефицит экзогенного кальция. Такие изменения связаны с нарушением формирования нейрональных сетей и ухудшению развития таких животных в онтогенезе.

Артериальная гипертензия всегда сопровождается гипертензивной нефропатией и почечной недостаточностью (Baggi Y.M., 2008), однако роль нарушений кальциевого обмена в клетке и влияния диетарного кальция в их развитии совершенно не изучена. Поэтому мы исследовали экспрессию белка NAP-22 в почках крысят линии SHR в возрасте 5, 13, 18 и 30 дней. В первой группе животные (самцы и самки) получали нормализованную по кальцию воду в течение всей жизни, включая период вскармливания потомства, а во второй – начиная с возраста 4 недели и до момента забоя пометов.

У крысят, полученных от крыс SHR первой группы, в почках экспрессия мРНК NAP-22 была достоверна в возрасте 5 дней и она была существенно ниже, чем у крыс той

же линии, не получавших кальций. В дальнейшем у этих животных уровень экспрессии снижался вплоть до полного исчезновения.

У крысят 5-дневного возраста из кальций-дефицитной группы наблюдался высокий уровень экспрессии мРНК NAP-22, который в последующий период (13 – 30 дней) постепенно снижался. При этом, чем ниже у животных изначально был этот показатель - уровень экспрессии белка NAP-22, тем более существенное его уменьшение происходило к 18 дневному возрасту. Однако, к моменту начала формирования у животных спонтанной гипертензии (30 дней) у всех них уровень экспрессии мРНК NAP-22 был почти одинаков, но значительно выше, чем у животных первой группы.

Белок NAP-22 в различных органах и тканях обнаруживается при различных патологических состояниях, включая онкологические заболевания, сердечно-сосудистые нарушения и заболевания почек. У крыс линии SHR значительное отклонение содержания NAP-22 в почках от нормы было обнаружено при диабетической нефропатии, а у людей при гипертензивной нефропатии обнаружена тенденция к увеличению уровня внутриканальцевой мРНК NAP-22. Возможно, что причиной этому служит перегрузка цитозоля в таких условиях свободным кальцием, что активирует протеинкиназу C, мажорным субстратом которой является NAP-22. Более выраженные эффекты дефицита экзогенного кальция на его экспрессию в почках, по сравнению с нервной тканью, могут быть связаны с большей ролью в эпителии трубочек, эндотелии и клетках интерстиции систем транспортеров, благодаря чему и нарушается внутриклеточный баланс электролитов, причем растет уровень не только кальция, но и натрия.

Наши результаты позволяют рассматривать уровень экспрессии мРНК NAP-22 в различных органах и тканях как ранний, диагностически ценный признак развития форм эссенциальной гипертензии, связанных с нарушениями обмена кальция в организме.

КОРОБОВ В.В.¹, ЖАРИКОВА Н.В.¹, ЯСАКОВ Т.Р.¹, АНИСИМОВА Л.Г.¹,
САГИТОВА А.И.², ХАРИСОВА А.Р.², ЖУРЕНКО Е.Ю.^{1,3}, МАРКУШЕВА Т.В.^{1,3}

¹Институт биологии Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия

²Башкирский Государственный Педагогический Университет им. М.Акмиллы, Уфа, Россия

³Учебно-научный центр БГПУ им. М.Акмиллы и ИБ УНЦ РАН, Уфа, Россия

МИКРООРГАНИЗМЫ РОДОВ *AGROBACTERIUM* И *GLUCONOBACTER* КАК ОБЪЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИЙ ЗАЩИТЫ СРЕДЫ

Одну из крупнейших групп загрязнителей природной среды составляют хлорфеноксиуксусные кислоты, способные к адсорбции биологическими и осадочными материалами биосферы. Безопасные и экономически выгодные методы уничтожения таких загрязнений в настоящее время разрабатываются на основе микроорганизмов, обладающих специальными системами акцептирования и превращения молекул ксенобиотиков в безопасные формы, а также способностью полностью расщеплять токсичные соединения. Использование микроорганизмов позволяет осуществить переработку значительных объемов загрязнений без образования продуктов вторичной контаминации. Поэтому современный этап исследований микробиологического воздействия на ксенобиотики характеризуется выраженным практическим интересом к поиску и изучению эффективных штаммов-деструкторов.

Целью исследования являлось выделение новых культур бактерий, способных к конверсии хлорфеноксиуксусных кислот, а именно 4-хлорфеноксиуксусной (4-ХФУК), 2,4-дихлорфеноксиуксусной (2,4-Д) и 2,4,5-трихлорфеноксиуксусной (2,4,5-Т) кислот.

Объектами исследования служили природные консорциумы почвенных микроорганизмов, подвергавшихся длительному воздействию факторов нефтехимического производства. Согласно морфологическим, морфометрическим, физиологическим и биохимическим критериям систематики бактерий из смешанных популяций были выделены штаммы *Agrobacterium tumefaciens* 21SG и *Gluconobacter oxydans* 2Т. Показано, что выделенные деструкторы накапливают биомассу в периодической культуре и проявляют активность по отношению к хлорфеноксиуксусным кислотам. Так, штамм *Agrobacterium tumefaciens* 21SG использовал 4-ХФУК на 62%, 2,4-Д на 66%, 2,4,5-Т на 82% от контроля. Штамм *Gluconobacter oxydans* 2Т утилизировал 4-ХФУК на 15%, 2,4-Д

на 69%, 2,4,5-Т на 73% от исходной концентрации. Из приведенных данных следует, что выделенные штаммы способны осуществлять конверсию 2,4,5-Т, 2,4-Д и 4-ХФУК. Ранее среди деструкторов хлорфеноксиуксусных кислот не были отмечены штаммы родов *Agrobacterium* и *Gluconobacter*. Методом ДНК-ДНК гибридизации по Саузерну показано, что детерминанты катаболизма хлорфеноксиуксусных кислот геномов исследуемых штаммов, имеют существенные отличия от изученного ранее кластера деградации плазмиды рJP4 штамма *Alcaligenes eutrophus* JMP134.

Резюмируя полученные данные, можно заключить, что из популяций почвенных микроорганизмов, подвергавшихся воздействию факторов нефтехимического производства, выделены новые бактерии-деструкторы хлорфеноксиуксусных кислот. Штаммы рекомендуются к применению при разработке методов очистки окружающей среды.

Работа выполнена при поддержке Программы Президиума РАН «Живая природа: современное состояние и проблемы развития», и гранта АН РБ «Биотехнологические способы воспроизводства и рационального использования биологических ресурсов».

КОРОЛЕВА А.В., ЛУКАНИНА Ю.К., МОНАХОВА Т.В.,
ХВАТОВ А.В., ПОПОВ А.А.

*Учреждение российской академии наук институт биохимической физики
им. Н.М. Эмануэля, Москва, Россия*

ОКСО-БИОРАЗЛАЖЕНИЕ ПЛЕНОК НА ОСНОВЕ ПЭНП С ДОБАВЛЕНИЕМ ПРИРОДНЫХ И СИНТЕТИЧЕСКИХ ДОБАВОК

В последние несколько лет пластиковая упаковка является основным виновником загрязнения окружающей среды. Поскольку многие пластиковые изделия, например пакеты, редко повторно используются их, как правило, просто выбрасывают после первого и единственного использования. После чего они долгими десятилетиями медленно разлагаются на городских свалках. В целях решения этой проблемы в полиэтиленовую матрицу вводят добавки различной природы (синтетические и природные) для ее скорейшего разложения в условиях окружающей среды.

Объектами исследования послужили образцы на основе ПЭНП с добавками, различной природы: D2W, PDQ-H, UV-H (1%) (промышленно выпускаемые добавки для оксо-биоразложения); крахмал (30%), целлюлоза (10%) (природные добавки). Смеси были получены на лабораторном смесителе типа Брабендер при 140°C, затем распрессованы для получения пленок. Полученные образцы были подвергнуты окислению кислородом воздуха при повышенной температуре (90°C), окислению чистым кислородом при температуре выше температуры плавления ПЭНП (130°C) и давлении 600 мм.рт.ст., а так же проведены исследования по оценке их водопоглощения.

При окислении кислородом воздуха образцы были помещены в термощкаф при температуре ниже температуры плавления ПЭ (90°C). Для контроля процесса окисления был выбран метод ИК-Фурье спектроскопии. За контрольную величину была выбрана полоса поглощения соответствующая карбонильным группам - 1715 см⁻¹. Измерения проводили каждый час. В ходе эксперимента было выявлено, что ПЭНП не окисляется на воздухе при 90°C. Для образцов с синтетическими добавками идет накопление карбонильных групп, для ПЭ/D₂W рост составляет 200%, для ПЭ/PDQ-H - 87%, для ПЭ/UV-H - 17%. Введение натуральных добавок, поглощение кислорода не увеличивает, т.е. они не ускоряют процесс окисления ПЭНП.

Измерение поглощения кислорода было проведено при температуре 130°C, при давлении кислорода 600 мм.рт.ст., в течение 900 мин. Как и при T=90°C скорость поглощения кислорода выше для смесей с синтетическими добавками, чем для смесей с натуральными добавками. Образец ПЭНП/PDQ-H поглощает кислород в 100 раз быстрее, чем в смеси ПЭНП/целлюлоза и ПЭНП/крахмал.

Степень водопоглощения оценивали по относительному приросту массы во время экспозиции образцов в дистиллированной воде при 30°C, в течение 17 дней. Натуральные добавки увеличивают поглощение воды, в то время как синтетические добавки ведут себя инертно. Причиной водопоглощения для смесей ПЭНП с натуральными добавками является их гидрофильность. Они состоят из полисахаридов, в состав которых входит большое количество полярных групп, приводящих к ускорению поглощения воды, и как следствие может приводить к ускорению биodeградации. Кроме того, молекулы воды нарушают микроструктуру полимера, и может способствовать проникновению ферментов, выделяемых микроорганизмами, в полимер.

Проведенные исследования показали, что введение синтетических промышленных оксо-биоразлагаемых добавок ускоряет окисление образцов, что является одним из начальных этапов биodeградации. Природные добавки, набухая в воде, делают возможным проникновение микроорганизмов в объем полимерной матрицы.

КОСТАРЕВА О.С.¹, ЛИН Ч.², ТИН У.Ф.¹,
ТИЩЕНКО С.В.¹, КАТАНАЕВ В.Л.^{1,2}, ГАРБЕР М.Б.¹

¹ *Институт белка РАН, Пуццино, Россия*

² *Отделение фармакологии и токсикологии университета Лозанны, Лозанна, Швейцария*

ПОЛУЧЕНИЕ И КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ КОМПЛЕКСА $G\alpha_o$ СУБЪЕДИНИЦЫ ГЕТЕРОТРИМЕРНОГО G-БЕЛКА С RGS-БЕЛКОМ CG5036 ИЗ ДРОЗОФИЛЫ

Гетеротримерные G-белки участвуют в системе переноса сигнала от рецепторов, расположенных на поверхности клеток, к эффекторным молекулам в цитоплазме. При взаимодействии с сигнальными рецепторами $G\alpha$ субъединица гетеротримерного G-белка связывается с ГТФ, что приводит к диссоциации субъединиц и их взаимодействию с эффекторными белками для передачи сигнала. Белки семейства RGS (**R**egulator of **G**-protein **S**ignaling), взаимодействуют, как правило, с $G\alpha$ /ГТФ, что приводит к стимуляции гидролиза ГТФ и к завершению передачи сигнала.

Недавно нами было показано, что белок CG5036 из дрозофилы может связываться не только с $G\alpha_o$ /ГТФ, но и с $G\alpha_o$ /ГДФ формой белка из дрозофилы, в результате чего ингибируется замена ГДФ на ГТФ. Таким образом, CG5036 обладает двойным негативным действием на $G\alpha_o$ - предотвращает связывание белка с ГТФ и образование активной формы $G\alpha_o$, а также способствует переходу белка в неактивное состояние, ускоряя гидролиз ГТФ на белке.

Целью нашей работы являются структурные исследования необычного взаимодействия CG5036 с $G\alpha_o$ субъединицей из дрозофилы. Для кристаллизации комплекса необходимо получить высокоочищенные белки в количествах, достаточных для кристаллизации, а также показать наличие стабильного комплекса.

Нами была создана конструкция, несущая ген белка CG5036 с гексагистидиновой последовательностью на N-конце. Известно, что N-концевая часть белка CG5036 неструктурирована, RGS-домен находится в C-концевой части белка. Мы также создали генетическую конструкцию, несущую укороченную на 109 аминокислотных остатков с N-конца версию белка CG5036 (CG5036₋₁₀₉) с гексагистидиновой последовательностью на N-конце. Белки были получены и очищены на смоле Ni-NTA агароза. Показано, что укороченная форма белка обладает такой же каталитической активностью, как и целый белок.

Поскольку известно, что N-концевая часть белка $G\alpha_o$ также неупорядочена, мы использовали для формирования комплекса укороченную на 21 аминокислотный остаток с N-конца форму $G\alpha_o$ ($G\alpha_{o-21}$). Образование белок-белкового комплекса было показано тремя методами – гель-фильтрацией (на смоле Superdex 75), аналитического ультрацентрифугирования и с помощью «pull-down» теста.

В настоящее время ведётся работа по кристаллизации белка CG5036₋₁₀₉ как в свободном виде, так и в комплексе с $G\alpha_{o-21}$ /ГТФ. Получены первые микрокристаллы белка и белкового комплекса.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (№ 11-04-00859) и Программы Президиума МКБ РАН.

КОСТИНА Н.В., НОВИКОВА Е.М., САЗЫКИНА М.А., ЧИСТЯКОВ В.А.

НИИ биологии Южного федерального университета, Ростов-на-Дону, Россия

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОБИОТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ *BACILLUSSUBTILIS*

Интерес к препаратам на основе споровых бактерий возник в последние несколько лет. Высокая антагонистическая активность в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, продукция биологически активных веществ обуславливают перспективность использования этих бактерий в качестве основы для разработки лечебно-профилактических препаратов. С использованием *Bacillus subtilis* созданы десятки новых пробиотических препаратов. Свойства некоторых штаммов этой группы бактерий

разнообразны и привлекательны. Бактерии продуцируют антибиотические вещества, ферменты. Пробиотический препарат на их основе нейтрализует разрушающее действие токсинов на организм животных, оказывает комплексное противовоспалительное и иммуностимулирующее действие.

В данной работе была изучена антиоксидантная активность пробиотика на основе бактерий *Bacillus subtilis*.

С этой целью использовались бактериальные lux-биосенсоры *E. coli* MG1655 (pKatG-lux) и *E. coli* MG1655 (pSoxS-lux). Материалом исследования служил пробиотик на основе *Bacillus subtilis*, приготовленный методом твердофазной ферментации.

Принцип определения антиоксидантной активности состоял в определении способности экстракта пробиотика ингибировать окислительные процессы, вызванные присутствием перекиси водорода, диоксида и параоквата, при помощи биолюминесцирующих бактерий.

С помощью бактериального lux-биосенсора *E. coli* MG1655 (pKatG-lux) была определена антиоксидантная активность по отношению к перекиси водорода в концентрации 10^{-3} М и диоксидину в концентрации $2,25 \cdot 10^{-5}$ М. Величина ее составила 59,34 % и 44,94 %, соответственно.

Антиоксидантная активность, определенная с помощью бактериального lux-биосенсора *E. coli* MG1655 (pSoxS-lux), по отношению к диоксидину в концентрации $2,25 \cdot 10^{-5}$ М составила 29,25%, а по отношению к параоквату в концентрации 10^{-3} М – 42,38%.

Таким образом, опираясь на полученные данные, можно сделать вывод, что пробиотик на основе *Bacillus subtilis* обладает антиоксидантным действием. Он способен не только подавлять патогенную микрофлору, но и снижать негативное действие, вызванное окислительными процессами.

КОТЛОВ М.И.¹, РЕВТОВИЧ С.В.², МОРОЗОВА Е.А.²,
АНУФРИЕВА Н.В.², БЕЛЫЙ Ю.Ф.¹, ДЕМИДКИНА Т.В.²

¹ФГБУ «НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздравсоцразвития РФ, Москва, Россия

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

МЕТИОНИН-ГАММА-ЛИАЗА ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ – ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ МИШЕНЬ ДЛЯ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ СРЕДСТВ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

Метионин-гамма-лиаза (МГЛ) принадлежит к классу пиридоксаль-5'-фосфат-зависимых ферментов, принимающих участие в метаболизме серосодержащих аминокислот у многих патогенных бактерий. Данные ферменты отсутствуют у млекопитающих. В связи с этим было высказано предположение о том, что МГЛ могут служить мишенями для новых антибактериальных средств, созданных на основе их ингибиторов и/или суицидальных субстратов.

В настоящей работе первоначально был проведен поиск в генетических базах данных патогенных бактерий и анализ аминокислотных последовательностей, которые могут представлять метионин- γ -лиазу. Белки, обладающие структурными свойствами МГЛ, были обнаружены у *Porphyromonas gingivalis* (возбудитель агрессивного пародонтита), *Clostridium sporogenes* (возбудитель газовой гангрены), *C. difficile* (возбудитель антибиотикоассоциированных диарей и псевдомембранозного колита), *C. tetani* (возбудитель столбняка) и *Brucella melitensis* (возбудитель бруцеллёза). Кодированные нуклеотидные последовательности были амплифицированы в полимеразной цепной реакции и клонированы в составе экспрессирующего вектора pET-28.

Плазмиды, содержащие вставку с генами предполагаемых МГЛ, трансформировали в штамм *E. coli* BL21 (DE3), который использовали в дальнейшем для наработки рекомбинантного белка. Все кодируемые белки содержали на N-концевых участках полипептидных цепей последовательность из 6 остатков гистидина, используемую для выделения белков методом никель-аффинной хроматографии. Нами показано, что все клонированные гены эффективно экспрессировались в штаммах-продуцентах, что позволяло выделять высокоочищенные препараты в количествах до 5 мг/100 мл культуры.

При определении кинетической активности полученных препаратов было выявлено, что белок, заявленный в базах данных в качестве МГЛ *C. difficile* и *B. melitensis*, не катализировал реакцию γ -элиминирования метионина и, следовательно, не являлся данным ферментом. В противоположность этому белки *P. gingivalis*, *C. tetani* и *C. sporogenes* проявляли высокую активность в ферментативной реакции и представляли собой типичные МГЛ.

Таким образом, нами были впервые получены и охарактеризованы ферментативно-активные препараты МГЛ *P. gingivalis*, *C. tetani* и *C. sporogenes*, пригодные для создания на их основе новых антибактериальных средств.

КОЧКИН Д.В.¹, ДЕМИДОВА Е.В.², ТИТОВА М.В.², НОСОВ А.М.^{1,2}

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

²Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН, Москва, Россия

ВЛИЯНИЕ СТЕПЕНИ ОЧИСТКИ САХАРОЗЫ НА НАКОПЛЕНИЕ ГИНЗЕНОЗИДОВ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК *PANAX JAPONICUS* VAR. *REPENS* ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ В АППАРУТУРЕ ПОЛУПРОМЫШЛЕННОГО ОБЪЕМА

Культура клеток высших растений является уникальной системой, эффективное использование которой позволяет решить не только фундаментальные, но и многие практические задачи. В частности, культуры клеток и тканей растений *in vitro* могут служить альтернативным природному источником лекарственного растительного сырья. При промышленном выращивании культур клеток большое значение имеет оптимизация состава сред культивирования. При этом важным моментом является выбор источника углеводного питания культуры, стоимость которого в большой степени определяет рентабельность процесса выращивания. В этой связи особое значение имеет выяснение закономерностей образования гинзенозидов при крупномасштабном выращивании культуры клеток *P. japonicus* var. *repens* на средах, содержащих сахарозу разных степеней очистки.

Суспензионная культура клеток женьшеня японского (*Panax japonicus* С. А. Меу. var. *repens* Maxim.), полученна в 1998 году из каллуса корня интактного двулетнего

растения (Приморский край, Россия). Зарегистрирована во Всероссийской коллекции культивируемых клеток высших растений под № 62.

Эксперимент проводили в 500 л биореакторе барботажного типа (1Т, ОКБА, Йошкар-Ола). Было проведено три последовательных цикла выращивания, общее время культивирования составило 59 суток. Первый цикл выращивания (14 суток) осуществляли с использованием химически чистой сахарозы производства фирмы Merck (Германия), второй и третий (по 21 и 24 суток, соответственно) — смеси 1:1 химически чистой сахарозы и сахарозы пищевой (сахар-рафинад, «Евросахар», Гост 22. 94, Россия). Содержание гинзенозидов определяли с помощью ВЭЖХ методом внешней калибровки.

Анализ ростовых характеристик культуры показал, что наибольшее накопление биомассы (8,9 г/л по сухому весу) отмечалось только в первом цикле выращивания. При этом во втором и третьем циклах выращивания максимальное накопление биомассы по сухому весу не превышало 7 г/л. Полученные результаты свидетельствуют, что степень очистки сахарозы может оказывать существенное влияние на ростовые характеристики культуры клеток *P. japonicus* var. *repens*.

Установлено, что в пределах двух первых циклов культивирования содержание суммы гинзенозидов менялось слабо, и находилось в пределах 4-5% от веса сухой биомассы клеток. В третьем цикле происходило существенное увеличение содержания гинзенозидов — наибольшее значение этого показателя (9,3% от веса сухой биомассы клеток) отмечено на 48 сутки культивирования.

Особый интерес вызывает тот факт, что в третьем цикле произошло повышение содержания в биомассе самого неполярного из изученных гинзенозидов — гипенозида XVII (на 48 сутки культивирования его выход составил 2,3% от веса сухой биомассы клеток).

На основании представленных результатов можно предположить, что усиление образования гинзенозидов (особенно гипенозида XVII) является реакцией культуры клеток *P. japonicus* var. *repens* на стресс, вызванный изменением качественных характеристик источника углерода в среде культивирования — сахарозы.

Работа поддержана ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009—2013 годы, лот № П403 и грантом РФФИ № 11-04-90432-Укр_ф_а.

КОЧКИН Д.В., НОСОВ А.М.

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

ТРИТЕРПЕНОВЫЕ ГЛИКОЗИДЫ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ЯПОНСКОГО ЖЕНЬШЕНЯ *PANAX JAPONICUS VAR. REPENS*

В 2012 году исполняется пятьдесят лет со дня открытия основных биологически активных веществ женьшеня (род *Panax* L.) — тритерпеновых гликозидов даммаранового ряда — гинзенозидов. За прошедшие полстолетия достигнуты немалые успехи в изучении структурного разнообразия этих соединений в интактных растениях.

Работы по исследованию культур клеток и тканей женьшеня *in vitro* стартовали одновременно с открытием гинзенозидов, однако достижения в изучении этих соединений в условиях стерильной культуры выглядят скромнее. Только сравнительно недавно была доказана возможность образования в условиях культуры клеток женьшеня японского минорных и нестабильных ацилированных (малонильных) производных гинзенозидов. Однако закономерности их накопления в процессе роста культуры клеток оставались неизученными.

В настоящей работе проведено изучение закономерностей образования индивидуальных гинзенозидов в суспензионной культуре клеток *P. japonicus var. repens* при выращивании в колбах. Содержание гинзенозидов определяли с помощью ВЭЖХ методом внешней калибровки.

Установлено, что на протяжении цикла выращивания в биомассе культуры клеток присутствовали все исследуемые гинзенозиды — Re+Rg₁, R₀, малонил-Rb₁, Rb₁, R_c, Rb₂, R_d и гипенозид XVII. При этом основной вклад в общее содержание гинзенозидов (более 80%) вносили гинзенозиды Re+Rg₁ (гликозиды протопанаксатриола), R₀ (гликозид олеаноловой кислоты) и малонил-Rb₁ (гинзенозид протопанаксадиола). На долю остальных гинзенозидов (все — производные протопанаксадиола) в различные периоды роста приходилось не более 15% от общего содержания гинзенозидов. Гипенозид XVII всегда присутствовал в биомассе в следовых количествах (менее 0,03% от веса сухой биомассы клеток). В течение цикла выращивания содержание суммы гинзенозидов менялось слабо, и находилось в пределах 3,0-3,8% от веса сухой биомассы клеток.

Полученные результаты свидетельствуют, что все многообразие тритерпеновых гликозидов культуры клеток *P. japonicus* var. *repens* можно разделить на три основные группы: гликозиды протопанаксатриола (Re+Rg₁), гликозиды олеаноловой кислоты (R₀) и гликозиды протопанаксадиола (малонил-Rb₁, Rb₁, Rc, Rb₂, Rd и гипенозид XVII). При этом гинзенозиды Re+Rg₁, R₀ и малонил-Rb₁, очевидно, являются основными продуктами метаболизма гликозидов каждого структурного типа. Накопление этих гликозидов в клетках *P. japonicus* var. *repens in vitro* может достигать значительных значений (до 5% от веса сухой биомассы клеток).

Культура клеток высших растений *in vitro* является популяцией соматических клеток, основной критерий отбора в которой — стабильно высокая пролиферативная активность клеток. Поэтому образование в культуре клеток *P. japonicus* var. *repens* большого количества вторичных метаболитов, таких как гинзенозиды, должно быть неразрывно связано с их перераспределением в метаболически неактивные компартменты клетки. Однако механизмы, на основе которых осуществляется компартментация гинзенозидов разных структурных классов, по всей видимости, неодинаковы. Так, уникальное строение гликозидов протопанаксатриола, которые содержат редко встречающийся в природе способ присоединения углеводного фрагмента (к шестому положению даммарана), вероятно, делает их устойчивыми к действию различных гликозилгидролаз. Поэтому накопление гинзенозидов Re+Rg₁ может происходить без существенного ущерба для жизнедеятельности клеток *P. japonicus* var. *repens in vitro*. С другой стороны, гинзенозиды группы протопанаксадиола являются уязвимыми для неспецифического расщепления, поскольку β -гликозидная связь у третьего положения агликона — весьма распространенный в природе структурный мотив. В настоящее время установлено, что у растений существует несколько механизмов предотвращения неспецифического гидролиза гликозидов. В частности, на примере флавоноидов доказано, что присоединение малоновой кислоты к первичной спиртовой группе остатка глюкозы делает соответствующие гликозиды устойчивыми к гликозилгидролазам и способствует их перераспределению в вакуоль. Тот факт, что в клетках *P. japonicus* var. *repens in vitro* гинзенозиды протопанаксадиола (прежде всего Rb₁) представлены в основном в виде своих малонильных эфиров — по всей видимости, является еще одним примером реализации описанного механизма регуляции метаболизма глико-конъюгатов в

растительной клетке. Однако для окончательного доказательства этого утверждения, безусловно, требуются дополнительные исследования.

Работа выполнена при поддержке РФФИ грант № 11-04-90432-Укр_ф_а.

КРАСНОВ М.С.¹, ЯМСКОВА В.П.², ЯМСКОВ И.А.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва, Россия

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Россия, Москва, Россия

БИОРЕГУЛЯТОРЫ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ ТКАНЕЙ ГЛАЗА ПОЗВОНОЧНЫХ

В настоящее время биорегуляторы данной группы обнаружены в различных тканях животных и растений; они выделены в отдельное семейство на основании: нового экспериментального подхода, разработанного для их идентификации и исследования (метод выделения из тканей, методика очистки, метод биотестирования, методы для изучения специфической биологической активности); их способности проявлять активность в сверхмалых дозах (СМД) (10^{-8} – 10^{-15} мг в мл); сходства физико-химических свойств. Показано, что биорегуляторы данной группы в СМД оказывают влияние на такие важные биологические процессы как: клеточная адгезия, миграция клеток, клеточная пролиферация, дифференцировка клеток, биорегуляторы поддерживают жизнеспособность клеток *in vitro*. Биорегуляторы стимулируют восстановление и репарацию в патологически измененных тканях. Их биологическая активность характеризуется отсутствием видовой, но проявлением тканевой специфичности. Предполагается, что их биологическое действие в микродозах реализуется в рамках концепции, в основе которой лежат представления о нарушениях регуляции органо-тканевого гомеостаза, как первопричины развития любой патологии. На основании результатов, полученных при исследовании биологической активности регуляторов данной группы, было высказано предположение об их роли "тонких настройщиков" органо-тканевого гомеостаза у позвоночных животных и человека. В состав биорегуляторов входят низкомолекулярные регуляторные пептиды (РП) (значение «кажущейся» молекулярной массы менее 10 кДа) и белков, модулирующих их

активность - белков-модуляторов. Как показали полученные нами результаты, активным веществом биорегуляторов являются низкомолекулярные РП. Их взаимодействие с белками-модуляторами опосредовано ионами Ca^{+2} . Во всех тканях млекопитающих (в том числе, и в тканях глаза) белки-модуляторы являются представителями мультисемейства альбуминов сыворотки крови. Установлено, что РП и белки-модуляторы в растворах присутствуют в виде наноразмерных частиц, которые, возможно, путем самосборки образуются в межклеточном пространстве тканей. Предполагается, что, взаимодействуя между собой, эти наночастицы формируют, так называемый, «малый матрикс» - надмолекулярную структуру межклеточного пространства, которая играет важнейшую роль не только в передаче регуляторного сигнала, но и в транспорте веществ к клеткам благодаря уникальному свойству сывороточных альбуминов взаимодействовать с различными веществами, проявляющими как гидрофильные, так и гидрофобные свойства. Методами иммуногистохимии показано, что биорегуляторы локализованы в межклеточном пространстве тканей. Разработка новых экспериментальных моделей для изучения специфического действия биорегуляторов данной группы в СМД явилась ключевым моментом этого исследования. На различных экспериментальных моделях *in vitro* и *in vivo* было продемонстрировано протекторное свойство биорегуляторов в СМД, которое выражалось в их влиянии на поддержание или восстановление соответствующей структуры ткани глаза. Учитывая отсутствие видовой специфичности активности биорегуляторов данной группы, многие экспериментальные серии были проведены на тритонах *Pleurodeles waltl*. Известно, что ткани хвостатых амфибий обладают большими регенераторными способностями и более жизнеспособны, по сравнению с тканями млекопитающих, в условиях органотипического культивирования *in vitro*. Экспериментальные модели для исследования специфической биологической активности биорегуляторов данной группы основаны на органотипическом культивировании тканей (например, глаза), при котором сохраняются не только межклеточные адгезионные взаимодействия, но и адгезия между отдельными тканями. Было показано, что биорегулятор, выделенный из роговицы глаза быка, в СМД стимулирует клеточные источники регенерации в этой ткани. Мы полагаем, что органотипическое культивирование тканей взрослых особей позвоночных, в том числе, и хвостатых амфибий, является адекватной моделью для исследования биологически активных

веществ, оказывающих влияние на основные биологические процессы, которые определяют функциональное состояние ткани. В настоящее время на основе биорегуляторов данной группы разработаны офтальмологические препараты нового поколения, которые на ограниченных клинических испытаниях на добровольцах показали свою эффективность действия при таких распространенных глазных заболеваниях как: катаракта, миопия, различные дистрофии сетчатки, кератопатии различной этиологии, витреоретинальных заболеваний.

КРИВОШЕЕВ Д.М.¹, КОЛЯЧКИНА С.В.², МИХАЙЛОВ С.Н.²,
ТАРАРОВ В.И.², РОМАНОВ Г.А.¹

¹*Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия*

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

№⁶-(БЕНЗИЛОКСИМЕТИЛ)АДЕНОЗИН - НОВОЕ СОЕДИНЕНИЕ С АНТИЦИТОКИНИНОВОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Цитокинины представляют собой большую группу природных и синтетических соединений – производных аденина или фенилмочевины. Природные цитокинины относятся к классическим фитогормонам и участвуют в регуляции роста и развития, а также в адаптации растений к внешним воздействиям. В настоящее время для изучения особенностей действия и сигналинга гормонов применяют различные подходы, в том числе активацию или подавление биосинтеза или распада гормона, а также блокирование генов рецепторов и элементов трансдукции сигнала. Полезным инструментом исследований являются антигормоны, которые способны подавлять действие гормона на уровне его рецепции. Такие антигормоны называют рецепторными антагонистами; они наиболее специфично ингибируют действие соответствующего гормона. Рецепторные антагонисты нашли широкое применение в изучении механизма действия гормонов животных, а также с успехом применяются и в медицинской практике. В исследованиях гормональной регуляции у растений также предпринимались попытки получения и использования антигормонов, хотя успехи в этой области пока очень ограничены.

В самое последнее время были обнаружены первые соединения, которые проявляли настоящую антицитокининовую активность, то есть способность подавлять сигналинг цитокининов именно на уровне их рецепторов. Данные антицитокинины конкурентно ингибировали связывание цитокининов с рецепторами растений арабидопсиса и при этом сами по себе не вызывали гормональные эффекты в биотестах. Этими соединениями оказались производные 6-бензиламинопурина (БАП): N^6 -(2-гидрокси-3-метилбензиламино)пурин (PI-55) и N^6 -(2,5-дигидроксибензиламино)пурин (LGR-991).

В настоящей работе нам впервые удалось выявить антицитокининовую активность производного аденина иного строения: N^6 -(бензилоксиметил)аденозина (БОМА). Это соединение принципиально отличается от двух ранее описанных антицитокининов наличием остатка кислорода в цепочке атомов, соединяющей ароматическое кольцо с N^6 аденина, а также отсутствием модификаций бензольного остатка.

В опытах по лиганд-рецепторному взаимодействию, проводившихся с использованием трансгенных бактерий (*E. coli*), экспрессирующих индивидуальные цитокининовые рецепторы арабидопсиса, было показано, что БОМА способен связываться с рецепторами, в первую очередь с рецептором CRE1/АНК4 (K_D для рецепторов CRE1/АНК4 и АНК3 примерно 230 и 3500 нМ, соответственно). Однако при этом реакция в биотесте с использованием проростков двойных мутантов арабидопсиса с заблокированными инсерцией двумя из трех генов рецепторов цитокининов и экспрессирующих репортерный ген *GUS* под контролем цитокинин-специфичного промотора гена *ARR5* ($P_{ARR5}:GUS$ арабидопсис) была крайне слабой (для рецептора АНК3) или отсутствовала вовсе (для рецептора CRE1/АНК4). Это позволило предположить, что данное соединение обладает антицитокининовой активностью, в первую очередь для рецептора CRE1/АНК4.

БОМА был проверен на способность подавлять физиологическое действие типичного цитокинина БАП. В качестве контроля было взято производное аденина PI-55. При проведении биотеста на проростках мутантного $P_{ARR5}:GUS$ арабидопсиса, экспрессирующего единственный рецептор CRE1/АНК4, было показано, что БОМА достоверно ингибирует действие БАП при их совместном добавлении к проросткам. При этом эффекты БОМА и антицитокинина PI-55 практически совпали, что служит прямым подтверждением антицитокининовых свойств БОМА. Антицитокининовый эффект БОМА,

как и PI-55, отсутствовал на проростках, экспрессирующих АНК3 как единственный рецептор цитокининов.

Таким образом, в ходе данного исследования был выявлен новый антагонист цитокининового рецептора CRE1/АНК4, который заметно отличается по структуре от антагонистов, обнаруженных ранее. В перспективе, благодаря открытию рецепторов цитокининов и возможности исследовать индивидуальные рецепторы *in planta* и *in vitro*, можно ожидать обнаружения новых антицитокининов разной структуры и различного механизма действия и их применения для решения исследовательских и практических задач.

Работа выполнена при поддержке Программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и Российским фондом фундаментальных исследований (гранты 11-04-00614, 11-04-90491, 11-04-00026-а).

КРУШИНСКИЙ А.Л.¹, РЕУТОВ В.П.², КУЗЕНКОВ В.С.², КОШЕЛЕВ В.Б.²,
СОРОКИНА Е.Г.³, САЛЫКИНА М.А.³, САМОСУДОВА Н.В.⁴, БАЙДЕР Л.М.⁵,
КУРОПТЕВА З.В.⁵, МОЛДАЛИЕВ Ж.Т.⁵, ЕСИПОВ Д.С.¹, ГРАНСТРЕМ О.К.⁶,
СТЕРНАД А.И.¹, ОХОТИН В.Е.¹, СВИНОВ М.М.², КОСИЦЫН Н.С.², ПОЛЕТАЕВА И.И.¹,
КАМЕНСКИЙ А.А.¹, ПИНЕЛИС В.Г.³

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

²Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия;

³ГУ Научный Центр Здоровья Детей РАМН, Москва, Россия;

⁴Институт проблем передачи информации РАН, Москва, Россия;

⁵Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля, Москва, Россия

⁶Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова,
Санкт-Петербург, Россия

АНАЛИЗ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ ПЕПТИДНОГО ПРЕПАРАТА КОРТЕКСИНА НА РАЗВИТИЕ ГЕМОРРАГИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА У КРЫС ЛИНИИ КРУШИНСКОГО-МОЛОДКИНОЙ

Исследования были проведены на 52 крысах линии Крушинского-Молодкиной, генетически предрасположенных к геморрагическому инсульту. В работе были

использованы методы электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC), комплекс биохимических препаративных методик выделения ДНК, оптической и электронной микроскопии, а также анализ поведенческих реакций крыс линии Крушинского-Молодкиной, связанных с развитием двигательных нарушений, вызванных экспериментальным геморрагическим инсультом.

В поведенческих исследованиях установлено, что кортексин уменьшает вероятность развития двигательных нарушений, вызванных геморрагическим инсультом.

Оценка площади кровоизлияний. В наших экспериментах с помощью метода оптической микроскопии показано, что у опытных крыс, получавших кортексин, наблюдается значительное уменьшение площадей субдуральных и субрахноидальных кровоизлияний по сравнению с контрольными ($92,2 \pm 14,7$ и $34,4 \pm 13,9$ мм², соответственно $p < 0,01$), а также снижение площадей внутрижелудочковых кровоизлияний (76,9% и 30,8% соответственно, $p < 0,05$), что, в свою очередь, указывало на снижение развития кровоизлияний после введения кортексина по сравнению с контрольными животными, которым внутрибрюшинно вводили физиологический раствор.

Ультроструктурные исследования, проведенные с помощью метода электронной микроскопии, показали, что кортексин достоверно уменьшает развитие внутричерепных кровоизлияний. Кроме того установлено, что на уровне отдельных нейронов кортексин способен уменьшать отек и разрушение нейронов мозжечка при геморрагическом инсульте.

Молекулярно-биологические исследования. Установлено, что кортексин защищает клетки мозга от окислительного стресса, вызванного акустическим воздействием на крыс, генетически предрасположенных к геморрагическому инсульту. Показано, что под влиянием кортексина при геморрагическом инсульте в ДНК достоверно снижается отношение 8-охо-dG/dG, что может свидетельствовать о благотворном действии кортексина на генетический аппарат клеток.

Иммунологические исследования. Количественный анализ аутоантител к глутаматным рецепторам выявил, что у животных с предварительным введением кортексина снижаются аутоантитела как к AMPA-, так и к NMDA-рецепторам глутамата, причем уменьшение содержания аутоантител к NMDA-рецепторам было более выражено, чем к AMPA-рецепторам.

Исследования с помощью ЭПР содержания Hb-NO комплексов в крови и тканях животных. Обнаружено, что при введении кортексина животным содержание NO и гемоглобин-NO комплексов в крови снижается в 3-10 раз.

Исследования содержания пептидов и аминокислот в сыворотке крови при активации образования NO в организме млекопитающих. С помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВСХЖ или HPLC) белков и пептидов сыворотки крови и метода тонкослойной хроматографии было установлено, что активация образования NO в организме млекопитающих приводит к повышению содержания пептидов с молекулярной массой от 1,0 до 5,0 кДа в крови, снижению содержания L-аргинина и повышению содержания L-лизина.

Работа частично поддержана грантами РФФИ и РГНФ (09-04-00481-а; 10-06-00946а).

КРЮЧКОВ М. В., ЕНИН Г. А., СЕРГЕЕВ А.В.,

ТИМЧЕНКО А. А., КАТАНАЕВ В. Л.

Институт Белка РАН, Пущино, Россия

НАНОСТРУКТУРА ПОВЕРХНОСТИ ГЛАЗА МУШЕК

DROSOPHILA MELANOGASTER

Модельные организмы, такие как *Drosophila melanogaster*, играют важнейшую роль в биологических исследованиях. Глаз этого насекомого традиционно используется для изучения роли различных белков в органогенезе и формировании упорядоченных структур. В отличие от внутренней организации глаза дрозофилы, ее ретины, роговица глаза дрозофилы изучена мало, неизвестен даже ее белковый состав. Ранее нами было показано, что поверхность роговицы глаза дрозофилы покрыта псевдоупорядоченными наноструктурами около 30 нм в высоту и 200 нм в диаметре, выполняющими антиотражательную функцию (Kryuchkov и др.; 2011 PLoS ONE 6(7): e22237). Впервые методом АСМ была продемонстрирована возможность экспресс анализа наноструктуры поверхности глаза мушек. Нами также была продемонстрирована роль

Wnt-зависимого сигнального каскада в формировании наноструктур роговицы. Однако молекулярные механизмы формирования таких структур оставались неизвестны.

В данной работе мы провели сравнительный анализ белкового состава роговицы и ретины глаза дрозофилы. Методом масс-спектрометрии нами были идентифицированы мажорные белковые компоненты роговицы: ретинин, энолаза, дрозокристаллин, алкогольдегидрогеназа и кутикулярный белок 72Ес. С использованием трансгенных линий, подавляющих экспрессию соответствующих генов, нами исследована роль каждого из этих белков в формировании роговицы в целом и наноструктур ее поверхности в частности. Так, с помощью атомно-силовой микроскопии выяснено, что при недостатке белка ретинина происходит значительное уменьшение размера наноструктур как по высоте, так и по площади сечения. Таким образом, сочетание физических и генетических подходов позволило нам исследовать молекулярную природу формирования роговицы глаза и ее наноструктурированной поверхности.

КУДИН К.В., ПРОКОПКИНА Ю.О., ПРОКУЛЕВИЧ В.А.

Белорусский государственный университет, биологический факультет, Минск, Беларусь

КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ ФРАГМЕНТА ГЕНА БЕЛКА КАПСИДА ЦВС-2 В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI*

Цирковирус свиней 2 типа (ЦВС-2) – это небольшой икосаэдрический вирус с несегментированным ковалентно замкнутым в кольцо геномом. Он принадлежит к семейству *Circoviridae* и одноименному роду *Circovirus* и является возбудителем целого ряда заболеваний, объединяемых в англоязычной литературе под общим названием Porcine Circovirus-Associated Diseases (сокр. PCVAD – заболевания, связанные с цирковирусом свиней). Вирус устроен достаточно просто, экспрессируется у него лишь несколько белков, поэтому обоснованно ожидалось, что выявить и обезвредить фактор вирулентности, приводящий к развитию синдромов PCVAD, будет легко. Однако на сегодняшний день темпы распространения цирковирусной инфекций таковы, что она стала существенной экономической угрозой всемирной индустрии свиноводства. Представленная работа направлена на разработку метода клонирования и системы

эффективной экспрессии гена, кодирующего белок капсида ЦВС-2, для использования в биотехнологическом производстве белка пригодного для создания вакцины.

В ходе работы были проанализированы последовательности геномов 690 штаммов ЦВС-2 из базы данных нуклеотидных последовательностей GeneBank. По результатам множественного выравнивания последовательностей построено их филогенетическое древо и определена консенсусная последовательность генома, на основе которой разработаны две пары праймеров, использованные в работе для амплификации области генома нескольких белорусских штаммов ЦВС-2. Амплифицированные фрагменты, содержащие последовательность гена белка капсида вируса, были клонированы в векторе pUC18 и секвенированы.

В качестве перспективного продуцента было решено использовать штамм *Escherichia coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL фирмы Stratagene, который помимо общих достоинств, характерных для продуцентов-прокариот, позволяет скомпенсировать различия в частотах встречаемости кодонов в экспрессионно активных последовательностях прокариот и эукариот, чем достигается высокий уровень экспрессии природных вариантов чужеродных генов без изменения структуры их кодирующей последовательности.

С помощью ПЦР с использованием пары праймеров, разработанных по результатам секвенса, открытая рамка трансляции (ОРТ) одной из последовательностей гена белка капсида ЦВС-2 была перенесена в вектор экспрессии pET-24b(+). Однако в данной системе экспрессии в наиболее оптимальных условиях продукцию белка удалось получить лишь на относительно невысоком уровне (по приблизительной оценке около 10% от общей массы белков клетки). Анализ возможных причин пониженной экспрессии белка капсида ЦВС-2 привел к следующему выводу: ключевой особенностью структуры белка капсида является наличие высокоосновного N-концевого домена, который выполняет функцию связывания вирусной ДНК в области начала репликации. Связывание ДНК происходит благодаря большому количеству положительно заряженных аргининовых остатков, которые в пределах первых 30 аминокислот образуют три tandemных повтора по 3-4 остатка в каждом, представленных исключительно редкими аргининовыми кодонами. Таким образом, даже несмотря на наличие в использованном для работы штамме-продуценте *E.coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL вспомогательных плазмид, кодирующих гены tRNA для

редких кодонов, их совокупный эффект кажется недостаточным для компенсации редких кодонов в данном случае. Принимая во внимание, что сложная N-концевая область белка капсида (в частности речь идет о первых 19 аминокислотных остатках) не содержит каких-либо антигенных детерминант, и более того, в нативном вирусе обращена внутрь капсида и потому никаким образом не участвует непосредственно в иммунных реакциях организма на возбудитель, было решено удалить участок ОРТ, кодирующий этот, предположительно ингибирующий экспрессию, фрагмент белка. Для этого были разработаны два праймера, которые позволили с помощью ПЦР получить усеченную рамку трансляции гена белка капсида ЦВС-2, лишенную нежелательного N-концевого фрагмента. Эта усеченная рамка также была клонирована в векторе рЕТ-24b(+) и эксперименты по индукции показали, что после удаления N-концевой области уровень экспрессии белка капсида увеличился в среднем в 2,5 раза. Тем не менее, пока нельзя однозначно утверждать, что причина низкой продукции белка капсида обусловлена только сложной для экспрессии в *E. coli* структурой его N-концевого домена, поскольку максимально возможного уровня экспрессии добиться не удалось. Более конкретные результаты ожидается получить после сравнения с результатами экспериментов с полноразмерным геном белка капсида, содержащим оптимизированную для экспрессии в *E. coli* N-концевую последовательность.

КУЗЕНКОВ В.С.¹, РЕУТОВ В.П.², КРУШИНСКИЙ А.Л.¹

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

²Институт ВНД и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

ВЛИЯНИЕ НИТРАТОВ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНУЮ ИШЕМИЮ МОЗГА, ВЫЗВАННУЮ ОККЛЮЗИЕЙ 2-Х СОННЫХ АРТЕРИЙ

Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что нитраты (NO_3^-) и нитриты (NO_2^-), ранее считавшиеся физиологически инертными, конечными продуктами метаболизма оксида азота (NO), способны оказывать протекторное влияние на ишемические и гипоксические процессы в различных органах, в том числе и мозге. Оксид азота и продукты его метаболизма способны участвовать в циклических взаимопревращениях. Поэтому NO может образовываться не только из L-аргинина, но и из

ионов NO_3^- и NO_2^- , которые восстанавливаются до NO при участии гемсодержащих белков. Известно, что в условиях физиологической и патологической гипоксии/ишемии мозга возрастает ферментативная активность нитратредуктаз и нитритредуктаз, которые осуществляют цепь превращений $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}$. Особенно этот процесс активизируется, когда синтез оксида азота NO-синтазами снижен. При этом умеренное повышение уровня NO оказывает протекторный эффект, а чрезмерное повышение/снижение уровня NO, наоборот, приводит к развитию неврологических нарушений. Известно, что на активность нитрат/нитритредуктаз кроме низкого pH, гипоксии, ишемии влияют катионы моновалентных и двухвалентных металлов, сопутствующие аниону. Падение нитратредуцирующей активности отмечено в ряду: K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} . Мы сравнили эффект нитритов KNO_3 и NaNO_3 , $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, введенных внутрибрюшинно в дозах 5 мг/кг и 50 мг/кг, на развитие неполной глобальной ишемии у самцов крыс линии Вистар.

Эксперименты проводились с соблюдением основных биоэтических правил. Для создания дефицита кровоснабжения мозга применяли классическую модель неполной глобальной ишемии, вызванной одномоментной двусторонней перевязкой общих сонных артерий. Крысам под эфирным наркозом отсепаровывали и перевязывали общие сонные артерии. Вещества вводили за 60 мин до перевязки сонных артерий. Контрольную группу составляли крысы, которым под эфирным наркозом перевязывали общие сонные артерии и вводили физиологический раствор. Длительность операции составляла не более 10 мин, затем крысы быстро восстанавливались после эфирного наркоза. После чего крыс помещали в отдельные клетки и в течение 8 часов оценивали динамику развития неврологического дефицита в баллах по неврологической шкале.

Результаты эксперимента показали, что NaNO_3 в дозе 5 мг/кг не оказал протекторного эффекта, а в дозе 50 мг/кг вызвал достоверное протекторное влияние на ишемию мозга по сравнению с контрольной группой. KNO_3 и $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ в дозе 5 мг/кг оказали достоверное защитное действие, а в дозе 50 мг/кг наоборот, вызвали усиление повреждающего действия неполной глобальной ишемии мозга по сравнению с контрольными крысами. Отсутствие протекторного влияния NaNO_3 в дозе 5 мг/кг, по всей видимости, связана с недостаточным уровнем синтеза NO из-за низкой концентрации нитрата натрия и низкой нитратредуцирующей активности катиона Na^+ по сравнению с

катионом K^+ . Усиление повреждающего действия KNO_3 в дозе 50 мг/кг на неполную глобальную ишемию мозга, по всей видимости, связано с высокой нитратредуцирующей активностью катионов K^+ , что приводит к гиперпродукции оксида азота. Известно, что большие концентрации NO действуют повреждающее на клетки мозга. Негативное влияние $Mg(NO_3)_2$ в дозе 50мг/кг, по всей видимости, связано с тем, что ионы Mg^+ довольно значительно понижают системное давление. При этом понижение общего системного давления вызывает усиление повреждающего действия ишемии мозга, вызванной окклюзией общих сонных артерий.

Таким, образом, полученные результаты подтверждают представление как о протекторном, так повреждающем влиянии нитратов на сосудистую систему мозга. Установленное защитное влияние нитратов на ишемические и гипоксические повреждения мозга открывает дверь для потенциальных терапевтических возможностей применения нитратов для лечения ишемического инсульта человека.

КУЗИН А.И., КУЗНЕЦОВА Н.И., НИКОЛАЕНКО М.А., АЗИЗБЕКЯН Р.Р.

*ФГУП "Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции
промышленных микроорганизмов", Москва, Россия*

ФУНГИЦИДНЫЕ СВОЙСТВА ШТАММА *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS*

Грибы являются основными патогенами сельскохозяйственных растений. Из 162 серьезных заболеваний культурных растений 135 вызываются грибами. Болезни, вызываемые фитопатогенными грибами, уничтожают до 30% потенциального урожая. Кроме того, заражая сельскохозяйственные растения, грибы не только снижают урожайность, но и загрязняют их продуктами своей жизнедеятельности – микотоксинами, которые ухудшают потребительские качества сельскохозяйственного пищевого сырья, снижают его биологическую полноценность и безопасность для теплокровных организмов. В настоящее время микотоксины считаются главными опасными загрязнителями урожая всех сельскохозяйственных культур. По данным ООН более 80% мирового сбора урожая (около 2 млрд. тонн сельскохозяйственной продукции), ежегодно производимой на планете, загрязнено микотоксинами.

Современные агротехнические и химические методы борьбы с грибными болезнями сельскохозяйственных растений недостаточно эффективны. К химическим фунгицидам возникает устойчивость, они небезопасны и загрязняют окружающую среду. В связи с этим, в последние годы большое внимание уделяется развитию экологически чистых биологических методов борьбы с заболеваниями растений, которые рассматриваются как альтернатива традиционным методам защиты растений, связанным с применением химических пестицидов.

Среди спорообразующих бактерий некоторые виды обладают выраженной антагонистической активностью по отношению к фитопатогенным грибам. Антагонисты из рода *Bacillus* представляют практический интерес для разработки на их основе биологических препаратов для защиты растений от болезней.

Выделенный нами из почвы спорообразующий штамм, идентифицированный с помощью анализа 16S рРНК как *Bacillus amyloliquefaciens*, обладает выраженной антагонистической активностью против грибов *Fusarium graminearum*, *Fusarium nivale*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotonia sclerotiorum*, *Phomopsis helianthi*, *Phoma solanicola*, *Alternaria tenuis*. Эти грибы являются возбудителями таких болезней, как фузариоз колоса и фузариозная снежная плесень пшеницы; фузариоз, альтернариоз и фомоз картофеля; корневая гниль; фомопсис подсолнечника.

Для изучения фунгицидного действия штамма *Bacillus amyloliquefaciens* использовали надсадок культуральной жидкости штамма *Bacillus amyloliquefaciens*. Надсадок фильтровали через фильтр (*Millipore, type HA 0,45 m*) для исключения присутствия клеток и спор.

Показано, что фунгицидный фактор штамма *Bacillus amyloliquefaciens*, локализованный в надсадке культуральной жидкости, термоустойчив и обладает резистентностью к протеолитическим ферментам трипсину, химотрипсину и проназе.

Изучено влияние фунгицидного фактора на различные стадии развития фитопатогенных грибов и проведена его количественная оценка, выражаемая максимальной степенью разведения при сохранении биологической активности.

В связи со сложным жизненным циклом фитопатогенных грибов успешное применение биологических фунгицидов возможно лишь в том случае, если они активны на

разных стадиях развития грибов. Вегетативная стадия развития представлена мицелием, состоящим из системы нитей или гиф, образующихся при прорастании спор.

В результате проведенных исследований показано, что фунгицидный фактор штамма *Bacillus amyloliquefaciens*, вызывает лизис конидий *Fusarium graminearum* и образование протопластов у конидий *Fusarium solani*. Зооспоры *Phytophthora infestans* в присутствии фунгицидного фактора не прорастают. Во всех случаях не происходит образование ростовых трубок, следовательно, не происходит и формирования мицелия. Количественной оценкой ингибирующего действия фунгицидного фактора служила степень разведения надосадка культуральной жидкости. Показано, что ингибирующее действие надосадка сохранялось при разведении 1: 64.

Известно, что ингибирующее действие бактерий на фитопатогенные грибы может осуществляться за счет образования комплекса ферментов, лизирующих клеточные стенки грибов, синтеза антибиотических веществ и за счет конкуренции в потреблении питательных веществ. Возможно предположить, что ингибирующее действие фунгицидного фактора штамма *Bacillus amyloliquefaciens* связано с образованием антибиотических веществ, выделяемых клетками в окружающую среду.

КУЗНЕЦОВ А.А., КОМИССАРОВА Л.Х., НЕЧИТАЙЛО Г.С, САМОЙЛОВ И.Б

ПОДОЙНИЦЫН С.Н, ШЛЯХТИН О.А., ПЫШНЫЙ М.Ф, ПЫШНАЯ С.В.

Институт Биохимической физики РАН, Москва, Россия

ПРИМЕНЕНИЕ МАГНИТНЫХ МИКРОЧАСТИЦ ДЛЯ РЕШЕНИЯ ПРОБЛЕМ МЕДИЦИНЫ

Использование ферромагнитных частиц для решения актуальных медицинских проблем основано на том, что все ткани и клетки организма состоят из диамагнитных или парамагнитных веществ и являются слабо магнитными. Это делает биологические ткани "прозрачными" для магнитного поля и открывает большие возможности для применения магнитных методов в медицине. Исследования по применению магнитных микрочастиц для решения медицинских проблем мы проводим более 30 лет. Работа проводилась совместно с МГУ, ВОНЦ, ГНИИХТЭОС, ИМЕТ РАН, И-т Рентгенологии, Онкоцентр им

Герцена, и др. Мы показали, что наноструктурные железо-углеродные сорбенты имеют уникальные качества для решения проблем медицины и особенно **онкологии**. Они имеют высокие магнитные свойства, не токсичны и обладают уникальными сорбционными возможностями. Позволяют осуществить эмболизацию сосудов опухоли, транспорт различных токсичных агентов, например, противораковых препаратов—цитостатиков, таких как доксорубицин, в злокачественную опухоль и осуществлять длительное депонирование их в этой зоне. В дальнейшем мы развивали это направление и показали, что железо-углеродные сорбенты позволяют осуществлять в зоне опухоли локализацию соединений для нейтронозахватной и фотодинамической терапии, осуществлять локальную гипертермию опухоли, осуществлять защиту имплантантов и детоксикацию организма путём магнитной гемосорбции. Проведено сравнительное изучение различных методов получения необходимых сорбентов, которое показало, что в зависимости от метода получения и режимов процесса ключевые параметры сорбентов могут меняться в широких пределах. Мы используем сорбенты, получаемые восстановлением углерода из оксида на частицах железа. Получаются многослойные углеродные нанотрубы, включающие наночастицы железа. Другой, предложенный нами метод получения оптимальных для медицины магнитных мелкодисперстных сорбентов -плазмохимическая переконденсация железа и углерода. Производительность разработанных плазмотронов позволяет обеспечить потребность медицины России.. Частицы образуют агломераты, имеющие размеры 0,1- 2мкм. . Эксперименты на животных показали крайне малую токсичность носителя и высокую противораковую активность магнитных препаратов, содержащих цитостатики. Лечебный эффект проявлялся как в полном излечении животных, так и в значительном увеличении продолжительности их жизни. Показано превышение концентрации препарата в опухоли в сотни раз по сравнению с его концентрацией в основных органах. Изучение фармакодинамики показало, что терапевтическая концентрация препарата сохраняется в течение 7-10 дней после однократного введения. Были разработаны и изучены два варианта лекарственной формы магнитоуправляемого стерильного препарата, пригодного для использования в клинике. Готовая суспензия вводится, под контролем ангиографа, в течение 20 минут через сосудистый катетер, подведённый к артериальному ложу опухоли, а на проекцию опухоли помещают магнитную систему на основе редкоземельных элементов. Магнитные частицы

фиксируются в микрососудах опухоли, образуя микроэмболы и лишая опухоль питания. Показано, что магнитоуправляемое введение создаёт депо препарата в зоне введения, а в общем кровотоке, в лёгких, печени, почках и в других органах доксорубицин практически отсутствует. Магнитный носитель ЦЕФЕСОРБ 1990 году прошёл полный цикл клинических исследований, было получено разрешение Фармакологического Комитета (протокол № 13 от 04.06.1990) на клинические испытания на пациентах с 3 и 4 стадией и получена ВФС.

Клинические испытания проводились в клиниках Москвы, С-Петербурга и Нижнего Новгорода. Проведено лечение более ста больных с различной локализацией опухолей. Большинство пациентов излечилось или их состояние значительно улучшилось. Основным преимуществом метода является значительное повышение эффективности лечения раковых опухолей, предотвращение метастазирования при существенном снижении общетоксической нагрузки на организм пациента. По независящим от нас причинам клинические испытания самопроизвольно прекратились, их итоги подведены не были. На метод у авторов имеются: патент СССР. Европатент и патент США.

Магнитная детоксикация. Наиболее универсальным методом, позволяющим удалять из организма как малые, средние и большие молекулы, но также и вирусы и клетки, является гемосорбция. Нами предложен (получен патент) новый метод осуществления экстракорпоральной гемосорбции для детоксикации организма. Метод заключается в том, что в поток крови, отведённой с помощью артерио-венозного или веноз-венозного шунта, вводят суспензию железоуглеродных сорбентов. В процессе краткого совместного движения крови и сорбента, происходит сорбция токсинов, а использованный магнитный сорбент удаляется из крови с помощью специального магнитного сепаратора. Очищенная кровь возвращается пациенту. В настоящее время мы продолжаем совершенствовать магнитные носители, методы их получения и использования. По мнению иностранных специалистов, наши разработки превосходят мировой уровень. По нашей инициативе с 1996 года проведено 8 международных форумов «Научное и клиническое применение магнитных носителей в биологии и медицине».

КУЗНЕЦОВ О.Ю.¹, САФОНОВА М.А.¹, СОСНИНА А.Е.²

¹Ивановская государственная медицинская академия Минздравсоцразвития России,
Иваново, Россия

²ЛДЦ «Миленарис», Иваново, Россия

«ВЕДЬМИНО КОЛЬЦО» - ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ АНТАГОНИЗМА ГРИБОВ

Необычным явлением в природе, которое вызывает много различных толкований и комментариев, является образование так называемого "ведьминого кольца" - роста множества плодовых тел высших грибов в виде кольца или ленты с небольшими зонами отсутствия грибов. В последнем случае, порой, несмотря на отсутствие грибов, все равно угадывается замкнутая окружность в росте мицелия в субстрате. Причины этого явления остаются непознанными до сих пор.

В нашей работе использовали чистые культуры вешенки *Pleurotus ostreatus* НК-35, выращенные на чашке Петри с агаризованной питательной средой (10% сусло + 1% агар-агара). При выполнении эксперимента осуществляли стандартизованный посев мицелия. Для этого мицелий в виде круглого блока с помощью специального пробойника переносили в лунку чистой агаризованной питательной среды. Дополнительно, для сравнения колониеобразующей активности штаммов использовали показатель колонизационной активности (ПКА). $ПКА = \lg \frac{КОЕ_2}{КОЕ_1}$, где $КОЕ_1$ и $КОЕ_2$ - диаметр колоний изучаемого микроорганизма в динамике развития (Кузнецов О.Ю., 2005). Выполняли статистическую обработку результатов с использованием электронных таблиц Microsoft Excel.

Установлено (на примере роста мицелия гриба вешенка - *Pleurotus ostreatus*), что обычное распространение мицелия гриба от посевного блока происходит практически равномерно во все стороны. Экспериментальные данные свидетельствуют о наличии линейного характера роста диаметра колонии вешенки. Этот тип роста можно также назвать равнопротрастенно-ориентированным, где в целом равномерный рост колонии не вполне совпадает с приростом колонии по дням исследования. Оценка развития колонии при использовании ПКА позволяет говорить о возникновении активных и затухающих гармоничных колебаний в динамике роста колонии. Ритмичность в этом составляет сутки, т.е. активный рост чередуется с замедлением роста на следующий день.

Полученные нами экспериментальные данные противоречат литературным данным развития мицелиального мата в субстрате, где главную роль отводят лишь одной гипотетически проросшей споре (начальной точке роста). Наши данные однозначно показывают, что иногда обычное равнопространственно-ориентированное развитие мицелия нарушается по неизвестным причинам, и из развивающейся мицелиальной колонии гриба в противоположных направлениях одновременно происходит активный центробежный рост мицелия в виде узкой замыкающейся в круг ленты. Предполагать, что причиной этого явления были какие-то неоднородности на поверхности питательной среды не приходится, поскольку первоначально питательная среда была разлита в чашки Петри в расплавленном виде, и переход в состояние геля прошел непосредственно в той же чашке.

Обнаруженный факт заставляет задуматься о том, что способность образовывать специфическое образование в виде так называемого "ведьминого кольца" - это лишь потенциальная способность, заложенная в геноме данной культуры грибов. Известен же факт, что "ведьино кольцо" способны формировать далеко не все грибы. Подобное образование в природе позволяет грибу, способному это делать, быстрее освоить максимальное количество питательного субстрата относительно конкурентов и противостоять им впоследствии. Это происходит за счет того, что зона питательного субстрата, пригодного для последующего роста оказывается как бы внутри "ведьминого кольца". Данная зона со временем осваивается центробежным и центростремительным ростом мицелия гриба. В целом образование "ведьминого кольца" возможно расценивать как один из возможных и необычных механизмов антагонизма существующий у грибов.

Таким образом, лабораторные исследования с использованием чистых культур грибов могут дать новые данные относительно активности роста, особенностей развития грибного мицелия при освоении им питательного субстрата, а также могут служить модельной системой для воспроизведения различных условий окружающей среды, в том числе и при процессах плодообразования (формирования плодовых тел грибов).

КУЗНЕЦОВ О.Ю.¹, САФОНОВА М.А.¹, СОСНИНА А.Е.²

*¹Ивановская государственная медицинская академия Минздравсоцразвития России,
Иваново, Россия*

²ЛДЦ «Миленарис», Иваново, Россия

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЖИДКОЙ КУЛЬТУРЫ МИЦЕЛИЯ ВЫСШИХ ГРИБОВ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ЗЕРНОВОГО МИЦЕЛИЯ В ГРИБОВОДСТВЕ

Получение жидкой культуры гриба, которую впоследствии можно использовать для ускорения зарастания стерилизованного зерна в различных емкостях (банках, пакетах) является весьма перспективным биотехнологическим направлением работы в микологических лабораториях. Изготовление и использование жидкой культуры для получения зернового мицелия является основополагающим фактором успешной работы биотехнологических производств по выгонке плодовых тел грибов, как для пищевых целей, так и для получения исходного биологически активного сырья в фарминдустрии.

Данный процесс многоэтапен и требует наличия соответствующей подготовки у работающих. Они должны сознавать одновременно всю степень ответственности за качество выполняемой работы, а также экономические риски при большом производстве. Культуру гриба, выросшую на поверхности агаризованной питательной среды, стерильным скальпелем надрезают до дна чашки по кругу, отступив от края чашки Петри примерно 1 см. Затем полученный диск агара с культурой разрезают по секторам к центру чашки. Стерильным (фламбированным) скальпелем вынимают из чашки сектор агаризованной питательной среды с грибной культурой. Размер данного сектора – произвольный (примерно 4-5 см²), но вновь напомним важное замечание - внешние границы сектора не должны касаться стенок чашки Петри. Причины этого кроются в том, что именно от внешних границ чашки иногда возможна внешняя экспансия низших грибов-конкурентов. Так избегают возможной контаминации ими засеваемых внесение кусочка-сектора в горловину емкости с жидкой питательной средой с соблюдением правил асептики. С целью предотвращения контаминации питательной среды бактериальной микрофлорой вновь, как и ранее (см.выше), можно добавить антибиотики – бензилпенициллин и стрептомицин. В ходе получения жидкой культуры, а также на этапе

зарастания мицелием зерна в пакетах крайне выгодно защитить развитие культурного (культивируемого) гриба с помощью биологического метода защиты.

Нами установлено, что гриб *Geotrichum candidum* не является конкурентом культурных грибов (Патент РФ № 2273981 Бюл. изобр. № 11 от 20.04.2006), но одновременно является активным антагонистом для роста низших плесневых грибов. Одновременное культивирование необходимого нам гриба и гриба *Geotrichum candidum* в культиваторе (ферментере) не мешает их совместному росту.

Затем емкости закрепляются на качающейся платформе (качалке), помещенной в термостатируемых условиях – 24÷28 С°. Скорость вращения регулируется таким образом, чтобы при длительном качении питательная среда не разбрызгивалась и брызги, попавшие и оставшиеся на стенках колбы, не касались бы изнутри ватно-марлевых пробок флаконов. Кроме того, возможно использовать для активного перемешивания среды магнитную мешалку. Время такого культивирования 48-72 часа.

По окончании культивирования в этой питательной среде при микроскопировании наблюдается большое количество различных по размерам мицелл (пеллет) используемого гриба. В связи с тенденцией к образованию поверхностного роста жидкая культура гриба должна быть использована в течение ближайших 2-3 суток, если она находится в неподвижном состоянии. В противном случае культура гриба образует поверхностный гифальный мат, и количество активных потенциальных точек роста в объеме раствора резко снижается.

При внесении в емкость со стерилизованным зерном жидкая культура протекает до дна этой емкости и поэтому вопрос как вносить жидкую культуру – в центр или по краям зависит от персонального опыта работающего на данной операции. Активное перераспределение зерна в пакете после внесения жидкой культуры ведет к более равномерному росту гриба в пакете. В первые три дня зерновки в мешке опускаются в тех местах, куда проникла жидкая культура гриба. Критическая оценка роста мицелия в мешке должна быть выполнена на 5-7 день культивирования. Именно к этому времени посторонние низшие грибы, загрязняющие мицелий культивируемого гриба дают окрашивание общей массы мицелия.

Использование чистых жидких культур грибов способно дать новый толчок к развитию грибоводства, поскольку интерес к промышленной выгонке грибов практически

постоянен. Однако следует помнить, что это специальное биотехнологическое производство, нуждающееся в постоянном контроле по качеству и персональному наполнению.

КУЗНЕЦОВА А.В., МИРОНОВА К.С., ГЛЕБОВА Н.Н

Пензенский государственный университет, Медицинский институт, кафедра общей и клинической фармакологии, Пенза, Россия

ЖИДКИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ФОРМЫ НА ОСНОВЕ СТЕВИИ. ПОЛУЧЕНИЕ И АНАЛИЗ КАЧЕСТВА

Stevia Rebaudiana Bertoni – продуцент заменителя сахара, является одной из самых молодых сельскохозяйственных культур в современном растениеводстве. В стевии содержатся разнообразные по химическому составу природные соединения, основные из них - гликозиды - стевиозид, ребаудиозид А, В, С, D, Е, дульткозид А, которые в 300- 500 раз слаще сахара и расщепляются в организме без инсулина.

Фармакологические эффекты стевии разнообразны, наиболее изученными являются гипогликемический и гипотензивный. Естественным ареалом произрастания стевии считается северо-восточная область Парагвая, которая граничит с Бразилией.

Целью работы было получить жидкие лекарственные формы на основе стевии и провести их сравнительный анализ качества.

В качестве основных задач рассматривались:

- Изучить возможность выращивания стевии в условиях Каменского района Пензенской области.
- Провести характеристику качества выращенного сырья листьев стевии.
- Получить жидкие лекарственные формы из листьев стевии с использованием различных экстрагентов.
- Провести анализ качества жидких лекарственных форм на основе стевии.

Посадка рассады стевии, её полив (0,5 л на одно растение) и уборка производилась вручную. Время от посадки растения до сбора составило 90 дней. Фаза цветения стевии в условиях Пензенской области не наступила. Заготавливали листья стевии, содержащие

наибольшее количество дитерпеновых гликозидов. Листья высушивали воздушно-теневым способом. Влажность сырья составила 6,7%

Из листьев стевии готовили три лекарственных формы. Две настойки на 40% спирте, получали методами перколяции и мацерации и водный настой. Настойки - спиртовые вытяжки из лекарственного растительного сырья, полученные без нагревания и удаления экстрагента. Настой - водное извлечение из лекарственного растительного сырья. Метод перколяции (процеживание) более быстрый и удобный для приготовления лекарственных форм, длительность приготовления настойки – 30 часов в отличие от метода мацерации (настаивание), который требует до 7 суток. Известно, что чрезмерная продолжительность извлечения приводит к загрязнению вытяжек сопутствующими высокомолекулярными соединениями, при длительном настаивании возможны гидролитическое расщепление биологически активных соединений под действием ферментов. Еще проще и быстрее приготовить настой стевии, сладкие гликозиды хорошо экстрагируются водой, и настой можно получить в течение 1-1,5 часов. Серьезным недостатком настоев мы считаем короткие сроки хранения и невозможность реализации.

Готовые лекарственные формы представляли собой прозрачные жидкости буровато-зеленого цвета, характерного запаха, сладкого вкуса.

Был проведен сравнительный анализ качества настоек, полученных методами перколяции и мацерации. Определили плотность, содержание спирта и сухой остаток. Сухой остаток в некотором роде является характеристикой степени извлечения биологически активных соединений стевии. Показано, что содержание сухого остатка в настойке, приготовленной методами мацерации и перколяции практически одинаково.

Выводы:

Агроклиматические условия Пензенской области ограниченно позволяют возделывать стевию как однолетнее растение открытого грунта рассадным способом. Фаза цветения стевии не наступила.

Проведен анализ качества выращенного сырья листьев стевии.

Наиболее быстрым, удобным и эффективным способом получения жидких лекарственных форм стевии является перколяция.

КУЗНЕЦОВА Е.А.¹, МОТЫЛЕВА С.М.², АЛЕХИНА Ю.И.¹, ПАРАМОНОВ И.Н.¹

*¹Государственный университет – учебно-научно-производственный комплекс,
Орел, Россия*

*²Всероссийский научно-исследовательский институт селекции плодовых культур,
Орел, Россия*

ЭЛЕМЕНТНЫЙ СОСТАВ И ЭПИДЕРМАЛЬНАЯ СТРУКТУРА ЗЕРНОВКИ

Анализ фонового состояния окружающей среды Центрального региона России свидетельствует о тенденции накопления в ней ряда химических соединений, отрицательно воздействующих на биологические системы. Происходит деградация естественных экосистем, снижение видового биоразнообразия растений.

Возможность применения в исследованиях новейших достижений аналитического оборудования – сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) и энергодисперсионного микроанализа (ЭДС) позволила провести комплексное изучение микро- и ультраструктурных признаков и химического состава зерновки злаковых культур в зависимости от условий произрастания.

Объектами исследования были определены типичные участки сельскохозяйственных угодий, расположенных на серых лесных почвах Болховского и Орловского районов Орловской области, а так же произрастающие на них зерновые культуры.

Методом ЭДС исследованы уровни накопления тяжёлых металлов в хозяйственно полезной части растений ряда сельскохозяйственных культур (пшеница, рожь, овес, ячмень), выращенных в условиях производственных посевов. Полученные результаты в целом соответствуют общим закономерностям, установленным для переноса микроэлементов в звене почва-растение, и отражают существующие различия в химических свойствах и биологической роли металлов, уровнях их содержания в почве, видовых особенностях растений. Определенные различия в элементном составе зерна наблюдаются в зависимости от условий произрастания и прежде всего от уровня почвенного плодородия и содержания макро- и микроэлементов в почве.

Однако отмечается превышение уровня ПДК и наличие сопоставимых с порогом фитотоксичности уровней накопления почти всех изучаемых тяжёлых металлов.

Результаты проведенного исследования содержания металлов в зерне различных культур показывают, что в отдельных случаях концентрация никеля и хрома в органах растений, используемых в питании животных и человека, превышает избыточный или токсичный уровень. Отмеченные уровни накопления металлов в хозяйственно полезных частях растений в регионе не подверженном прямому воздействию промышленных источников представляют серьёзную опасность.

ЭДС детектор mini Cup в системе электронного сканирующего микроскопа JEOL JSM 6390 представляет аналитическую станцию – это новый подход к созданию комплексной системы электронная микроскопия + ЭДС-анализатор. Энергодисперсионный рентгеновский спектрометр позволяет проводить анализ следовых количеств элементов в субмикронных областях, что дает возможность изучить распределение тяжелых металлов и других химических элементов в пределах зерновки. В основе метода лежит система просмотра изображения, полученного на сканирующем электронном микроскопе и анализа наблюдаемого вещества. Подготовка тонких продольных и поперечных срезов биологических объектов позволяет определить зоны локализации химических элементов с учетом микроструктуры и морфологических особенностей растительного материала. Установлено преимущественное накопление тяжелых металлов в периферийных зонах зерна. Первичные клеточные стенки являются сложной экстрацеллюлярной структурой, в состав которой входят целлюлоза, гемицеллюлозы, белки, способные к многократной адсорбции и десорбции ионов. При этом концентрация происходит на внутренней поверхности оболочки. Адсорбированные ионы мобильно связанные с оболочкой могут впоследствии десорбироваться в свободное пространство и поглощаться протоплазмой.

Проведенными исследованиями установлено, что условия произрастания определяют не только элементный состав зерна злаковых культур, но и его эпидермальную структуру. Методом СЭМ исследовали микро- и ультроструктуру поверхности зерновки пшеницы, ржи, овса, ячменя. Установлено, что поверхность нативного зерна пшеницы, ржи, овса и ячменя имеет характерный рельеф первого порядка, представляющий собой параллельные тяжи целлюлозных фибрилл различной толщины и извилистости, покрытые эпидермальными производными полисахаридных компонентов матрикса. Однако в зависимости от условий произрастания эпидермальные производные

гемицеллюлоз имеют различную форму и глубину расположения в пределах целлюлозных тяжей. Также установлены различия в содержании гемицеллюлоз в периферических частях зерновки.

КУЗНЕЦОВА Е.А., ЧЕРЕПНИНА Л.В., КЛЕПОВ Р.Е.

*Государственный университет – учебно-научно-производственный комплекс, Орел,
Россия*

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ КОМПОНЕНТОВ КОМПЛЕКСА ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ФИТАЗЫ НА ПРОЦЕСС ГИДРОЛИЗА ФИТИНА ЗЕРНА ПШЕНИЦЫ

Фосфор играет важную роль в полноценном питании человека. Это один из основных структурных компонентов организма. Он принимает активное участие в обмене белков, жиров, углеводов, энергии, минеральных веществ, витаминов, входит в состав важнейших метаболитов. Недостаток фосфора вызывает ухудшение общего состояния, снижение аппетита, роста и устойчивости к болезням, костные заболевания. Дефицит фосфора в пищевых рационах составляет 20 – 50 %.

В зерне злаковых культур примерно 2/3 общего фосфора находится в связанной форме известной под названием фитин. Фитин является запасным веществом растений и присутствует в алейроновом слое и наружных зонах зерновки. Фитин является хелатирующим агентом, соединяется с двух- и трехвалентными катионами, может связывать, кроме кальция и магния, также биогенные микроэлементы такие, как железо, цинк, молибден, марганец, медь и другие. С фитиновым комплексом также связана низкая доступность аминокислот и фосфора. Известно, что среднее содержание фитина в зерне пшеницы 1,2%. Фитатный фосфор может быть усвоен в пищеварительном тракте человека только после гидролиза. При гидролизе фитина происходит высвобождение неорганического фосфата, кальция, железа, цинка и других минеральных элементов.

Ферментные препараты на основе фитазы нашли широкое применение в животноводстве и птицеводстве для улучшения переваримости и усвояемости питательных веществ.

Для обработки зерна с целью дальнейшего его использования в технологии зернопродуктов и кормов использовали ферментный препарат на основе фитазы F 4.2В (ИБФМ РАН г. Пущино), продуцент *Penicillium canescens*. В состав препарата входят целлобиогидролаза, β -глюканаза, ксиланаза и фитаза (фитазная активность 12008 ед/г, ксиланазная – 803 ед/г). Для подтверждения эффективности действия фермента фитазы на деструкцию фитина и высвобождение фосфорной кислоты из субстрата проводили также обработку зерна злаковых культур при замачивании лабораторными образцами ферментных препаратов, полученных на основе грибной культуры *Penicillium canescens* Eg P6 с фитазной активностью - 2400 ед/г и β -глюканазной активностью 5000 ед/г и препарат Хул 23 с ксиланазной активностью - 9084 ед/г. Рациональные дозы ферментных препаратов были определены экспериментально и составили 0,08-0,16 % от массы сухих веществ зерна. При оптимальных температуре (50 °С) и рН среды (4,5) продолжительность процесса замачивания зерна в растворе ферментного препарата составила 12 часов.

Фитазную активность определяли по высвобождению фосфорной кислоты из зерна пшеницы. Установлено, что скорость высвобождения фосфорной кислоты из субстрата выше под действием препарата на основе фитазы, в составе которого присутствует ксиланаза. Препарат, содержащий наряду с фитазой только β -глюканазу в течение 12 часов гидролиза оказывается менее эффективным в отношении фитина. Однако после 12 часов воздействия на субстрат фитазная активность препаратов на основе фитазы и Eg P6 имеет примерно одинаковые значения.

С помощью электронного сканирующего микроскопа JEOL JSM 6390 было проведено исследование изменения микроструктуры поверхности зерновки под действием ферментных препаратов. Установлено, что состав ферментного комплекса препарата определяет характер изменения микроструктуры поверхности зерновки. Препарат на основе фитазы F-4.2В имеет в своем составе комплекс ферментов, катализирующих последовательный гидролиз структурных полисахаридов. Под действием этих препаратов изменения микроструктуры поверхности более выраженные и глубокие. Препарат EgP6 действует аналогично предыдущему, оставляя на поверхности оболочек толстые параллельно расположенные целлюлазные тяжи, разрушая поперечные шивки матрицы и образуя площадки. Препарат Хул 23 содержит фермент β -глюканазу, под действием

которого происходит деградация поверхностного слоя оболочек зерна пшеницы, при этом оголяются многочисленные поперечные волокна, соединяющие микрофибриллы целлюлозы.

Таким образом, проведенные исследования показали, что ферментные препараты, в состав которых входит фитаза в разной степени оказывали влияние на ход процесса гидролиза фитина. Присутствие ксиланазы в ферментном препарате ускоряло этот процесс, даже в том случае, если фермент фитаза отсутствовал.

Вероятно доступность фитина для фитазы, как вносимой в составе препарате, так и собственной, расположенной в алейроновом слое, связана со степенью деструкции гемицеллюлоз.

КУЗНЕЦОВА Н.И., АЗИЗБЕКЯН Р.Р.

*ФГУП "Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции
промышленных микроорганизмов", Москва, Россия*

СОЗДАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ЗАЩИТЫ ВОДОЁМОВ ОТ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

Микроскопические водоросли при избыточном развитии вызывают ряд экономических, технологических, медицинских, экологических и рекреационных проблем. В связи с глобальным потеплением климата планеты широкое распространение микроводорослей приобретает характер глобальной мировой проблемы. Серьёзный экономический ущерб, а также токсическое воздействие микроводорослей на окружающую среду диктует необходимость в разработке методов подавления развития микроскопических водорослей и прогнозирования состояния водных экосистем.

Микроскопические водоросли могут существовать в двух состояниях - суспендированном (планктонном) и в виде биологической плёнки («мата»). Увеличение численности микроводорослей в водоёмах приводит к неблагоприятным последствиям, таким как образование трёхмерных структурированных биологических плёнок («матов»), что проявляется в «цветении» воды. «Цветение» водоёмов сопровождается последующим отмиранием избыточной биомассы микроводорослей, выделением токсинов, нарушением

кислородного режима, органолептическими проявлениями гниения. Процесс разложения и гниения составляющих биоплёнки («маты») микроводорослей сопровождается выбросом в воду ряда токсических соединений (фенолов, индола, скатола). Высокая численность клеток микроводорослей при их отмирании может приводить к гипоксии и гибели многих аэробных организмов. Некоторые виды микроводорослей продуцируют ряд специфических токсинов, в том числе нейро- и гепатотоксины, представляющие серьезную угрозу здоровью людей и животных. Антидотов к токсинам микроводорослей не существует.

В ГосНИИгенетика выделены новые природные штаммы микроорганизмов, подавляющие развитие микроводорослей. В процессе исследований отобраны уникальные природные штаммы *Brevibacillus laterosporus*, не имеющие аналогов в мире. Оценка альгицидного эффекта бацилл проводилась по трём параметрам: по изменению цвета смеси микроводоросли - бациллы, по изменению оптической плотности микроводорослей при их совместном культивировании с бациллами, а также при оптической микроскопии.

Изучена зависимость антагонистического действия штаммов в зависимости от дозы, времени контакта, стрессовых условий (температуры, освещённости, солёности и др.) и формы существования микроводорослей - планктонная и биоплёночная форма («мат»). Штаммы *Brevibacillus laterosporus* обладают альгицидной активностью на микроводорослях различных таксономических групп.

Показано, что при совместном культивировании один из наиболее активных штаммов вызывал гибель 5 видов микроводорослей - *Anabaena*, *Nostoc*, *Microcystis* (2-х видов), *Cosmarium*., обитающих в пресных водах, и 3-х видов микроводорослей - *Amphidinium*, *Thalassiosira*, *Prorocentrum*, обитающих в морских водах. Штамм продуцирует, как минимум, два альгицидных фактора, один из которых локализуется в осадке, другой - в надосадочной фракции культуральной жидкости. Способность штамма секретировать альгицидный фактор во внешнюю среду позволяет использовать его для создания препарата с минимальной способностью к загрязнению окружающей среды спорами бацилл.

Альтернативой химическим гербицидам для подавления развития микроводорослей в водной среде является применение биологических средств, на основе бактерий и их метаболитов, обладающих альгицидными свойствами. Известны штаммы бактерий,

подавляющие развитие микроводорослей, однако сведений о биологических препаратах на основе таких бактерий в источниках информации не обнаружено.

В ФГУП ГосНИИгенетика создан биологический препарат на основе культуральной жидкости штамма *Brevibacillus laterosporus*, включающей комплекс спор, вегетативных клеток и продуктов метаболизма, и гранул вспученного перлитового песка, на которых этот комплекс иммобилизован. Преимуществом биологического препарата для контроля развития микроводорослей является то, что он экологически безопасен, хорошо хранится, удобен для транспортировки, даёт стабильный объём, не слёживается, а альгицидные свойства проявляет в водной среде. Применение биопрепарата эффективно для борьбы с микроводорослями в открытых природных водоёмах, рисовых чеках, а также закрытых технологических водных системах и аквариумах.

КУЗНЕЦОВА Т.Г., ГОЛУБЕВА И.Ю., ГОРБАЧЕВА М.В.

*Федеральное государственное учреждение науки Институт физиологии
им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия*

КОГНИТИВНЫЕ СПОСОБНОСТИ ПРИМАТОВ

До недавнего времени мышление животных практически не было предметом отдельного рассмотрения, хотя уже Дарвин [1872], Торндайк [1898], Келлер [1917], говорили о сходстве интеллекта человека и высших обезьян. И.П. Павлов [1935] считал, что шимпанзе обладают способностью к формированию ассоциаций и помимо инстинктов и простых условных рефлексов у них существует тип поведения, который может быть охарактеризован как разумный. В России Н.Н. Ладыгина-Котс [1935], а за рубежом Ж. Пиаже [1923] выявили многочисленные черты сходства поведения шимпанзе и человека на ранних стадиях онтогенеза и обнаружили критические точки, после которых развитие психики ребенка идет принципиально иными темпами и на качественно другом уровне, чем у шимпанзе. На протяжении многих лет в лаборатории физиологии ВНД Института физиологии им. И.П. Павлова РАН проводится сравнительный фило-онтогенетический анализ когнитивных способностей детей, макак и шимпанзе.

При исследовании рефлекса цели по оригинальной методике (патент № 1410948), не требующей мыслительной нагрузки, было установлено, что различные скорости достижения цели у детей и обезьян приводят к однонаправленным произвольным изменениям поведенческих, эмоциональных, инструментальных реакций и способов достижения объекта, что свидетельствует об их безусловнорефлекторной природе в отряде приматов. Высокие скорости (250 мм/с) достижения цели, активировали эмоционально положительные реакции, при этом ценность цели в ситуации снижения скорости достижения цели длительно поддерживала реакцию сосредоточения внимания, не оказывая существенного влияния на само стремление к достижению объекта. Вместе с этим длительное монотонное применение одной и той же даже высокой, равно как и низкой скорости (5-10 мм/с), вели к постепенному развитию негативной реакции, снижению мотивации и стремления к достижению цели, на фоне возрастания “стресс-индекса” (ИН), отражающего напряженность механизмов регуляции сердечного ритма. Использование промежуточных скоростей (50 мм/с) достижения цели не только вело к увеличению ИН, но и к существенной перестройке биопотенциалов головного мозга – в отличие от высоких и низких скоростей достижения цели, когда преимущественно устанавливались межполушарные лобно-затылочно-теменные связи, дополнительно активированными оказывались внутриполушарные лобные, лобно-височные и височно-теменно-затылочные зоны мозга. Этот факт показывает, что неопределённая, с точки зрения, времени достижения цели, скорость, активируя систему эмоций и лимбические структуры (вариабельность сердечного ритма), приводит к перестройке активности мозговых процессов, вероятно, за счет влияний со стороны подкорки и гиппокампа.

Принципиальные отличия в процессе достижения цели проявились во внешних поведенческих реакциях обезьян и детей: поведение детей уже в раннем возрасте обусловлено социальными рамками, у обезьян в проявлении поведения оказывается больше степеней свободы (от легкого избегания до ярко выраженной агрессии).

Использование методик, требующих когнитивной нагрузки, выявили большие принципиальные различия между представителями отряда приматов. Так оказалось, что если дети 2-3 лет, шимпанзе и макаки с легкостью справлялись с выбором реальных геометрических объектов, то выбор из изображений как 100 %, так и частичной целостности представляли для обезьян затруднения. Шимпанзе и дети 2-3-х лет успешно

осуществляли выбор из конкретных и абстрактных изображений, переносили образ реального предмета на его силуэтное изображение, но при соотнесении трехмерного и силуэтного изображения у шимпанзе процент правильного выбора достоверно снижался, макаки оказались не способны осуществлять выбор из конкретных и абстрактных изображений. Вместе с этим выяснилось, что незнание ребенком предмета, изображенного на рисунке, или его наименования не только затрудняет его выбор, но задание оказывается для него не доступным. Отсюда можно предположить, что уровень развития головного мозга низших обезьян, а, следовательно, и их способности к обобщению, позволяет им справляться с реальными предметами, вызывая затруднения при переносе образов предметов на их изображения. Шимпанзе, обладая “эйдетической” (фотографической, образной) памятью, могут запечатлевать образ целиком и переносить его на другой, а детям для успешного осуществления выбора по образцу необходима помощь второй сигнальной системы, составляющей основу высшей когнитивной функции человека, его способности к обобщению, абстрагированию, формированию не вербальных понятий, представляющих механизмы первой и второй сигнальных систем.

Таким образом, сравнительные фило-онтогенетические исследования, позволяют не только выявить сходство в поведении, эмоциональной и когнитивной деятельности приматов, но и подойти к выявлению тех критических моментов, когда первая сигнальная система переходит во вторую и последняя начинает доминировать у человека.

КУЛЕШОВА Ю.М., ФЕКЛИСТОВА И.Н.

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

КОЛОНИЗАЦИЯ РАСТЕНИЙ БАКТЕРИЯМИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИ ЦЕННЫХ ШТАММОВ *PSEUDOMONAS PUTIDA* И *PSEUDOMONAS AURANTIACA*

Непатогенные ризосферные бактерии *P. putida* КМБУ4308 и *P. aurantiaca* В-162/428, используемые для создания биологических препаратов «Немацид» и «Аурин» соответственно, отличаются комплексной биологической активностью: способны препятствовать поражению растений почвенными нематодами, стимулировать рост и обеспечивать защиту сельскохозяйственных культур от заболеваний как бактериальной,

так и грибной этиологии. Интересно отметить, что обработка семенного материала культурой бактерий *P. putida* и *P. aurantiaca* при последующем искусственном заражении проростков спорами листовых фитопатогенов также снижает поражаемость растений.

Принимая во внимание вышеперечисленные данные, нами выдвинуто предположение, что антагонистическая активность бактерий *P. putida* КМБУ4308 и *P. aurantiaca* В-162/428 может проявляться либо при прямом контакте синтезируемого бактериями вещества-антагониста с фитопатогеном, либо опосредовано, за счет индукции бактериями системной устойчивости растения к возбудителям заболеваний. Однако, данные о колонизации растений изучаемыми бактериями, а также о конкурентоспособности последних в естественных условиях, до настоящего времени отсутствовали в литературных источниках.

С целью проверки выдвинутых предположений колонизацию растений бактериями изучали с использованием бактериальных штаммов *P. putida* КМБУ4308, маркированных устойчивостью к действию канамицина, и *P. aurantiaca* В-162/428, обладающих природной устойчивостью к действию стрептомицина. Для этого в стерильную почву высевали семена растений, предварительно обеззараженные в растворе $KMnO_4$ и обработанные затем культурой маркированных бактерий. Растения культивировали 10 суток в светотеплице, после чего извлекали из почвы, тщательно отмывали корневую систему водой и помещали на чашки Петри с селективной агаризованной средой Канедо, содержащей соответствующий антибиотик. В случае определения конкурентоспособности и выживаемости исследуемых бактерий в естественных условиях, инокулированные семена высевали в нестерильную почву. Выросшие растения извлекали из грунта спустя 3 месяца культивирования.

Установлено, что устойчивые к действию антибиотиков бактерии способны расти, выделяя при этом в среду флуоресцирующие пигменты, лишь в прикорневой зоне растения. Надземная же часть стебля и листья проростков рапса оставались свободными от исследуемых бактерий. Подобная же картина наблюдалась при исследовании колонизации растений табака и арабидопсиса. Интересно отметить, что маркированные бактерии выделялись из ризосферы растений даже спустя 3 месяца культивирования в нестерильной почве. Полученные результаты свидетельствуют о том, что аборигенная микрофлора, присутствующая в почве до посева обработанных семян, не вытесняет клетки бактерий

P. putida и *P. aurantiaca*. В то же время, указанные бактерии не были обнаружены на надземной части растений, что исключает прямой антагонистический эффект бактериальных метаболитов в случае снижения заражаемости растений спорами листовых фитопатогенов и свидетельствует о потенциальной возможности индукции системной устойчивости соединениями бактериального происхождения.

Таким образом, установлено, что ризосферные непатогенные бактерии *P. putida* КМБУ4308 и *P. aurantiaca* В-162/428 эффективно колонизируют корневую систему, но не надземную часть растений. Изучаемые бактерии не вытесняются аборигенной микрофлорой нестерильной почвы даже спустя 3 месяца после инокуляции. Антагонистическая активность изучаемых бактерий относительно фитопатогенов может определяться как непосредственным антимикробным действием бактериальных метаболитов-антагонистов, так и индукцией бактериями системной устойчивости растений к патогенам.

КУЛИКОВА П.А.¹, АРХИПОВА Л.В.², КУЛИКОВ Д.А.^{1,3}, СМИРНОВА Г.Н.²,
КУРАНОВА А.В.¹, РОГАТКИН Е.В.³, МАШКОВ А.Е.³, КУЛИКОВ А.В.²

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

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, Пущино, Россия

³Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия

КОРРЕКЦИЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ДЕФЕКТОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ АУТОЛОГИЧНЫХ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ И ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ ТКАНЕЙ

На сегодня не вызывают сомнения объективные данные, свидетельствующие о значительной возрастной инволюции центрального органа гемопоэза и иммуногенеза – тимуса. Считается установленным, что снижение эндокринной активности тимуса (вилочковой железы) играет ключевую роль в дисфункциях иммунной системы и даже

может ограничивать продолжительность жизни. Стимулом к выполнению данной работы явился тот факт, что в практической деятельности хирурга (особенно детского) достаточно частой является операция по удалению тимуса (тимэктомия), после чего резецированный орган утилизируется. Основное показание для удаления даже интактного тимуса – это наличие прогрессирующей миастении. Миастения - тяжелое нейромышечное заболевание, характеризующееся патологическим истощением произвольной мускулатуры. Оно имеет прогрессирующее течение и приводит к инвалидизации в 60-70% наблюдений, а при отсутствии эффективного лечения – и к гибели больных. Частота спонтанной ремиссии отмечена у 20-30% и может наблюдаться в первые 2 или 4-7 лет. Продолжительность и степень ремиссии или улучшения состояния могут быть незначительными и проявляются только в виде снижения дозы/частоты приема антихолинэстеразных препаратов. У 25% больных ремиссия не наступает. Миастения встречается с частотой до 5-12 на 100000 населения. Соотношение М : Ж = 1 : 1,5-2. Излечение миастении медикаментозными средствами практически невозможно. При этом тимэктомии следует выполнять как можно раньше.

Мы предположили, что вместо утилизации тимуса после удаления (т.е. орган попросту выбрасывают) – его можно использовать более рационально. В работе показано, что резецированная ткань тимуса может быть криоконсервирована и далее ретрансплантирована в подкожножировую клетчатку (щадящее и малотравматичное вмешательство). Работа выполнена на крысах Вистар. Данные экспериментов свидетельствуют, что пересадка ткани тимуса после его длительной криоконсервации - (до 6,5 мес) ассоциирована с нормализацией гематологических показателей стареющих животных, более того, происходит значимое увеличение содержания фактора некроза опухоли- α в крови.

Мы также исследовали динамику возрастной необратимой инволюции тимуса крысы. Разрабатываемые методы пересадки ткани тимуса в подкожножировую клетчатку, а также в переднюю камеру глаза экспериментальных животных ведут к снижению скорости потери тимоцитов с возрастом.

В случае пересадки криоконсервированных тканей применение токсичных иммунодепрессантов не требуется по причине использования аутологичного материала. Помещение трансплантата в переднюю камеру глаза позволяет также избежать назначения

иммунодепрессантов ввиду иммунологической привилегированности последней; появляется возможность пересадки не только аллогенного, но и ксеногенного материала.

Как уже было указано, пересадка криоконсервированной ткани тимуса ведет к «торможению» инволюции тимуса .

Мы также показали, что пересадка ткани тимуса (или костного мозга) может приводить к значимому увеличению выживаемости после облучения в летальной дозе (8Гр) и ускоренному восстановлению иммунологического статуса после облучения в сублетальной дозе (4Гр). Более того, трансплантологическое замедление процесса инволюции тимуса оказывает положительное влияние на увеличение как средней, так и максимальной продолжительности жизни.

Разрабатываемые методики пересадки иммунокомпетентных тканей позволяют затормозить возрастную инволюцию тимуса. «Омоложение» иммунной системы может быть достигнуто в зрелом возрасте посредством малотравматической операции.

Применение разрабатываемых методик позволит рационально использовать ранее бесцельно утилизируемый материал после тимэктомии, за счет влияния на иммунную систему повысить общую сопротивляемость организма, радикально изменить эффективность лечения инфекционных и онкологических заболеваний. Стоит отметить, что пересадка иммунокомпетентных тканей способствует увеличению продолжительности жизни, оказывает значимое положительное действие и при воздействии ионизирующей радиации. Применение разрабатываемых методик радикально решает проблему нехватки донорского материала и необходимости высокотоксичной иммунодепрессивной терапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке программ президиума РАН «Поддержка инноваций и разработок», 2007, 2009, 2011, «Фундаментальные науки медицине» 2012.

КУРАНОВА Л.К., ШВЕЙКИНА К.С., ВОЛЧЕНКО В.И.

Мурманский государственный технический университет, Мурманск, Россия

**РАЗРАБОТКА ОПТИМАЛЬНОГО РЕЖИМА СТЕРИЛИЗАЦИИ НОВОГО ВИДА
МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ КОНСЕРВОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ СПОР
КУЛЬТУРЫ CLOSTRIDIUM SPOROGENES ШТ.25.**

Разработка режима стерилизации – задача, для решения которой необходим научный подход. Производство каждого нового вида консервов требует разработки нового режима. Основное назначение стерилизации заключается в обеспечении гибели микроорганизмов, находящихся в полуфабрикате, поэтому эффективность процесса во многом зависит от их количества и термоустойчивости. Внедрение в практику рыбоконсервных предприятий оптимальных режимов стерилизации не только улучшает качество консервов, но и дает промышленности определенный экономический эффект, так как позволяет интенсифицировать процесс производства. Использование сырья с низкой бактериальной обсемененностью, выполнение санитарно-гигиенических требований, правильно подобранный и научно-обоснованный режим стерилизации играют важную роль в повышении безопасности и увеличении срока годности конечного продукта.

На кафедре ТПП МГТУ разработана технология производства нового вида паштетных многокомпонентных консервов на основе печени трески с использованием овощей и грибов: «Паштет печёночно-грибной (на основе печени трески)». Подобран предварительный режим стерилизации: $\frac{5-15-50-20}{120^{\circ}C}$ 0,2 МПа, с фактическим эффектом стерилизации ($F = 7,6$ усл. мин), превышающим нормативный эффект для рыбных консервов в масле ($F_n = 6,3$ усл. мин).

Однако значительную часть нового вида продукта составляют овощи и грибы, поэтому консервы не являются чисто рыбными и не могут быть отнесены ни к группе рыбных в масле, ни к группе рыбо-растительных консервов, что затрудняет согласование и утверждение режима стерилизации в организации - координаторе ООО «Гипрорыбфлот». Это, в свою очередь, потребовало провести комплекс исследований для разработки научно-обоснованного режима стерилизации нового вида консервов.

На первом этапе исследований проводился выбор тест-объекта, способного вызвать порчу готового продукта. Для консервов с $pH \geq 4.2$ таким тест-объектом является гнилостный облигатный анаэробный микроорганизм *Clostridium sporogenes* um.25. Споры *Cl. sporogenes*, используемые при разработке режима, имеют следующие показатели термоустойчивости (D, Z) в нейтральном фосфатном буфере: $D_{121,1}^{0C} = 0,55$ мин., $Z = 10$ °C, в 1 см^3 содержится $8,0 \times 10^6$ спор. Полученные термоустойчивые споры необходимы для экспериментального определения термоустойчивости спор в содержимом продукта при базисной температуре $121,1^\circ\text{C}$ (для консервов с $pH \geq 4.2$) и для расчета нормативной величины требуемой летальности (F_n). F_n - это нормативная величина продолжительности нагревания при базисной температуре, обеспечивающая гибель определенного количества клеток или спор микроорганизмов, вызывающих порчу продукта или представляющих опасность для здоровья потребителей, выражается в условных минутах.

На втором этапе определялась термоустойчивость спор в исследуемом продукте, который смешивали с суспензией спор, и полученный гомогенат расфасовывали в капилляры по 0,1 мл и прогревали в глицериновой бане при температуре $121,1^\circ\text{C}$ в течение 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 5.0 минут. Содержимое капилляров после охлаждения высевали в питательный агар Хотингера в трубки Вейона. Посевы помещались в термостат на 72 часа при 37°C , затем оставляли при комнатной температуре ещё на 72-120 часов. Из графика кривой летальности, построенной методом наименьших квадратов по результатам подсчета количества выживших спор, определили значение $D_{121,1}^{0C}$ для исследуемого ассортимента консервов, равное 0,4 минутам, и рассчитали нормативную летальность, которая составила 3, 2 усл. мин.

На следующем этапе при выборе режима стерилизации консервов в качестве определяющего показателя использовали значение величины фактической летальности (F), которое должно быть выше установленной нормативной. При подборе режима стерилизации (стерилизация паром, охлаждение водой с противодавлением в автоклаве Н2-ИТА 602) варьировали длительность непосредственно стадии стерилизации (от 30 до 50 мин.) и температуру греющей среды (112°C и 120°C). На основании проведенного комплекса исследований разработан окончательный режим стерилизации консервов «Паштет печёночно-грибной (на основе печени трески)» в банке 3: $\frac{5-15-40-20}{120^\circ\text{C}} 0,2 \text{ МПа}$,

фактический стерилизующий эффект составил 4,5 усл. мин. Микробиологические анализы подтвердили промышленную стерильность консервов, мезофильных аэробных, факультативно-анаэробных и анаэробных микроорганизмов не обнаружено.

Использование разработанного режима позволит повысить эффективность производства за счет уменьшения энергетических и временных затрат на стерилизацию консервов.

КУРБАТОВА И.Н., ЦЕДИК В.В.

Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Киев, Украина

ЭКОЛОГО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ВОДЫ ПРУДОВ ЗАГРЯЗНЕННЫХ СТОКОВЫМИ ВОДАМИ ЖИВОТНОВОДЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

Промышленное выращивание рыбы во внутренних водоемах является существенной составляющей формирования продовольственной безопасности Украины. В то же время известно, что значительное количество водоемов рыбохозяйственного назначения поддается интенсивному загрязнению отходами сельскохозяйственных предприятий, преимущественно, животноводческого направления и пищевой промышленности. Следствием которого является ухудшение их экологического состояния, качества воды и продукции рыбоводства.

Токсикологическая оценка воды проведена с помощью метода биотестирования, где как тестовый объект использована *Daphnia magna*., а показателем токсичности стоковых вод была принята концентрация аммонийного азота (NH_4^+). Проведенные исследования показали, что в колбах со стоковой водой через 48 часов экспозиции выживаемость дафний составляла 90-94% при тенденции снижения на третьи сутки до 80-83%. При этом в контрольном варианте выживаемость дафний в воде на вторые сутки составляла 97% и практически не изменилась на третью. В опытном же варианте наблюдалось значительное влияние токсиканта - аммонийного азота (NH_4^+) на выживаемость дафний: 1 сутки – 94%, 2 сутки – 83%, 3 сутки – 80%. В контрольном варианте влияния раствора NH_4^+ на выживаемость дафний не отмечено. Можно сделать вывод, что в опытном варианте на выживаемость дафний влияет не столько аммонийный азот, а в первую очередь

органическая составляющая стоковых вод. Добавление стоковых вод свиноводческих предприятий к среде с дафниями повышает содержание аммонийного азота, снижает уровень кислорода, изменяет значение pH воды и уменьшает выживаемость дафний до 80-83%.

Полученные нами данные можно использовать для эколого-токсикологической оценки воды прудов загрязненных стоковыми водами животноводческих объектов.

КУРОПТЕВА З.В., БАЙДЕР Л.М.

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

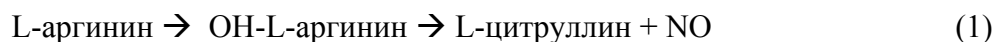
ОКСИД АЗОТА И КЛЕТКИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

В 80-е годы было установлено, что активированные макрофаги (МФ), культивируемые совместно с опухолевыми клетками-мишенями, убивают клетки-мишени. Оказалось, что агентом, ответственным за гибель опухолевых клеток, является оксид азота (NO). Участие NO в цитотоксической активности макрофагов по отношению к опухолевым клеткам было одним из первых функциональных свойств, описанных для этой молекулы. Ингибирование синтеза NO в макрофагах снижало противоопухолевую сопротивляемость организма и установление этого основного факта внесло огромный вклад в расширение исследований, связанных с образованием и функцией NO в норме и при патологии.

К настоящему времени имеется уже большое количество исследований, показывающих, что поддерживаемая продолжительная продукция NO в макрофагах обеспечивает их цитотоксическую/цитостатическую активность не только против опухолевых клеток, но и против вирусов, бактерий, грибков, простейших, гельминтов. Макрофаги используют NO как эффекторную молекулу, поэтому от количества производимого ими NO зависит эффективность действия макрофагов.

Известно, что NO синтезируется в клетках из L-аргинина и кислорода с участием специальных ферментов - NO-синтаз. Три известные для клеток млекопитающих изоформы NO-синтаз (конститутивные эндотелиальная и нейрональная NO-синтазы -eNOS и nNOS, соответственно, и индуцируемая iNOS) катализируют продукцию NO по одному

и тому же пути, который состоит из двух последовательных монооксигеназных реакций: одна молекула L-аргинина окисляется с образованием одной молекулы NO и одной молекулы L-цитруллина:



Первые 2 синтазы оксида азота eNOS и nNOS синтезируют небольшие количества NO – до десятков микромолей. Индуцируемая изоформа, которая экспрессируется, в иммунокомпетентных клетках после стимуляции медиаторами иммунных или воспалительных реакций, вырабатывает NO от нескольких часов до нескольких суток и приводит к появлению миллимолярных концентраций NO в клетках. Непонятным и широко дискутируемым в литературе остается вопрос – как при единообразии механизма реакций и сохранении центров связывания кофакторов среди изоформ NO-синтаз может существовать такое поразительное различие в количестве и временах продуцирования NO этими ферментами. В организме млекопитающих аргинин появляется как из пищи, так и синтезируется в печени в цикле мочевины из цитруллина и аммиака. Считают, что синтезируемый в цикле мочевины аргинин не выходит из цикла. О запасниках аргинина в организме также ничего не известно.

Изучая особенности образования NO клетками, в которых функционирует iNOS, мы попытались выяснить, каким образом эти клетки обеспечивают продукцию высоких количеств оксида азота. Нами были получены данные, которые позволяют говорить о функционировании в перитонеальных МФ и клетках печени специального цикла синтеза аргинина и оксида азота. Было исследовано влияние на образование NO в клетках печени двух участников цикла мочевины – хлорида аммония, являющегося активатором цикла мочевины, (и используемого нами также в качестве субстрата для синтеза аргининосукцината) и цитруллина, вторичного продукта реакции ферментативного синтеза NO из L-аргинина. Показано, что в присутствии этих субстратов как в клетках печени, так и в перитонеальных МФ синтезируются значительные количества NO. За образованием NO следили по появлению нитрозильных комплексов Гем-NO, регистрируемых методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Полученные данные позволяют говорить о том, что процесс синтеза NO из L-аргинина с участием NO-синтазы не является линейным, а представляет собой замкнутый цикл, в котором образующийся при синтезе NO и считавшийся ранее побочным продуктом цитруллин

используется вновь для синтеза аргинина и далее – для синтеза NO. При этом, количество образующегося NO будет все же ограничиваться наличием кофакторов и субстратов для ферментов синтеза аргинина и функционированием iNOS, которая является, наряду с другими NO-синтазами, тщательно регулируемым ферментом, и для нормального функционирования которой необходимы 6 кофакторов: FMN, FAD, NADH, BH₄, NADPH и связанный с активным центром кальмодулин.

Макрофаги таким образом сами могут обеспечивать себя аргинином для синтеза NO, поскольку цикл работает как молекулярная машина. Важно лишь обеспечить работу ферментов цикла необходимыми коферментами и субстратами.

КУРЧАЕВА Е.Е., ДРУЧИНИН А.С.

*«Воронежский государственный аграрный университет им. императора Петра I»,
Воронеж, Россия*

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИФИДОБАКТЕРИЙ ДЛЯ ОБРАБОТКИ ВТОРИЧНОГО МЯСНОГО СЫРЬЯ В ТЕХНОЛОГИИ МЯСНЫХ ИЗДЕЛИЙ

Применение модифицированного вторичного сырья мясной промышленности в современных технологиях может привести не только к значительной экономии материальных ресурсов и созданию безотходных производственных циклов, но и способствовать оздоровлению окружающей среды. Одним из таких видов сырья, перспективных для биомодификации с применением культур микроорганизмов, являются субпродукты II категории. В силу низких функционально-технологических свойств в связи с высокой массовой долей соединительной ткани, специфических санитарно-гигиенических показателей и потребительских характеристик, они недостаточно эффективно применяются в традиционных технологиях при производстве качественных мясных продуктов. В связи с этим использование биотехнологических методов для модификации вторичного мясного сырья с целью улучшения его функционально-технологических свойств и дальнейшего вовлечения в процессы производства мясных изделий является актуальным и перспективным.

В последние годы внимание многих ученых привлекают бифидобактерии. Это объясняется уникальными свойствами данных микроорганизмов, которые дают возможность их широкого использования в пищевой промышленности, в частности, в мясной и молочной.

В настоящее время установлено, что бифидобактерии являются преобладающим компонентом кишечной микробиологической системы, составляя в среднем до 90 % общего числа микроорганизмов. Именно бифидофлоре отводится ведущая роль в нормализации микробиоценоза кишечника, улучшении процессов всасывания и гидролиза жиров, белкового и минерального обмена, поддержании неспецифической резистентности организма.

В работе использовали вымя крупного рогатого скота, измельченное до состояния шрота, а также чистые культуры и закваски молочнокислых и бифидобактерий: «Биовестин» (*Bifidumbacterium bifidum*), ТУ9222-010-70517093-05 и сухой препарат молочнокислых бактерий лиофильной сушки «Биоантибут» (*Str. lactis*, *Str. Diacetilactis*, *Str. Cremoris*, *Leuc. Citrovorum*) ТУ49-493-83.

Был проведен выбор дозы вносимой закваски, состоящей из *Bifidumbacterium bifidum* и бактериального концентрата Биоантибут в соотношении 1:1. Интенсивность молочнокислого брожения в субстрате (шрот вымени) отчетливо проявляется в изменении активной кислотности, поэтому она и была выбрана для объективной оценки дозы вносимой закваски. Во всех образцах наблюдается снижение активной кислотности. Установлено, что при внесении 3% рН достигает 5,4 за 10 часов, при 5% – за 6 часов. Дальнейшее увеличение массовой доли закваски нецелесообразно как по экономическим соображениям, так и по технологическим.

Далее в ходе экспериментальных исследований изучались функционально-технологические свойства шрота вымени с использованием комбинированной закваски в процессе ферментации. Установлено положительное влияние продолжительности ферментации на влагоудерживающую и влагосвязывающую способность шрота вымени КРС (60 % и 48% соответственно).

Отмечено изменение аминокислотного состава, происходящее в процессе биотрансформации вымени КРС, которое объясняется развитием молочнокислых микроорганизмов в субстрате, количество которых значительно увеличивается к 24 ч.

В мясном сырье молочнокислые микроорганизмы расщепляют белки, что приводит к образованию пептидов и свободных аминокислот. Первоначальный протеолиз белков происходит под действием внеклеточных протеаз, в результате чего образуются олигопептиды и пептиды, которые в дальнейшем гидролизуются внутриклеточными пептидазами до свободных аминокислот. Это объясняет увеличение содержания фенилаланина, метионина, изолейцина, аргинина, гистидина в субстрате. Уменьшение содержания пролина, валина, изолейцина объясняется тем, что они необходимы для оптимального роста бактерий. Кроме этого, свободные аминокислоты участвуют в образовании специфического аромата, являясь предшественниками некоторых летучих соединений. Таким образом, под воздействием протеолитической системы молочнокислых микроорганизмов, входящих в бактериальные закваски, происходят желаемые изменения исходного сырья, а именно, деструкция белков, в том числе коллагеновых, накопление продуктов метаболизма бактерий, обуславливающих аромат биотрансформированного сырья, о чем свидетельствуют полученные органолептические характеристики.

Работа выполнена при поддержке фонда РГНФ № 11-02-00574 а.

КХАТАБ З.С., САЗЫКИНА М.А., НОВИКОВА Е.М.,
САЗЫКИН И.С., КОСТИНА Н.В.

НИИ биологии Южного федерального университета, Ростов-на-Дону, Россия

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СВЕТЯЩИХСЯ БАКТЕРИЙ В СИСТЕМЕ МОНИТОРИНГА ЗАГРЯЗНЕНИЯ РОДНИКОВ РОСТОВА-НА-ДОНУ

Составной частью экологического мониторинга окружающей природной среды является биотестирование. Оно включает в себя систему наблюдений, оценки качества среды и прогноза различных изменений в биоте, вызванных факторами антропогенного происхождения.

Целью данной работы было изучение качества воды родников г. Ростова-на-Дону при помощи бактериальных lux-биосенсоров.

Образцы воды для биотестирования отбирались из 15 родников г. Ростова-на-Дону осенью 2011 г. Для обнаружения в среде токсинов и генотоксинов использовалась батарея

бактериальных lux-сенсоров. Мерой загрязнения служил фактор индукции, который определяли как отношение интенсивности свечения суспензии штамма, содержащей тестируемый образец, к интенсивности свечения контрольной суспензии штамма.

Для обнаружения в среде химических агентов, повреждающих в клетке ДНК, был использован биосенсор *E. coli*C600 (pPLS-1). Его применение позволило зарегистрировать слабый генотоксический эффект в 2 пробах родниковой воды без применения метаболической активации, и в воде 2 родников в случае использования метаболической активации. Тестирование со штаммом *E. coli*MG1655 (ColD-lux) выявило также 2 пробы воды, содержащие прямые мутагены; при метаболической активации генотоксичность не была обнаружена. Оба биосенсора зафиксировали наиболее высокий генотоксичный эффект в воде родника, расположенного в районе ж/д станции «Аксай». Возможно, что генотоксичность в этом источнике регистрируется благодаря содержанию бенз(а)пирена, содержание которого было показано в результате параллельно проведенного химического анализа.

Тестирование с биосенсором *E. coli*MG1655 (pKatG-lux), который отвечает на присутствие в среде веществ, вызывающих окислительный стресс, в частности, перекиси водорода, содержится в воде всех исследованных источников. Билюминесцентный ответ биосенсора *E. coli* MG 1655 (pSoxS-lux) регистрировался в 5 родниках из 15 исследованных (33,3 %), что свидетельствует о присутствии в воде данных родников супероксид-аниона.

Данные по загрязнению образцов воды родников г. Ростова-на-Дону, полученные при помощи сенсоров *E. coli* MG1655 (pMerR-lux) и *E. coli*MG1655 (pArsR-lux) свидетельствуют о содержании в родниковой воде количеств ртути и мышьяка, гораздо меньших, чем действующие в настоящее время ПДК в воде водоемов санитарно-бытового водопользования (СанПиН 2.1.4.1074-01) и водоемов у пунктов питьевого и культурно-бытового водопользования (ГН 2.1.5.1315-03). Данные химического анализа также подтвердили присутствие ртути в концентрациях, не превышающих вышеуказанные ПДК.

Для обнаружения в среде химических агентов, повреждающих в клетке белки, использовались два биосенсора - *E. coli*MG1655 (GprE-lux) и *E. coli*MG1655 (pIbpA-lux). Тестирование с использованием биосенсора *E. coli*MG1655 (GprE-lux) выявило вещества,

повреждающие белки, в 11 пробах родниковой воды, а штамм *E. coli*MG1655 (pIbpA-lux) показал их наличие в воде всех исследованных родников. Самый высокий эффект, полученный с обоими биосенсорами, зарегистрирован в воде родника, расположенного в районе ж/д станции «Аксай».

Для детекции в среде химических агентов, повреждающих липиды и, в частности, клеточные мембраны, использовался биосенсор *E. coli*MG1655 (pFabA-lux). Статистически достоверный ответ биосенсора был отмечен в присутствии всех проб воды.

Таким образом, как показали наши исследования, lux-биосенсоры могут занять ключевую роль в биотестировании качества окружающей среды. Практическое использование тест-системы на их основе позволяет достичь высокой экспрессности и производительности в тестировании качества природной среды, дает возможность проводить комплексную экспресс-оценку состояния экосистем.

ЛАВРЕНТЬЕВА Е.В., РАДНАГУРУЕВА А.А., БАНЗАРАКЦАЕВА Т.Г.

Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ, Россия

АЛКАЛИ- И ТЕРМОСТАБИЛЬНЫЕ ПЕПТИДАЗЫ ПРОКАРИОТ БАЙКАЛЬСКОЙ РИФТОВОЙ ЗОНЫ

Исследования пептидаз экстремофильных микроорганизмов в прикладном аспекте привели к обнаружению ферментов, обладающих уникальными свойствами: экстремально термостабильных, устойчивых к экстремальным значениям pH, действию химических детергентов, органических растворителей, (Niehaus et al., 1999; Friedrich and Antranikian, 1996; Horikoshi, 1996). Особое биотехнологическое значение имеют термостабильные и щелочеустойчивые внеклеточные пептидазы. Байкальский регион, где распространены водные экосистемы с резко градиентными физико-химическими характеристиками, является уникальным объектом для выделения алкало- и термофильных микроорганизмов.

В щелочных гидротермах Байкальской рифтовой зоны из проб микробных матов, воды и донных осадков были выделены культуры аэробных термофильных алкалитолерантных и алкалифильных бактерий. Изученные нами 15 органотрофных бактерий способны развиваться в широком диапазоне температур от 23 до 60⁰C и pH от 7,6

до 10,0. Анализ генов 16S рРНК позволил отнести исследуемые штаммы к представителям родов *Bacillus*, *Paenibacillus* и *Anoxybacillus*. Для определения субстрат-специфичной активности пептидаз использовали синтетические 20 мМ *n*-нитроанилидные субстраты, специфичные для определенных групп внеклеточных пептидаз – субтилизин-подобных, химотрипсин-подобных, трипсин-подобных, цистеиновых и аминопептидаз.

Определение субстратной специфичности показало, что изученные внеклеточные пептидазы относятся к классу сериновых пептидаз субтилизин-подобного типа. Характерно, что образование пептидаз зависит от источника азота и времени культивирования. Обнаружено, что наибольшая активность по субстрату для субтилизин-подобных пептидаз обнаружена на среде с триптоном. Отмечено, что добавление в состав питательной среды казеина и желатина приводило к снижению продукции фермента. Активный синтез ферментов отмечен на 12 ч и 36 ч культивирования. Показана широкая вариабельность температурного оптимума и стабильности. Наиболее высокая активность на субстрате для субтилизин-подобных пептидаз обнаружена при 50⁰С. Показано, что температура 60⁰С для некоторых культур бактерий является наиболее благоприятной для развития аминопептидазной активности. Исследования рН оптимума и стабильности проведены в диапазоне рН 5,8 – 12,03. Показано, что субтилизин-подобные пептидазы являются высокощелочными с рН оптимумом больше 8.

Исследованные нами культуры не гидролизуют субстраты, специфичные для химотрипсинподобных и цистеиновых пептидаз, независимо от времени культивирования (до 60 ч) и источников органического азота (триптон, казеин и желатин).

Проведенный нами анализ функциональных групп активного центра показал, что активность внеклеточных пептидаз подавляется специфическим ингибитором сериновых пептидаз – FMSF. Ингибиторы цистеиновых пептидаз – IAA и металлопептидаз – EDTA либо совсем не оказывали влияния на активность, либо подавляли активность в незначительной степени. На основании определения природы функциональных групп активного центра и субстратной специфичности, можно предположить, что у исследованных штаммов бактерий преимущественно содержатся щелочные и термостабильные пептидазы, относящиеся к классу сериновых пептидаз субтилизин-подобного типа.

ЛАГУНОВА Н.Л.¹, ПУНГУС И.Ф.²

¹Тульский государственный университет, Тула, Россия

²ФГБУН ИБФМ им. Г.К. Скрыбина, Пущино, Россия

БИОСЕНСОРНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ПСЕВДОМОНАД, СТИМУЛИРУЮЩИХ РОСТ РАСТЕНИЙ, К РЯДУ ТЕХНОГЕННЫХ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ

В последние годы большое внимание уделяется развитию экологически чистых методов стимуляции роста растений и борьбы с их заболеваниями.

Бактерии рода *Pseudomonas* способны к стимуляции роста растений, что используется при создании биопрепаратов на их основе. Влияние псевдомонад на растения включает непосредственную стимуляцию роста растений за счет синтеза различных метаболитов, полезных для растений и опосредованную стимуляцию угнетением почвенных фитопатогенов. Псевдомонады также являются активными нефтеструкторами, что расширяет возможность применения биопрепаратов на их основе для стимуляции роста растений на территориях сельскохозяйственных земель, подверженных техногенным загрязнениям, в том числе углеводородами нефти и поверхностно-активными веществами (ПАВ).

В работе использован штамм *Pseudomonas aureofaciens* BS1393, являющийся основой биопрепарата Псевдобактерин-2. Биопрепарат применяется в России на территории 27 областей и показывает высокую биологическую активность и экономическую эффективность в качестве средства защиты для зерновых и овощных культур от фитопатогенов.

Процесс деструкции углеводородов бактериальными клетками протекает при участии кислорода, что позволило использовать биосенсор на основе кислородного электрода для оценки окислительной активности псевдомонад. Биосенсор предназначен для формирования цифрового электрического сигнала, пропорционального концентрации определенного химического соединения или ряда соединений, в данной работе - углеводородов нефти (гексан, ундекан, бензол, толуол (бензиновая фракция), гексадекан, нафталин (дизельная фракция)), интермедиатов окисления нафталина и толуола (бензойная и салициловая кислоты) и наиболее распространенных анионных ПАВ

(додецилсульфат натрия и додецилбензосульфат натрия). В качестве измеряемого параметра (ответа биосенсора) использовали максимальную скорость изменения выходного сигнала биосенсора, связанную с уменьшением кислорода в приэлектродном пространстве при добавлении субстратов в измерительную кювету.

Для исследуемого штамма, выращенного на агаризованной среде Эванса с сукцинатом (1 г/л), получена субстратная специфичность ферментов-оксигеназ в отношении нефтекомпонентов и ПАВ биосенсорным способом. Наибольший ответ биосенсора зарегистрирован на ростовой субстрат (сукцинат) и принят за 100%. Отмечена небольшая активность псевдомонад в отношении нафталина (скорее всего за счет широкой субстратной специфичности оксигеназ) и в отношении токсичных для микробных клеток субстратов – бензола и толуола (10% от максимальной). Ответы биосенсора на алканы оказались различны, самый высокий ответ получен на ундекан (20%), самый низкий – на гексадекан (8%). Из моноароматических соединений *P. aureofaciens* BS1393 лучше всего окислял бензойную кислоту (50%), что позволило в дальнейшем использовать ее в качестве ростового субстрата. Немного ниже оказалась окислительная активность псевдомонад в отношении додецилсульфата натрия и додецилбензосульфата натрия (32% и 28% соответственно).

Использование при культивировании в качестве ростового субстрата бензойной кислоты способствовало увеличению окислительной активности псевдомонад в отношении ароматических соединений (бензола – в 4 раза, толуола – в 7 раз), что объясняли индукцией ферментов-оксигеназ. Также возросла окислительная активность в отношении алканов (гексана в 2,5 раза, ундекана в 3,5 раза, гексадекана в 3 раза), что связывали с адаптивными реакциями псевдомонад, возникающими при выращивании на среде с бензойной кислотой, способной угнетать активность ферментных систем окислительного фосфорилирования и снижать внутриклеточный pH бактерий.

Таким образом, биосенсорный анализ показал возможность применения биопрепарата Псевдобактерин-2 на территориях сельскохозяйственных земель, подверженных техногенным загрязнениям, что может оказаться перспективным и требует дальнейших исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ №11-04-97562-р_центр-а.

ЛАКТИОНОВА А.А.

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии
им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия*

СИНЦИТИАЛЬНОЕ СЛИЯНИЕ И ФОРМИРОВАНИЕ ДВУЯДЕРНЫХ НЕРВНЫХ КЛЕТОК

Двухядерные нервные клетки впервые были обнаружены Р. Ремаком в 1837 году. С тех пор двухядерные нейроны сотни раз исследовали многочисленные гистологи, такие как: Ранвье, Штёр, Догель, Шпильмаер, Бильшовский, Кёликер, Альцгеймер и другие. Двухядерные нейроны обнаружены в различных центральных и периферических отделах нервной системы: в коре полушарий большого мозга, в гиппокампе, бледном шаре, стволе мозга, мозжечке, эпифизе, спинном мозге, спинномозговых ганглиях, в пограничном симпатическом стволе, превертебральных ганглиях и интрамуральных нервных сплетениях. Двухядерные нервные клетки исследовались у человека, обезьяны, лошади, свиньи, овцы, кролика, кошки, собаки, крысы, мыши, морской свинки, лягушки, сельди. Вопрос о двухядерных клетках затрагивает проблему синцитиальной связи в нервной системе и проблему неделимости высокодифференцированных нейронов. Поэтому исследуемую проблему следует считать актуальной.

Наиболее важным является вопрос о механизме формирования феномена двухядерности нейронов. Механизмом формирования двухядерных нейронов является клеточное слияние. У позвоночных межнейрональный синцитий обнаружен у кошек и крыс (Santander et al., 1988; McCarthy et al., 2009). Нами синцитиальные связи нервных отростков были обнаружены в энтеральном нервном сплетении у 1-2-месячных поросят, в симпатических ганглиях, у эмбрионов крыс 14-22 дней развития, в гиппокампе и мозжечке кроликов и в коре большого мозга крыс и человека. Описаны структурные закономерности синцитиальных перфораций спаренных мембран смежных нейронов. В культуре ткани на вторые у нейронов формируются двухядерные и многоядерные клетки. На полутонких срезах удается обнаружить образование вдоль контактирующих краев нейронов множественные цитоплазматические мостики слияния. С помощью электронного микроскопа это действительно подтверждается. Вместо контактирующих наружных клеточных мембран, разграничивающих цитоплазму смежных нейронов, обнаруживаются

только их короткие остаточные фрагменты. Нейроплазмы смежных клеток непосредственно переходят друг в друга.

Таким образом, в этих опытах впервые удалось смоделировать синцитиальную связь между нейронами *in vitro*, доказать их слияние и тем самым подтвердить принципиальное сходство нейронов с другими ненервными клетками в вопросе межклеточных взаимоотношений и образования двуядерности. Кроме того, результаты этих экспериментов, по нашему мнению, решают главный вопрос дискуссии о принципиальной возможности или невозможности синцитиальной связи нейронов. Продемонстрированы не только начальные мелкие мембранные поры и перфорации, а показано почти полное разрушение мембран спаренных нейронов и слияние их цитоплазмы в динамике.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 12-04-90001-Bel_a.

ЛАМБЕРОВА М.Э., БУЯНОВА А.С., ЛАМБЕРОВА А.А., КОЧНЕВА Т.А.

Бийский технологический институт (филиал) ФГБОУ ВПО «Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова», Бийск, Россия

БИОСИНТЕЗ ШИКИМОВОЙ КИСЛОТЫ В КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЕ

В России и в мире актуальным является поиск новых сырьевых источников препаратов, применяемых для лечения и профилактики гриппа, при химиотерапии в онкологии, а также обладающих антикоагулянтной и антитромботической активностью. Такие препараты изготавливают на основе шикимовой кислоты.

Шикимовая кислота – это важнейшее промежуточное звено в биосинтезе лигнина, ароматических аминокислот и многих алкалоидов растений и микроорганизмов. Шикимовая кислота встречается в диких лекарственных растениях - звездчатый анис, амбровое дерево, *гинкго* билоба, а также была обнаружена в сельскохозяйственных растениях в ходе селекционной работы с использованием биотехнологических методов при выработке устойчивости к гербициду глифосату. Было показано, что глифосат приводит к накоплению шикимовой кислоты, ингибируя ферменты, ответственные за ее дальнейшее превращение в клетке.

В биотехнологии растительные клетки можно размножать круглогодично методом культуры клеток и тканей *in vitro*, в том числе и клетки продуцентов шикимовой кислоты.

Целью данной работы является исследование способности гречихи к биосинтезу шикимовой кислоты в культуре клеток *in vitro* на среде с глифосатом.

Для этого получены и оценены культуры клеток *in vitro* гречихи сорта «Аромат», из них приготовлены экстракты, в которых было определено наличие шикимовой кислоты методом ВЭЖХ.

В качестве экспланта был взят гипокотиль корня после проращивания стерильных семян гречихи. Эффективность инициации каллусогенеза оценивали на агаризованной питательной среде Мурасиге-Скуга (МС) с 2,4-Д и кинетином. Затем определяли эффективность каллусогенеза на агаризованной среде МС с α -НУК, кинетином и разной концентрацией глифосата (табл. 1).

Оценку эффективности каллусогенеза в клеточной культуре гречихи *in vitro* проводили на 10-е сутки культивирования при разных концентрациях глифосата в среде МС. Лучшие из полученных результатов представлены в табл. 1.

Таблица 1

Зависимость эффективности каллусогенеза в клеточной культуре гречихи *in vitro* от концентрации глифосата в среде МС

Концентрация глифосата, мг/л	Эффективность каллусогенеза, %
контроль	20,0
0,00025	7,0
0,00050	13,0
0,00075	11,0

Из табл. 1 видно, что наибольшая эффективность каллусогенеза была при культивировании клеточной культуры гречихи *in vitro* на питательной среде МС, содержащей $0,5 \times 10^{-3}$ мг/л глифосата. Такая среда использовалась далее в опытах по определению шикимовой кислоты в экстрактах из культуры клеток гречихи *in vitro*.

Затем проводили экстракцию из полученной каллусной культуры 75 %-ным водно-спиртовым раствором в 4х-кратном объеме в течение 3 ч. В полученных экстрактах из биогречихи методом ВЭЖХ определяли шикимовую кислоту на жидкостном хроматографе «Agilent 1200» с дегазатором, градиентным насосом и УФ-детектором.

Разделение веществ, содержащихся в экстрактах, проводили на колонке Zorbax Bonus RP (C18) 2,1×150 мм с размером частиц 5 мкм при 25 °С.

Были получены пики шикимовой кислоты (рис. 1) на хроматограммах экстрактов из культуры клеток гречихи *in vitro* при культивировании на питательной среде МС с $0,5 \times 10^{-3}$ мг/л глифосата в течение 4...16 суток.

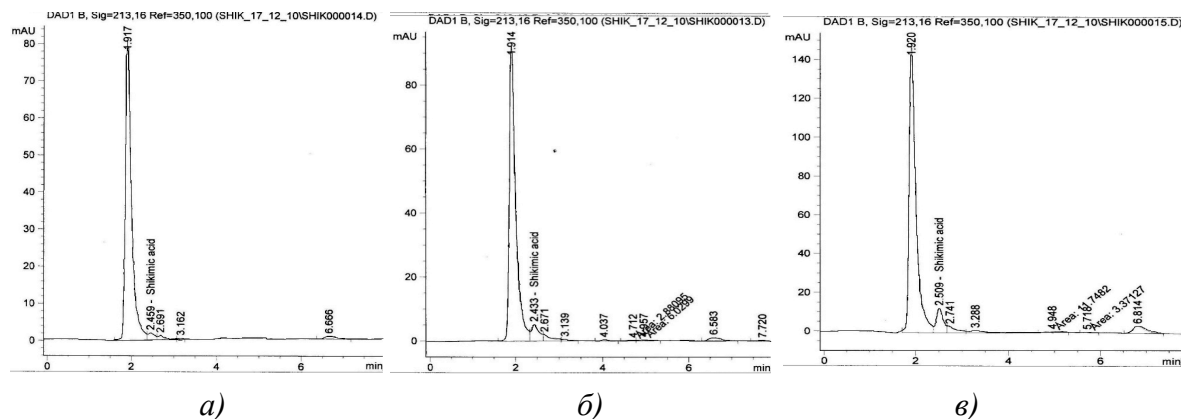


Рис. 1. Хроматограммы шикимовой кислоты, полученные методом ВЭЖХ

Пик шикимовой кислоты (рис. 1) наблюдался в экстракте из 4-суточной (а), а затем только 10-суточной (б) и 16-суточной (в) культур клеток гречихи *in vitro*.

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что установлена возможность накопления шикимовой кислоты в клеточных культурах гречихи *in vitro* на агаризованной питательной среде МС с глифосатом.

ЛАТЫНИНА Т.И., ГАРАСЬКО Е.В.

Ивановская государственная медицинская академия, Иваново, Россия

ПРОБЛЕМЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ И ПРОФИЛАКТИКИ ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИИ У ВОЕННОСЛУЖАЩИХ

Внебольничная пневмония (ВП) наряду с гриппом, острыми респираторными вирусными инфекциями, острыми бронхитами занимает первое место в структуре заболеваний внутренних органов у военнослужащих по призыву и по контракту ВС РФ. Согласно официальной статистике заболеваемость ВП в России достигает 14 – 15%, а

среди военнослужащих, проходивших службу по призыву – 29,6% и за последние 3 года отмечается значительный рост заболеваемости внебольничными пневмониями.

Цель настоящего исследования – оценить резистентность штаммов *H. influenzae* выделенных от пациентов с внебольничной пневмонией в закрытом организованном коллективе – воинское соединение (призывники первого месяца службы).

Исследованный материал – мокрота от 38 больных в возрасте от 18 до 20 лет с диагнозом внебольничная пневмония, находившихся на лечении в терапевтическом отделении ФГУ «1998 Военный госпиталь», Ивановской области в 2010 г.

Выделение, идентификация и определение чувствительности к антибиотикам *H. influenzae* проводились в соответствии с методическими рекомендациями Межрегиональной ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ), НИИ антимикробной химиотерапии Смоленской государственной медицинской академии.

В результате исследований было выделено 38 штаммов микроорганизмов, преобладающими видами были *H. influenzae* (24 штамма – 63,1%), *S. pneumoniae* (6 штаммов – 15,7%), *St. aureus* (4 штамма – 10,6%), *K. pneumoniae* (4 штамма – 10,6%). Грибы рода *Candida* (15 штаммов – 39,4%) были выделены в ассоциации с другими микроорганизмами. *H. influenzae* выделялась в монокультуре в 75% случаев. Среди микробных ассоциаций преобладали комбинации *H. influenzae* + грибы рода *Candida*. В результате определения чувствительности к антибиотикам дискодиффузионным методом установлено, что резистентность выделенных штаммов *H. influenzae* к ампициллину/амоксициллину составила 30,7%. Чувствительность к цефалоспорином III поколения составила 52,3%, к цефтазидиму – были резистентны 26%, к цефтриаксону – 21,7%, к цефатоксиму были чувствительны все выделенные штаммы *H. influenzae*.

Результаты проведенного нами исследования позволили оценить спектр антибиотикочувствительности *H. influenzae* – ведущего возбудителя, выделенного от пациентов с внебольничной пневмонией в закрытом коллективе – воинское соединение (призывники первого месяца службы), что может быть полезным для выбора антибактериальной терапии до получения результатов микробиологического исследования у данной популяции пациентов.

При проведении эпидемиологического анализа установлено, что между ежемесячными показателями заболеваемости ВП и ОРЗ отмечается тесная корреляционная связь. Это свидетельствует об общности механизма развития эпидемического процесса между этими инфекциями и их взаимообусловленности. Причинами повышения уровня заболеваемости внебольничными пневмониями являются:

- переохлаждение военнослужащих (при проведении подготовки и во время полевого выхода, при обеспечении мероприятий по поддержанию боевой готовности во время несения комендантской и караульной службы, при длительных построениях перед казармой и при передвижении в столовую) при отсутствии пунктов обогрева и условий для просушивания обмундирования, а также несоответствия формы одежды температуре наружного воздуха;

- появление в воинских частях большого количества источников передачи инфекции вследствие сезонного подъема уровня заболеваемости ОРЗ среди гражданского персонала и среди военнослужащих по контракту;

- наличие активно действующего механизма передачи инфекции в результате скученного размещения военнослужащих в спальном помещении казарм, где приходится 6-7м³ воздуха на одного человека (вместо 12 м³ в соответствии с требованиями);

- наличие активно действующего фактора передачи инфекции в результате проведения уборки казарменных помещений без использования дезинфицирующих средств и нерегулярного проветривания спальных и учебных помещений;

- невыполнение рекомендаций медицинских работников по освобождению военнослужащих по призыву от нарядов, строевой и физической подготовки после перенесенного ОРЗ;

- неудовлетворительная работа специалистов медицинской службы учебных центров по организации специфической профилактики (иммунизация против гриппа и ВП).

Первоочередными мерами для снижения заболеваемости ОРЗ и ВП будут специфическая профилактика – иммунизация всех военнослужащих по призыву пневмококковой вакциной (Пневмо-23) и гриппозной вакциной, а также строгое соблюдение мероприятий по неспецифической профилактике.

ЛЕБЕДЕВ В.Г.¹, МАТВЕЕВА С.В.², ЧУПРИНА О.И.³,

РОЗОВА Х.А.³, ШЕСТИБРАТОВ К.А.¹

¹Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино, Россия

²Северный (Арктический) Федеральный Университет имени М.В. Ломоносова, Архангельск, Россия

³Пуцинский Филиал МГУ им. М.В.Ломоносова, Пушкино, Россия

АНАЛИЗ ФЕНОТИПА И БИОБЕЗОПАСНОСТИ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ОСИНЫ И БЕРЕЗЫ С ГЕНОМ *GSI*

Доступность неорганических форм азота часто является лимитирующим фактором для продуктивности растений. Чтобы ускорить рост древесных лесных пород, мы клонировали ген глутаминсинтетазы *GSI* из сосны обыкновенной и перенесли его в растения осины (*Populus tremula*) и березы (*Betula pubescens*) с помощью агробактериальной трансформации. Оценка трансгенных растений проводилась в течение трех лет. По шесть линий каждой породы (контроль и пять с геном *GSI*) были высажены в горшки и выращивались в теплице (2009-2010 годы) и на открытой площадке (2011 год). Трансгенные растения осины были схожи между собой: их высота варьировала от 91 до 123% по сравнению с контролем, а объем древесины – от 114 до 141%. Среди линий березы две (2b и 2c) отличались замедленным ростом, а одна (8b) – ускоренным. По сравнению с контролем, их высота была ниже на 25-31% или выше на 41%, соответственно. Объем древесины был уменьшен на 26-49% или увеличен на 74%, соответственно. Анализ морфологии листьев трансгенных деревьев, проведенный с помощью программы LAMINA, не показал существенных различий от контрольных растений по таким параметрам, как площадь, длина, ширина, вертикальная и горизонтальная симметрия и ряду других. Однако были обнаружены существенные различия по признаку округлости листьев у трех линий березы и по признаку зубчатости листьев у двух линий осины. С целью оценки биобезопасности в конце каждого вегетационного сезона мы проводили оценку ферментативной активности почвы. Анализы

не показали существенных различий между трансгенными и контрольными растениями осины и березы.

ЛЕБЕДЕВ В.Г.¹, ФАСХИЕВ В.Н.², САВЧИКОВА Е.В.², ШЕСТИБРАТОВ К.А.¹

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

²Уральский Федеральный Университет имени первого Президента России Б.Н.Ельцина,
Екатеринбург, Россия

ИНТЕГРАЦИЯ Т-ДНК С РАЗЛИЧНЫХ ВЕКТОРОВ ПРИ АГРОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ОСИНЫ

В настоящее время в мире все большее распространение получают трансгенные растения, содержащие несколько перенесенных генов. Помимо сочетания ряда признаков, трансформация различными генами также необходима для придания растениям полигенных признаков и модификации сложных путей метаболизма. Особенный интерес представляет перенос нескольких генов в геном древесных растений. Например, этот способ может применяться для одновременного встраивания различных хозяйственно-ценных генов с генами индукции стерильности для предотвращения утечки генов с пылью в целях биобезопасности. Мы провели ко-трансформацию осины (*Populus tremula* L.) различными генами и изучали частоту их ко-интеграции. В работе мы использовали систему, состоящую из бинарного вектора и обезоруженной Ti-плазмиды pCBE21 с двумя участками Т-ДНК, находящихся в одном штамме *Agrobacterium tumefaciens*. Бинарные векторы, использованные нами, помимо селективного гена *nptII* содержали маркерные гены *uidA* (pBI121), *gfp* (pBINmGFP5-ER), ген глутаминсинтетазы сосны *GSI* (pGS) или ген зеаматина (pBINZP). Всего было получено и проанализировано 50 трансгенных линий осины. Частота ко-трансформации генами с Ti-плазмиды в зависимости от вектора варьировала от 20 до 64%, причем ген *hpt* из T_L-области переносился почти в три раза чаще, чем ген *ags* с T_R-области. Перенос генов из всех трех Т-ДНК был отмечен у 4 из всех трансгенных линий осины. Ко-перенос генов *hpt* и *ags* Ti-плазмиды после трансформации

штаммом с вектором pV121 происходил значительно чаще, чем после трансформации другими векторами. Полученные данные свидетельствуют о возможности использования данной системы для одновременного переноса в растения нескольких целевых генов.

ЛЕБЕДЕВ В.Г., ШЕСТИБРАТОВ К.А.

Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино, Россия

ПРИМЕНЕНИЕ СТИМУЛЯТОРОВ РОСТА В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* ЯСЕНЯ ОБЫКНОВЕННОГО

Стимуляторы роста в последнее время находят широкое применение в биотехнологии растений, особенно на самых критичных этапах клонального микроразмножения - укоренении и акклиматизации. Наиболее эффективным их использование может быть на древесных растениях, которые обычно хуже укореняются в культуре *in vitro* и испытывают сложности с адаптацией к нестерильным условиям. В своей работе мы исследовали эффект природных (дигидрокверцетин, циркон, рибав) и синтетических стимуляторов роста (мелафен, фумар, эпин) на укоренение и акклиматизацию микрорастений ясеня обыкновенного (*Fraxinus excelsior* L.). Эксперименты показали несомненный положительный эффект стимуляторов роста на корнеобразование ясеня *in vitro*. Циркон в концентрации 0,05-0,2% и мелафен в концентрации 10⁻⁵% повысили укореняемость на 28,6-36,8% и 30,8%, соответственно. На средах с мелафеном также отмечалось более раннее образование корней. Дигидрокверцетин в концентрации 0,01% повысил укореняемость на 23,9% и увеличил количество корней в 1,8 раза. Последствие стимуляторов роста отмечалось и в процессе акклиматизации растений ясеня к тепличным условиям. Растения после укоренения с мелафеном, фумаром и цирконом раньше тронулись в рост по сравнению с контролем. Через два месяца после высадки растения, укоренявшиеся на 0,01% дигидрокверцетина, были выше контроля на 45%. Обработка микропобегов ясеня в процессе акклиматизации препаратом эпин в концентрации 0,02% способствовала получению более развитых и

однородных растений. Таким образом, применение синтетических и природных стимуляторов роста в клональном микроразмножении ясеня позволило увеличить выход укорененных растений и ускорить сроки получения посадочного материала.

ЛЕБЕДЕВ В.Г., ШЕСТИБРАТОВ К.А.

*Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института
биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
Пушино, Россия*

ВОПРОСЫ БИОБЕЗОПАСНОСТИ ТРАНСГЕННЫХ ДЕРЕВЬЕВ

Трансгенные растения впервые появились на полях в 1996 году и с тех пор площади под ними ежегодно возрастали на 10-15%. В 2011 году они уже выращивались в 29 странах на площади 160 млн. га, что составляет около 12% всех пахотных земель в мире. В настоящее время из трансгенных древесных растений возделываются только папайя (в США с 1999 года) и тополь (в Китае с 2002 года), но в ближайшее время ожидается коммерциализация еще нескольких видов. Деревья отличаются большой продолжительностью жизни и способностью существовать в природных экосистемах без помощи человека, а их взаимоотношения с окружающей средой более сложны и менее изучены, чем у травянистых видов. По этим причинам в области биобезопасности трансгенных деревьев на первый план выходят вопросы переноса чужеродных генов через пыльцу, влияния на немишенные организмы и стабильности экспрессии трансгенов. Для предотвращения утечки генов с пыльцой был разработан ряд генно-инженерных подходов. Полученные с их помощью стерильные деревья, помимо исключения утечки трансгенов, могут обладать большей продуктивностью и не производят аллергенную пыльцу. Одним из широко обсуждаемых аспектов биобезопасности трансгенных деревьев является возможность воздействия на окружающую среду модификации состава лигнина, который играет значительную роль в биогеохимическом цикле углерода. Его изменение в трансгенных растениях может оказывать воздействие на почвенные и другие организмы. Особый интерес для древесных растений, культивируемых много лет, представляет оценка характера и уровня экспрессии чужеродных генов на протяжении всего периода их

выращивания. Из всего этого возникает необходимость проведения испытаний трансгенных деревьев в полевых условиях в различных почвенно-климатических зонах в течение ряда лет. Работы в этом направлении в России ведутся, но они должны быть расширены.

ЛЕБЕДЕВА А.О.¹, ВАЙНЕР О.Б.¹, ЮНОШЕВ А.С.², ЛАКТИОНОВ П.П.¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,*

Новосибирск, Россия

² *Институт гидродинамики им. М.А. Лаврентьева СО РАН, Новосибирск, Россия*

НОВЫЕ МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ЗАМЕСТИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ

Травма и артроз гиалинового хряща - наиболее часто встречающиеся заболевания опорно-двигательного аппарата. Гиалиновый хрящ обладает очень низкой способностью к регенерации повреждений, а эффективные протоколы лечения дефектов гиалинового хряща, как правило, малоэффективны, что в результате приводит к необходимости полного протезирования суставов.

Для восстановительной терапии гиалинового хряща мы предлагаем использовать клеточно-наполненные трансплантаты, состоящие из двух типов материалов: мембран, изготовленных методом электроспиннинга, и фотополимеризуемых биосовместимых гелей. Мембраны были изготовлены из растворов нейлона-6, полилактид-ко-гликолида, поликапролактона, и их смесей с желатином в 1,1,1,3,3,3-гексафторизопропанолем методом электроспиннинга на аппарате NF-103 (MECC, Japan). Толщина мембран составляла 100±20 микрон, толщина волокон 1±0,3 микрона. Было показано, что хондробласты из гиалинового хряща человека прикрепляются и пролиферируют на поверхности таких мембран, особенно хорошо на мембранах из смесей полимеров с желатином.

Для получения фотополимеризуемого геля были синтезированы производные хондроитин-4-сульфата и желатина, модифицированные глицидилметакрилатом. Фотополимеризуемый гель содержал 12,5 мг/мл желатина, 25 мг/мл хондроитин-4-сульфата, 2,5 мг/мл полиэтиленгликольметакрилата. Для формирования геля в раствор добавляли 0,04% фотоинициатора Dagocur 2959B и освещали ультрафиолетовым источником света

MTE U 301 UV LED lamp в течение 3 минут (мощность 28 мВт/см²). Было показано, что хондробласты, заключенные в такой гель, сохраняют свою жизнеспособность и способны секретировать компоненты внеклеточного матрикса. Прочность геля составила не менее 11 кПа.

Были получены стопки тканезамещающего материала, состоящие из листов, полученных электроспиннингом, пропитанных раствором фотополимеризуемой композиции и заполимеризованных после освещения в избытке фотополимеризуемого раствора. Показано, что прочность на разрыв для такого материала составляет 2,8 МПа, и что он может быть эффективно зафиксирован фотополимером в поврежденном участке и использоваться для репарации гиалинового хряща

ЛЕВАНОВА Н.А., ТУХВАТУЛИН А.И.

ФГБУ "НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи" Минздравсоцразвития РФ, Москва, Россия

МОДЕЛЬНАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ДОСТАВКИ БЕЛКОВЫХ ВЕЩЕСТВ

Разработка систем доставки биологически активных веществ внутрь эукариотической клетки является актуальной задачей современной биологической науки. Решение подобной задачи важно как для фундаментальных исследований при изучении механизма действия факторов вирулентности патогенных микроорганизмов и механизмов протективного иммунитета, а также для прикладных исследований, связанных с разработкой новых лекарственных средств. В качестве подобной системы внутриклеточной доставки белковых веществ может выступать сибироязвенный токсин.

Данный токсин состоит из трех компонентов: протективного антигена (РА), отечного фактора (ЕF) и летального фактора (LF). На поверхности клетки-хозяина РА образует структуру из семи субъединиц, связывает от одной до трех молекул ЕF или LF (или ЕF и LF совместно) и подвергается эндоцитозу. В последующем, образовавшийся комплекс преобразуется в пору, через которую возможно проникновение ЕF и LF в цитоплазму клетки. Известны литературные данные о возможности доставки с помощью

этой системы внутрь клетки химерных белков, состоящих из двух субъединиц: N-концевого домена токсинов *Bacillus anthracis* (EF_N или LF_N) и исследуемого белка.

Нами было проведено изучение возможности применения описанной системы для трансмембранного переноса токсина Lgt1, синтезируемого бактерией *Legionella pneumophila*. Lgt1 – глюкозилтрансфераза, которая инактивирует фактор элонгации 1A (eEF1A). Как известно, eEF1A играет ключевую роль в биосинтезе белка на рибосоме, в связи с чем инактивация данного фактора ведет к остановке трансляции клеточной мРНК и вызывает гибель эукариотической клетки.

В ходе нашей работы ген протективного антигена *B. anthracis* был клонирован в штамм *Escherichia coli* и получен рекомбинантный белок, обладающий требуемой биологической активностью. Таким же образом был получен химерный белок, состоящий из Lgt1 и EF_N (EF_N::Lgt1). Добавление смеси PA и EF_N::Lgt1 к клеткам млекопитающих приводило к их гибели, тогда как добавление используемых компонентов отдельно или обработка клеток каталитически-неактивными вариантами Lgt1 не вызывало биологического эффекта.

Таким образом, в ходе проведенной работы была создана модельная система доставки гетерогенных веществ внутрь эукариотической клетки и показана ее эффективность на модели токсического белка Lgt1 *L. pneumophila*.

ЛЕЩЕНКО А.А., ПОГОРЕЛЬСКИЙ И.П., КОМОСКО Г.В.,

ЛАЗЫКИН А.Г., БАГИН С.В., ЛОГВИНОВ С.В.

Вятский государственный университет, Киров, Россия

ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОРЕАКТОРА БИОК-022С ДЛЯ ВЫРАЩИВАНИЯ МИКРОБНЫХ КУЛЬТУР *ESCHERICHIA COLI* ШТАММА М-17

В настоящее время российскими специалистами ЗАО «Саяны» (г. Новосибирск) разработан газо-вихревой биореактор-культиватор нового поколения, не имеющий близких по принципу перемешивания аналогов. Перемешивание культуральной среды в нём осуществляется путём создания в жидкой среде трёхмерного движения типа «вращающегося вихревого кольца» за счёт перепада давления над поверхностью и силы

трения воздушного потока о поверхность суспензии. К преимуществам конструкции аппарата авторы отнесли мягкое, но эффективное перемешивание без образования пены, гидроударов, кавитации, высокотурбулентных и застойных зон.

Исследователями кафедры микробиологии Вятского государственного университета были проведены испытания вихревого биореактора БИОК-022с в сравнении с лабораторным реактором классической конструкции MDT-400 фирмы «Марубиши» (Япония), снабженным перемешивающим устройством с нижним магнитным приводом, отбойниками, кольцевым барботёром, системой автоматического поддержания температуры рабочей среды.

Испытания выполнялись при выращивании микробной культуры *Escherichia coli* штамма М-17 (колибактерин) в жидкой питательной среде на основе ферментативного гидролизата мяса крупного рогатого скота (ФГМ КРС). В качестве рабочей служила двухсуточная микробная культура *Escherichia coli* штамма М-17, выращенная на скошенной плотной питательной среде на основе ФГМ КРС в матрацах при температуре 36-38 °С. Жидкая питательная среда включала в свой состав: основу – ФГМ КРС с аминным азотом 110-125 мг %; KN_2PO_4 - 1,2 г·дм⁻³; K_2HPO_4 - 3,6 г·дм⁻³; глюкозу - 15 г·дм⁻³.

Подготовку и монтаж оборудования проводили согласно инструкциям по эксплуатации. Биореакторы стерилизовали в автоклаве при 121-123 °С в течение 40 мин. Далее они в стерильных условиях заполнялись жидкой питательной средой на основе ФГМ КРС в количествах: БИОК-022с – 4,0 дм³ и соответственно MDT-400 - 3,0 дм³.

Проведение циклов выращивания осуществлялось по технологическим режимам, изложенным в регламенте производства колибактерина сухого № 153-80 согласно следующим параметрам культивирования: подача стерильного воздуха через барботёр в культуральную среду – 1,0 объем стерильного воздуха на объем культуральной среды в минуту; температура культуральной среды выращивания – 36-38 °С; продолжительность процесса (время) выращивания – 7,0 часов; частота вращения перемешивающего устройства для биореактора БИОК-022с составляла от 1850 до 1950 об/мин, а MDT-400 соответственно 300 об/мин. Значение рН в среде культивирования поддерживали введением 50% водного раствора глюкозы непосредственно, перед операцией засева в биореакторы по 1,5% на объем среды и на 5 час роста культуры по 1% на объем среды. В процессе культивирования с 2 часовой периодичностью отбирали пробы, в которых оценивали общее

количество микробов по стандарту мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича (ОК), количество живых микробов путем высева на плотную питательную среду (БК); показатель концентрации водородных ионов (рН) и наличие посторонней микрофлоры при микроскопии в мазках окрашенных по Граму.

В ходе сравнительных исследований в биореакторах были получены нативные культуры *Escherichia coli* штамма М-17 без посторонней микрофлоры со следующими характеристиками:

для биореактора БИОК-022с:

ОК, млрд. м. кл. · см⁻³18,5;

БК, млрд. ж. м. кл. · см⁻³16,5;

рН, ед. рН.....4,95,

для биореактора МДТ-400:

ОК, млрд. м. кл. · см⁻³20,5;

БК, млрд. ж. м. кл. · см⁻³18,5;

рН, ед. рН.....5,16.

Таким образом, полученные данные, показывают возможность использования биореактора БИОК-022с для выращивания бактериальных микробных культур. В ходе экспериментов отмечена положительная особенность конструкции биореактора БИОК-022с, позволившая исключить процесс пенообразования культуральной жидкости. В тоже время, сравнительный анализ показателя биологической концентрации микробной культуры *Escherichia coli* штамма М-17 свидетельствует о том, что условия культивирования, созданные в биореакторе БИОК-022с не оптимальны для получения максимальных выходов микробных клеток.

ЛИТВИНОВА И.И.¹ ГЛАДКОВ Е.А.²

¹Московский Государственный Университет Инженерной Экологии, Москва, Россия

²ФГБУ Институт Физиологии Растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия

ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ КЛЕТОК ХРИЗАНТЕМЫ КИЛЕВАТОЙ И ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ МЕДИ В УСЛОВИЯХ IN VITRO

Хризантема является одним из самых красивых цветов, обладающей удивительной многоликостью красок и продолжительным цветением, и по популярности уступает только розе. Хризантема широко распространена в городском озеленении, используется на клумбах, в миксбордерах, в срезке. Хризантема килеватая (*Chrysanthemum carinatum* L.) — однолетнее, обильноцветущее, с конца июня по сентябрь, растение. Соцветия — корзинки, чаще простые, реже полумахровые или махровые, душистые, довольно крупные, 5-7 см в диаметре, различной окраски. Обладая высокой декоративностью и неприхотливостью в уходе, хризантема килеватая чувствительна к воздействию тяжелых металлов, особенно меди, что существенно ограничивает использование этого растения в условиях высокого уровня загрязнения. Один из способов решения данной проблемы – получение растений, с помощью биотехнологических методов, устойчивых к меди. Однако для использования данного метода необходимо растение ввести в культуру клеток.

Основным этапом работы было введение в культуру клеток хризантемы килеватой 2 сортов – Эльдorado и Радость. Хризантема оказалась трудоемкой культурой, было рассмотрено большое количество комбинаций питательных сред и фитогормонов для каллусообразования и регенерации растений. В качестве первичных эксплантов использовали семена растений. Семена стерилизовали однократной обработкой спиртом с последующей стерилизацией раствором содержащим гипохлорит натрия в течение 20 минут. Затем их три раза промывали стерильной дистиллированной водой. Оптимальной питательной средой оказалась среда Мурасиге-Скуга (МС) с 1 мг/л БАП и 0,1 мг/л ИУК. Для получения растений-регенератов использовали среду ½ МС с 0,5 мг/л БАП. На данный момент оценена фитотоксичность меди для каллусных тканей хризантемы. Каллусы хризантемы оказались очень чувствительны к действию ионов меди. Ингибирующее действие меди проявлялось для всех растений уже при концентрации 10 мг/л (процент выживших каллусов – 64,9% сорт Радость, 72,8% сорт Эльдorado). Через 14

суток, при концентрации меди 30 мг/л, значительная часть каллусов погибала. Исходя из полученных данных, была разработана схема клеточной селекции, получены регенеранты в условия *in vitro*.

ЛИТВИНОВА И.И.¹, ГЛАДКОВ Е.А.², ДОЛГИХ Ю.И.²

¹Московский Государственный Университет Инженерной Экологии, Москва, Россия

²ФГБУ Институт Физиологии Растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия

РАЗРАБОТКА СХЕМЫ КЛЕТОЧНОЙ СЕЛЕКЦИИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ РАСТЕНИЙ ДЕКОРАТИВНОГО ЛЬНА ТОЛЕРАНТНЫХ К МЕДИ

Основные загрязнители почвенного покрова мегаполисов - тяжелые металлы. Особенно высокие концентрации меди, цинка, свинца, кадмия фиксируются вблизи промышленных объектов и автотранспортных магистралей. Вблизи крупных металлургических и машиностроительных заводов ряда городов обнаружены участки с существенным (до 10 раз) превышением ПДК для меди. Из-за постоянного действия техногенных факторов у городских растений существенно снижаются декоративные качества, многие растения погибают. Для многих декоративных растений, по степени фитотоксичности, медь является наиболее опасным тяжелым металлом.

Декоративный лен – однолетнее или многолетнее неприхотливое растение, из семейства льновые, высотой 50 см. Цветет в июне-августе. Лен используют в озеленении городов. Лен очень эффектен в совместных посадках с другими газонными растениями и рабатках с яркими летниками, например, в мавританском газоне. Несмотря на неприхотливость, лен чувствителен к тяжелым металлам, в частности к меди. Один из путей решения данной проблемы - получение растений, устойчивых к меди. Задача работы - разработка схемы клеточной селекции для получения растений, устойчивых к меди. Ранее была разработана технология введения в культуру клеток декоративного льна.

Первый этап работы – оценка фитотоксичности меди для льна крупноцветкового (*Linum grandiflorum* L.) сортов Голубой, Рубрум, Шарм и льна многолетнего (*Linum perenne* L.) сорта Синий Шелк. Для оценки фитотоксичности меди каллусы культивировали на питательной среде Мурасиге-Скуга (МС), содержащей медь в

различных концентрациях (от 10 до 100 мг/л, в пересчете на чистый металл) в течение 30 суток. Ингибирующее действие меди проявлялось у всех сортов льна уже при концентрации 10 мг/л через 14 суток. Все исследуемые сорта льна были очень чувствительны к ионам меди. Например, при концентрации меди 30 мг/л процент выживших каллусов составлял у сорта Синий Шелк - 59,1%, а у сорта Рубрум – 53,7%. Сорта льна крупноцветкового (однолетнего) оказались более чувствительными, чем сорта льна многолетнего. Среди сортов однолетнего льна наиболее устойчивым был сорт Рубрум, высокую чувствительность демонстрировали сорта Шарм и Голубой. Значительная часть выживших каллусов, после культивирования на среде содержащей 20 мг/л меди, сохраняла регенерационную способность, при концентрации 30 мг/л – только 10% каллусов были морфогенными. Поэтому концентрация 20 мг/л меди была выбрана в качестве селективной.

Для получения устойчивых растений к меди была использована прямая схема клеточной селекции – культивирование первичного каллуса на среде МС с 20 мг/л меди в течение 1-2 пассажей; затем, культивирование каллусов, в течение 3-4 пассажей, на среде для регенерации и укоренения без токсиканта. Использование прямой схемы селекции и непродолжительного периода культивирования, позволило получить растения-регенеранты всех исследуемых сортов. Было получено 50 регенерантов различных сортов льна в условиях *in vitro*.

ЛИТВИШКО В.С.¹, РАХМЕДОВ Б.Ч.²

¹Российский экономический университет им. Г. В. Плеханова, Москва, Россия

²Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии
им. К. И. Скрябина, Москва, Россия

БИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ МИКРОКАПСУЛИРОВАННЫХ ФОРМ ПЕСТИЦИДОВ

К настоящему времени больших успехов достигло применение систем регулируемого выделения на основе микро- и нанокапсулированных систем, обеспечивающих выделение активного вещества в среду действия по заданной

концентрационно-временной программе. Исследования по разработке такого рода систем относятся к числу наиболее перспективных и востребованных направлений науки и технологий в индустриально развитых странах.

Большой интерес представляет внедрение агробiotехнологий на основе капсулированных систем химических и биохимических средств защиты растений, позволяющих осуществлять введение в малых дозах реагентов в количестве, не превышающем уровень токсичности для человека и животных, но смертельных для вредителей.

В настоящее время в большинстве развитых стран на первом месте по ассортименту, масштабам производства и применения находятся фосфорорганические пестициды, из которых в наибольших количествах производятся метафос, тиофос, карбофос, хлоро-фос. Объем выпуска каждого из них достигает нескольких десятков тысяч тонн. Вместе с тем данные пестициды, являющиеся высокотоксичными, все в меньшей степени удовлетворяют требованиям снижения их опасности для окружающей среды. Важным в связи с этим представляется поиск форм применения, которые способствовали бы достижению максимальной биологической эффективности при одновременном снижении токсичности фосфорорганических препаратов.

В работе приводятся результаты исследований токсикологических показателей микрокапсулированной формы метафоса (метилпаратиона), наиболее широко применяемого пестицида в России и за рубежом с использованием в качестве полимерных мембран полиуретанов, полимочевин, полиамидов, полиэфиров.

Как оказалось, микрокапсулированные формы пестицида обладают повышенной безопасностью при хранении и эксплуатации.

Образцы микрокапсулированной формы метафоса изучались в острых опытах при различных путях поступления в организм лабораторных животных. Оценивалась токсичность препаратов при введении в желудок, местное раздражающее действие на кожу и слизистые оболочки глаз, кожно-резорбтивное действие. Объем исследований соответствовал требованиям Государственной комиссии при постановке пестицидов на Госиспытания.

Токсичность устанавливалась согласно стандартной методики при введении в желудочно-кишечный тракт крысам самцам. Токсикологические показатели для микрокапсулированного метафоса (LD_{16} , LD_{50} , LD_{84}) определялись в сравнении с его жидкой

формой. Согласно полученным данным оральная токсичность в 10-25 раз меньше в случае микрокапсулированного метафоса. По гигиенической классификации жидкий метафос может быть отнесен к сильнодействующим ядовитым веществам (СДЯВ), в то время как его микрокапсулированный аналог является препаратом средней токсичности.

При определении раздражающих свойств при нанесении на кожу лабораторных животных и их слизистые оболочки глаз, установлено, что микрокапсулированная форма обладает умеренно выраженным раздражающим действием. При нанесении препарата наблюдалась гиперемия при концентрациях выше 5%. Рабочие растворы для обработки растений на основе микрокапсулированного препарата с концентрацией метафоса 0,08% не обладали указанным действием.

Изучение кожно-резорбтивного действия показало, что способность проникать через неповрежденную кожу у микрокапсулированного метафоса ниже. При этом токсическое действие уменьшилось почти в два раза.

Влияние на репродуктивную функцию микрокапсулированной формы оценивалось его эмбриотоксичностью и тератогенностью. Исследования проводились на половозрелых белых крысах линии “Вистер”. Патологии внутренних органов потомства крыс выявлялись микроскопически. Как следует из полученных данных, в отличие от некапсулированной микрокапсулированная форма при введении в желудок крысам не вызывает тератогенного и эмбриотропного действия как в процессе онтогенеза, так и постнатальный период их роста и развития.

В целом проведенные токсикологические испытания свидетельствуют о том, что микрокапсулирование в значительной степени снижает опасность интоксикации и является перспективным путем снижения токсического действия пестицидов.

ЛИЯСЬКИНА Е.В., НАЗАРКИНА М.И., РЕВИН В.В., ЛИЯСЬКИН Ю.К.

Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарёва, Саранск, Россия

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ БИОТЕХНОЛОГИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ

В работе проводится анализ современного состояния фундаментальных и прикладных аспектов биотехнологии бактериальных экзополисахаридов. Рассмотрены

вопросы получения ксантана, декстрана и бактериальной целлюлозы. Оптимизированы условия культивирования продуцентов на средах с отходами биотехнологических производств. Получены высокопродуктивные штаммы и оптимизированы методы их хранения. Изучены культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства продуцентов. Показано, что исследуемые культуры образуют в динамических условиях до 25 г/л ксантана, до 45 г/л декстрана и до 15 г/л бактериальной целлюлозы. Рассматриваются перспективные направления использования этих полисахаридов в медицине, строительной биотехнологии и биофармацевтике.

ЛОБАНОВ А.В.¹, ГРАДОВА М.А.¹, КОБЗЕВ Г.И.², СИНЬКО Г.В.³

¹*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук, Москва, Россия*

²*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Оренбургский государственный университет», Оренбург, Россия*

³*Федеральное государственное унитарное предприятие «Российский Федеральный ядерный центр - Всероссийский НИИ технической физики» им. Е.И. Забабахина Государственной корпорации «Росатом», Снежинск, Россия*

ФОТОБИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ХЛОРОФИЛЛА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ АГРЕГАЦИИ И КООРДИНАЦИОННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

Рассмотрены процессы образования и превращений активных форм кислорода (АФК) и водорода в насыщенных кислородом воздуха системах, содержащих хлорофилл (Chl) при освещении. Облучение проводили светом галогенной лампы в комплекте с линзами, конденсором и светофильтром КС-13, отсекающим излучение с $\lambda < 630$ нм, в кварцевых кюветах толщиной 1 см. Мощность светового потока составляла 20-80 мВт/см². Проанализированы водно-мицеллярные и водно-белковые системы на основе Chl, растворы Chl в CCl₄, CHCl₃, EtOH с добавками воды (смешанные или двухфазные системы) и водные суспензии кремнеземов с адсорбированным Chl.

Показано, что первичные продукты - это $^1\text{O}_2$, $\text{HO}\cdot$ и O_2^- (соотношение АФК зависит от рН) и в ряде случаев Н. По расчетам энергий взаимодействия Chl выступает как фотосенсибилизатором $^1\text{O}_2$, так и частично его дезактиватором. Разложение H_2O_2 , как обнаружено экспериментально, легче осуществляется агрегатами Chl_n . Квантовохимическими расчетами модельных систем Chl_n ($n = 1, 2, 3$) выявлены их предпочтительные структуры и активные центры координации. Координация хлорофиллом молекулы гистидина снижает энергию первого триплетного уровня Chl, что существенно меняет фотохимическую активность Chl. Рассмотрено влияние гомологических растворителей и макромолекул на электронные переходы в Chl.

Работа выполнена при финансировании грантом Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук МК-227.2011.3, грантом РФФИ № 12-03-01081-а, программой Президиума РАН № 28, проектом МНТЦ № 3910 и Ведущей научной школой (грант № 6605.2012.3).

ЛОБАНОВА Н.В.¹, НУРБАКОВ А.А.¹, ТРУСОВА И.Н.², САУТКИНА Е.Н.²,

ЕРМОЛИНА Л.В.¹, КЛИШИН А.А.¹, СЕРЕГИН Ю.А.¹

¹ ООО «Фармапарк», Москва, Россия

² ФГУП Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва, Россия

ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЭУКАРИОТИЧЕСКОГО ПРОДУЦЕНТА РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРФЕРОНА-БЕТА-1a В ОДНОРАЗОВОМ БИОРЕАКТОРЕ

Интерферон-бета-1a (ИФН-бета-1a) – биотехнологический препарат, являющийся эффективным средством борьбы с рассеянным склерозом. ИФН-бета-1a, как и эндогенный, синтезируемый в организме человека, является гликопротеином, поэтому его производство возможно только с использованием генетически-модифицированных клеток млекопитающих, в частности, клеток яичников китайского хомяка – CHO.

Цель исследования. Работа была направлена на оптимизацию процесса культивирования клеточной линии СНО, позволяющую увеличить продукцию ИФН-бета-1а и улучшить профиль гликозилирования белка.

Материалы и методы. Клеточные линии были созданы на основе клеток яичников китайского хомяка СНО и содержали ген ИФН-бета-1а под контролем индуцируемого промотора. Клетки были адаптированы к культивированию в суспензионной форме в бессывороточной, химически определенной среде. Оптимизация схемы подпиток проводилась в колбах в шейкере-СО₂-инкубаторе во влажной среде с 5% содержанием СО₂ при перемешивании со скоростью 100 об/мин при двухфазном температурном режиме: двое суток при 37°, далее при 30°. В течение процесса культивирования в среду периодически вносили коммерческие подпитки Efficient Feed А, В (Invitrogen) и СНО Xtreme Feed (Lonza). Масштабирование процесса культивирования проводили в одноразовых мешках волнового типа объемом 10 л. Плотность и жизнеспособность клеток определяли микроскопически после окрашивания клеток трипановым синим. Для оценки концентрации целевого белка в культуральной жидкости использовался метод Вестерн-блоттинга.

Результаты. Оптимизация технологии была начата с подбора подпитки, позволяющей увеличить прирост клеток и, соответственно, повысить продуктивность клеточной линии. В колбы с клетками вносили подпитки Efficient Feed А, В (Invitrogen) и СНО Xtreme Feed (Lonza) по разным схемам: №1 – 1, 4, 7, 9 дни, №2 – 3, 5, 7, 9 дни. Количество вносимых подпиток составляло 2,5, 5 и 10% от объема среды в колбе. Было выявлено, что максимальный прирост клеточной массы и жизнеспособность достигались при введении смеси (1:1) подпиток Efficient Feed А и В (Invitrogen), добавленных на 3, 5, 7 и 9 дни, независимо от объема введения подпиток. На 7 день культивирования с подпитками было достигнуто максимальное значение клеточной плотности – 5,1 – 5,6 млн/мл, тогда как в контрольной колбе – 4 млн/мл. Жизнеспособность клеток на 10 день культивирования в колбах с подпитками была более 90%, в контрольной колбе тот же показатель составил 65%. Интересно, что, несмотря на существенную разницу в клеточной плотности, во всех колбах (контрольных и с подпитками) была достигнута сопоставимая концентрация ИФН-бета-1а (около 20 – 30 мкг/мл).

При этом было детектировано, что подпитки существенно влияют на гликозилирование целевого белка. Так, в контрольном образце помимо полосы, соответствующей основной гликозилированной форме ИФН-бета-1а, детектируется более низкомолекулярная полоса, сопоставимая по интенсивности с основной полосой. Аналогичные данные получены для образцов из колб с подпитками, добавленными в количестве 5 и 2,5% от объема среды, причем, чем меньше объем внесенной подпитки, тем интенсивнее полоса, соответствующая менее гликозилированной нецелевой форме белка. Введение смеси подпиток Efficient Feed А и В в количестве 10% от объема приводит к образованию одной гликозилированной формы белка, полностью соответствующей форме, содержащейся в стандартном образце очищенного ИФН-бета-1а. Мы полагаем, что более высокое качество белкового продукта связано с большей жизнеспособностью клеток при внесении подпиток.

При масштабировании процесса культивирования в одноразовом мешке объемом 10 л клетки за 9 дней культивирования достигли плотности 5,1 млн/мл с сохранением высокой жизнеспособности (98%). Продуктивность клона, культивируемого в данных условиях, составила 20 – 30 мкг/мл. Введение смеси подпиток в количестве 10% от объема среды на 3, 5, 7 и 9 дни цикла также приводило к образованию одной целевой гликозилированной формы белка, которая соответствует форме, содержащейся в стандартном образце.

Вывод. Разработана технология культивирования эукариотического продуцента интерферона-бета-1а в одноразовом биореакторе волнового типа. Использование подпиток в процессе культивирования позволяет повысить жизнеспособность клеток и качество целевого продукта.

ЛУКАНИНА Ю.К., КОЛЕСНИКОВА Н.Н., КОРОЛЕВА А.В.,
ХВАТОВ А.В., ПОПОВ А.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

ОЦЕНКА СТЕПЕНИ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПОЧВЕННОЙ МИКРОБИОТЫ НА КОМПОЗИЦИИ ПОЛИПРОПИЛЕНОВ С ЦЕЛЛЮЛОЗОЙ

Биоразлагаемые полимерные материалы, используемые в качестве упаковки, способны решить проблему загрязнения окружающей среды.

В настоящее время широкое распространение получили композиции на основе полиолефинов (полиэтилен, полипропилен и др.) и синтетических оксо-добавок, введение которых инициирует окислительную деструкцию в результате воздействия УФ облучения, кислорода озона или температуры.

Однако не следует забывать, что захоронение подобных полимерных материалов на свалках не приводит к их разрушению. В подобных условиях наиболее эффективно для разложения полиолефинов введение природных наполнителей.

В представленной работе были исследованы композиции на основе полипропиленов различного состава (полипропилен, стат-сополимер с содержанием 3% этиленовых звеньев и блок-сополимер с содержанием 9% этиленовых звеньев). В качестве природной биоразлагаемой добавки была исследована целлюлоза марки Полицел ПЦ с размером частиц 5x100мкм.

Смешение целлюлозы и гранул полимеров проводили на смесителе типа «Brabender» при температуре 190°C в течение 4 минут. Пленочные образцы получали прессованием с последующим быстрым охлаждением до комнатной температуры. Условия прессования подбирались таким образом, чтобы пленки не имели видимых дефектов и имели толщину 50 – 80 мкм.

Оценку степени воздействия почвенной микробиоты на композиции полипропиленов с целлюлозой проводили при компостировании в почве, изготовленной в соответствии с ГОСТ 9.060-75. Наблюдения проводили на 1, 3 и 7 месяцы экспозиции. Для характеристики образцов до и после воздействия измеряли массу образцов, использовали микроскопирование в проходящем свете при 5x увеличении (микроскоп Axio Imager Z2m),

а также метод ИК-Фурье спектроскопии (ИК-Фурье спектрометр “PerkinElmer” в диапазоне 4500 – 450 см⁻¹).

С первого месяца экспозиции для всех образцов характерно постепенное уменьшение массы, в среднем до 15% за полгода, так же как и уменьшение относительной интенсивности полосы, характерной для гидроксильных групп, присутствующих в целлюлозе (3360 см⁻¹). Происходящие изменения свидетельствуют о протекающих процессах деструкции добавки - целлюлозы.

Методом микроскопирования образцов было отмечено, что уже на 3 месяце экспозиции наблюдается адгезия микромицетов в областях выхода наполнителя на поверхность материала. А на седьмой месяц – отмечен интенсивный рост, развитие и спороношение грибов.

Исследования показали, что при воздействии почвенной микробиоты, начальная адгезия и последующий рост грибов происходят на наполнителе, который не закапсулирован в полимерной матрице, а присутствует на поверхности материала. По мере развития, грибы пронизывают объем композиционной полимерной пленки по волокнам наполнителя, используя его в качестве питательной среды. Образование свободного объема внутри материала, способствует проникновению воды и почвенной микрофлоры, что может привести к растрескиванию материала, а в дальнейшем и к его фрагментации.

ЛУНИН С.В., КАТАЛЕВСКИЙ А.А.

ЗАО «Владисарт», Владимир, Россия

ПРОБЛЕМЫ КАЧЕСТВА ФИЛЬТРАЦИИ В СОВРЕМЕННОЙ БИОФАРМАЦЕВТИКЕ

В данной статье мы рассмотрим несколько актуальных вопросов, касающихся производства биопрепаратов в России. Среди них такие, как стерилизующая фильтрация, доведение препаратов до нужной концентрации, а также использование одноразовых технологий.

Стерилизующая фильтрация широко используется при приготовлении многих лекарственных форм, препаратов крови, кровезаменителей, питательных сред для

культивирования и т.д. и имеет преимущества по сравнению с методами термической стерилизации.

Для концентрирования различных сред применяются системы на базе мембранных кассетных модулей. Они предназначены для проведения процессов микро- и ультрафильтрации в тангенциальном потоке («кросс-флоу»). Системы применяются везде, где требуется высокая производительность и экономичность, качество и бережная обработка продукта (например, концентрирование в производстве альбумина и иммуноглобулина, очистка в вакцинно-сывороточном производстве, концентрирование и очистка в биотехнологических производствах пищевой и фармацевтической отраслей и т. д.)

Сравнительно новое направление в биотехнологии - одноразовые системы. Они представляют собой стерильные контейнеры, системы смешивания, одноразовые биореакторы, а также дополнительное оборудование: соединительные устройства, системы спаивания и герметизации и т. д. Данные системы имеют ряд преимуществ по сравнению с многоразовыми системами фильтрации. К сожалению, в биофармацевтической отрасли производства России одноразовые технологии пока не нашли широкого применения.

ЗАО «Владисарт», образованное в результате сотрудничества с фирмой «Сарториус АГ» (Германия) является одним из немногих предприятий России, которое, сочетая достижения немецких и российских специалистов, с 1990 года производит и поставляет уникальное фильтрационное оборудование и материалы для биофармацевтической и пищевой промышленности. Интеллектуальный потенциал предприятия в сочетании с техническими возможностями партнеров позволяют нам реализовывать технологические решения под конкретные задачи заказчика. Эти задачи могут быть связаны с очисткой, разделением, выделением, концентрированием продуктов различной молекулярной массы и различной химической и биологической активности.

Фильтрационное оборудование и комплектующие материалы, поставляемые от фирмы «Сарториус», имеют международные и национальные сертификаты на систему контроля качества производимой продукции. На изделия медицинского назначения ф. «Сарториус» имеются Регистрационные удостоверения Росздравнадзора, выданные Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения и социального развития и

сертификаты соответствия ГОСТ Р Госстандарта России, оформленные в Федеральном агентстве по техническому регулированию и метрологии.

Продукция собственного производства ЗАО «Владисарт» сертифицирована в рамках системы сертификации ГОСТ Р.

На изделия медицинского назначения собственного производства действуют Регистрационные удостоверения Росздравнадзора, выданные Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения и социального развития.

С декабря 2007 г. на предприятии внедрена и действует Система менеджмента качества в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 9001 применительно к производству, поставке и техническому обслуживанию фильтрующих элементов и фильтрационного оборудования для напорной и вакуумной фильтрации, а также для фильтрации в режиме и тангенциального потока.

В декабре 2010 г. проведена ресертификация Системы менеджмента качества и получен сертификат соответствия, удостоверяющий, что Система менеджмента качества ЗАО «Владисарт» соответствует требованиям ГОСТ Р ИСО 9001-2008

ЛУНИНА Ю.Н., КАМЗОЛОВА С.В., МОРГУНОВ И.Г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина РАН, Пущино, Россия

БИОСИНТЕЗ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ ИЗ ГЛЮКОЗЫ У МУТАНТА *YARROWIA LIPOLYTICA* № 15 В УСЛОВИЯХ ПЕРИОДИЧЕСКОГО И НЕПРЕРЫВНОГО РЕЖИМА

Ежегодно в мире производится 1 млн. 600 тыс. тонн лимонной кислоты (ЛК) с годовым приростом производства 3-5% от существующего уровня. Наряду с традиционным использованием ЛК в пищевой, химической и фармацевтической промышленности рассматриваются новые направления ее применения, расширяется использование ее натриевой соли в составе синтетических моющих средств в качестве заменителя полифосфатов, опасных для экологии.

Традиционная технология производства ЛК из мелассы при помощи мицелиальных грибов *Aspergillus niger* имеет ограниченную сырьевую базу, является многостадийным и экологически небезопасным процессом. В последние годы в ИБФМ РАН разработаны процессы получения ЛК с использованием дрожжей *Yarrowia lipolytica* при использовании широкого спектра современных возобновляемых субстратов: этилового спирта, рапсового масла, подсолнечного масла, глицерина и глицерин-содержащих отходов производства биодизельного топлива.

В настоящее время в качестве доступного и дешевого сырья для микробиологического синтеза рассматривается глюкоза, производящаяся путем ферментативного гидролиза крахмала. В связи с этим, целью настоящей работы было разработка эффективного способа получения ЛК из глюкозы и глюкозо-содержащего сырья с помощью дрожжей *Y. lipolytica*.

На первом этапе работы при обработке природного штамма *Y. lipolytica* 704 ультрафиолетовым облучением и N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидином из 1500 колоний отобрано 3 мутанта, характеризующихся более высокой (на 23,0%), чем исходный штамм, биосинтетической активностью. При комбинированном воздействии ультрафиолетового облучения и N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина на клетки *Y. lipolytica* из 1000 колоний отобраны еще 3 мутанта, у которых биосинтетическая активность на 43,9% выше, чем у исходного штамма. Последующая работа проводилась с наиболее активным продуцентом - мутантом №15, полученными в результате комбинированного мутагенеза.

Для мутанта *Y. lipolytica* № 15 в условиях периодического культивирования достигнута концентрация ЛК в среде, равная 100 г/л, достаточная для реализации в промышленном масштабе. Впервые показана принципиальная возможность продолжительного синтеза ЛК из глюкозы с использованием мембранного модуля и метода отъемов-доливов. С использованием мембранного модуля интенсивное кислотообразование (39-32,8 г/л) наблюдалось до 300 ч; средняя производительность аппарата и выход в данный промежуток времени поддерживались высокими и составляли 0,47 г/л·ч и 77%, соответственно. Процесс в режиме отъемов-доливов обеспечивает накопление ЛК на уровне 65-70 г/л в течение более 1000 ч.

Показано, что мутант *Y. lipolytica* № 15 способен ассимилировать глюкозные сиропы, полученные в результате ферментативного гидролиза отходов переработки древесины осины, в качестве источника углерода и энергии и продуцировать ЛК. Разнообразный химический состав клеток пролуцента *Y. lipolytica* № 15 (наличие белка, липидов, витаминов (рибофлавин), ЛК, макроэлементов) представляет возможность использования этой биомассы в кормлении животных.

ЛУНИЧКИН А.М.¹, ЖЕМЧУЖНИКОВ М.К.², КНЯЗЕВ А.Н.²

¹*Федеральное государственное учреждение высшего профессионального образования
Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена,
Санкт-Петербург, Россия*

²*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной
физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия*

ИССЛЕДОВАНИЕ БАЗОВЫХ ПРИНЦИПОВ АКУСТИЧЕСКОЙ КОММУНИКАЦИИ НА МОДЕЛЬНЫХ ОБЪЕКТАХ – НАСЕКОМЫХ (*ORTHOPTERA, GRYLLIDAE*)

Важнейшим механизмом обеспечения репродуктивной, агрессивной, социальной и иных форм поведения, поддержания популяционной и биоценотической структур, передачи накопленного опыта является акустическая коммуникация (АК). Наивысшего развития она достигает у человека, становясь ведущим фактором социального, технологического и духовного прогресса современной цивилизации. Для человека, например, акустический канал связи является вторым по значимости каналом получения информации после зрительного.

Изучение базовых принципов акустической связи между организмами необходимо не только для фундаментального понимания механизмов, лежащих в основе биокommunikации и поведения, но и в области современных технологий, в частности робототехники. На основе знания принципов работы АК системы, возможна разработка более качественных и надежных способов взаимодействия между оператором и машиной, машиной и машиной. Опираясь на представления о механизмах репродуктивного и

агонистического звукового поведения вредителей сельского хозяйства и вредных синантропных видов возможно создание строго избирательных, безопасных акустических аттрактантов и репеллентов. Эти исследования могут быть полезны и в социальной сфере в качестве средства интенсификации трансляции информации для целевой аудитории и установления эффективной обратной связи. Они могут представлять интерес для специалистов в области рекламы и маркетинга, управления и связей с общественностью, а также в сфере СМИ. АК играет ведущую роль и в образовании. Исследования звуковой биокommunikации способны ускорить и оптимизировать передачу информации между участниками образовательного процесса, интенсифицировать процесс обучения.

Многие проблемы, касающиеся биокommunikации, невозможно исследовать на позвоночных животных и человеке. Для решения таких проблем используют модельные объекты. Такими модельными объектами изучения механизмов биокommunikации, и АК в частности, являются насекомые. Это объясняется наличием у этой группы животных четко выраженного и относительно небольшого, по сравнению с позвоночными, комплекса коммуникационных сигналов и поведенческих реакций, а также большого набора специализированных сенсорных систем. В то же время, базовые принципы и механизмы, обеспечивающие акт коммуникации, по-видимому, одинаковы как для насекомых, так и для позвоночных животных. Большое значение имеет тот факт, что структуры, воспринимающие отдельные компоненты звукового сигнала – волны давления и волны смещения, а также вибрации – у насекомых пространственно четко разграничены и представлены разными сенсорными системами – тимпанальной и церкальной, а также системой подколенных органов. Вместе они образуют единый механорецепторный комплекс, структуры которого не только воспринимают отдельные компоненты звука, но и модулируют деятельность друг друга. Это дает уникальную возможность для изучения особенностей восприятия компонентов звука по отдельности, а так же влияния элементов комплекса механорецепторных органов на формирование целостной сенсорной картины и на различные формы поведения.

Удобным объектом акустических и этологических исследований являются представители отряда прямокрылые (*Orthoptera*), в частности, семейства сверчковых (*Gryllidae*), обладающих развитой АК, четким набором репродуктивных и агонистических акустических сигналов.

В работе представлены результаты исследования АК, механизмов лежащих в ее основе, участия элементов механорецепторного комплекса, нервной и эндокринной систем в восприятии акустической информации и формировании репродуктивного, агрессивного, территориального и оборонительного поведения. Изучено три вида сверчков, обладающих развитой видоспецифичной «песней» – *Gryllus argentinus* Sauss., *Gryllus bimaculatus* De Geer и *Grylloides supplicans* Walk., и один вид *Phaeophilacris bredoides* Kalt., особенностью которого является отсутствие классической «песни» и тимпанальных органов, воспринимающих звуковое давление. В то же время, сверчки этого вида обладают развитым церкальным аппаратом и системой подколенных органов. Они способны воспринимать два из трех компонентов звука – волны смещения и вибрации. Предполагается, что сравнительное изучение *Gryllidae* приведет к более полному пониманию эволюции сенсорных систем, базовых принципов биокommunikации не только беспозвоночных, но позвоночных животных и человека.

ЛЫСЕНКОВА Л.Н.¹, КАТРУХА Г.С.¹, ШАШКОВ А.С.², КОРОЛЕВ А.М.¹,
ГАЛАТЕНКО О.А.¹, ТЕРЕХОВА Л.П.¹, СУМАРУКОВА И.Г.¹, КОЗЛОВ Д.Г.¹,
МАКАРОВА М.О.¹, ГЛАДКИХ Е.Г.¹, ЕФРЕМЕНКОВА О.В.¹

¹Институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе РАМН, Москва, Россия

²Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, Россия

ОПИСАНИЕ АНТИБИОТИКА АКТИНОМИЦЕТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ, ЭФФЕКТИВНОГО В ОТНОШЕНИИ МЕТИЦИЛЛИН- РЕЗИСТЕНТНЫХ СТАФИЛОКОККОВ

Распространение патогенных бактерий, устойчивых к антибиотикам медицинского назначения, требует изыскания новых лекарственных средств и новых схем лечения инфекций. В ходе поиска новых антибиотиков, эффективных в отношении метициллин-резистентных стафилококков (MRSA), был разработан способ выделения из почвы штаммов – продуцентов антибиотиков, заключающийся в предварительной обработке образца почвы суспензией бактерий. В ходе такой обработки из образца почвы Краснодарского края был выделен ряд продуцентов, относящихся к актиномицетам и

эубактериям, в том числе продуцентов антибиотиков, эффективных в отношении штаммов тест-бактерий с лекарственной устойчивостью. Один из таких продуцентов, штамм *Streptomyces* sp. 4031, образует несколько антибиотиков различного химического строения. Одно из соединений, антибиотик ИНА-17, было выделено из культуральной жидкости экстракцией органическими растворителями. Антибиотик очищали, используя хроматографию на силикагеле, силанизированном силикагеле, сефадексе LH-20. Антибиотик ИНА-17 хорошо растворяется в хлороформе, этилацетате, метаноле, имеет свойства основания и образует соли с кислотами. На основании данных масс-спектров, УФ- и ЯМР-спектроскопии доказана его идентичность с ранее описанным антибиотиком пактамицином, молекулярная формула $C_{28}H_{38}N_4O_8$, мол. масса 558,27. Пактамицин проявляет широкий спектр антибактериального действия, подавляя рост как грамотрицательных, так и грамположительных бактерий, включая MRSA. Этот антибиотик можно отнести к «старым новым антибиотикам», которые становятся востребованными на новом этапе поиска антибиотиков медицинского назначения. В отличие от ранее описанного продуцента пактамицина *Streptomyces pactum*, штамм 4031 относится к другому виду рода *Streptomyces*. Разработаны условия культивирования, при которых максимальное содержание антибиотика в культуральной среде достигается на 2-3 сутки роста.

ЛЮБАВИНА Н.А.¹, ВАРВАРИНА Г.Н.¹, МАКАРОВА Е.В.¹, МЕНЬКОВ Н.В.¹,
МАЛЫШЕВА А.А.¹, ПРЕСНЯКОВА Н.Б.², НОВИКОВ В.В.³

¹ Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород, Россия;

² ФБУН ННИИЭМ им. акад. И.Н.Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;

³ Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,
Нижний Новгород, Россия

ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО ОТВЕТА И МИКРОБИОЦЕНОЗА ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ СМЕШАННОГО ГЕНЕЗА

Целью работы явилось определение диагностического значения сывороточного содержания растворимых форм мембранных молекул иммунокомпетентных клеток и их

взаимосвязь с состоянием микробиоценоза нижних дыхательных путей у больных с обострением бронхиальной астмы смешанного генеза.

Проведено обследование 50 больных бронхиальной астмой (БА) смешанного генеза в стадии обострения (60% женщин, 40% мужчин в возрасте 56 ± 13 лет). Продолжительность болезни у них составила 15[7;20] лет. БА средней степени тяжести была выявлена у 30 (60%) пациентов, тяжелое течение болезни - у 20 (40%) человек. В диагностике степени тяжести БА руководствовались критериями GINA пересмотра 2007 года. Всем больным проводились общеклиническое обследование, спирометрия, микробиологическое исследование мокроты. Сывороточное содержание молекул sCD50, sCD54, sCD38, sCD25, sCD8, sCD95, sHLA I и sHLA-DR определяли иммуноферментным методом, результаты представлены в условных единицах (U/ml) в виде Me[25;75]. Образцы сыворотки крови больных сравнивали с образцами сыворотки 30 здоровых доноров, сопоставимых по полу и возрасту. Статистический анализ проводили с использованием программы Statistica 6.0.

БА средней тяжести характеризовалась снижением уровней sCD50 (317[298;405]) и олигомерного sCD54 (93[64;191]), при тяжелой БА концентрации этих молекул нормализовались, а уровень суммарной фракции sCD54 был повышен по сравнению с донорами и составил 73[62;209] U/ml. Содержание суммарного sCD38 было увеличено на всех стадиях астмы, а количество других молекул, косвенно отражающих активацию иммунных клеток (sCD25, sCD8, sHLA-DR) лишь при тяжелой БА (480[326;610] и 461[348;654] соответственно). Обнаружено снижение уровня sHLA I, нарастающее с тяжестью бронхообструкции (844[570;999] при тяжелом течении БА). Нами выявлено повышение сывороточного уровня ингибитора апоптоза sCD95 при тяжелой БА (418[381;531]). Обнаружены корреляционные связи между показателем бронхиальной проходимости ОФВ1 и уровнями молекул sCD50, sCD54, sCD8, sCD38 и sHLA-DR ($r_1 = -0,44$ $p_1 = 0,02$; $r_2 = -0,4$ $p_2 = 0,02$; $r_3 = -0,63$ $p_3 = 0,01$; $r_4 = -0,47$ $p_4 = 0,03$; $r_5 = -0,4$ $p = 0,03$ соответственно). Выявлена связь продолжительности болезни и содержания суммарного sCD54 и sHLA-DR ($r_1 = 0,48$ $p_1 = 0,03$; $r_2 = 0,36$ $p_2 = 0,035$ соответственно).

При микробиологическом исследовании мокроты у больных БА было выделено 62 культуры микроорганизмов, из них в виде монокультуры – 28% посевов, в остальных случаях были ассоциации от 1 до 6 видов микроорганизмов. Выявлена обратная

корреляционная связь между количеством видов микроорганизмов, обнаруженных при микробиологическом исследовании мокроты и значением ОФВ1 ($r=-0,49$ $p=0,04$), а также прямая связь этого показателя с уровнем нейтрофильных лейкоцитов периферической крови и мокроты ($r_1=0,65$ $p_1=0,02$; $r_2=0,5$ $p_2=0,03$). В микробном пейзаже бронхов больных БА преобладали стрептококки, представленные α -гемолитическими (21%), β -гемолитическими (2%), негемолитическими (7%) стрептококками и пневмококками (2%), а также орофарингеальная флора (23%), представленная стоматokokками, непатогенными нейссериями, дифтероидами и др. Стафилококки составили 14%, энтеробактерии – 10%, кандиды – 17% выделенных культур. Реже обнаруживались гемофильные палочки и моракселлы (в 2% каждая). Тяжелое течение БА сопровождалось нарастанием в мокроте энтеробактерий и кандид. При менее выраженных обструктивных изменениях в посевах мокроты чаще выявлялись стрептококки. Обнаружена связь показателя проходимости мелких бронхов МОС25 и количества энтеробактерий ($r=-0,54$ $p=0,03$), кандид ($r=-0,6$ $p=0,042$), стрептококков ($r=0,79$ $p=0,03$) в мокроте. Угнетение Т-клеточного цитотоксического звена иммунитета, которое подтверждалось снижением концентрации sHLA I у больных БА, сопровождалось ростом числа стрептококков ($r=-0,5$ $p=0,05$) и энтеробактерий ($r=-0,46$ $p=0,09$) мокроты.

Заключение. Высокие сывороточные концентрации sCD50, sCD54, sCD8, sCD25, sCD95 и sHLA-DR служат маркерами тяжелого течения БА смешанного генеза. У пациентов с обострением смешанной БА в посевах мокроты чаще выявляются ассоциации микроорганизмов, чем монокультура. Нарастание бронхообструкции и изменение сывороточного содержания sCD50, sCD54 sCD95, а также низкий уровень sHLA I сопровождаются увеличением микробной обсемененности нижних дыхательных путей энтеробактериями и грибами Кандида, что соответствует более тяжелому течению патологии дыхательных путей.

ЛЮШИНА Г.А., ОКТЯБРЬСКИЙ О.Н., СМИРНОВА Г.В.

*Пермский национальный исследовательский политехнический университет,
Пермь, Россия*

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ ЖЕЛЕЗА НА АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВОСТЬ БАКТЕРИЙ *E.coli*

В последнее время все большую актуальность приобретает загрязнение сточных вод антибиотиками. Так в пробах воды вокруг установок для очистки сточных вод на территории Австралии обнаружены высокие концентрации таких антибиотиков как ципрофлоксацин, норфлоксацин и цефалексин, применяемых для лечения при тяжелых бактериальных инфекциях. Там же были обнаружены продукты распада антибиотиков, токсичные для окружающей среды.

В то же время значительно растет резистентность бактерий. Приобретение устойчивости может происходить при любом контакте бактериальной популяции с антибиотиком. Подавляющее большинство бактерий в результате этого контакта погибает, однако отдельные клетки, используя определенные генетические механизмы, выживают, и в дальнейшем в присутствии антибиотиков могут размножаться.

Бытовые стоки и стоки фармпроизводств могут содержать значительные количества антибиотиков и противомикробных веществ. Это отрицательно сказывается на природных микробных сообществах, а также приводит к появлению антибиотикоустойчивых болезнетворных бактерий. В связи с этим, востребованными являются разработки противомикробных веществ, не вызывающих резистентности. Перспективными являются работы по изучению влияния ионов железа на метаболизм бактерий в присутствии антибиотиков.

Предполагается, что угнетение метаболизма болезнетворных бактерий в результате продукции АФК, образующихся в ходе реакции Фентона, может приводить к повышению эффективности антибиотикотерапии в отношении резистентных штаммов. Однако такое предположение требует дополнительных исследований.

При действии ряда антибиотиков у бактерий наблюдается нарушение метаболизма железа. В данной работе изучалось влияние ионов железа на рост бактерий *E. coli* при действии двух антибиотиков с различными механизмами действия: ампициллин разрушает

клеточную стенку микроорганизмов, а ципрофлоксацин препятствует транскрипции ДНК, угнетая ДНК-гиразу. Для исследования использовался штамм BN407, несущий генное слияние *iuc::lacZ*. Ген *iuc* связан с промотором гена β -галактозидазы, экспрессию которого измеряли фотометрически (по методу Миллера), и она прямо пропорциональна экспрессии исследуемого гена. *iuc* входит в группу генов, контролирующих метаболизм железа у *E. coli*, и находится под контролем у транскрипционного регулятора Fug. Культивирование проводилось на среде М9 с глюкозой. Бактерии обрабатывали антибиотиками ципрофлоксацином (ЦФ) или ампициллином (амп). Дефицит железа создавался путем добавления в среду хелатора дефероксамина (деф), а избыток - добавлением FeSO₄. При добавлении дефероксамина происходит связывание свободного железа внутри клетки и отсоединение Fug-репрессора с промоторов подконтрольных генов, что приводит к повышению уровня их экспрессии.

Установлено, что с повышением концентрации ЦФ происходит уменьшение роста бактерий. При концентрации антибиотика 3 мкг/мл через 45 мин после добавления ЦФ наступает лизис клеток. Было исследовано влияние ципрофлоксацина на экспрессию гена *iuc*. Установлено, что при концентрации 3 мкг/мл экспрессия достоверно увеличивается в 2 раза.

В культурах, обработанных цф+деф, быстрее наступает лизис, т.е. полная гибель клеток, по сравнению с культурами, обработанными только ЦФ (хелатор защищает культуру от действия антибиотика). В присутствии дефероксамина и дополнительных ионов железа эта закономерность сохраняется. В культурах, обработанных ЦФ и железом наблюдается уменьшение времени остановки роста, лизис наступает через 25 мин после добавления в-в. А это раньше по сравнению с культурами, обработанными только ЦФ. Т. о. присутствие железа усиливает токсическое действие антибиотика.

Обработка культуры ампициллином вызывает лизис клеток через 65 мин после добавления антибиотика. Аналогично ситуации с ЦФ, в культурах обработанных амп+ деф наблюдался защитный эффект хелатора. Добавление железа не оказало ощутимого эффекта на изменение выживаемости клеток.

В результате исследования установлено, что присутствие ионов железа в среде повышает токсическое действие ЦФ, о чем свидетельствует раннее наступление лизиса;

Показано, что присутствие в среде хелаторов железа способствует защите бактериальных культур от токсического действия антибиотиков и ионов железа.

МАГАДОВА М.Ю., ВОРОБЬЕВА Н.Е., КРАСНОВ А.Н.

Институт биологии гена, Российская Академия Наук, Москва, Россия

ИНСУЛЯТОРНЫЙ БЕЛОК D. MELANOGASTER SU(HW) РЕКРУТИРУЕТ КОМПЛЕКСЫ SAGA И BRAHMA И СОЗДАЕТ УСЛОВИЯ ДЛЯ СВЯЗЫВАНИЯ БЕЛКОВ, УЗНАЮЩИХ УЧАСТКИ НАЧАЛА РЕПЛИКАЦИИ (ORC)

Не смотря на то, что на сегодняшний день количество информации относительно участков начала репликации непрерывно растет, молекулярные механизмы позиционирования белков, узнающих участки начала репликации (ORC), в геноме остаются малопонятными. Белок Su(Hw) обеспечивает активность ряда хорошо изученных инсуляторов *D.melanogaster*. В нашей работе мы показали, что Su(Hw) привлекает комплексы ацетилирования гистонов SAGA и ремоделирования хроматина Brahma на Su(Hw)-зависимые инсуляторы, что приводит к созданию на инсуляторах областей с низкой плотностью нуклеосом. Эти области служат платформой для связывания комплекса белков, узнающих участки начала репликации (ORC). Нокдаун Su(Hw) приводит к значительному снижению количества белковых комплексов SAGA, Brahma и ORC, и, в то же время, к увеличению плотности нуклеосом на Su(Hw)-зависимых инсуляторах. Эксперименты по артефактному рекрутингу Su(Hw) показали, что этого достаточно для привлечения SAGA, Brahma и ORC комплексов. Таким образом мы показали, что Su(Hw) необходим и достаточен для ремоделинга хроматина и привлечения репликационного комплекса ORC. Мы предполагаем, что ключевыми детерминантами позиционирования пре-репликативных комплексов в геноме являются ДНК-связывающие белки, которые привлекают на инсуляторы, промоторы и энхансеры комплексы, ковалентно модифицирующие гистоны и ремоделирующие хроматин. Таким образом, ДНК-связывающие белки позволяют создать условия для посадки комплекса ORC и связать регуляцию транскрипции и репликации. Белок Su(Hw) является первым примером, реализующим данный механизм.

МАГЗАНОВА Д.К., МУХАМБЕТАЛИЕВА А.¹, КАНИЕВА Н.А.,

РАЗУМОВСКАЯ Р.Г.²

¹ ФГБОУ ВПО «Астраханский государственный университет», Астрахань, Россия

² ФГОУ ВПО «Астраханский государственный технический университет»,

Астрахань, Россия

РЕЗУЛЬТАТЫ СРАВНИТЕЛЬНОГО АНАЛИЗА ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА КОРМА РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ С ДОБАВКАМИ И БЕЗ ДОБАВОК БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

По материалам исследований, данные которых представлены в настоящем сборнике тезисов (Земков и др., 2012), установлена степень токсичности корма для рыб приготовленного на основе тростника с добавками и без добавок биоактивных веществ (БАВ). Наряду с этим был проведен химический анализ данного вида корма. Для этого были взяты образцы корма: в виде высушенного тростника без добавок и обогащенного раствором БАВ. Данные проведенного анализа показали количественные различия показателей между обоими образцами кормов. В корме с добавкой БАВ по сравнению с кормом без добавок в три раза понизилось количество минеральных веществ, АТФ и липидов, в два раза уменьшилось количество водородного азота и незначительно снизился уровень небелкового азота, хотя величина общего азота возросла, возможно, за счет аминокислотного азота, на что указывают результаты увеличения количества тирозина (α -амино- β -параоксифенилпропионовая кислота) класса ароматического ряда. Почти в пять раз увеличилось кислотное в два раза перекисное число.

Таким образом, ограничительными показателями качества корма с добавками БАВ являются – снижение АТФ, увеличение перекисного и кислотного чисел. Остальные показатели корма с добавками БАВ следует отнести к положительным факторам.

Несмотря на то, что обогащение БАВ кормовой массы тростника осуществляется в системе твердой и жидкой фаз, не исключается и биохимическая трансформация веществ. С этой точки зрения уменьшение одних показателей (АТФ, соединений азота и увеличение тирозина) мы считаем происходит в результате метаболизма бактериальной микрофлоры, следовательно в предстоящих исследованиях важно провести работы с целью изучения

видовой принадлежности бактерий и зарегистрировать периодичность изменений биохимических показателей в процессе ферментации.

Исходя из сказанного выше, предстоит улучшить качественные данные корма с добавками за счет дополнительного внесения антиоксидантов (аскорбиновая кислота, токоферол и др.) снижение уровня АТФ, возможно за счет безвредных сорбентов и адгезивных материалов в раствор БАВ.

В последующих исследованиях предстоит осуществить анализ раствора метаболитов по содержанию БАВ, микроэлементов, что необходимо для применения разработанной формы корма, которую можно предварительно отнести к обогащенным кормам, предназначенных для растительноядных рыб. Данный вид корма изучается нами на других животных. Качественные показатели корма также предстоит улучшить, за счет других видов травянистых растений, в том числе и неликвидного сырья животного происхождения. Приоритетным направлением в получении новых видов кормов, является изучение симбиотных организмов-продуцентов БАВ, необходимых для формирования устойчивого иммунитета на ранних стадиях онтогенеза и повышения общей продуктивности сельскохозяйственных животных.

МАЖУЛИНА И.В., ШЕВЦОВ А.А.

Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

ПРИМЕНЕНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ В ТЕХНОЛОГИИ ХЛЕБОПЕКАРНОГО ПРОИЗВОДСТВА

Важнейшим критерием ведения технологического процесса приготовления хлеба является накопление до заданного предела кислотности, так как органические кислоты способствуют изменению электростатического взаимодействия белковых молекул, их набухаемости, пептизации, уменьшению жидкой фазы теста и улучшению его физических свойств. С повышением кислотности до определенной величины изменяется активность некоторых ферментов, улучшается подъемная сила дрожжей, обеспечивается выраженный вкус и аромат хлеба.

Для активного проявления своей жизнедеятельности в жидких заквасках

молочнокислые бактерии и дрожжи требуют наличия сложных субстратов, включающих источники углеводного и азотистого питания, витамины, стимуляторы роста, минеральные вещества. Основным потребляемым субстратом из них являются моно- и дисахариды. В условиях жидкой закваски их основным источником является питательная смесь из муки и воды при заданном соотношении.

Для увеличения содержания усвояемых сахаров в составе питательной смеси закваски на тритикалевой муке предложено внесение гидролизованного пюре топинамбура. Гидролиз инулина топинамбура проводили с применением ферментного препарата инулоаваморин Г10х, полученного на основе микромицета *Aspergillus awamori* 2250. Дозировка инулоаваморина составляла 0,02-0,023 % к массе пюре при оптимальных условиях действия инулиназы (температура 60 °С, рН 4,2). Гидролизованное пюре характеризовалось массовой долей сухих веществ 17,0 %, содержало 14,2 % редуцирующих сахаров, в т.ч. 11,4 % фруктозы, 2,2 % глюкозы.

В качестве контроля использовали жидкую ржаную закваску с заваркой влажностью 85,0 %, разводочный цикл которой осуществляли с применением сухого лактобактерина из смеси чистых культур молочнокислых бактерий *Lactobacillus casei*-26, *L. brevis*-1, *L. plantarum*-30, *L. fermenti*-34 и чистой культуры дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* Л-1», и жидкую ржаную закваску без заваривания муки влажностью 70,0 % с внесением в разводочном цикле сухого лактобактерина и дрожжей *S. cerevisiae* Л-1, *Saccharomyces minor* «Чернореченский». В производственном цикле в жидкой закваске определяли газообразование, подъемную силу – принятыми в хлебопечении методами, кислотность – потенциометрическим титрованием и на рН-метре, редуцирующие сахара – перманганатным методом Бертрана, летучие кислоты – полумикрометодом ВНИИХП. Подсчет микроорганизмов осуществляли методом Бургвица и в камере Горяева.

Гидролизованное пюре топинамбура вносили в питательную смесь для восполнения закваски в производственном цикле в дозировке от 5 до 15 % к массе питательной смеси.

Закваску готовили без заваривания муки, ее влажность увеличивали до 85,0 %. Закваски вели непрерывно в течение 7 сут при температуре 31±1 °С. Ритм отбора – через каждые 3-3,5 ч.

Проведенные исследования показали, что по сравнению с различными вариантами контроля в заквасках с внесением гидролизованного пюре топинамбура

интенсифицируются процессы газообразования и кислотонакопления. Так, по отношению к закваске с заваркой более выражено накопление органических кислот, по отношению к закваске без заваривания части муки – накопление диоксида углерода.

Активному накоплению молочной, яблочной, янтарной и других органических кислот способствует более низкая влажность питательной смеси, характеризующаяся меньшим содержанием кислорода воздуха и, значит, создающая более благоприятные условия для жизнедеятельности молочнокислых бактерий, относящихся к факультативным анаэробам. В то же время, гидролизованное пюре топинамбура обогащает питательную смесь углеводами, в лучшей степени усваиваемыми микрофлорой закваски, в первую очередь, дрожжевыми клетками. Подтверждением этому являются результаты изучения процесса газообразования, определяющего разрыхление полуфабрикатов, создание структуры готовых изделий, формирование их вкуса и аромата.

Как показали результаты исследований, введение в состав жидкой ржаной закваски гидролизованного пюре топинамбура способствует интенсификации газообразования, которое, в первую очередь, определяется спиртовым брожением в результате жизнедеятельности дрожжей, а также – гетероферментативным молочнокислым брожением, связанным с жизнедеятельностью соответствующих молочнокислых бактерий.

Результаты исследований подтверждают более благоприятный состав питательной смеси при внесении в нее гидролизованного пюре топинамбура. Лучшей совокупностью органолептических и физико-химических показателей обладает жидкая закваска при внесении в состав питательной смеси на основе тритикалевой муки 10,0-15,0 % гидролизованного пюре топинамбура. Содержание усвояемых сахаров составляет 8,1-9,0 % (в контроле – 5,0 %).

Применение нового ферментного препарата с инулиназной (и β -фруктофуранозидазной) активностью позволяет гидролизовать инулин в пюре из топинамбура и интенсифицировать микробиологические и биохимические процессы приготовления закваски на основе тритикалевой муки, обуславливающих высокое качество хлеба в условиях упрощения технологии за счет исключения стадии заваривания и осахаривания.

МАЗАНКО М.С., ДЕНИСОВА Т.В., КОЛЕСНИКОВ С.И.

Южный Федеральный Университет, Ростов-на-Дону, Россия

ВЛИЯНИЕ ЗАГРЯЗНЕНИЯ СВИНЦОМ И ПЕРЕМЕННЫМ МАГНИТНЫМ ПОЛЕМ НА ПОЧВЕННЫЕ АКТИНОМИЦЕТЫ

Актиномицеты – важнейшие компоненты почвенных микробиоценозов. Они, наряду с почвенными микромицетами, способны разлагать сложные органические молекулы, не доступные другим видам почвенных бактерий.

Актиномицеты обладают уникальными ферментативными системами, позволяющими им синтезировать уникальные органические соединения, такие как антибиотики, пигменты, пахучие вещества. Именно поэтому многие актиномицеты, особенно почвенные, могут быть в дальнейшем использованы как микроорганизмы-продуценты в разнообразных отраслях биотехнологической промышленности.

Химические и электромагнитные загрязнения почвы губительно сказываются на численности и активности актиномицетов.

Целью данной работы было исследовать влияние загрязнения свинцом и переменным магнитным полем (ПеМП) на почвенные актиномицеты.

В качестве объекта исследований были выбраны серопески, образцы почвы отбирали в Шолоховском районе Ростовской области рядом со ст. Вешенская. Почву высушивали до воздушно-сухого состояния, увлажняли до 60% влагоемкости, образцы загрязняли PbO в концентрациях 1, 5, 10, 15, 20 ПДК и ПеМП промышленной частоты (50Гц) индукцией 300, 1500 и 3000 мкТл так, чтобы в опыте присутствовали все варианты сочетаний загрязнений, а так же отдельно химические и отдельно электромагнитные загрязнения. При этом контролем служил образец, не подвергавшийся воздействию ПеМП и загрязнению оксидом свинца. Затем все 24 варианта компостировали при комнатной температуре (20-22°C) и оптимальном увлажнении (60% от полевой влагоемкости) в течение 10 суток. Лабораторно-аналитические исследования выполнены с использованием общепринятых в биологии почв методов.

Без электромагнитного загрязнения оксид свинца негативно повлиял на численность актиномицетов вызывая снижение их численности на 39, 46 и 50 % ($p < 0,05$) при концентрации свинца в почве 10, 15 и 20 ПДК соответственно. Однако концентрация

свинца в 5 ПДК вызвала увеличение численности актиномицетов на 71% ($p < 0,05$). Подобное увеличение численности при низких концентрациях химических загрязнителей часто описывается авторами для различных групп почвенных бактерий. Концентрация свинца 1 ПДК не вызвала достоверных изменений в численности почвенных актиномицетов.

Под влиянием ПеМП интенсивностью 300 мкТл численность исследуемых бактерий возросла на 25% ($p < 0,05$), в то время как концентрация свинца в 1 ПДК не вызвала достоверных изменений численности. Дальнейшее увеличение концентрации свинца в сочетании с электромагнитным загрязнением вызвало резкое снижение численности актиномицетов – на 50% ($p < 0,05$), 38% ($p < 0,05$), 78% ($p < 0,01$) и 54% ($p < 0,05$) при концентрации оксида свинца в образцах 5, 10, 15 и 20 ПДК соответственно.

При увеличении интенсивности ПеМП до 1500 мкТл в отсутствие свинца не было зафиксировано достоверного изменения численности исследуемых бактерий, свинец в концентрации 1 ПДК вызывал резкое возрастание численности на 43% ($p < 0,05$), а свинец в более высоких концентрациях – резкое снижение на 42% ($p < 0,05$), 87% ($p < 0,01$), 67% ($p < 0,05$) и 78% ($p < 0,05$) при концентрациях оксида свинца 5, 10, 15 и 20 ПДК соответственно.

ПеМП интенсивностью 3000 мкТл вызвало снижение численности актиномицетов на 48% ($p < 0,05$). Общая картина сочетанного загрязнения свинцом и ПеМП 3000 мкТл сходна с описанной выше. Так же концентрация свинца 1 ПДК вызывала возрастание численности бактерий 38% ($p < 0,05$), а концентрации в 5, 10, 15 и 20 ПДК вызывали снижение численности на 58% ($p < 0,05$), 76% ($p < 0,01$), 71% ($p < 0,01$) и 64% ($p < 0,05$) соответственно.

Из описанного выше можно сделать вывод о том, что влияние сочетанного загрязнения не является простой суммацией изменений, вызванных оксидом свинца и ПеМП. Загрязнение почвы вызывает резкое снижение численности почвенных актиномицетов, за исключением случаев с низкой концентрацией загрязнителей, вызывающих увеличение численности.

МАКАРОВА Е.Л.¹, КОВАЛЕВА Т.А.¹, ХАУСТОВА Г.А.²

¹ Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

² Воронежский государственный университет инженерных технологий,
Воронеж, Россия

КОЛЛАГЕН РЫБ КАК НОСИТЕЛЬ ДЛЯ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ

Адсорбционная иммобилизация переводит ферменты из разряда гомогенных растворимых катализаторов в разряд гетерогенных, что позволяет повысить стабильность биокатализатора по отношению к денатурирующим факторам среды. Полученные ферментные препараты обладают рядом технологических преимуществ.

Наиболее перспективным носителем для иммобилизованных ферментов является коллаген. В медицине и фармации коллаген используется как основа лекарственных препаратов пролонгированного действия. Главными положительными качествами коллагена в отличие от синтетических полимеров следует считать его способность перевариваться ферментами организма и рассасываться, постепенно замещаясь его собственными тканями. Применяют коллаген растительного, животного и морского происхождения. Аминокислотный состав коллагена рыб ближе всего к человеческому.

В связи с вышеизложенным нами была проведена сорбционная иммобилизация глюкоамилазы (α -1,4-глюкан-глюкогидролаза КФ 3.2.1.3) на коллагене, выделенном из дермы шкуры прудовых рыб, являющимся побочным продуктом производства рыбных консервов и пищевых концентратов.

В качестве субстрата использовали растворимый картофельный крахмал фирмы «Экрос».

Концентрацию белка в иммобилизованном ферменте определяли модифицированным методом Лоури, каталитическую активность глюкоамилазы - глюкозооксидазным методом с помощью набора реактивов для измерения концентрации глюкозы в биологических жидкостях («OLVEX DIAGNOSTICUM», Россия).

С помощью аминокислотного анализатора нами был определен аминокислотный состав используемого коллагена. Процентное содержание аминокислот составило: аспарагиновая кислота-7,12%, треонин-2,46%, серин-4,57%, глутаминовая кислота-11,36%, пролин-11,67%, оксипролин-12,93%, глицин-16,72%, аланин-10,51%, валин-2,65%,

метионин-1,03%, изолейцин-3,83%, лейцин-1,98%, тирозин-0,99%, фенилаланин-2,49%, гистидин-0,77%, лизин-4,16%, аргинин-8,33%.

Показано, что адсорбционно иммобилизованная глюкоамилаза сохраняет 51% каталитической активности свободного энзима.

Комплекс глюкоамилаза-коллаген обладает достаточной прочностью и не разрушался при гидролизе крахмала, что, по-видимому, объясняется большим количеством связей в комплексе фермент-носитель.

Нами было установлено, что глюкоамилаза, адсорбционно иммобилизованная на коллагене, характеризуется максимальной скоростью гидролиза крахмала при 55 °С, что на 5 °С выше, чем для нативного фермента.

Оптимум рН-активности для свободного фермента составляет 4,7 единиц. При адсорбционной иммобилизации на коллагене имеет место расширение значений рН (4,5-5,0), при которых гетерогенный ферментный препарат проявляет максимальную каталитическую активность.

Проведенные нами исследования позволяют рекомендовать коллаген как носитель для иммобилизованных ферментов. Полученные препараты обладают устойчивостью к воздействию внешних факторов и способностью к пролонгированному действию.

МАКАРОВА Е.П.

Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

АГРОБИОТЕХНОЛОГИИ В ФОКУСЕ ФОРУМА АЗИАТСКО-ТИХООКЕАНСКОГО ЭКОНОМИЧЕСКОГО СОТРУДНИЧЕСТВА

В работе проводится геополитический анализ современного состояния агробιοтехнологий в странах Форума Азиатско-Тихоокеанского Экономического Сотрудничества (АТЭС). АТЭС, являясь крупнейшим экономическим объединением на (свыше 57% мирового ВВП и 48% объёма мировой торговли), рассматривает агробιοтехнологии как революционный инструмент, который трансформирует сельское хозяйство, имеет потенциал для стимулирования экономического роста, повышения

производительности труда в сельском хозяйстве, искоренения голода и недоедания, и уменьшения воздействия сельского хозяйства на окружающую среду. В основном, под агробιοтехнологиями понимают генетически модифицированные (ГМ) культуры, полученные методами генной инженерии.

В настоящее время площадь под ГМ культурами составила 160 млн.га в 29 странах мира (К.Джеймс, 2011). Если посмотреть на географию распространения ГМ культур, то можно отметить, что 1/3 стран АТЭС (США, Канада, Китай, Австралия, Филиппины, Мексика, Чили) выращивают на своих территориях ГМ культуры, а по площади это составляет 53% от 160 млн.га. Все эти страны входят в список так называемых «мега-стран», имеющих площади под ГМ культурами 50 тыс. га и больше.

США лидируют на рынке ГМ культур, выращивают ГМ культуры на площади 69 млн. га. Основные ГМ культуры – кукуруза, соя, хлопок, рапс, сахарная свекла, папайя, люцерна. Канада выращивает ГМ культуры на площади 10,4 млн. га. Основные ГМ культуры – рапс, кукуруза, соя, сахарная свекла.

Китай является 6-й страной по площади выращиваемых ГМ культур в мире. Площадь под ГМ культурами – 3,9 млн. га из 143,5 млн.га пашни. Основные ГМ культуры – хлопок, тополь, папайя, сладкий перец, томаты. Доход фермеров от агробιοтехнологий за 1997-2009 гг. 9,3 млрд. долларов. В Китае 7 миллионов мелких бедных фермеров (в среднем 0,5 га хлопка) на рекордном количестве земли 3,9 млн. га сажали ГМ хлопок, это составило самый высокий процент (71%) принятия данной технологии. Власти подтвердили важность биотехнологических культур, они должны развиваться по строгим стандартам биобезопасности. ГМ кукуруза и ГМ рис находятся на полевых испытаниях. Для коммерциализации ГМ кукуруза является приоритетной для обеспечения быстрорастущего спроса на корма для производства мяса, более высокая продуктивность выращиваемой в стране ГМ кукурузы сможет снизить увеличившийся импорт кукурузы.

Австралия выращивает ГМ культуры на площади 0,7 млн. га. Основные ГМ культуры – хлопок, рапс. После длительных засух в течение 3 лет и последующих наводнений, в Австралии в 2011 году площади под ГМ хлопком составили 597 тыс.га, что составило 99,5% от общей площади под этой культурой. Причем 95% приходилось на хлопок как с устойчивостью к насекомым, так и к гербицидам. Также проводятся исследования по выведению ГМ пшеницы и сахарного тростника.

Филиппины выращивают ГМ культуры на площади 0,6 млн. га из 5,1 млн.га пашни. Основная ГМ культура – кукуруза. Доход фермеров от агробιοтехнологий за 2003-2009 гг. 108 млн. долларов. Мексика выращивает ГМ культуры на площади 0,2 млн. га из 25,6 млн.га пашни. Основные ГМ культуры – хлопок, соя. Доход фермеров от агробιοтехнологий за 1996-2009 гг. 102 млн. долларов.

Чили выращивает ГМ культуры на площади 10 тыс. га. В данное время согласно законодательству страны разрешена коммерциализация ГМ культур только на экспорт. Новый законопроект, рассматриваемый Парламентом Чили, возможно разрешит коммерческое использование и потребление ГМ культур на национальном рынке, тогда ГМ кукуруза составит конкуренцию ввозимой из Аргентины. Чили экспортирует семена на мировой рынок стоимостью 370 млн.долларов, из них 200 млн.долларов – ГМ семена. Биотехнологии успешно развиваются последние 10 лет, ученые вывели около 10 ГМ культур с различными характеристиками – вирусостойчивый картофель, засухоустойчивый эвкалипт, ГМ виноград и фрукты. В Чили также очень развиты и распространены агробιοтехнологии при производстве лосося.

Несмотря на дебаты о потенциальном вреде трансгенных культур, кроме 29 стран, выращивающих эти культуры, в 31 стране созданы регуляторные системы и получены разрешения на импорт в качестве продовольствия и кормов. Таким образом, 60 стран участвуют в торговле ГМ культурами, включая такого крупного импортера продовольствия как Япония, который сам трансгенные культуры не выращивает. Среди них страны АТЭС: США, Япония, Канада, Мексика, Южная Корея, Австралия, Филиппины, Новая Зеландия, и, кроме того, Европейский Союз. На принятие положительного решения в странах АТЭС безусловно повлиял Диалог высокого уровня по вопросам биотехнологий в сельском хозяйстве, а также Рабочей группы АТЭС по вопросам биотехнологий, где обсуждались вопросы регулирования, безопасности, научной составляющей, коммуникаций в сфере биотехнологий.

МАКСИМЕНКО А.В., ВАБАЕВ А.В., ТУРАШЕВ А.Д.

ФГБУ Российский Кардиологический Научно-Производственный Комплекс

Минздравсоцразвития РФ, Москва, Россия

МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ФЕРМЕНТНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ И УГЛЕВОДНАЯ ОБОЛОЧКА СОСУДИСТОЙ СТЕНКИ КАК ФАКТОРЫ ЗАЩИТЫ ПРИ ОСТРЫХ ПОРАЖЕНИЯХ

Многообразное проявление окислительного стресса при развитии различных патологий, в том числе и сердечно-сосудистых, подчеркивает актуальность поиска средств его фармакологической коррекции. Существование звена свободнорадикального поражения при атерогенезе, подтвержденное в целом ряде работ, указывает на необходимость его терапевтического предупреждения для нормализации функционирования сосудов и миокарда. Одним из аспектов этой проблемы предстает, в частности, снижение частоты и степени рестенозов после транслюминальной коронарной ангиопластики.

Повреждение сосудов баллонным катетером у животных ведет к резкому повышению содержания гиалуронана в этой зоне. Его особенно много вокруг пролиферирующих и мигрирующих гладкомышечных клеток артерий, где растет содержание ассоциирующегося с ним версикана (хондроитинсульфатпротеогликана). Гиалуронан и версикан, избыточно представленные в рестенозированных участках сосудов, образуют высоко-молекулярные гидрофильные комплексы. Они обычно гидратируются и вызывают тканевый отек. Благодаря этому, в частности, происходит быстрое распространение рестенозного поражения. (Гиалуронан влияет как на гиперпластическую, так и на ремоделирующую фазу развития рестеноза). В условиях окислительного стресса гиалуронан может фрагментироваться под действием свободно радикальных форм кислорода. Такая деструкция увеличивает гиалуронановый оборот в организме. Полагают, что 15–30% частота стентных рестенозов (в течение 6 месяцев с их установки) обусловлена скорее повышенным накоплением экстрацеллюлярного матрикса, чем клеточной пролиферацией. Предупреждение окислительного стресса в этой ситуации способствует, в частности, ингибированию разрастания экстрацеллюлярного матрикса в зоне катеризации/стентирования. Вероятно, реализация такого подхода возможна при

локальном введении модифицированных антиоксидантных ферментных средств с заметным антитромботическим потенциалом (как, например, ковалентный биферментный конъюгат супероксиддисмутаза-хондроитинсульфат-каталаза, разработанный ранее нами). Кроме того, прямое ферментативное уменьшение плотности внеклеточного матрикса после стентирования благоприятно для снижения частоты и степени рестенозирования. В качестве подобного биокаталитического производного продуктивно использовать в ходе процедуры стабилизированную форму гиалуронидазы.

Уменьшение неоинтимального образования в пораженной баллонным катерированием аорте крыс достоверно наблюдалось после введения небольших фрагментов гиалуронана (состоящих из 4–16 звеньев). Такие данные обращают внимание на фрагменты гиалуронана как на привлекательный объект для предупреждения рестенозов после ангиопластики. Заманчиво их эндогенное образование в месте поражения в результате локального введения экзогенной гиалуронидазы. В её роли интересно апробировать производное этого биокатализатора модифицированное хондроитинсульфатом.

Ковалентная модификация гиалуронидазы хондроитинсульфатом придавала ферменту резистентность к гепариновому ингибированию в результате сходства экваториальной ориентации ОН групп с таковой у гиалуроновой кислоты. Выяснение тонкого характера этих взаимодействий требует исследования влияния на гиалуронидазу олигомерных гликозаминогликановых фрагментов и их производных. Стабилизация гиалуронидазного эндогликозидирования важна для снижения последствий острых сердечно-сосудистых поражений, таких как инфаркт миокарда.

Инфаркт миокарда сопровождается отеком, в развитии которого заметную роль играет гиалуронан, интенсивно гидратирующийся при этом. Деструкция гиалуронана гиалуронидазой приводит к изгнанию воды, снижению плотности углеводной околклеточной оболочки. Это способствует улучшению тканевого потока для проникновения лекарственных средств и нутриентов, а также снижает размер поражения *in vivo*. Более того, отек миокарда, сопровождаемый заметными потерями жидкости в микроциркуляции, ведет к уплотнению ее внеклеточного матрикса и сердечной дисфункции (при ишемии, гипертонии, сепсисе, хирургической реваскуляризации). Этим обуславливается важность адекватного восстановления кровотока в “макро-” и “микро-”

циркуляторной системе селективным ферментативным воздействием на углеводное клеточное окружение. Для осуществления последнего важно биотехнологическое получение и биомедицинское исследование стабилизированных форм гиалуронидазы.

Настоящее исследование поддержано грантами РФФИ (12-04-00015 и 12-08-00010).

МАКСИМЕНКОВА К.И., ЛОСЕНКОВА С.О.,
КИРЮШЕНКОВА С.В., КИРИЛЛОВ С.К.

Смоленская государственная медицинская академия, Смоленск, Россия

ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАЗВУКОВОЙ НИЗКОЧАСТОТНОЙ ОБРАБОТКИ НА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКУЮ СТАБИЛЬНОСТЬ ЛЕКАРСТВЕННОГО СИРОПА С ГИПОКСЕНОМ

Многие заболевания, а также тяжелые умственные и физические нагрузки, сопровождаются состоянием гипоксии, которое может привести к необратимым изменениям в организме, а в тяжелых случаях к летальному исходу. Поэтому в таких случаях целесообразно применение антигипоксических и антиоксидантных лекарственных средств (ЛС), которые улучшают утилизацию организмом кислорода и снижают потребность в нем органов и тканей. Сиропы являются удобной лекарственной формой (ЛФ) для внутреннего применения, как у детей, так и у взрослых. По данным Государственного реестра лекарственных средств РФ лекарственные сиропы с антиоксидантами и антигипоксантами не зарегистрированы.

Нами был изготовлен 5% лекарственный сироп с гипоксеном по следующей схеме: 70,0 г ксилита («AppliChem») заливали небольшим количеством воды очищенной и оставляли на несколько минут для разрыхления и лучшего растворения при варке. Затем варили сироп, при этом давали вскипеть один раз до получения прозрачного раствора. В горячий раствор ксилита вносили 7,0 г концентрата мультифруктового (Израиль), 5,0 г гипоксена (натриевая соль полидигидроксибензилсульфокислоты, ЗАО «Олифен») и доводили водой очищенной до 100%. Затем давали сиропу вскипеть второй раз. Горячий сироп фильтровали через 3 слоя марли во флакон из темного стекла.

Так как гипоксен растворим только в горячей воде, для лучшего и быстрого его растворения, а также гомогенизации смеси и обеспечения микробиологической чистоты сиропа, перед фильтрацией применяли обработку смеси ультразвуком в течение 30 секунд при помощи установки медицинской УРСК-7н (частота 25 кГц), снабжённой волноводом-концентратором. При этом нами экспериментально установлено, что воздействие ультразвука на данной частоте в течение данного времени (25 кГц, 30 секунд) не влияет на количественное содержание гипоксена в сиропе.

Далее свежеприготовленный сироп с гипоксеном проверяли на микробиологическую чистоту путем посева проб на питательные среды. Свежеприготовленный сироп по микробиологической чистоте соответствовал требованиям первой категории ЛФ. Затем сироп откладывали на хранение в плотно закупоренной таре из темного стекла в темном месте при комнатной температуре и проверяли на микробиологическую чистоту через 3, 6, 9, 12, 18 и 24 месяца.

По истечении времени исследовали ЛФ на микробиологическую чистоту, определяя общее микробное число (ОМЧ) в 1,0 г сиропа путём посева разведения ЛФ 1:10 на накопительные среды по методике ГФ XI. Обнаружение грибов, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* проводили путём пересева на накопительные среды Сабуро, желточно-солевой агар, Эндо, мясо-пептонный агар.

Согласно ГФ XI сиропы по микробиологической чистоте относятся к 3-ей категории: ОМЧ должно быть не более 10^3 в 1,0 (1 мл) сиропа, грибов не более 10^2 в 1,0 (1 мл) сиропа, отсутствие *E. coli* в 1,0 (1 мл) сиропа.

При хранении в течение 3, 6, 9, 12, 18 и 24 месяцев сироп также соответствовал по микробиологической чистоте требованиям первой категории.

Следовательно, воздействие ультразвука в процессе приготовления лекарственного сиропа с гипоксеном является эффективным способом гомогенизации смеси и обеспечения микробиологической чистоты ЛФ.

МАКСИМОВА А.В., КУЗНЕЦОВА М.В.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Россия

ТРАНСФОРМАЦИЯ ПРОИЗВОДНЫХ ПРОПИОНОВОЙ КИСЛОТЫ ПОЧВЕННЫМИ БАКТЕРИЯМИ

Биогенные альдоксимы – это интермедиаты биосинтеза некоторых биологически активных веществ, таких как ауксин и цианогликозиды растений. У бактерий конверсия альдоксимов в нитрилы, а затем в соответствующие карбоновые кислоты происходит путем сочетания работы ферментов альдоксимдегидратазы и нитрилутилизирующих ферментов – нитрилгидратазы и амидазы и/или нитрилазы (Kato et al., 1998).

В данной работе проводили трансформацию производных пропионовой кислоты – пропиональдоксима (5 и 10 мМ), пропионитрила (10 и 100 мМ) и пропионамида (10 и 100 мМ) биомассой штаммов, выделенных ранее на нитрилах (*Rhodococcus ruber* gt1, *Rhodococcus* sp. A0) и альдоксимах (*Pseudomonas* sp. 6-1 и 6-5). Для анализа субстратов и продуктов реакции применяли метод газовой хроматографии (Shimadzu GC-2014). За ЕД активности нитрилгидратазы и амидазы принимали количество продукта (для альдоксимдегидратазы – количество субстрата) в мкмоль/мг сух. веса клеток/мин.

Предварительные исследования по **оценке токсичности альдоксимов, нитрилов и амидов выявили, что все** штаммы лабораторной коллекции были устойчивы к высоким концентрациям исследованных субстратов (альдоксимы – 0,015-1 М; нитрилы – 0,5-2 М; амиды – 1-4 М). Токсичность нарастала в ряду амид→нитрил→альдоксим. Производные уксусной кислоты оказывали меньшее ингибирующее действие на клетки микроорганизмов, чем производные пропионовой кислоты. Не отмечено прямой зависимости между субстратом, на котором шла селекция штамма, и его устойчивостью к этому веществу.

Конверсия пропиональдоксима. Скорость трансформации альдоксима штаммами *Pseudomonas* sp. 6-1 и 6-5 была существенно ниже (0,11 и 0,18 ЕД), чем биомассой штаммов – суперпродуцентов нитрилгидратазы *R. ruber* gt1, *Rhodococcus* sp. A0 (0,72 и 0,32 ЕД). Показано, что к 30 мин реакции в среде оставалось менее 30% количества внесенного субстрата для всех штаммов. Дальнейшее уменьшение альдоксима проходило

медленно, но к 5-7 ч он полностью удалялся из среды. Нитрилутилизирующие бактерии трансформировали пропиональдоксим с образованием соответствующего нитрила, амида и кислоты, что обусловлено работой ферментов альдоксим-нитрильного метаболического пути. В процессе трансформации пропиональдоксима биомассой штаммов *Pseudomonas* sp. 6-1 и 6-5 в анализируемом супернатанте не было обнаружено продуктов реакции – пропионитрила и пропионовой кислоты. Этот факт может быть объяснен либо внутриклеточным накоплением этого субстрата, либо наличием другого метаболического пути, промежуточные продукты которого не детектируются используемым аналитическим методом.

Трансформация пропионитрила. При конверсии пропионитрила биомассой штамма *R. ruber* gt1 (3,25 мг сух веса) при 30°C к 10 мин реакции количество нитрила в реакционной среде резко сократилось до 10% от вносимого. Дальнейшее убывание субстрата происходило медленно и завершилось к 50-ти мин. Нарастание продукта – пропионамида происходило в течение всего времени и к концу реакции составило 400 мкмоль. Также в супернатанте обнаруживалась пропионовая кислота, количество которой к 60-ти мин составило 50 мкмоль. Показано, что нитрилгидратазная активность не превышала 55 ЕД. В ходе 24-часовой трансформации выявлено, что продукт нарастал до 3 ч реакции, после чего его содержание в среде заметно снижалось. В то же время количество пропионовой кислоты увеличивалось, что связано с функционированием фермента амидазы. Аналогичная тенденция описана для штамма *Rhodococcus* sp. A0. У штаммов *Pseudomonas* sp. 6-1 и 6-5 в данной реакции продукты не обнаруживались. Вероятно, у этих штаммов отсутствует фермент нитрилгидратаза.

Трансформация пропионамида. Часовая конверсия амида биомассой штаммов *R. ruber* gt1 (1 мг сух веса) и *Rhodococcus* sp. A0. (2,8) проходила с низкой скоростью: активность амидазы составила 1,7 и 0,7 ЕД соответственно. С течением времени активность фермента еще снижалась, и к 24 ч реакции в среде оставалось более 80% от количества вносимого субстрата. При использовании в часовой конверсии пропионамида клеток штамма *Pseudomonas* sp. 6-1 (3,4 мг сух веса) активность амидазы составила 0,06 ЕД.

Таким образом, показано, что трансформация пропиональдоксима может идти с образованием соответствующего нитрила и кислоты. Активность альдоксимдегидратаз

всех изученных штаммов не превышала 1 ЕД, что существенно ниже активности нитрилгидратазы, а в ряде случаев и амидазы. Набор и активность ферментов, участвующих в альдоксим-нитрильном метаболизме у бактерий, может варьировать у разных видов/штаммов.

МАКСИМОВА Е.М., КОРЕПАНОВ А.П., КОРОБЕЙНИКОВА А.В.,
ГАРБЕР М.Б., ГОНГАДЗЕ Г.М.

Учреждение Российской академии наук Институт белка РАН, Пущино, Россия

ИЗМЕНЕНИЯ В ПЕТЛЕ $\alpha 3$ - $\beta 4$ РИБОСОМНОГО БЕЛКА L5 ПРИВОДЯТ К СНИЖЕНИЮ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ РИБОСОМ

Рибосомный белок L5 входит в состав рибосом представителей всех доменов жизни. Белки этого семейства обладают консервативной пространственной структурой, а в рибосоме белок L5 формирует ряд консервативных межмолекулярных контактов. Все это может указывать на универсальность функций выполняемых белком L5 в рибосоме. Согласно современным кристаллографическим данным при взаимодействии белков L5 и S13 формируется межсубъединичный мостик V1b. В образовании этого межмолекулярного контакта могут принимать участие петли $\alpha 3$ - $\beta 4$ и $\beta 4$ - $\beta 5$ белка L5. Структурные исследования функциональных комплексов рибосом свидетельствуют о том, что этот мостик является одним из тех структурных элементов рибосомы, который подвергается наибольшим конформационным изменениям во время транслокации. Процесс транслокации начинается с поворота головы малой субчастицы относительно большой субчастицы. По всей видимости, этот поворот является результатом конформационных изменений в частности в мостике V1b. Считается, что движение этого мостика необходимо для перемещения деацелированной тРНК из Р-сайта в Е-сайт. Однако, несмотря на все имеющиеся данные о структуре рибосомы и динамике транслокации, роль структурных элементов рибосомы в этом процессе остается пока не ясной. Особенно интересна роль конформационных изменений в мостике V1b для процесса транслокации. Настоящая работа посвящена изучению роли петель $\alpha 3$ - $\beta 4$ и $\beta 4$ - $\beta 5$ белка L5 в формировании мостика V1b и функционировании рибосомы *Escherichia coli*.

Нами был проведен направленный мутагенез в соответствующих структурных элементах белка L5. Показано, что укорочение петли $\beta 4\text{-}\beta 5$ в белке L5 не влияет ни на рост клеток, ни на функциональную активность их рибосом. В то же время, клетки, содержащие белок L5 с укороченной на 4 или 6 аминокислотных остатков петлей $\alpha 3\text{-}\beta 4$, замедляют свой рост, проявляя при этом холодочувствительный фенотип. Показано, что внесенные изменения в петлю $\alpha 3\text{-}\beta 4$ существенно понижают эффективность синтеза полипептида (β -галактозидазный тест) в системе *in vivo*. Учитывая то, что петли $\alpha 3\text{-}\beta 4$ и $\beta 4\text{-}\beta 5$ белка L5 могут участвовать в образовании межсубъединичного мостика, была проверена стабильность ассоциации рибосомных субчастиц из полученных мутантных штаммов. Оказалось, что делеции в петле $\beta 4\text{-}\beta 5$ не влияют на ассоциацию рибосомных субчастиц. Укорочение же петли $\alpha 3\text{-}\beta 4$ белка L5 отражается на способности 50S субчастицы участвовать в формировании рибосомы. С одной стороны, показано, что способность очищенных 50S субчастиц из мутантного и контрольного штаммов ассоциировать с 30S субчастицами при различных концентрациях ионов Mg^{2+} в среде принципиально не отличается. Однако, в отличие от контрольных субчастиц, образующих при ассоциации 70S рибосому, субчастицы из клеток мутантного штамма формируют менее компактную рибосому с коэффициентом седиментации около 63S. Этот результат указывает на важность контакта между белками L5 и S13 для правильной ассоциации рибосомных субчастиц. С другой стороны, оказалось, что состав рибосомной фракции из цитоплазмы клеток мутантного и контрольного штаммов отличается принципиально. В отличие от контрольного образца, состоящего только из 70S рибосом, образец из мутантного штамма содержит в сравнимых соотношениях четыре компонента: 70S и 63S рибосомы, а также свободные субчастицы. Учитывая этот результат можно предположить, что в клетках исследованных мутантных штаммов существует проблема с вовлечением рибосом в трансляцию.

Таким образом, полученные данные указывают на то, что именно петля $\alpha 3\text{-}\beta 4$ белка L5 участвует в формировании межсубъединичного мостика B1b, а ее укорочение влияет не только на ассоциацию рибосомных субчастиц, но и на эффективность трансляции в бактериальной клетке.

Работа поддержана грантом РФФИ № 09-04-01747-а и Программой «Молекулярная и клеточная биология» РАН.

МАКСИМОВА С.Н.¹, ГАФУРОВ Ю.М.², ПОЛЕЩУК Д.В.¹

¹ФГБОУ ВПО «Дальрыбвтуз», Владивосток, Россия

²ДВО РАН «ТИБОХ» Владивосток, Россия

ХИТОЗАН-НУКЛЕИНОВЫЙ ГИДРОЛИЗАТ КАК РЕГУЛЯТОР МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Развитие пищевой индустрии и технологии в XXI веке привело к удалению из продуктов важнейших для человека пищевых и регуляторных веществ. Некоторые технологии лишают пищу важнейших биологически активных веществ в результате чего происходит нарушение метаболических процессов, что является большой угрозой для здоровья человека. Для поддержания постоянства этих процессов в организме требуются биологически активные соединения, обеспечивающие биосинтез регуляторных элементов.

Решить эту проблему могут БАДы и функциональные продукты, так называемые «продукты XXI века», которые в своем составе содержат эссенциальные пищевые вещества и микронутриенты. Перспективным источником таких соединений являются водные биологические ресурсы. В Дальневосточном регионе к наиболее массовым промысловым объектам относятся тихоокеанские лососи, вторичным сырьем переработки которых являются молоки богатые протаминами, фосфолипидами, стеринами, жирорастворимыми витаминами, полиненасыщенными жирными кислотами, а так же нуклеиновыми кислотами (ДНК и РНК).

Например, ДНК, проникая в клетку, активизирует репарационные процессы, улучшает функционирование нервной эндокринной и сосудистой систем, что создает оптимальные условия для метаболических процессов.

Однако выделенная ДНК обладает высокой молекулярной массой и слабой растворимостью в воде, что ограничивает ее целевую доставку до тканей и клеток.

Из литературных источников известна способность молекул нуклеиновых кислот образовывать полиэлектролитные комплексы (ПЭК) с поликатионами различной природы. Например, при образовании комплекса с хитозаном, положительный заряд поликатиона нейтрализует отрицательный заряд нуклеиновой кислоты, в результате чего происходит компактизация молекулы нуклеиновой кислоты, что защищает его от эндонуклеазной деградации и облегчает проникновение ее через клеточную мембрану.

Нами предложен способ выделения нуклеинового материала методом ферментативного гидролиза, который по сравнению с другими методами позволяет получить нуклеиновые продукты высокой степени нативности. В качестве ферментного препарата использовали гепатопанкреатин, характеризующийся специфическим воздействием на нуклеопротеиды гонад гидробионтов. При этом оптимальными условиями гидролиза приняты следующие: концентрация ферментного препарата 0,7 г на 1 л субстрата; температура гидролиза 37-40 °С; продолжительность гидролиза-12 часов; инактивация фермента сорбиновой кислотой в объеме 1 г на 1 л гидролизата; величина гидромодуля гонады: вода – 1:9; прохождение гидролиза в присутствии ацетатного буфера рН 5,0.

В результате эксперимента путем измерения оптической плотности гидролизата и исследования качественного состава нуклеиновых продуктов тонкослойной хроматографией было установлено, что для полного гидролиза молок лососевых и выделения максимального количества нуклеинового материала оптимальная продолжительность гидролиза составляет 10-12 часов.

В качестве противоиона, способным образовывать ПЭК с нуклеиновыми продуктами, предложено использовать хитозан, способствующий нормальному функционированию иммунной системы, пищеварительных органов и достижению биогомеостатического равновесия, создаваемого метаболическими процессами в организме.

Водорастворимый хитозан с молекулярной массой 55 кДа в виде 1%-ого раствора вносили в гидролизат при соотношении хитозан-гидролизат - 0,5-1,0:1,0.

В эксперименте было подтверждено образование хитозан-нуклеинового комплекса путем исследования величин оптической плотности полученных образцов, представляющих собой смеси гидролизата и 1% -го водного раствора хитозана. в разных соотношениях с учетом значений оптической плотности проб, содержащих только хитозан в исследуемых количествах.

Полученный хитозан-нуклеиновый комплекс является аналогом полиэлектролитных систем, функционирующих в клетке, с помощью которых обеспечиваются метаболические реакции организма.

В связи с чем разработанный биологически активный гидролизат может позиционироваться как регулятор метаболических процессов организма и быть использован в качестве основы БАД или полуфабриката пищевого функционального продукта.

МАКСИМОВА Ю.Г.

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

ГЕТЕРОГЕННЫЙ БИОКАТАЛИЗ: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ВОПРОСА

Ферментативный катализ, протекающий на поверхности раздела фаз – гетерогенный биокатализ – является перспективным биотехнологическим процессом. Процессы такого рода катализируются гетерогенными биокатализаторами, которые представляют собой иммобилизованные на нерастворимом носителе или в структуре материала носителя ферменты, клетки (чаще микроорганизмов), органеллы или части клеток. Историю использования гетерогенных биокатализаторов можно условно разделить на три этапа: 1 – эмпирический (начало XIX в, производство уксусной кислоты и очистка сточных вод); 2 – иммобилизация отдельных ферментов (60-е гг XX в, получение L-аминокислот, изомеризация глюкозы); 3 – иммобилизация комплексов ферментов и целых клеток (80-е гг XX в). В нашей стране большой вклад в изучение иммобилизованных ферментов внес И.В. Березин – специалист в области инженерной энзимологии. Интерес к иммобилизации целых клеток микроорганизмов возник в начале 70-х гг XX в, когда в Японии И. Шибата с коллегами осуществили биосинтез L-аспартата иммобилизованными клетками бактерий, содержащими аспартазу. Г.К. Скрябин в 1975 г. обосновал теоретические аспекты иммобилизации живых клеток, возможности их практического использования, в том числе как биокатализаторов пролонгированного действия в синтезе стероидных гормонов. В начале 80-х гг К.А. Кощеенко и сотрудниками ИБФМ АН СССР были разработаны технологии получения преднизолона на основе использования иммобилизованных бактериальных клеток.

В условиях современности развитие биотехнологических производств предполагает широкое внедрение биокаталитических процессов, т.к. в отличие от химических они более

специфичны, энергетически выгодны и безопасны для окружающей среды. В свою очередь, гетерогенный биокатализ имеет ряд несомненных преимуществ, среди которых стабилизация процесса, возможность внедрения непрерывных технологий, упрощение процедуры выделения и очистки конечных продуктов, снижение количества отходов в виде отработанной биомассы. Исследования гетерогенного катализа иммобилизованными на неорганических носителях ферментами и бактериальными клетками проводятся под руководством д.х.н. Г.А. Коваленко (Институт катализа им. Г.К. Борескова СО РАН). Разработка гетерогенных биокатализаторов для различных биотехнологических процессов выполняется под руководством д.б.н. Е.Н. Ефременко (МГУ, кафедра энзимологии). В настоящее время самым крупномасштабным иммобилизованным продуктом в мире является глюкозоизомераза.

Нами проводятся работы по получению гетерогенных катализаторов гидролиза нитрилов и изучению их свойств и эффективности в гидролитических процессах. Гетерогенный биокатализатор может быть представлен клетками нитрилутилизующих бактерий в стационарной фазе роста, иммобилизованными на различных органических и неорганических носителях; биопленками этих бактерий, полученными при гетерофазном культивировании с носителями; иммобилизованными изолированными ферментами нитрильного метаболизма (нитрилазой, нитрилгидратазой и амидазой). В случае если носитель обладает макропористостью (и/или) высокой дисперсностью, шероховатой поверхностью, а также совпадает гидрофобность/гидрофильность поверхности клеток и носителя, возможно получение активного и стабильного адсорбированного биокатализатора, пригодного для многократного использования или для функционирования в непрерывных процессах. Эффективность использования биопленок в гидролитических процессах зависит от природы самих бактерий и связана с особенностью структуры биопленок, а также выработкой внеклеточных полимерных веществ, избыток которых может затруднять массообмен и загрязнять реактор. Иммобилизация ферментного препарата обеспечивает специфичность процесса, но выделение фермента может приводить к удорожанию производства конечного продукта, а иммобилизация – к снижению исходной активности. В этом случае необходимо эмпирическое сравнение влияния различных методов иммобилизации и используемых носителей на активность и стабильность фермента. По нашим данным, ковалентная сшивка нитрилгидратазы с

активированным хитозаном дала возможность получить более активный и стабильный препарат, чем в случае адсорбции на неорганических носителях.

Таким образом, гетерогенный биокатализ актуален для современных биотехнологических производств, а его внедрение предполагает переход от экстенсивных способов проведения процессов к интенсивным.

Работа поддержана программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

МАКСЮТОВ И.Ю.

*ГОУ ВПО "Башкирский государственный медицинский университет",
кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии, Уфа, Россия*

РАЗРАБОТКА СПОСОБОВ МОЛЕКУЛЯРНО ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ ПРОТИВОМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ НА ПРИМЕРЕ: СИНЕГНОЙНОЙ ПАЛОЧКИ (PSEUDOMONAS AERUGINOSA)

Актуальность проблемы. Как следует из многоцентровых национальных и международных исследований, уже на протяжении десятки лет *P.aeruginosa* выступает в качестве одного из наиболее частых возбудителей госпитальных инфекций, особенно в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ). Частота развития синегнойной инфекции во многом определяется нозологической структурой пациентов, тяжестью их исходного состояния, распространенностью инвазивных процедур, в частности, числом больных, нуждающихся в длительной респираторной поддержке, катетеризации мочевого пузыря или проведении длительной инфузионной терапии. Необходимость обсуждения проблемы антибактериальной терапии инфекций, вызываемых данным микроорганизмом, наряду с их высокой распространенностью, связана также с ростом его резистентности практически ко всем из используемых в широкой практике антибиотикам, трудностями эрадикации из тканей и высокой летальностью.

Цель исследования: на молекулярно – генетическом уровне разработать способ оценки противомикробной активности новых химических соединений, применяемых при лечении инфекции, вызванной синегнойной палочкой.

Материалы и методы исследования. Нами была проведена культуральная диагностика с последующей бактериоскопией. Возбудители, дополнительно выращенные в культуре, исследовали под микроскопом, оценивали устойчивость к различным группам антибиотиков, «перевивали» на среды с другим составом для исследования ферментативных свойств. С помощью полимеразно-цепной реакции (ПЦР) в реальном времени определяли количество микроорганизмов. С иммуноферментного анализа (ИФА) были выявлены как антигены возбудителя инфекции, так и антитела, вырабатываемые в ответ на антигенную стимуляцию иммунной системы.

Полученные результаты. Было выявлено: доля резистентных штаммов синегнойной палочки к цефтазидиму 42,8%; имипенему – до 36%; ципрофлоксацину – до 82,1%; амикацину – до 56,2%.

Выводы. Таким образом наибольшая устойчивость синегнойной палочки наблюдается к ципрофлоксацину, наименьшая к имипенему. Значит при лечении инфекции, вызванной синегнойной палочкой, наиболее эффективно применять антибиотики в лактамного ряда (имипенем). Культуральный метод, ИФА, ПЦР являются наиболее информативными для оценки противомикробной активности новых химических соединений, применяемых при лечении инфекции, вызванной синегнойной палочкой.

МАМАЕВА М.Е.¹, НОВИКОВ Д.В.², ПРЕСНЯКОВА Н.Б.³,

КОРОЛЕВА В.В.³, ФИЛАТОВА Е.Н.³

¹*Приволжский окружной медицинский центр, Нижний Новгород, Россия*

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

³*Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Академика И.Н.Блохиной, Нижний Новгород, Россия*

СЫВОРОТОЧНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАСТВОРИМОГО CD95 АНТИГЕНА У БОЛЬНЫХ ОПУХОЛЯМИ ТЕЛА И ШЕЙКИ МАТКИ

Цель исследования – охарактеризовать сывороточное содержание растворимого CD95 (sCD95) антигена у больных миомой, раком тела и шейки матки.

Материал и методы. Под наблюдением находилось 94 больных опухолями женских половых органов в возрасте 30–57 лет. Все пациентки впервые поступили в стационар и ранее не получали какого–либо противоопухолевого лечения. По результатам гистологического анализа послеоперационного материала у 53 больных (56,4%) диагностирована доброкачественная опухоль матки, у 34 женщин (36,2%) – рак тела матки, у 7 (7,4%) – рак шейки матки. У больных раком тела матки в 52,9% случаев (18 женщин) был выявлен высокодифференцированный опухолевый процесс. Умеренно дифференцированный рак эндометрия диагностирован у 16 пациенток (47,1%). У всех больных раком шейки матки имел место умеренно дифференцированный плоскоклеточный рак. На основании данных инструментального обследования и с учетом гистологического заключения степень распространенности опухолевого заболевания по классификации FIGO у всех пациенток не превышала вторую (I степень – 27 человек (65,8%), II – 14 (34,2%)). Всем пациенткам было выполнено оперативное вмешательство, объем которого определялся характером заболевания. Контрольную группу составили 30 клинически здоровых женщин соответствующего возраста.

Кровь для иммунологического анализа забирали при поступлении больной в стационар и на 10 день после выполнения хирургического вмешательства. Сывороточное содержание растворимого растворимого CD95 антигена определяли с помощью меченых пероксидазой моноклональных антител ИКО-160. Результаты были представлены в условных единицах (U/ml). Статистический анализа проводился с использованием пакета программ Statistica 6.0.

Результаты. Уровень sCD95 антигена в сыворотке крови здоровых женщин составил $336,75 \pm 19,99$ U/ml. При наличии доброкачественных опухолей его содержание соответствовало $449,23 \pm 31,52$ U/ml, превышая норму в 1,3 раза ($p=0,003$). После выполнения хирургического вмешательства сывороточное содержание sCD95 антигена не изменялось, оставаясь по–прежнему выше показателей в контрольной группе – $463,65 \pm 32,84$ U/ml ($p=0,001$).

У больных раком тела матки содержание sCD95 антигена имело тенденцию к повышению, но статистически значимо не отличалось от нормы, составляя величину, равную $372,22 \pm 15,75$ U/ml ($p>0,05$). Степень дифференцировки новообразования не влияла на уровень растворимого CD95 антигена. У больных с высоко

дифференцированными опухолями содержание sCD95 антигена составило $359,44 \pm 20,33$ U/ml, у пациенток с умеренно дифференцированными новообразованиями – $392,55 \pm 32,95$ U/ml. В послеоперационном периоде уровень sCD95 антигена не изменялся по сравнению с исходными значениями, но повышался относительно нормы ($390,90 \pm 16,67$ U/ml, $p=0,04$).

В группе больных раком шейки матки уровень sCD95 антигена составил $1119,0 \pm 11,02$ U/ml, превышая контрольные показатели в 3,3 раза ($p < 0,00005$). Содержание белка в сыворотке крови этой группы больных было в 2,5 раза выше ($p < 0,00005$), чем у женщин с доброкачественными опухолями и в 3,0 раза выше ($p < 0,00005$), чем у больных раком тела матки. После выполнения хирургического вмешательства содержание sCD95 антигена не изменялось, оставаясь выше нормального уровня ($1168 \pm 16,14$ U/ml, $p < 0,00005$ в сравнении с нормой).

Таким образом, развитие опухолей женских половых органов сопровождается повышением сывороточной концентрации растворимого CD95 антигена. Наиболее выраженное повышение наблюдается у больных раком шейки матки. Возрастание сывороточной концентрации растворимого CD95 антигена происходит не только при злокачественных, но и при доброкачественных новообразованиях. Выполнение оперативного вмешательства не оказывает значимого влияния на уровень растворимого CD95 антигена.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно–технологического комплекса России на 2007–2013 гг.».

МАМЕДОВА Х.Р.

Азербайджанский научно исследовательский институт Земледелия, Баку, Азербайджан

БИОЛОГИЯ - НАУКА XXI ВЕКА, ЕГО ДОСТИЖЕНИЯ И ЗАДАЧИ

С биологической точки зрения XX век прошёл под знаком дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). Именно, ДНК, а не белки, жиры и углеводы, как оказалось позже, является носителем кода жизни. К 1945 году это утверждение уже можно было считать доказанным научным фактом. А после того как в 1953 году удалось определить

пространственную структуру ДНК, перспективы биологии изменились самым кардинальным образом.

В XXI веке биологии занялись расшифровкой структуры генома, который сводится к выявлению последовательности символов отдельных структурных единиц и к определению их функциональной нагрузки. В геноме человека содержится около 3S109 оснований генетических «букв» (А, Т, G, С), составляющих десятки тысяч различных генов. Задача состоит в определении последовательности расположения 3,5 млрд. нуклеотидов, содержащих в своем составе те или иные азотистые основания. Такими генетическими «буквами» и написаны слова «книги жизни», определяющей образ рода человеческого. Если издать генетическую информацию только об одном человеке в виде книги, то получится фолиант в 750 тыс. страниц.

Задачей проекта «Геном человека» (HumanGenomeProject, HGP) было определение последовательности всех нуклеотидов в геноме человека с точностью до 0,01%. Инициатором этой работы стало Министерство энергетики США, которое в 1986 году выступило с идеей осуществить полную расшифровку генома человека. Проект был развернут Национальным институтом здоровья США, и планировался к завершению в 2005 году. В 2000 году премьер-министр Великобритании Тони Блэр и президент США Билл Клинтон заявили, что расшифровано 97% генома человека. На тот момент была расшифрована структура 50 тыс. генов, в которых идентифицирована последовательность расположения 3.5 млрд. генетических букв.

Полное изучение генома человека, поможет решению еще одной важной задачи биологии, изучению наследственных болезней (сегодня их известно уже более 2 тыс.), генетического компонента предрасположенности человека к наиболее распространенным онкологическим, сердечнососудистым и многим другим заболеваниям, в том числе болезней XX и XXI вв. СПИДа, Рака и Диабета!!По данным ученых, за последние 30 лет количество больных диабетом увеличилось со 153 млн. человек до 347 млн. Британский благотворительный фонд обнародовал данные, согласно которым, число заболеваний раком в мире за последние десять лет выросло на 20%. Каждый год, на планете выявляется двенадцать миллионов новых раковых больных - это в четыре раза больше, чем тех, кто заражается ВИЧ, заявляют во Всемирном фонде исследования рака. И хотя по данным ООН число больных ВИЧ в 2011 году сократилось до самого низкого уровня за

последние 14 лет, проблема все еще остается. По информации ООН, в настоящее время число ВИЧ-инфицированных составляет 34 миллиона человек.

Биологи также считают, что одна из главных задач биологии – это старение. Общепринятая версия, что старение – это поломка сложной системы, которая рано или поздно должна произойти. Но Вейсманом (Weismann) в конце 19 века была высказана другая точка зрения – что смерть была придумана эволюцией для того, чтобы выбраковывать ненужные особи, чтобы популяция не засорялась монстрами (чем старше организм, тем больше вероятность, что он родит уродливое потомство). Чтобы все это предотвратить, была – специально! – придумана смерть в результате старения. Первые указания в пользу вейсмановской точки зрения уже есть. Обнаружены такие гены, при поломке которых существо живет дольше. В 1999 году был проделан опыт на мышах: им испортили ген (это называется нокаут гена), который кодирует так называемый белок р66, и продолжительность жизни подопытных особей возросла на 30 процентов. Вот пример одной недавней и совершенно фантастической работы: нахождение вещества, блокирующего белок р53. Этот ключевой белок, называется «стражем генома», есть в каждой клетке. Он ползает по молекуле ДНК и проверяет, не порвалась ли она где-нибудь. Если порвалась, он дает команду починить, а сам продолжает ползать. Если ДНК не чинится, белок дает другой приказ – запрещает клетке делиться. А потом если за длительный срок повреждение не исправлено, дает приказ на самоубийство. Оказывается, что в половине всех случаев рака этот замечательный белок сломан. Поэтому клетка с поврежденной ДНК и шалит – сигнала на самоубийство нет. С другой стороны, при инфарктах, инсультах, септическом шоке это самоубийство охватывает сразу огромное количество клеток в жизненно важном органе. Поэтому хорошо было бы найти на него управу.

Решение продовольственной программы населения тоже немаловажно. С учетом демографических прогнозов для обеспечения растущей человеческой популяции мы должны увеличивать продовольственный потенциал ежегодно в среднем на 2%. Естественно, чтобы удвоить в обозримом будущем объем производимого продовольствия, необходимо создать принципиально новые формы с реконструированными геномами и более продуктивные, качественные и устойчивые. Одним из основных направлений биотехнологии являются получение и многопрофильное

использование транс генных растений, т.е. форм, несущих в своем геноме встроенные генно-инженерными методами чужие гены, нормально работающие в новом геноме. В настоящее время транс генные растения уже возделываются на десятках миллионов гектаров. Только в США транс генная соя занимает около 15% всех посевных площадей, транс генная кукуруза – около 10%. Если оценивать последние достижения биотехнологий в методологическом аспекте, то речь идет, несомненно, о серьезном вмешательстве в эволюционно устоявшиеся геномы растений, животных, да и самого человека. Усугубляются они тем, что мы пока не знаем последствий нашего вмешательства в геном, хотя исследования в этом направлении ведутся интенсивно.

В заключение приведу слова Т.Манна из его романа-притчи “Иосиф и его братья”:
“...То, что не поддается исследованию, словно бы подтрунивает над нашей исследовательской неумностью, приманивая нас к мнимым рубежам и вехам, за которыми, как только до них доберешься, сразу же открываются новые дали...”. Это и есть философия науки в частности наук XXI в., в том числе и биологии.

МАРЕТИНА М.А.¹, ЖЕЛЕЗНЯКОВА Г.Ю.¹, ЕГОРОВА А.А.², КИСЕЛЕВ А.В.²

¹ Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург, Россия

² НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О.Отта СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА ТЯЖЕСТЬ ТЕЧЕНИЯ СПИНАЛЬНОЙ МЫШЕЧНОЙ АТРОФИИ

Спинальная мышечная атрофия (СМА) – распространенное аутосомно-рецессивное нейродегенеративное заболевание, которое развивается в результате гомозиготной мутации в гене *SMN1*. Основным симптомом является прогрессирующая мышечная слабость, которая возникает из-за потери функции мотонейронов передних рогов спинного мозга. В зависимости от тяжести и времени появления симптомов различают четыре типа СМА: I тип – наиболее тяжелая форма заболевания, которая приводит к летальному исходу на 12-14 месяце жизни; II тип – промежуточная форма, продолжительность жизни больных составляет 15-20 лет; III тип – наиболее легкая форма СМА, пациенты способны ходить и доживают до 30-40 лет и старше. Наименее тяжелой является взрослая форма

заболевания - СМА IV типа, которая возникает на третьей декаде жизни; ее симптомы проявляются в позднем возрасте.

Ген *SMN1* экспрессирует полноразмерный транскрипт, с которого считывается функционально активный белок. Ген *SMN2*, центромерно ориентированная копия гена *SMN1*, способен производить только 10% полноразмерной мРНК, что делает его основным геном-модификатором заболевания. Было показано, что число копий гена *SMN2* может варьировать от 0 до 8 и, как правило, коррелирует с тяжестью СМА. Другим модификатором фенотипа является мутация 859 G>C в гене *SMN2*. Наличие данной замены приводит к повышению уровня полноразмерных транскриптов, и, следовательно, смягчению фенотипа у пациентов со СМА.

Нами был разработан метод выявления мутации 859 G>C с помощью ПЦР-ПДРФ с использованием праймера, вводящего сайт узнавания для эндонуклеазы рестрикции FokI. Также для детекции данной замены были разработаны аллель-специфические праймеры. Работоспособность методики была доказана в эксперименте с контрольной ДНК пациентов со СМА из испанской популяции, несущих данную мутацию в гене *SMN2*. Всего 155 образцов ДНК пациентов со СМА Северо-Западного региона РФ были протестированы на наличие мутации 859 G>C. Пациентов с мутацией выявлено не было, что может быть связано с различиями во встречаемости замены 859 G>C в разных популяциях.

Определение числа копий гена *SMN2* было проведено с помощью метода ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) у 117 больных с различными типами спинальной мышечной атрофии – 39 пациентов со СМА I типа, 50 пациентов со СМА II типа и 28 пациентов с III типом СМА. Были получены достоверные различия между диапазонами значений после ПЦР-РВ для разного числа копий гена *SMN2*. У большинства пациентов СМА I типа было обнаружено 2 копии гена *SMN2* (76,9%), у 20,5% пациентов - 3 копии гена *SMN2*, у одного (2,6%) была обнаружена 1 копия гена *SMN2*. Большинство пациентов со СМА II типа имеют 3 копии гена *SMN2* (78%), 12% пациентов – 4 копии гена *SMN2* и 10% – 2 копии гена *SMN2*. У 50% пациентов со СМА III типа обнаруживается 4 копии гена *SMN2*, у 46,43% пациентов - 3 копии гена *SMN2* и у одного пациента (3,57%) было найдено 2 копии гена *SMN2*. Получены достоверные различия в частотах встречаемости 2, 3 и 4 копий гена *SMN2* у пациентов с разными типами СМА. При наличии 2 копий гена *SMN2* наиболее

вероятно развитие СМА I типа, в случае присутствия 3 копий - СМА II типа, а при 4 копиях гена *SMN2* с наибольшей вероятностью развивается СМА III типа. У 12% пациентов СМА II типа было обнаружено 4 копии гена *SMN2*, таким образом, в 88% случаев у пациентов с 4 копиями гена *SMN2* можно предсказать развитие СМА III типа. У 10% пациентов СМА II типа было обнаружено 2 копии гена *SMN2*, значит в 90% случаев у пациентов с 2 копиями гена *SMN2* можно предсказать развитие СМА I типа.

Таким образом, определение количества копий гена *SMN2* является важным дополнительным критерием при определении типа СМА, который следует учитывать при раннем прогнозе развития заболевания.

МАРКОВА О.В., ГАРИПОВА С.Р.

ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет», Уфа, Россия

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АССОЦИИ ЭНДОФИТНЫХ БАКТЕРИЙ Ф4 С РАСТЕНИЯМИ *PHASEOLUS VULGARIS L.* В ЗАВИСИМОСТИ ОТ МЕТЕОРОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

Изучение взаимоотношений эндофитных бактерий с растениями является актуальным для увеличения продуктивности, повышения устойчивости и адаптации сельскохозяйственных культур к неблагоприятным факторам среды. В полевых опытах 2007-2010 гг. исследовали ответную реакцию растений *Phaseolus vulgaris L.* (сорта Золотистая, Эльза) на обработку семян ассоциацией эндофитных бактерий Ф4, выделенной из клубенька растений фасоли, и каждым образующим ее штаммом. Эффект от инокуляции в значительной степени зависел от сорта растения и условий влагообеспеченности сезона. В благоприятных по климатическим условиям 2007, 2008 гг. на обоих сортах ассоциация Ф4, способствовала повышению продуктивности на 19-28% и устойчивости к фитопатогенам на 11-24%. В менее благоприятных условиях 2009, 2010 гг. инокуляция Ф4 на сорте Золотистая в отличие от сорта Эльза привела к снижению семенной продуктивности несмотря на повышение устойчивости этого сорта и сорта Эльза к фитопатогенам. Инокуляция отдельными штаммами ассоциации Ф4 (*Bacillus megaterium* 411, 412, 413 и *Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli* 420) проводилась в крайне

засушливом 2010 году. Результаты показали, что наибольшая продуктивность и наименьший процент поражения корневыми гнилями были отмечены у растений сортов Эльза и Золотистая при обработке штаммом *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli* 420. Для изучения механизмов взаимодействия разделенных штаммов ассоциации в опытах *in vitro* проанализировали проявление ростстимулирующего эффекта, цитокининпродуцирующую активность и устойчивость к антагонистическому воздействию отдельных штаммов. Все исследованные штаммы стимулировали рост корней на 34% (Ф4), на 32-68% (индивидуальные штаммы); синтезировали цитокининподобные вещества (кроме штамма 420); проявляли нейтраллизм к *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli* 2630 и подавляли развитие *Fusarium oxysporum*. Таким образом, в отличие от ризобиального штамма 420 неризобиальные эндофиты клубенька при взаимодействии с растением в условиях дефицита влаги не проявили мутуалистического эффекта. Это свидетельствует о необходимости выявления механизмов формирования эффективных симбиотических систем в условиях стресса.

МАРЧЕНКО Н.Ю., СИКОРСКАЯ Е.В., МАРЧЕНКОВ В.В.,

СУРИН А.К., КОТОВА Н.В., СЕМИСОТНОВ Г.В.

Институт белка Российской академии наук, Пушкино, Россия

АФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ НА ОСНОВЕ ДЕНАТУРИРОВАННЫХ БЕЛКОВ КАК МЕТОД ОЧИСТКИ И ЭКСПРЕСС-АНАЛИЗА МОЛЕКУЛЯРНЫХ ШАПЕРОНОВ В КЛЕТОЧНЫХ ЭКСТРАКТАХ (ЛИЗАТАХ)

Молекулярные шапероны – большая группа разнообразных белков, обеспечивающих правильное сворачивание клеточных белков (синтезированных *de novo* или денатурированных вследствие клеточных стрессов), а также трансмембранный транспорт и деградацию белковых цепей. Молекулярные шапероны (как бактериальные, так и эукариотические) участвуют также в процессах, происходящих при инфекционных и аутоиммунных заболеваниях, при амилоидозах, а также многофакторных заболеваниях, таких как артриты и атеросклерозы. В этой связи, разработка методов экспресс-анализа

содержания и функциональной активности молекулярных шаперонов может быть одним из подходов к ранней диагностике таких заболеваний.

Основным функциональным свойством молекулярных шаперонов является их способность взаимодействовать с ненативными белками и предотвращать патологическую межмолекулярную ассоциацию таких белков.

В настоящей работе представлены результаты исследований взаимодействия с различными ненативными белками одного из наиболее изученных молекулярных шаперонов – GroEL клеток *Escherichia coli* и его аналогов термофильных и эукариотических клеток (Hsp60). Эти молекулярные шапероны представляют собой сложные олигомерные структуры, состоящие из 14-16 субъединиц, объединённых в две взаимодействующие торцами кольцевые структуры по 7-8 субъединиц в каждой. Они обладают слабой АТФазной активностью и получили название «шаперонины».

В качестве субстратных ненативных белков, взаимодействующих с GroEL, были исследованы группа отрицательно заряженных при нейтральных рН белков, включающая пепсин (заряд -32), β -казеин (-8) и α -лактальбумин (-7), а также группа положительно заряженных белков, включающая апоцитохром *c* (+9), рибонуклеазу А (+4) и лизоцим куриного яйца (+8). Ряд этих белков являются денатурированными при нейтральных рН (пепсин, казеин, апоцитохром *c*), а α -лактальбумин, рибонуклеаза А и лизоцим куриного яйца были денатурированы разрывом внутримолекулярных дисульфидных связей белков в присутствии тиоловых реагентов (дитиотрейтола или β -меркаптоэтанола). Было установлено, что все эти денатурированные белки характеризуются различной «гидрофобностью» (средством к гидрофобному флуоресцентному зонду – АНС). Были созданы аффинные носители путём ковалентной пришивки субстратных белков к CNBr-активированной сефарозе, которые помещались в небольшие колонки ($V = 2$ мл) и являлись аффинными сорбентами молекулярных шаперонов, находящихся в клеточных лизатах. С использованием чистого GroEL показана высокая сорбирующая способность аффинных носителей на основе денатурированных пепсина и лизоцима и подобраны условия сорбции и элюции шаперона. Показано также, что с использованием этих аффинных сорбентов можно выделять GroEL и подобные ему шапероны из различных клеточных экстрактов практически в одну стадию. Результаты работы показывают перспективность разработки метода аффинной хроматографии на основе

денатурированных белков для высокоэффективной очистки и экспресс-анализа содержания молекулярных шаперонов в лизатах клеток различных организмов.

Работа поддержана грантами «Молекулярная и клеточная биология» Российской академии наук, Российского фонда фундаментальных исследований, госконтракта «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» № 02.740.11.0295.

МЕЩЕРЯКОВА Е.С., ШПИРНАЯ И.А., ЧУРАКОВА М.И., БАСЫРОВА А.М.

Башкирский государственный университет, Уфа, Россия

АКТИВНОСТЬ ИНГИБИТОРОВ ЭКЗОГЕННЫХ ГИДРОЛАЗ В ПЛОДОВЫХ ТЕЛАХ ГРИБОВ КЛАССА *BASIDIOMYCETES*

Белки-ингибиторы гидролитических ферментов обнаружены в тканях животных, растений и в микроорганизмах. Общим свойством этих молекул является способность образовывать с соответствующими ферментами устойчивые комплексы, тем самым блокируя их активность.

К настоящему времени, в основном исследованы ингибиторы гидролаз растений. Работы, посвященные изучению активности и функциям ингибиторов гидролаз грибов единичны.

Ингибиторы могут использоваться в токсикологии, фармакологии, в сельском хозяйстве, а также научных исследованиях для выяснения механизмов ферментативного катализа. Возможно применение ингибиторов в медицине в качестве терапевтических средств.

В связи с вышесказанным изучение уровня активности ингибиторов экзогенных гидролаз представляет как теоретический, так и практический интерес.

Целью настоящей работы явилось исследование уровня активности ингибиторов, подавляющих действие экзогенных гидролаз из плодовых тел *Basidiomycetes*.

Определяли уровень активности ингибиторов экзогенных гидролаз (пектиназы *Aspergillus niger*, целлюлазы *Trichoderma reesei*, амилазы *Bacillus subtilis* и трипсина) в плодовых телах грибов распространенных на территории Республики Башкортостан. Отбирали плодовые тела средних размеров, без червоточин, плотной консистенции. После

сбора их замораживали. Объектом исследования служили экстракты плодовых тел масленка обыкновенного (*Suillus luteus*), рыжика настоящего (*Lactarius deliciosus*), сыроежки красной (*Russularubra*), груздя настоящего (*Lactarius resimus*), говорушки рыжей (*Clitocybe geotropa*), говорушки серой (*Clitocybe nebularis*), шампиньона полевого (*Agaricus arvensis*), мухомора красного (*Amanita muscaria*), подберезовика обыкновенного (*Leccinum scabrum*), опенка осеннего (*Suillus luteus*), трютовика лакированного (*Ganoderma lucidum*).

Использовали коммерческие препараты ферментов трипсина (Serva, США), амилазы *Bacillus subtilis*, пектиназы *Aspergillus niger*, целлюлазы *Trichoderma reesei* (Sigma).

Для эксперимента навеску замороженных плодовых тел растирали в фарфоровой ступке с кварцевым песком, заливали дистиллированной водой (1:1). Экстракт выдерживали в течение 1,5 ч при 4°C, далее фильтровали и центрифугировали при 10000 об/мин на центрифуге MPW-310 (Польша) в течение 10 мин. В дальнейших исследованиях использовали супернатант.

Использовали метод определения уровня активности ингибиторов гидролаз по гидролизу субстрата в геле агарозы. За 1 миллиединицу активности (МЕ) фермента принимали такое количество фермента, которое гидролизовало субстрат на участке геля размером 1 мм². Активность ингибитора рассчитывали по разнице значений активности свободного фермента и смеси фермента и ингибитора. За 1 миллиединицу активности (МИЕ) принимали такое количество ингибитора, которое подавляло 1МЕ активности фермента.

Все исследованные образцы характеризуются высокой активностью ингибиторов экзогенных амилаз, целлюлаз, пектиназ и трипсина. Наибольшим уровнем активности ингибиторов амилазы *Bacillus subtilis* отличаются экстракты масленка обыкновенного (4,71 ИЕ/г сырой массы) и говорушки рыжей (4,33). Активность ингибиторов трипсина наиболее выражена в плодовом теле опенка осеннего и составляет 3,06 ИЕ/г сырой массы.

Исследованные образцы грибов принадлежащих к сапротрофам, обладают высокой активностью ингибиторов амилазы *Bacillus subtilis*. Интересно, что амилолитическая активность в них не выявляется, это может быть связано с таким явлением как субстратная индукция. Для всех исследованных образцов выявлена высокая активность ингибиторов

пектиназы *Aspergillus niger*. Наибольший уровень активности ингибиторов пектиназы выявлен в плодовом теле трутовика лакированного (4,12 ИЕ/г сырой массы).

Наибольшей активностью соединений, подавляющих активность целлюлазы *Trichoderma reesei* характеризуется экстракт трутовика (5,26 ИЕ/г сырой массы).

Итак, все исследованные виды высших грибов характеризуются высоким уровнем активности ингибиторов пектиназы *Aspergillus niger*, целлюлазы *Trichoderma reesei*, амилазы *Bacillus subtilis* и трипсина.

Таким образом, плодовые тела высших грибов могут рассматриваться, как источник ингибиторов экзогенных гидролаз и могут быть использованы для их массового получения.

МЕЩЕРЯКОВА Е.С., ШПИРНАЯ И.А., ЦВЕТКОВ В.О., БАСЫРОВА А.М.

Башкирский государственный университет, Уфа, Россия

ПЛОДОВЫЕ ТЕЛА ВЫСШИХ ГРИБОВ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ИСТОЧНИК ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

В настоящее время в промышленных биокаталитических процессах широко используются различные ферменты, такие как протеазы, липазы, ксиланазы, гидролазы, оксидоредуктазы и др.

Многие грибы обладают богатым ферментным аппаратом, а также образуют ряд физиологически активных веществ. Эти свойства грибов широко используются человеком. В настоящее время широко используются ферментные препараты, полученные в ходе культивирования микроскопических грибов. Однако существует и ряд проблем при использовании их в качестве продуцентов различных соединений, например риск развития различного рода заболеваний у работников производства, а также определенные технические сложности в процессе культивирования.

Высшие грибы, относящиеся к классу *Basidiomycetes*, могут служить источником ферментов как пищевого, так и медицинского назначения. Преимуществами этих грибов при искусственном культивировании могут являться - пригодность некоторых из них для

употребления в пищу и отсутствие спороношения в культуре, что уменьшает опасность профессиональных заболеваний в условиях производства.

В связи с вышесказанным, исследование активности ферментов у высших грибов представляет научный и практический интерес.

Целью данной работы являлось выявление уровня активности гидролитических ферментов (протеаз, целлюлаз, и пектиназ) и определение содержания белка в плодовых телах широко распространенных съедобных грибов класса *Basidiomycetes*.

Объектом исследования служили экстракты плодовых тел масленка обыкновенного (*Suillus luteus*), рыжика настоящего (*Lactarius deliciosus*), сыроежки красной (*Russuia rubra*), груздя настоящего (*Lactarius resimus*), говорушки рыжей (*Clitocybe geotropa*), говорушки серой (*Clitocybe nebularis*), шампиньона полевого (*Agaricus arvensis*), подберезовика обыкновенного (*Leccinum scabrum*), опенка осеннего (*Suillus luteus*).

Сбор плодовых тел осуществляли осенью, в Уфимском районе Республики Башкортостан. Отбирали плодовые тела средних размеров, без червоточин, плотной консистенции. После сбора их замораживали.

Для эксперимента навеску замороженных плодовых тел растирали в фарфоровой ступке с кварцевым песком, заливали дистиллированной водой (1:1). Экстракт выдерживали в течение 1,5 ч при 4°C, далее фильтровали и центрифугировали при 10000 об/мин на центрифуге MPW-310 (Польша) в течение 10 мин. В дальнейших исследованиях использовали супернатант.

Активность гидролаз определяли по гидролизу специфического субстрата иммобилизованного в гель агарозы. В качестве субстратов для определения протеиназ, пектиназ и целлюлаз, использовали желатин, пектин и КМЦ (карбоксиметилцеллюлоза) соответственно. За 1 миллиединицу активности (мЕ) фермента принимали такое количество фермента, которое гидролизовало субстрат на участке геля размером 1 мм². Содержание белка в экстрактах определяли методом Бредфорд.

Наши исследования показали, что все исследованные образцы характеризуются высоким уровнем активности протеаз, целлюлаз и пектиназ. Наиболее высоким является уровень протеолитической активности. Возможно, это связано с тем, протеиназы выполняют в клетке важнейшие функции, связанные с ростом и развитием организма.

Среди исследованных образцов наибольшей протеолитической активностью обладали экстракты плодовых тел масленка и подберезовика.

Интересно, что наибольшей пектиназной активностью характеризуются экстракты сыроежки (6,13 Е/г сырой массы) и подберезовика (5,41), которые относятся к микоризным сапротрофам, а наименьшей – шампиньона (3,10) и говорушки (3,71) (подстилочные сапротрофы). Таким образом, микоризные сапротрофы при сравнении с подстилочными обладают большей пектиназной активностью. При анализе активности целлюлаз выявляется та же зависимость. Наибольшей активностью целлюлаз характеризовались экстракты, полученные из шампиньона (6,13) и говорушки рыжей (6,13). Наименьшей активностью – экстракты масленка (3,17) и груздя (3,92)

В целом, целлюлолитическая активность характерна для всех исследованных образцов, поскольку целлюлазы активно разрушают субстрат, на котором произрастают грибы в природных условиях.

Также показано, что все исследованные образцы характеризуются высоким содержанием белка. Так, например, количество белка составляет 30 мг/г сырой массы для плодовых тел груздя и шампиньона.

Таким образом, грибы являются ценным источником белка и ферментов - гидролаз и могут быть рассмотрены как источник этих соединений при искусственном культивировании.

МАРТИРОСОВА Е.И., ПЛАЦИНА И.Г.

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

ЭФФЕКТ МЕТИЛРЕЗОРЦИНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНОСТЬ ЛИЗОЦИМА

Применение лизоцима в пищевой промышленности связано с его способностью предотвращать бактериальное заражение продуктов. Широкое применение он нашел в производстве продуктов детского и лечебно-профилактического питания, в молочном производстве. В пищевой промышленности лизоцим зарегистрирован в качестве консерванта готовой продукции Е1105.

Повышение эффективности использования лизоцима достижимо путем его обработки метилрезорцином (МР). В частности, показано, что в концентрациях 10^{-7} – 10^{-3} М МР вызывает повышение активности фермента в отношении специфического субстрата - бактериальных клеток *Micrococcus luteus* (до 120%), и неспецифических субстратов - дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* (до 400%) и коллоидного хитина (до 470%). Таким образом, МР демонстрирует способность изменять субстратную специфичность, повышая скорость гидролиза связей, неспецифических для данного фермента. Также лизоцим, модифицированный МР (7 мМ), демонстрировал увеличение температурного диапазона работы фермента: в интервале температур 35-57⁰С, имел активность такую же или выше, как и при оптимальной температуре (53⁰С) для нативного лизоцима.

Опираясь на данные, полученные методом микрокалориметрии смешения для индивидуального раствора МР и результаты анализа размеров частиц метилрезорцина в растворе, а также на дифильный характер структуры молекулы МР было выдвинуто предположение о принадлежности к поверхностно-активным веществам. Цель работы заключалась в изучении влияния концентрации МР на поверхностную активность лизоцима, динамику формирования и реологические свойства его адсорбционных слоев на границе раствор (0,05М PBS, рН 7,4)/воздух. Методом динамической капельной тензиометрии и дилатометрии изучена адсорбция МР в индивидуальных и смешанных с лизоцимом растворах при 25⁰С в диапазоне концентраций МР (0,16-128 мМ) и постоянной концентрации лизоцима $3,4 \cdot 10^{-6}$ М.

Установлено, что МР обладает поверхностной активностью, сравнимой по величине с таковой у ионогенных ПАВ. Обнаружена способность МР к самоорганизации в растворе, с образованием «мицеллоподобной структуры». Показано, что МР изменяет термодинамическое сродство лизоцима к растворителю в зависимости от концентрации. Ниже условной величины критической концентрации мицеллообразования (ККМ) МР повышает гидрофильность белка, а выше ККМ – повышает его гидрофобность. В исследуемых условиях МР и лизоцим способны конкурировать в процессе адсорбции на границе воздух/вода, о чем свидетельствует увеличение ККМ МР в присутствии лизоцима. Значение ККМ в смеси и концентрация МР, при которой активность лизоцима в присутствии МР достигает максимального значения и сохраняется постоянной при дальнейшем увеличении в широких пределах, практически совпадают. Можно

предположить, что самоорганизация МР служит стерическим препятствием для его проникновения в активный центр лизоцима, вследствие чего дальнейшее увеличение концентрации лиганда в системе перестает влиять на активность фермента.

Поведение адсорбционных слоев как интактного, так и модифицированного лизоцима является «твердообразным» (слабая частотная зависимость комплексного модуля вязкоэластичности E_0 и преобладание его упругой составляющей E' над вязкостной E''). С увеличением концентрации МР наблюдается повышение E' и увеличение инкремента его частотной зависимости при практически неизменной величине E'' , что свидетельствует о повышении вязкоэластичности слоев.

Также в лабораторных условиях исследовались пены, приготовленные на 1 % растворе лизоцима с концентрацией МР в растворе – 0,3 – 1,0 % масс. Критерием оценки служили: кратность пены, скорость выделения жидкости, время полураспада пены.

В ходе опытов установлено, что при вспенивании 1 % раствора лизоцима кратность пены составляет 1,6, при этом половина объема раствора, пошедшего на пенообразование, выпадает в течение первого получаса.

При добавлении растворов МР наблюдается увеличение кратности пены в 1,8-2,3 раза, а также повышается стабильность пены. Так, если время полураспада пены интактного лизоцима составляет 50 мин, то обработанного МР (1 %) более 4,5 ч.

Проведенные исследования показали, что введение МР увеличивает кратность и устойчивость получаемых пен, при этом концентрация ПАВ оказывает определяющее значение.

Наблюдаемые эффекты могут быть использованы для получения антибактериальных фармакологических препаратов пенообразного типа с повышенной физической стабильностью и увеличенным сроком действия при более высокой ферментативной активности и расширенной субстратной специфичности.

МАСАГУТОВА Н.Р., ТАМАРОВА Э.Р., МАВЗЮТОВ А.Р.

Бакирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОБИОТЫ РОТОВОЙ ПОЛОСТИ ПРИ КАРИЕСЕ

Развитие кариеса обусловлено микрoэкологическим дисбалансом между бактериями полости рта и сахарами пищи, используемых микробной популяцией для образования органических кислот. Длительное закисление среды микроорганизмами приводит к непрерывной деминерализации эмали зубов.

Как в настоящее время установлено, кариозные поражения возникают в местах наибольшего скопления бактерий, которые плотно фиксированы на поверхности зуба. Эти образования получили название зубной бляшки. Приводится следующий состав бляшки: 70 % колоний — стрептококки, 15 % — вейлонеллы и нейссерии и 15 % — другие микроорганизмы. Участие микроорганизмов в возникновении кариеса подтверждается выделением и идентификацией специфических бактерий из бляшек при кариозных поражениях, а также эффективностью использования антибиотиков для профилактики кариеса, как у животных, так и у человека.

Показано, что в возникновении кариеса ведущая роль принадлежит *Streptococcus mutans*, который вырабатывает из сахарозы экстрацеллюлярный глюкан, что способствует развитию адгезивного и высококариесогенного зубного налета. *S. mutans* является ацидогенным микроорганизмом и это определяет его значение в развитии кариеса. Кроме того, большую роль играют также *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus anguis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus macacae*, *Streptococcus sobrinus*.

Для эффективного лечения кариеса крайне-важное значение имеет полноценная характеристика микрофлоры полости рта. Поэтому целью данной работы явилось повышение диагностики кариеса через разработку новых методов детекции микроорганизмов, ассоциированных с кариесом.

В ходе работы было проведено молекулярно – генетическое типирование возбудителей кариеса. По международной базе данных GenBank были определены нуклеотидные последовательности *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus anguis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus macacae*, *Streptococcus sobrinus*. Далее

были подобраны праймеры (к генетическим маркерам, которые являются островками патогенности этих микроорганизмов и генами антибиотикоустойчивости), которые были испытаны на 60 образцах дна кариозной полости и слюны, взятых у лиц, с диагнозом глубокий кариес.

В результате исследования образцов с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием разработанных нами праймеров, доля *Streptococcus mutans* составила 76,6%; *Streptococcus salivarius* – 18,3%; *Streptococcus sanguis* – 50,1%; *Streptococcus oralis* – 51,6%; *Streptococcus macacae* – 13,3%; *Streptococcus sobrinus* – 28,3%.

Полученные нами данные могут быть применимы в лабораторной диагностике и медицине при назначении антибиотикотерапии против кариеса.

МАСАГУТОВА Н.Р., ТАМАРОВА Э.Р., МАВЗЮТОВ А.Р.

Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ ПАРОДОНТИТЕ

Заболевания пародонта представляют собой одну из серьезных проблем современной стоматологии. Высокая распространенность воспалительных заболеваний пародонта среди взрослого населения, наличие клинических форм, приводящих к разрушению зубочелюстной системы и потере зубов, недостаточная эффективность лечения и частота возникновения рецидивов заболевания диктуют необходимость поиска оптимальных средств, методов лечения, диагностики и профилактики воспалительных заболеваний пародонта.

Современный уровень научных знаний об этиопатогенезе пародонтита, определяет пародонтальную микрофлору в качестве доминирующего фактора. Причиной пародонтита может быть резкое увеличение количества резидентной микрофлоры при неудовлетворительной гигиене или появление в составе микрофлоры полости рта пародонтопатогенных микроорганизмов, обладающих повышенными адгезивными, инвазивными и токсическими свойствами. К ним относят: *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas melaninogenica*, *Treponema denticola*, анаэробоспириллы, некоторые

стрептококки, спирохеты, фузобактерии, актиномицеты. Ассоциации условно-патогенных и патогенных бактерий, развиваясь в пародонтальном кармане, способствуют разрушению зубодесневого аппарата и резорбции альвеолярной кости. Кроме того, длительный контакт с микроорганизмами вызывает сенсбилизацию организма, с последующим снижением его реактивности.

Обычные культуральные исследования не являются достаточно информативными. Поэтому существует необходимость в создании тест-систем для экспресс-детекции и идентификации микроорганизмов полости рта при пародонтите. Среди всех методов наиболее информативными являются молекулярно-генетические методы. Исходя из этого, нами была предпринята попытка создания тест-систем для идентификации микроорганизмов при данном заболевании.

В ходе работы было исследовано 60 образцов (содержимое пародонтального кармана и слюна), взятых от пациентов с диагнозом пародонтит средней степени тяжести. По международной базе данных GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) были исследованы нуклеотидные последовательности *Porphyromonasgingivalis*, *Treponemadenticola*, *Streptococcusmutans*, *Streptococcussalivarius*, *Streptococcussanguis*, *Streptococcusoralis*, *Streptococcusmacacae*, *Streptococcussobrinus*. Затем были подобраны праймеры кгенаантибиотикоустойчивости (*tetracyclineresistanceprotein*, *bacitracinresistanceproteini* др.) и варибельным участкам 16SpРНКвышеперечисленных микроорганизмов. При подборе праймеров использовали программу PrimerSelectиз пакета программ DNASar. Определили условия реакции. Подобранные праймеры были испытаны на образцах при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР); проведена оценка специфичности и чувствительности разработанных диагностических тест-систем. Впервые был выявлен в клиническом материале спектр вышеперечисленных возбудителей с помощью ПЦР и доказана эффективность данной методики.

Идентификация основных микроорганизмов, ассоциированных с пародонтитом, полученными нами тест-системами может стать основой при постановке диагноза и дальнейшего лечения больных. Результаты проделанной работы могут быть применимы в медицине и лабораторной диагностике.

МАСАЛОВ И.С., ЦВЕТКОВ Е.А., ЛОКШИНА Е.И., ВЕСЕЛКИН Н.П.

Федеральное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

**МОДУЛЯЦИЯ СЕРОТОНИНОМ ПАРНО-ИМПУЛЬСНОЙ
ФАСИЛИТАЦИИ СИНАПТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ
ДОРСОЛАТЕРАЛЬНОЙ АМИГДАЛЫ КРЫСЫ**

Синаптическая передача является динамическим процессом. Постсинаптические ответы могут усиливаться или ослабляться за счет изменений, происходящих в пресинаптической терминали. Изменение силы синапса (величины постсинаптического ответа) с течением времени называется синаптической пластичностью. Одним из видов кратковременной синаптической пластичности является парно-импульсная фасилитация (ПИФ) постсинаптического ответа, наблюдаемая при парной стимуляции пресинаптической терминали. Проведенное исследование посвящено изучению ПИФ возбуждающих постсинаптических токов (ПСТ), регистрируемых методом «пэтч-кламп» на проекционных нейронах дорсолатерального ядра амигдалы крысы при парной стимуляции афферентных кортикальных входов в амигдалу. Величина ПИФ зависела от временного интервала между стимулами. При интервале 50 мс она была максимальна и составляла $ПИФ_{50}=1.48\pm 0.12$ ($n=10$), то есть амплитуда ПСТ на второй стимул превышала величину ответа на первый стимул на $48\pm 12\%$. Было установлено, что серотонин (5-НТ) увеличивал фасилитацию ПСТ до величины $ПИФ_{50}=1.80\pm 0.19$ ($n=6$). Вместе с тем, 5-НТ уменьшал амплитуду ВПСТ проекционных нейронов на $21\pm 6\%$ ($n=6$). В связи с вышесказанным, можно сделать вывод о том, что 5-НТ осуществляет модуляцию активности и пластичности синапсов дорсолатерального ядра амигдалы и, тем самым, может принимать участие в процессах модуляции условно-рефлекторного страха и эмоциональной памяти.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 11-04-00868) и программы Президиума РАН «Молекулярные механизмы физиологических функций».

СОДЕРЖАНИЕ АНТОЦИАНОВ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЯХ БОТАНИЧЕСКОГО САДА БФУ ИМ. И. КАНТА (Г. КАЛИНИНГРАД)

Лекарственные растения составляют особую группу объектов исследования – благодаря высокой биологической активности, с одной стороны, и практической не изученности накопления в них природных антиоксидантов, с другой. Как показывают данные статистики значительная, часть населения России испытывает недостаток в потреблении антиоксидантов. Обеспечение нормальной жизнедеятельности возможно не только при условии снабжения организма необходимым количеством энергии, но и при соблюдении сложных соотношений между многочисленными факторами питания. Лекарственные растения с высоким содержанием биологически активных веществ могут быть использованы как основа для создания функциональных пищевых продуктов и продуктов лечебно-профилактического назначения с повышенным антиоксидантным действием. Эффективные и малотоксичные природные антиоксиданты могут найти свое применение для решения многих технологических задач и повышения качества выпускаемой продукции в пищевой, косметической и фармацевтической промышленности. Так, например, использование природных антиоксидантов - красителей позволяет избежать применения небезопасных синтетических колорантов, с другой стороны дает возможность не только улучшить внешний вид продуктов питания, но и повысить их пищевую ценность. К наиболее распространенным натуральным красным красителям, разрешенным в РФ для окрашивания продуктов питания, относятся - кармин E120, красный свекольный E162 и антоцианы E163.

Цель настоящей работы – исследовать суммарное содержание антоциановых пигментов в лекарственном сырье и выявить наиболее перспективные в качестве источников природных БАВ виды лекарственных растений.

Концентрацию антоциановых пигментов определяли спектрофотометрически в 1% соляно-кислом водном экстракте при длине волны 510 нм, предварительно гомогенизировав при 4500 g в течение 30 минут. Для внесения поправок на содержание зеленых пигментов, определяли оптическую плотность полученных экстрактов при длине

волны 657 нм. Содержание суммы антоцианов рассчитывали по цианидин-3,5-дигликозиду. Поглощение данных пигментов определяли на спектрофотометре «СФ-2000» (ЗАО «ОКБ СПЕКТР» Россия).

Антоцианы – водорастворимые природные пищевые красители, принадлежащие к группе флавоноидов. По химической структуре основных пигментов это фенольные соединения, являющиеся моно- и дигликозидами. Антоциановые красители, наряду с красящей функцией, имеют самостоятельное значение как биологические добавки, они обладают Р-витаминной активностью, противосклеротическим и антиоксидантным действием, нормализуют кровяное давление, укрепляют капилляры, повышают эластичность сосудов, препятствуют образованию тромбов, блокируют воспалительные процессы, ускоряют заживление ран, благоприятно влияют на зрение, способствуют профилактике онкологических заболеваний.

Для анализа суммы антоциановых пигментов в лекарственных растениях использовались листья растений. Наибольшее количество антоцианов было найдено (в порядке уменьшения количества) в листьях маклейи сердцевидной (*Macleaya cordata*), дурмана обыкновенного (*Datura stramonium*), мыльнянки лекарственной (*Saponaria officinalis*), зверобоя обыкновенного (*Hypericum perforatum*), лука поникающего (*Allium nutans*), мордовника шароголового (*Echinops sphaerocephalus*), очитка большого (*Sedum maximum*), василистника водосборолистного (*Thalictrum aquilegifolium*), полыни горькой (*Artemisia absinthium*), козлятника аптечного (*Galega officinalis*), любистока лекарственного (*Levisticum officinale*), горечавки желтой (*Gentiana lutea*). Суммарное содержание антоциановых пигментов в этих растениях составило 0,09-0,24 %. Из 12 видов лекарственных растений с максимальным содержанием антоцианов, 2 вида входили в семейство сложноцветные (*Asteraceae*).

Достаточно высоким содержанием антоцианов отличались листья льна обыкновенного, спаржи лекарственной, валерианы лекарственной, ваточника сирийского, купальницы европейской, расторопши пятнистой, руты душистой, кровохлебки лекарственной, буквицы лекарственной, василистника малого, алтея лекарственного, меума атамантового, полыни понтийской, ландыша майского, бузины травянистой, аралии сердцевидной. Эти растения оказались способными накапливать в своих листьях фенольные соединения в концентрации от 0,04 до 0,08 %. Для остальных исследованных

видов лекарственных растений, которых оказалось несравнимо больше (38), средние уровни накопления флавоноидов были значительно ниже 0,04 %.

МАРТЫНОВА Е.У., КАПЕЛИНСКАЯ Т.В., МУХА Д.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия

ИЗУЧЕНИЕ БЕЛКОВОГО СОСТАВА КАПСИДА ДЕНСОВИРУСА РЫЖЕГО ТАРАКАНА *BLATTELLA GERMANICA*

В современной медицине все отчетливее обозначается потребность в создании новых высокоэффективных лекарственных препаратов, средств диагностики и профилактики заболеваний, в том числе новых типов вакцинных препаратов. Подобные требования обуславливаются различными факторами, среди которых возрастание уровня вирусных и онкологических заболеваний, появление новых возбудителей, формирование устойчивости к уже существующим лекарствам, а также низкая биодоступность и, соответственно, эффективность многих современных лекарственных препаратов в тех формах, в которых они существуют в данное время.

В связи с этим, возрастает необходимость поиска и разработки новых лекарственных форм, среди которых на первом месте стоит применение наночастиц. Использование наночастиц в качестве носителей для лекарственных и вакцинных препаратов дает возможность контролируемой доставки точно подобранных доз препарата в заданные участки организма, в том числе те, которые не были доступны для этого ранее. Одним из видов наночастиц, перспективных для применения в биомедицине являются таковые на основе капсидов вирусов (вирусные наночастицы), представляющие собой природные, и следовательно, биосовместимые, носители. В связи с этим, важное значение приобретает исследование структуры и свойств вирусных капсидов, позволяющее в дальнейшем рационально планировать и разрабатывать на их основе эффективные средства доставки препаратов.

Денсовирус рыжего таракана *Blattella germanica* (BgDNV) принадлежит к подсемейству Densovirinae, семейства Parvoviridae. Представители данного подсемейства

являются высоковидоспецифичными патогенами членистоногих и не поражают позвоночных. BgDNV характеризуется икосаэдрическим капсидом размером 20 нм, состоящим из 60 белковых субъединиц и не обладающим липопоротеиновой оболочкой. Линейный одноцепочечный 5335 нт. ДНК-геном BgDNV характеризуется наличием концевых инвертированных повторов, способных формировать шпилечные структуры, необходимые для репликации, и содержит две открытые рамки считывания для белков капсида ORF1 (69,7 кДа) и ORF 2 (24,8 кДа) и три открытые рамки считывания ORF3-5 для регуляторных белков.

Целью представленной работы являлось определение белкового состава капсида BgDNV и демонстрация соответствия данных белков открытым рамкам считывания ORF1 и 2.

На первом этапе работы методом центрифугирования в градиенте плотности CsCl был получен высокоочищенный препарат вирусных частиц BgDNV. Разделение препаратов капсидов с помощью SDS-PAGE и последующий масс-спектрометрический анализ показал, что капсид составлен тремя белками VP1, VP2, VP3 размером 97 кДа, 85-80 кДа и 57 кДа. При этом фракция VP2 представлена двумя белками с соответствующими размерами 80 и 85 кДа., различающимися, наиболее вероятно, присутствием посттрансляционной модификации Белок VP3, представленный в наибольшем количестве, является основным белком, составляющим капсид, белки VP1 и VP2 представляют минорные фракции.

На втором этапе методом Нозерн-блоттинга было выявлено присутствие двух основных мРНК, соответствующих открытым рамкам считывания для белков капсида, размером 2600 нт и 2400 нт. Последующий RT-ПЦР и RACE-анализ показали, что 2600 нт транскрипт представляет собой несплайсированную мРНК, содержащую ORF1 и ORF2. С данной мРНК наиболее вероятно происходит считывания белка VP2. Также было показано, что 2400 нт транскрипт представляет собой сплайсированный вариант, в котором ORF1 и ORF2 объединены с получением одной продолжительной рамки считывания размером 778 а.о. С данного транскрипта, предположительно, с участием leaky-scanning механизма происходит считывание белков VP1 и VP3 с двух последовательных метиониновых кодонов.

Таким образом, в результате данной работы нами было продемонстрировано, что BgDNV характеризуется наличием трех белков капсида VP1, VP2 и VP3, для каждого из которых были определены соответствующие им мРНК и получены их кДНК-копии. С использованием данных кДНК далее возможно получение экспрессионных конструкций для продукции вирусных белков и самосборки вирусных частиц BgDNV в гетерологичных системах для разработки в перспективе на их основе носителей для вакцинных препаратов.

МАТКОВСКАЯ М.В., МЕЗЕНОВА О.Я.

Калининградский государственный технический университет, Калининград, Россия

ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ НОВЫХ БИОПРОДУКТОВ ИЗ ЧЕШУИ И ГОЛОВ РЫБ НА ЖЕЛАТИНОВОЙ ОСНОВЕ

Целью работы являлось создание технологии биопродуктов остеотропного и хондропротекторного действия из вторичного сырья гидробионтов (голов салаки и чешуи сардины) на желатиновой основе, которые обладали бы высокими органолептическими свойствами.

За основу технологии были взяты принципы максимального сохранения биопотенциала рыбных чешуи и голов, которые сегодня не используются на пищевые цели. Данные отходы в больших количествах накапливаются на рыбоперерабатывающих предприятиях Калининградской области, прежде всего, на консервных заводах. Установлено, что в чешуе и головах рыб содержится большое количество биологически активных веществ, полезных при заболеваниях опорно-двигательного аппарата, причем в сбалансированном для человека соотношении.

Разработанная технология включает размораживание предварительно замороженных отходов, их мойку, стекание воды, грубое измельчение, тепловую обработку (варка в кипящей воде 20-40 минут), удаление излишней влаги (стечка в течение 15 мин), охлаждение, сушку при мягких условиях (при температуре не выше 60-70°C), тонкое измельчение высушенной массы, ее внесение при перемешивании в теплую желатиновую основу на фитоотваре, формование, охлаждение, хранение. Полученные продукты получили названия «Биошуппе» и «Биокопф».

Экспериментальное определение химического состава измельченных высушенных рыбных полуфабрикатов, вносимых в желатиновую основу, показало, что они являются, прежде всего, источником белковых и минеральных веществ (кальция и фосфора).

При выборе фитокомпонентов, вносимых в желатиновую основу в виде отваров, исходили из необходимости усиления профилактического эффекта, компенсации рыбного запаха и облагораживания вкусо-ароматических свойств готовых биопродуктов. Были изготовлены отвары двух видов: 1- из череды трехраздельной, шалфея лекарственного и мяты перечной (для биопродукта «Биошуппжеле»); 2 - из череды и шалфея (для биопродукта «Биокопфжеле»). В первом случае в качестве корригентов вводились корица и сахар, а в последнем случае вводились лимонный сок и специи: соль, сушеные петрушка и базилик. Анализ качества фитоотваров показал, что они обладают приятным ароматом, а также являются богатым источником флавоноидов, дубильных веществ, рутина и аскорбиновой кислоты, полезных при заболеваниях опорно-двигательного аппарата.

На основе пищевой добавки «Биошуппе» была разработана рецептура сладких мармеладов «Биошуппжеле», а с применением добавки «Биокопф» – желатиновый закусочный продукт «Биокопфжеле». Путем математического планирования эксперимента были получены математические модели технологических процессов, обоснованы дозировки сушеных добавок и фитокомпонентов в составе новых желатиновых биопродуктов: количество добавки и фитокомпонентов соответственно в биопродукте «Биошуппжеле» - 2,73 г и 3,04 г на 100 г готовых изделий; а в биопродукте «Биокопфжеле» - соответственно 0,88 г и 1,15 г.

Изготовленные по оптимизированным рецептурам желатиновые биопродукты были органолептически оценены терминологически и методом профилограмм по показателям вкуса, запаха, цвета, консистенции, форме и состоянию поверхности. Анализировали интенсивность проявления следующих оттенков вкуса: сладкий, травяной, рыбный, приятный, резкий, отталкивающий, легкий, терпкий, сбалансированный, нежный, пряный, соленый. Оценка химического состава желатиновых биодобавок показала, что последние являются функциональными по содержанию белка, кальция, фосфора, аскорбиновой кислоты и других минорных компонентов растений. На основании количественного содержания данных веществ и с учетом их суточных норм разработаны рекомендации потребления новых биопродуктов. Они рекомендованы людям, страдающим

заболеваниями опорно-двигательного аппарата, также детям, пожилым людям, спортсменам и работникам тяжелого физического труда, испытывающим повышенные физические нагрузки в ходе спортивных занятий или в своей профессиональной деятельности. Также разработана соответствующая проектная документация на сырье, пищевые добавки и биопродукты.

МАТЫЧЕНКОВ В.В.

Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пущино, Россия

НОВЫЕ АГРОБИОТЕХНОЛОГИИ И ВЕРТИКАЛЬНО ИНТЕГРИРОВАННАЯ ФЕРМА – КОНЦЕПЦИЯ, ТЕОРИЯ И ПРАКТИКА

Современное сельское хозяйство основано на неполном обеспечении культивируемых растений питательными элементами (минеральными удобрениями старого поколения), игнорирующими ряд важных питательных элементов, и приводящих к постоянному разрушению системы почва – микроорганизмы - растения. Введение монокультур и отстранение фермерских хозяйств от системы конечной реализации продуктов питания обуславливает максимальную деградацию почвенного покрова, подчинение фермерских хозяйств финансовым структурам и невозможность потребителя контролировать качество продуктов питания. При условии, что основным фактором определяющим здоровье население являются продукты питания до сих пор фактически не выработано само понятие, что же является экологически чистым земледелием и условия получения экологически чистых продуктов питания. В результате всех этих факторов сельское хозяйство как основной производитель продуктов питания стало убыточным или потеряло независимость, что в свою очередь приводит к потере независимости самого государства.

Анализ современных агробιοтехнологий и разработка целого спектра своих технологий, основанных на преодолении разногласия между природой и сельскохозяйственной активностью человека, получением высокой прибыли и защитой гражданского населения позволил разработать концепцию устойчивого, высоко-рентабельного и полностью экологически чистого метода ведения сельского хозяйства,

позволяющего вернуть уникальность сельскохозяйственной продукции каждого региона и полностью удовлетворить питание людей не дорогими, но чистыми и полезными продуктами. Это вертикально интегрированная ферма (ВИФ). Основными принципами вертикально интегрированной фермы являются:

А) постоянное повышение уровня плодородия почв при их сельскохозяйственном использовании, что достигается путем использования кремний-органических удобрений, почвенных мелиорантов полученных при утилизации отходов и микробных препаратов.

Б) постоянное стремление к наибольшей независимости от внешних источников материалов и энергии, путем создания собственной биоэнергетики и производства биотоплива,

В) широкий ассортимент производства продуктов питания с конечным выходом на конечного потребителя, что позволяет самому потребителю контролировать их качество.

Понимание механизмов природной защиты растений от неблагоприятных условий позволил создать новый класс экологически чистых препаратов, которые активируют иммунную систему растений и при этом не оказывают неблагоприятное влияние на систему почва-растение-микроорганизмы. Эти препараты позволяют повысить устойчивость растений к высоким и низким температурам, засухе, грибковым заболеваниям, нападением насекомых-вредителей, химическому загрязнению. ВИФ использует так же принцип полной переработки всех отходов.

Комплексное использование новых агротехнологий позволяет не только повышать уровень плодородия почв, но и получать высокие урожаи сельскохозяйственных культур и успешно выращивать животных и птицу. При сравнении общепринятых агротехнологий и используемых в ВИФ урожайность сельскохозяйственных культур в среднем выше на 20-25%, а расходы на агрохимикаты, препараты защиты растений и медикаменты снижаются на 50-75%. При этом повышается качество получаемых продуктов питания.

Все предлагаемые агротехнологии были успешно испытаны и апробированы как в России, так и в других странах – США, Австралии, Южной Африке, Канаде. В настоящее время первые ВИФ начинают создаваться в странах Африки и ведутся переговоры по созданию первых таких ферм в России.

МАТЫЧЕНКОВ В.В.¹, МАТЫЧЕНКОВ И.В.²

¹ *Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пущино, Россия*

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

АКТИВНЫЙ КРЕМНИЙ И ПОВЫШЕНИЕ ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ

Современное высокоэффективное сельское хозяйство невозможно без применения средств защиты растений. В то же время применение пестицидов, даже современного поколения негативно влияет на устойчивость системы почва-растение-микроорганизмы и они могут аккумулироваться в выращиваемых растениях. Опыт применения синтетических средств защиты растений от насекомых-вредителей свидетельствует о возможности быстрой адаптации вредителей к новым видам ядохимикатов. Поэтому применение ядохимикатов никогда не позволит полностью обеспечить устойчивость и безопасность сельского хозяйства. Известно, что культивируемые растения используют не более 20% природного потенциала самозащиты при неблагоприятных условий, в том числе атаках насекомых-вредителей. Поэтому поиск возможностей повышения использования природного потенциала защиты растений весьма актуален.

Малоизученным, но перспективным направлением повышения природной устойчивости растений к биогенным стрессам является использование экологически безвредных препаратов, содержащих активные формы кремния. Кремний – второй по распространенности элемент в земной коре - обладает уникальной способностью образовывать как инертные, так и биологически активные формы соединений. Одной из наиболее активных форм кремния является монокремниевая кислота. Это соединение активно поглощают растения и микроорганизмы. Накоплен обширный литературный материал, показывающий важность данного элемента в формировании защитной системы растений. Однако механизмы воздействия соединений кремния на растения изучены слабо. Известно, что при оптимальном кремниевом питании повышается толщина эпидермального слоя растительных тканей, что механически повышает устойчивость культивируемых растений к атакам насекомых-вредителей. Мы полагаем, что, кроме механической, в растениях существует также биохимическая защита, обусловленная

подвижными соединениями кремния. Наше предположение базируется на основе соподчинения двух составляющих: а) ответной реакции генетического аппарата растений на стресс, приводящей к началу синтеза необходимых соединений (ферменты антиоксидантной защиты, стресс-белки и др.) и б) дополнительном неферментативном синтезе этих же веществ на матрицах поликремниевых кислот, присутствующих в растительных тканях. При этом образование клише кремниевой матрицы определяется белками или их фрагментами, синтезированными генетическим аппаратом. Работа кремниевой составляющей позволяет обеспечить дополнительный синтез стресс-белков или их фрагментов без прямого участия генетического аппарата, что объясняет известный феномен кремния как защитного агента. В результате участия вспомогательной матрицы растение может экономить энергию, тем самым обеспечивая повышенную стрессоустойчивость.

Используя фундаментальные исследования были разработаны экологически чистые препараты, позволяющие активировать природную защитную систему растений до появления стресса (иммунизация), а так же резко повысить выход анти-оксидантов и стресс-ферментов. Вегетационные и полевые испытания были проведены с томатами, огурцами, цветной капустой, свеклой, пшеницей, ячменем, кукурузой. При применении разработанных препаратов уровень зараженности растений грибками и атака насекомых-вредителей снижались на 75% и выше. Исследуемые препараты были не только эффективнее, но и дешевле общеиспользуемых ядохимикатов.

Таким образом разработанная технология позволяет полностью отказаться от ядохимикатов и перейти на экологически безопасные методы ведения сельского хозяйства. Разработанные технологии являются уникальными. Мировое первенство обусловлено фундаментальными исследованиями, аналогов которых нет в мире.

МАЦ А.Н.¹, ПЕТРОВСКИХ В.П.², АФАНАСЬЕВА Т.М.², НИКОЛАЕВА А.М.²

¹ГУ НИИ вакцин и сывороток им.И.И. Мечникова РАМН, Москва, Россия

²Пермское НПО «Биомед» Филиал ФГУП НПО «Микроген» МЗСР РФ, Пермь, Россия

ИММУНОПЕПТИДНЫЕ БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ ИЗ ПЛАЗМЫ КРОВИ

Иммунная донорская плазма крови, из которой производятся препараты специфических иммуноглобулинов, может также служить исходным сырьём для приготовления специфических «иммунопептидных» препаратов «неантительной природы» [термины предложил Marchalonis JJ (1997)] для иммунотерапии и экстренной иммунопрофилактики.

Низкотемпературным этаноловым фракционированием плазмы по Кону, переосаждением фракции III сульфатом аммония и хроматографией на Сефакриле S-300 выделяют растворимые Т-клеточные антигенсвязывающие белки (ТАБ) [T-cell-derived antigen binding molecules по Cone RE (2002)]. После дезинтеграции ТАБ многоцикловым замораживанием-оттаиванием с помощью дифференциальной ультрафильтрации на мембранах с ретенцией 30, 10 и 5 кД получают препараты иммунопептидов с мол. массой 6 – 8 кД.

Иммунопептидные препараты обладают своеобразной остаточной иммуноспецифической активностью исходной донорской плазмы. Так, при иммуноферментном анализе препарат Стафилолейкин из плазмы доноров, иммунизированных стафилококковым анатоксином, связываясь с адсорбированными на планшетах стафилококковым белком А или анатоксином, увеличивает аффинность их взаимодействия со специфическими антителами, что сдвигает позитивную оценку на 2 – 3 лунки к концу ряда. Эффект повышения аффинности связывания антигена с антителами *in vitro* в присутствии Стафилолейкина исчезает после истощения препарата стафилококковой бактериальной массой.

Введение 5 – 50 мкг Стафилолейкина мышам F₁ (СВА × С57BL/6) индуцирует в зависимости от дозы гиперчувствительность замедленного типа к стафилококковому белку А (СБА), выявляемую через сутки в кожной реакции на этот антиген, адсорбированный на

алюмокалиевых квасцах, или с помощью реакции конгломерации лейкоцитов крови в присутствии СБА.

Стафилолейкин в эксперименте обладает противостафилококковой иммунотерапевтической активностью. Его ежедневные инстилляции в конъюнктивальный мешок при экспериментальном стафилококковом гнойном кератите у кроликов на неделю, по сравнению с контролем, ускоряют заживление роговицы при значимом различии бальных оценок кератита.

Коммерческие препараты иммуноглобулинов уже более полувека успешно применяются для создания пассивного гуморального иммунитета. Однако, для иммунотерапии хронической инфекционной патологии, особенно обусловленной внутриклеточными возбудителями, требуются принципиально новые лекарственные средства (ЛС), активное начало которых (благодаря малой мол. массе) способно проникать из сосудов в ткани и создавать пассивный специфический клеточный иммунитет. Биофармацевтические иммунопептидные препараты, приготовленные из антигенсвязывающих белков Т-клеточного происхождения (в частности Стафилолейкин) могут стать таким ЛС.

МАЧАВАРИАНИ Н.Г., ГАЛАТЕНКО О.А., ТЕРЕХОВА Л.П.

Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение "Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф.Гаузе" Российской Академии медицинских наук, Москва, Россия

ВЫДЕЛЕНИЕ АКТИНОМИЦЕТОВ-ЭНДОФИТОВ, ОБРАЗУЮЩИХ АНТИБИОТИКИ, ИЗ ЛИСТЬЕВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Вероятность обнаружения новых природных антибиотиков в большой степени определяется биологическим разнообразием продуцентов, что в свою очередь зависит от методов выделения и использования различных биологических ниш, из которых проводится выделение. Одной из таких ниш являются растения - местообитание микроорганизмов-эндофитов. В настоящее время из актиномицетов-эндофитов получены антибактериальные антибиотики широкого спектра действия – мунумбицины

(munumbicins) и альнумицин (alnumycin), противогрибковые антибиотики – коронамицины (coronamycins), противовирусный антибиотик ксиамицин (xiamycin), противоопухолевые антибиотики из группы антрахинонов -лупинацидины (lupinacidins) и др.

В настоящей работе проводилось выделение актиномицетов-эндофитов из листьев лекарственных растений: подорожника большого (*Plantago major*), алоэ древовидного (*Aloe arborescens*), облепихи (*Hippophae rhamnoides*), шиповника коричневого (*Rosa cinnamomea*) и крапивы двудольной (*Urtica dioica*). Для выделения эндофитов был использован метод, разработанный нами на основе известных методик, основная модификация которого заключалась в обработке листьев биологически активными веществами растительного происхождения - цирконом (0,001 мг/мл), представляющим смесь гидроксикоричных кислот, и гетероауксином (0,02 мг/мл), являющимся бета-индолилуксусной кислотой. Наши исследования показали, что применение циркона стимулирует выделение актиномицетов-эндофитов в 2 раза, а гетероауксина - в 3 раза по сравнению с контролем.

Актиномицеты-эндофиты выделялись из листьев всех использованных растений. В общей сложности выделено 60 штаммов актиномицетов, из которых 46 штаммов (77%) обладали антибактериальной активностью, преимущественно в отношении грамположительных бактерий, включая MRSA (метициллин-резистентный *Staphylococcus aureus*). Большинство выделенных культур принадлежали роду *Streptomyces* (75%), остальные – к роду *Micromonospora* (8%) и другим родам (17%). На основе антибиотической активности и таксономических признаков проведён отбор культур, перспективных для использования в биотехнологии.

Таким образом, актиномицеты-эндофиты являются потенциальным источником продуцентов антибиотиков, перспективных для биотехнологической и фармацевтической практики.

МЕДВЕДЕВА Е.В., КАЛЕНИК Т.К.

Школа биомедицины, Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ КИСЛОМОЛОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО РЕГИОНА

В последнее десятилетие XX в. во всем мире получило широкое признание развитие нового направления в пищевой промышленности – так называемое функциональное питание, под которым подразумевается использование таких продуктов естественного происхождения и трансформации, которые при систематическом употреблении оказывают регулирующее действие на организм в целом или на его определенные системы и органы.

Создание и внедрение в производство продуктов функционального питания (ПФП) является одним из направлений программы питания человека, провозглашенной в РФ.

Функциональное питание подразумевает использование исключительно продуктов естественного происхождения, имеющее определенное регулирующее действие на организм в целом или на его определенные системы и функции. Оно включает специальные пищевые волокна, витамины, минеральные вещества, полиненасыщенные жирные кислоты, продукты, содержащие бифидобактерии, лактобактерии, олигосахариды и другие микронутриенты.

В связи с вышеизложенным, представлялось целесообразным оценить возможность и эффективность обогащения молочных товаров биотехнологическими полисахаридами из морских водорослей для получения функциональных продуктов с заданными свойствами.

Работа выполнялась в рамках Государственного контракта от 21.06.07 г. № 02.522.11.2013 на тему «Разработка технологий и выпуск опытных партий биологически активных субстанций из морских организмов в качестве основы новых лекарств и пищевых добавок для коррекции оксидативного и иммунного статусов, липидного и углеводного обменов». Раздел: «Разработка технологий изготовления опытных партий молочных функциональных продуктов питания», в которых основополагающей является проблема улучшения структуры питания и снабжения населения высококачественными пищевыми продуктами функционального назначения.

В качестве стимулирующих функциональных ингредиентов при выработке

кисломолочных продуктов использованы биологически активная добавка к пище «Фуколам-С» – источник полисахаридов (фуколама) и растворимых пищевых волокон (альгинатов), биологически активная добавка каррагинан-к, которые предоставлены изготовителем Тихоокеанским институтом биоорганической химии Дальневосточного отделения Российской академии наук.

Выбор закваски *Bifidobacterium longum* В379М обоснован тем, что данный штамм не является генетически модифицированным, относится к микроорганизмам непатогенным для человека, не требует специальных мер предосторожности. Штамм *Bifidobacterium longum* В379М ферментирует глюкозу как биопродуцент с образованием уксусной и L+ молочной кислот без образования газа, ферментирует лактозу, обладает антагонистической активностью по отношению к патогенной и условно-патогенной флоре, устойчив к антибиотикам. Бифидум-среда, представляет собой мелкодисперсный, гигроскопичный, светочувствительный порошок светло-желтого цвета.

Жидкие кисломолочные продукты готовились по общепринятой технологической схеме, термостатным способом:

Образец № 1 - жидкий кисломолочный продукт с фуколамом;

Образец № 2 - жидкий кисломолочный продукт с каррагинаном;

Образец № 3 - жидкий кисломолочный продукт с фуколамом и каррагинаном.

Качество разработанных функциональных кисломолочных напитков оценивали по комплексу органолептических, физико-химических показателей, безопасности в соответствии с действующей нормативно – технической документацией.

Обоснован и экспериментально подтвержден выбор и дозировки функциональных ингредиентов для создания молочных функциональных продуктов питания, которые составили: фуколама 25 %, каррагинана 5 % от массы продукта.

При анализе всех образцов выявлено, что бифидопродукт на молочной основе с фуколамом содержит 10^9 КОЕ/г бифидобактерий, как и контрольный образец.

Бифидопродукт на молочной основе с каррагинаном содержит 10^{10} КОЕ/г бифидобактерий и по сравнению с контрольным образцом присутствие каррагинана в бифидопродуктах увеличивает содержание живых бифидобактерий в 10 раз.

Бифидопродукт на молочной основе, содержащей смесь БАВ фуколам + каррагинан, содержит бифидобактерий 5×10^9 КОЕ/г., что по сравнению с контрольным

образцом увеличивает содержание бифидобактерий в 5 раз.

Научная новизна принятых технологических решений, подтверждена Патентом РФ № 2375878 «Кисломолочный напиток» Бюл. № 35 от 20.12.2009, также ТУ 9222-020679362008 «Бифидум Дальневосточный».

МЕДЖИДОВ М.М.¹, АХМЕДОВ М.И.²

¹ООО Научно-производственное предприятие «Питательные среды», Махачкала, Россия

²ООО Научно-производственный центр «Подземгидроминерал» (ОАО «Газпром»),

Махачкала, Россия

РАЗРАБОТКА КРОВЕЗАМЕНИТЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ ВОДЫ КАСПИЙСКОГО МОРЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОТЕХНОЛОГИИ

В работе представлены экспериментальные данные по созданию нового поколения кровезаменителей (КЗ) с использованием в качестве основы воды Каспийского моря, не имеющего аналога в мировой медицинской практике.

Еще в конце XIX в. исследователи отмечали сходство неорганического состава крови с морской водой, а в 1882г. английский физиолог С.Рингер предложил для внутреннего введения сбалансированный солевой раствор, близкий по составу и концентрации ионов к морской воде. В 1904г. французский физиолог Рене Кентон научно обосновал сходство микроэлементного состава плазмы крови и морской воды.

Первые исследования на животных с использованием воды Каспийского моря были проведены в нашей стране в 1957г. и показали, что вода Каспийского моря, будучи сложным водно-солевым раствором, нетоксична при внутреннем введении, восстанавливает кровяное давление при кровопотере до 45-50%, нормализует дыхание, также не вызывает некроза тканей при подкожных вливаниях. (Магомедов М.И., 1957 г.).

Осмотическое давление крови является одной из жестких гомеостатических констант и на долю неорганических электролитов приходится до 96% от общей величины. Изотоничным плазме крови является широко используемый на сегодняшний день синтетический кровезаменитель – 0,89% раствор NaCl. Но электролитный состав плазмы важен не только для поддержания ее осмотического давления, но и кислотно-щелочного

состояния, функций клеточных элементов крови и сосудистой стенки, активности ферментов, процессов свертывания крови и фибринолиза.

В связи с этим представляет практический и научный интерес получение с использованием современных технологий наиболее приближенных по неорганическому макро- и микрокомпонентному составу к плазме человеческой крови инфузионных растворов, положительно отличающихся от известных синтетических однокомпонентных растворов кровезаменителей, из морской воды и проведение клинических исследований с их использованием.

В 2011 г. изучен физико-химический состав серии проб морской воды, отобранных севернее г. Махачкалы, который показал, что около 99% от общего количества минеральных веществ, растворенных в морской воде, составляют семь главных ионов: Cl^- , Na^+ , SO_4^{2-} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , HCO_3^- , K^+ и pH. Поэтому предварительный анализ проведен по этим главным ионам. При этом определение содержания ионов в морской воде указывает, что для приближения макрокомпонентного состава морской воды к составу плазмы, необходимо уменьшить в ней, в первую очередь, концентрацию кальция, магния и сульфатов, а затем хлоридов и ионов натрия.

Проведенные поисковые исследования с использованием ионообменной технологии для необходимого снижения концентрации кальция, магния и сульфатов с последующим использованием ультрафильтрационной (нано-фильтрационной) мембраной технологии для корректировки состава по однозарядным ионам (хлориды, натрий, калий) позволили получить наиболее приближенную по составу к плазме крови морскую воду.

Исследования по усовершенствованию технологии обработки морской воды (использование активированного угля) для снижения концентрации растворенных органических веществ, исследование финишного обеззараживания воды, возможное исключение из технологии ионообменной стадии с использованием соответствующих мембран, изучение поведения микрокомпонентов и экспериментальная проверка на животных, может стать базой для организации производства кровезаменителей широкого потребления.

Следует подчеркнуть, что для этих целей возможно использование и подземных гидрокарбонатных минерализованных вод, химический состав которых также близок к неорганическому составу плазмы крови. Важным преимуществом использования этих вод,

широко представленных в регионе, является то, что они, в отличие от всех поверхностных вод, не подвержены антропогенному воздействию и поэтому бактериологически чистые, что содержание сульфатов в этих водах гораздо ниже, чем в морской воде, гидрокарбонатов – выше. Реализация предполагаемой технологии в последующем может снять зависимость от внешней поставок инфузионных растворов, снизить стоимость препаратов за счет снижения затрат на производство и доставку до потребителей.

МИНАЙЧЕВА П.Р., НИКОЛАШИНА К.А., АЛФЕРОВ С.В.

Тульский Государственный Университет, Тула, Россия

ПАРАМЕТРЫ РАБОТЫ БИОТОПЛИВНОГО ЭЛЕМЕНТА НА ОСНОВЕ ИММОБИЛИЗОВАННОГО БИОКАТАЛИЗАТОРА

Биотопливные элементы (БТЭ) – это устройства, в которых осуществляется превращение химической энергии различных веществ (например, углеводов, спиртов) в электричество в процессе биологических трансформаций. Особая привлекательность БТЭ обусловлена возможностью использования в них в качестве топлива веществ, являющихся отходами. Это связано с тем, что микроорганизмы способны к деструкции достаточно широкого класса низко- и высокомолекулярных соединений. Таким образом, помимо энергетической, биотопливные элементы способны решать экологические проблемы утилизации отходов.

Одним из способов увеличения долговременной работы биотопливных элементов является иммобилизация биоматериала на поверхности анода. Перспективным методом иммобилизации клеток микроорганизмов в БТЭ является включение в гель на основе поливинилового спирта (ПВС). ПВС химически и микробиологически стабилен, нетоксичен и биосовместим, что обуславливает эффективное использование полимера в качестве матрицы для иммобилизации клеток микроорганизмов.

Целью работы являлось определение параметров работы биотопливного элемента на основе иммобилизованного биокатализатора — клеток бактерий *Gluconobacter oxydans*.

Установлено, что иммобилизация бактерий *Gluconobacter oxydans* в химически модифицированный ПВС на активированной поверхности графитового электрода

позволяет повысить величину генерируемого потенциала в 2 раза по сравнению с использованием суспензии клеток *Gluconobacter oxydans* в анолите. Оценка мощностных характеристик макета БТЭ с биоанодом на основе иммобилизованных бактерий *Gluconobacter oxydans* показала, что максимальная удельная мощность (200 мкВт/м^2), развиваемая БТЭ, наблюдается при приложенном внешнем сопротивлении 150 кОм. Необходимо отметить, что при использовании иммобилизованных бактерий по сравнению с использованием суспензии клеток в анолите внутреннее сопротивление элемента снижается в 1,6 раз, а максимальная удельная мощность биотопливного элемента возрастает в 30 раз.

Долговременной стабильность биоанода с иммобилизованными бактериями *Gluconobacter oxydans* составила 7 суток, падение генерируемого потенциала на 8-ой день в среднем составило 40% , что может быть обусловлено вымыванием клеток бактерий из пленки химически модифицированного ПВС.

Широкий спектр окисляемых субстратов бактерий *Gluconobacter oxydans* позволяет использовать не только отдельные субстраты, но и их смеси, например отходы бродильных производств. Показано, что величина генерируемого потенциала при использовании в качестве субстрата бродильной массы составила 330 мВ, а при использовании в качестве субстрата глюкозы аналогичная величина — 250 мВ.

Таким образом, иммобилизация бактерий *Gluconobacter oxydans* в химически модифицированный поливиниловый спирт позволяет получать биоаноды многократного использования для их применения в БТЭ непрерывного действия.

МИТРАКОВА М.Е., ПОСТНИКОВА М.В.

Пермский национальный исследовательский политехнический университет,

Пермь, Россия

МАКУЛАТУРА – ВОЗМОЖНОЕ СЫРЬЕ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА БИОЭТАНОЛА

В настоящее время во всем мире наблюдается рост производства этилового спирта. Это связано с применением его в качестве автомобильного топлива (биоэтанола) и сырья для многих органических синтезов. Традиционно этиловый спирт получают брожением

сахаров, чаще всего глюкозы, под влиянием энзимов и дрожжей. Глюкозу обычно получают гидролизом полисахаридов, крахмала и клетчатки. Для замены пищевых продуктов (зерна) в производстве биоэтанола ведутся активные поиски экономически и экологически приемлемой технологии получения биоэтанола из целлюлозы, содержащейся в отходах лесной, целлюлозно-бумажной и деревообрабатывающей промышленности. Для России вопрос производства биотоплива так остро как для других стран не стоит, но приобретает важное значение.

Для производства альтернативных видов топлива кроме древесины, соломы и других целлюлозосодержащих растений представляет интерес макулатурная масса. Вторичное волокнистое сырье – макулатура представляет собой бывшие в употреблении бумажные и картонные изделия или печатную продукцию из бумаги (газеты, журналы) и картона, а также отходы их производства и переработки. Макулатурное сырье может быть источником сахаров в производстве биоэтанола.

Ранее нами был изучен процесс подготовки картонной тары для получения сахаров, необходимых для получения биоэтанола, в настоящее время изучался процесс получения сахаров из газетной макулатуры.

Для получения сахаров газетная макулатура подвергалась разволокнению с помощью быстроходной мешалки и легкого подмола, а также термообработке. Разволокнение проводилось при массовой доле волокна (концентрации массы) равной 5 % - 8% и температуре 20°C - 40°C. Продолжительность разволокнения составляла 30-120 минут. Разволокнение проводилось в щелочной среде с добавкой перекиси водорода. При этом расход щелочного реагента составлял 2% - 3%, а перекиси водорода - 0,5%. При увеличении продолжительности разволокнения до 120 минут наблюдалось некоторое увеличение степени помола массы (происходило разделение макулатурной массы на отдельные волокна). Последующий подмол разволокненной массы позволил продолжить фибриллирование волокна. Термообработка проводилась в щелочной среде при температуре 90-95°C с расходом NaOH - 2% и 4%, H₂O₂-2%. Продолжительность обработки составляла 120 и 180 минут. После термообработки массу промывали и анализировали полученный полуфабрикат (твердый остаток). Выход полуфабриката составлял 85,2-87,5% от исходной абсолютно сухой газетной макулатуры. Содержание основных компонентов в полученном полуфабрикате: лигнина 7,6 % - 10,1%, целлюлозы

52,3 % - 58,1%, пентозанов 9,8% - 12,1%. Осахаривание полученного полуфабриката проводилось 1,5% раствором H₂SO₄ при температуре 95°C - 98°C. При этом были получены гидролизаты с содержанием редуцирующих сахаров 2,3 % - 2,5%, что вполне приемлемо для микробиологической переработки.

Помимо этого был проведен ферментативный гидролиз газетного макулатурного сырья после предподготовки. Для ферментативного гидролиза был использован экспериментальный фермент «целлозим ультра», целлюлозная активность которого составляла 519,7 ед/г.

Условия ферментативного гидролиза рН 4,7 (0,1 М ацетатный буфер), концентрация субстрата 10 г/л. О ферментативной гидролизуемости полученного субстрата на основе газетного макулатурного сырья наблюдали по накоплению редуцирующих сахаров в гидролизате.

Данным исследованием подтверждается, что газетная макулатура, как и макулатура из картонной тары, может быть сырьем в производстве биоэтанола. Исследование будет продолжено в направлении оптимизации процесса подготовки макулатуры и процесса ферментативного гидролиза с целью повышения выхода сахаров для производства биоэтанола. В дальнейшем предполагается решить следующие задачи: провести исследование компонентного состава исходного макулатурного сырья, гидролизатов и полученного биоэтанола физико-химическими методами (эбулиостатический и фотоколориметрический методы определения редуцирующих сахаров в гидролизатах, хроматографические методы разделения и определения моносахаров в гидролизатах, ИК-Фурье спектроскопический анализ исходного макулатурного сырья и полученного из него целлюлозного материала).

МИТРОШИН И.В., КРАВЧЕНКО О.В., НИКОНОВ С.В., ГАРБЕР М.Б.

Институт Белка Российской Академии Наук, Пущино, Россия

**КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ И СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
ПОЛНОРАЗМЕРНОГО РИБОМНОГО КОМПЛЕКСА P0-P1 ИЗ АРХЕИ
*METHANOCOCCUS THERMOLITHOTROPICUS***

Рибосомы из всех изученных организмов содержат два высокоподвижных и функционально важных морфологических элемента: L1- и L12-выступы. L1-выступ участвует в освобождении деацетилированной тРНК из E сайта рибосомы. L12-выступ (L12-выступ в бактериях, P1-выступ в археях, P1/P2-выступ в эукариотах) вовлечен в образование «сайта связывания ГТФаз» и способствует взаимодействию рибосомы с факторами трансляции. До последнего времени из-за подвижности обоих выступов определение их структуры представляло очень трудную задачу. С 2007 года стала проясняться структура основания L12-выступа, но, правда, с низким разрешением (структура изолированного L1-выступа уже определена).

Архейный P1-выступ состоит из белков P0 и P1. Белок P1 является единственным рибосомным белком, который представлен несколькими копиями на рибосоме. В растворе он образует стабильные димеры, которые связываются с белком P0. P0 играет роль моста между белками P1 и рибосомой, взаимодействуя с 23S рРНК. Архейные белки P0 и P1 по аминокислотной последовательности отличаются от бактериальных белков L10 и L12 и гомологичны эукариотическим белкам P0 и P1/P2. Белки P0 имеют специфический для архей и эукариот второй домен, а РНК-связывающий домен консервативен среди белков P0 и L10, поэтому каждый из этих белков связывается с не менее консервативным участком большой рибосомной РНК всех доменов жизни. Это доказано с помощью экспериментов, в которых архейный и эукариотический комплексы P0-P1 могут замещать *in vitro* L10-L12 комплекс из бактерий, и такая гибридная рибосома становится доступной для взаимодействия с архейными и эукариотическими факторами трансляции, но не с бактериальными.

На данный момент с высоким разрешением известны кристаллические структуры комплекса белка P0 из археи *Pyrococcus horicoshii* в комплексе с димерами N-концевого

домена белка P1 и двудоменного N-концевого фрагмента белка P0 из *Methanococcus jannaschii* (MjaP0NTF).

Наша работа посвящена структурным исследованиям компонентов рибосомного P1-выступа из архей рода *Methanococcus*. Ранее мы определили структуру MjaP0NTF с высоким разрешением. Дальнейшим продолжением нашей работы стали кристаллизация и структурные исследования полноразмерного архейного комплекса P0-P1 из *M. thermolithotrophicus* (MthP0-P1). Знание пространственной структуры этого белкового комплекса позволит уточнить структуру как архейной, так и эукариотической рибосом. На данный момент разработана методика очистки P0-P1 комплекса, а также выделен MthP0-P1 в препаративных количествах с чистотой пригодной для кристаллизации. Проведен поиск условий кристаллизации этого комплекса. И получены первые кристаллы комплекса MthP0-P1.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и грантом РФФИ (№ 11-04-00327-а).

МИХАЙЛОВА Е.А., ШУБАКОВ А.А., ОВОДОВ Ю.С.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии

Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, Россия

РЕГУЛЯЦИЯ ПЕКТИНАМИ ОНТОГЕНЕЗА РАСТЕНИЙ

Одним из перспективных направлений фундаментальных и прикладных исследований является изучение регуляции роста и развития растений с помощью природных и синтетических физиологически активных веществ. При этом очевидно, что главное внимание следует обратить на первые этапы онтогенеза растений, начиная с прорастания семян и роста проростков, когда происходят наиболее заметные, существенные и принципиальные изменения в полисахаридном составе растений.

Известно, что в регуляции роста однодольных и двудольных растений важную роль играют эндогенные пектины, арабиноксиланы и ксилоглюканы, входящие в состав семян этих растений. Однако, имеется очень мало данных относительно влияния экзогенных

пектинов на прорастание семян, рост проростков и на урожайность плодоносящих культур. В этой связи представляется весьма актуальным выяснение роли пектинов в регуляции роста и развития растений.

Проведенный нами скрининг 48 пектинов, выделенных из ряда растений Республики Коми, показал, что все пектины способствуют прорастанию семян и росту проростков, но наибольшее влияние на увеличение всхожести семян, ускорение их прорастания, рост корней и побегов овощных и зерновых культур оказывают следующие пектины: лемнан из ряски малой *Lemna minor* L. и силенан из каллусной ткани смолевки обыкновенной *Silene vulgaris* (M.) G. Наименьшее влияние оказал коммерческий яблочный пектин, выбранный в качестве положительного стандарта.

То есть, обработка семян экзогенными пектинами оказывает стимулирующее влияние на всхожесть и скорость прорастания семян, рост корней, проростков и урожайность овощных (томаты, огурцы) и зерновых (пшеница, рожь, ячмень, овес) культур. При этом найдено, что пектины из разных растений отличаются по характеру влияния на прорастание семян овощных и зерновых культур. Можно предполагать, что это связано с различиями в молекулярных размерах и в особенностях структуры пектиновых полисахаридов.

Обработка семян изучаемыми пектинами повышает всхожесть семян томатов на 5-18%, огурцов – на 20-23%, пшеницы – на 16-23%, ржи – на 18-25%, а также увеличивает скорость роста их корней и проростков.

Урожайность томатов, обработанных разветвленными пектинами: лемнаном, потамогетаном из рдеста плавающего *Potamogeton natans* L. и силенаном, а у огурцов – лемнаном и силенаном, – заметно увеличивается по сравнению с контролем, что также подтверждает предположение о важности величины молекулярной массы и разветвленности макромолекулы пектиновых полисахаридов в их влиянии на онтогенез растений.

При обработке томатов и огурцов пектинами заболеваемость растений корневой гнилью и настоящей мучнистой росой снижается на 30-40%. Данные факты могут свидетельствовать о повышении иммунитета у растений, обработанных пектинами.

Таким образом, нами показано, что пектины оказывают стимулирующее действие на всхожесть, прорастание семян, рост и развитие растений и способствуют увеличению урожая сельскохозяйственных культур.

МИХАЙЛОВА Е.О., АХМАДИЕВА С.В., ХАБИБУЛЛИНА Л.И., ШУЛАЕВ М.В.
Казанский национальный исследовательский технический университет, Казань, Россия

ВЛИЯНИЕ МЕЛАФЕНА НА МИКРООРГАНИЗМЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ АКТИВНОГО ИЛА ОЧИСТНЫХ СООРУЖЕНИЙ

В последние годы в нашей стране и за рубежом ведутся активные поиски способов интенсификации классических методов биологической очистки, в том числе и с помощью добавления биологически активных веществ (БАВ) в сточные воды при очистке. Одним из новых БАВ является Мелафен, который представляет собой меламиновую соль бис(оксиметил)фосфиновой кислоты. Технология с использованием Мелафена запатентована для биологической очистки почвы от нефтяных загрязнений.

Целью данной работы явился анализ влияния препарата Мелафен на рост бактерий родов *Bacillus* и *Serratia*, входящих в состав активного ила очистных сооружений. Рост бактерий осуществлялся на жидкой пептоновой среде, содержащей Мелафен в конечных концентрациях 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} . Максимальный ингибирующий эффект на рост бактерий *Bacillus sp.* был отмечен для концентраций Мелафена 10^{-2} и 10^{-4} . Было показано, что при внесении в питательную среду Мелафена в концентрации 10^{-2} культура выходит на стационарную фазу на 20 ч роста, а в отсутствие препарата – на 28 ч, подавление роста культуры бактерий было отмечено на уровне 30-35 %. При внесении в питательную среду в концентрации 10^{-4} Мелафен ингибировал рост микроорганизмов на 40-45 %. Кроме того, выход на стационарную фазу роста наблюдался на 24 ч, и ее период сокращался. В присутствии Мелафена в концентрации 10^{-6} рост бактерий снижался на 18-20%, в то время как концентрация данного препарата 10^{-8} не оказывала значительного влияния на рост микроорганизмов. Исследование динамики роста бактерий р. *Serratia* не выявило значительного влияния Мелафена на рост культур данных микроорганизмов. Подавление роста культуры в присутствии Мелафена было отмечено начиная с 12 ч роста и составило

5-10% относительно контроля. Таким образом, данный препарат характеризуется способностью оказывать различное воздействие на рост бактерий в зависимости от концентрации, что может быть использовано для повышения эффективности процесса очистки сточных вод.

МИХАЙЛОВА И.Д., ЛУКАТКИН А.С.

Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева,

Саранск, Россия

ИЗУЧЕНИЕ И ПОВЫШЕНИЕ МЕТАЛЛОУСТОЙЧИВОСТИ ОВОЩНЫХ РАСТЕНИЙ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Культуры *in vitro* дают возможность изучения влияния стрессовых факторов на растение на клеточном уровне, в том числе – тяжелых металлов (ТМ). Однако работ по действию ТМ на культуры растительных клеток немного, в отличие от опытов по влиянию ТМ на растения *in vivo*. В связи с этим необходимо сравнительное изучение устойчивости растений *in vivo* и культур клеток *in vitro* к ТМ с последующей разработкой способов направленного повышения металлоустойчивости посредством клеточной селекции. Для этого необходимо знание физиологических процессов, являющихся индикаторами состояния организма и показывающих быструю реакцию растения и/или его клеток на стрессовое изменение окружающей среды. Селекция на уровне клеток и тканей более успешна, чем на уровне растений, поскольку сокращает время и уменьшает объем работ. В условиях *in vitro* можно задавать различные параметры, адекватные тем, в каких позже придется жить взрослым растениям, в том числе и экстремальные условия выращивания. При использовании методов микроразмножения *in vitro* одновременно проводят повышение устойчивости растений к стрессам и выведение высококачественных сильных микрорастений.

Каллусные культуры являются удобным объектом для изучения повреждающего действия стрессовых факторов среды, и их использование имеет ряд преимуществ: культура *in vitro* является однородным материалом, в котором исключены надклеточные системы регуляции; в культуре *in vitro* достаточно легко изучать некоторые параметры

физиологии клетки, и т.п.

Объекты исследования – молодые растения и 5-недельные каллусные культуры огурца (*Cucumis sativum* L.) сорта Единство и редиса (*Raphanus sativus* L.) сорта Красный великан (гипокотильного происхождения). Первичная каллусная ткань выращивалась на стандартной среде Мурасиге-Скуга (МС) с добавлением 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2 мг/л) и 6-бензиламинопурина (2 мг/л) при температуре 21–22°C. Через 5 недель проводили пересадку каллусной ткани на среду МС с добавлением $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ в концентрациях 0,1 мМ, 1 мМ. Культивирование отобранных каллусов во 2 и 3 пассаже проводили при тех же условиях, что и в первом пассаже.

Выявлено, что ионы Cu^{2+} оказали более сильное влияние на проростки, чем на каллусные культуры. Возможно, это связано с отсутствием дальнего транспорта ионов меди, как это происходит в целом растении; отсутствием надклеточного уровня регуляции, на который влияют ионы Cu^{2+} ; отсутствием тканей, избирательно поглощающих тяжелые металлы; а также может быть связано с результатом адаптации на клеточном уровне к избыточным дозам тяжелых металлов в среде. В результате исследований получены данные, на основании которых можно судить об устойчивости к ионам Cu^{2+} изученных объектов в культуре *in vitro* и *in vivo*.

По результатам проведенной работы сделано заключение, что каллусные культуры огурца и редиса после нескольких пассажей на селективных средах (содержащих ионы ТМ, в данном опыте – Cu^{2+}) показали более высокую устойчивость к этому ТМ. Очевидно, что в данных условиях происходил отбор клеток на повышенную устойчивость к ионам Cu^{2+} , и растения-регенеранты из этих каллусов будут более устойчивыми к ТМ.

МИХАЙЛОВА Р.В., СЕМАШКО Т.В.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГЛЮКОЗООКСИДАЗ
PENICILLIUM ADAMETZII ЛФ F-2044.1 И *PENICILLIUM FUNICULOSUM* 46.1 С
РАЗЛИЧНЫМИ РЕДОКС-МЕДИАТОРАМИ**

Достижения информационно-измерительной техники, микроэлектроники и биохимии стали основой создания биосенсоров и других биоэлектрохимических приборов,

включая биотопливные элементы (БТЭ). В биосенсорах и БТЭ на основе глюкозооксидаз (ГО) катализ реакции окисления глюкозы включает перенос электронов от субстрата к молекуле флавинадениндинуклеотида (ФАД) в активном центре фермента, а затем к акцептору электронов. При разработке таких устройств для улучшения контакта между активным центром фермента и электродом используются медиаторы – редокс активные соединения. Эффективность таких устройств весьма зависима от кинетики ферментативной реакции и скорости переноса электрона от ФАД/ФАДН₂.

Ранее в лаборатории ферментов Института микробиологии НАН Беларуси получены высокоактивные продуценты внеклеточных ГО – *Penicillium adametzii* ЛФ F-2044.1 и *P. funiculosum* 46.1, выделены и охарактеризованы ферментные препараты. Цель настоящей работы – сравнительный анализ взаимодействия ГО пенициллов с различными редокс-медиаторами.

Изучена специфичность взаимодействия грибных ГО с редокс-медиаторами – ферроценом, его производными ((ферроцен-карбоксильной кислотой (C₁₁H₁₀FeO₂), ферроцен-карбоксияльдегидом (C₁₁H₁₁FeO), метил-ферроцен-метанолом (C₁₂H₁₄FeO)) гексацианоферратом калия (K₃[Fe(CN)₆]), 1,10-фенантролин-5,6-дионом и N-метил-феназон-метилсульфатом. Согласно полученным кинетическим параметрам выявлено преимущество модификации ГО пенициллов производными ферроцена по сравнению с модификацией ферроценом (увеличение сродства ГО к β-D-глюкозе и эффективности ее окисления в 1,5-2,1 и в 1,3-1,65 раза). Установлено, что для создания биоэлектрохимических датчиков и БТЭ с использованием ГОД *Penicillium adametzii* ЛФ F-2044.1 и *P. funiculosum* 46.1 в качестве эффективных медиаторов можно использовать C₁₁H₁₀FeO₂, C₁₂H₁₄FeO, 1,10-фенантролин-5,6-дион.

Работа выполнена в рамках проекта №Б11ЛИТ-012 Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований.

МИХАЙЛОВА Ю.В.

Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург, Россия

ПОЛОВОЙ СОСТАВ ПОПУЛЯЦИЙ СМОЛЁВКИ БЕССТЕБЕЛЬНОЙ (*SILENE ACAULIS* (L.) JACQ.) НА ЧУКОТСКОМ ПОЛУОСТРОВЕ

Silene acaulis (L.) Jacq. (семейство *Caryophyllaceae*) — аркто-альпийский вид, распространённый в тундрах Европы и Северной Америки, Кольдильерах, Урале, высокогорьях Средней и Южной Европы, Чукотке, Камчатке и Командорских островах (Кожанчиков и др., 1971). Это многолетнее подушковидное растение с цветками разных оттенков розового, иногда встречаются белоцветковые формы. Благодаря своей декоративности *Silene acaulis* активно культивируется на альпийских горках.

Важной особенностью *Silene acaulis* является её многодомность, причём обоеполые, мужские и женские цветки встречаются на разных особях. Существование трёх половых форм связывают с селективными преимуществами (Philipp et al., 2009).

Цель исследования заключалась в выявлении полового состава естественных популяций *Silene acaulis* на Чукотском полуострове.

Было проанализировано семь популяций *Silene acaulis*: три в окрестностях посёлка Новое Чаплино (Провиденский район), одна на острове Итыгран (Провиденский район), три в районе реки Люгрэн (Чукотский район).

Растения с женскими цветками преобладали во всех трёх популяциях Чукотского района, их процентная доля варьировалась от 59 до 71%. Особи с мужскими цветками преобладали в двух популяциях, расположенных к западу от посёлка Новое Чаплино (53% и 73%). В популяции, расположенной к востоку от посёлка, доля женских растений (54%) ненамного превышала долю мужских (42%). Почти равные доли мужских и женских особей наблюдались в популяции на острове Итыгран (47% и 48%, соответственно). Число гермафродитных особей во всех популяциях оставалось минорным — от трёх до семи процентов, за исключением одной популяции, где было 17 % обоеполых растений.

Таким образом соотношение половых форм неодинаково в разных популяциях *Silene acaulis*. В относительно более северных местообитаниях (район реки Люгрэн), расположенных на карбонатных породах, преобладают особи с женскими цветками, тогда как южнее, в более кислых местах, их доля меньше. На шведских популяциях *Silene acaulis*

было показано, что при увеличении высоты над уровнем моря, доля растений с женскими цветками также растёт (Alatalo, Molau, 1994). В популяциях *Silene acaulis* Баффиновой Земли (Канада) преобладали женские особи в сухих и хорошо дренированных участках, исключением была только одна популяция, расположенная в сыром месте (Hermanutz, Innes, 1994).

Полученные результаты можно объяснить необходимостью увеличить долю перекрестного опыления при увеличении суровости условий. На половой состав популяции может влиять заражение патогенным грибом *Microbotryum violaceum* (Hermanutz, Innes, 1994). Важным фактором могут быть условия, формирующие микроклимат для конкретной популяции: прогреваемость воздуха на уровне земли, дренированность почвы, состав горной породы.

Работа была выполнена при поддержке Службы Национальных Парков США и гранта РФФИ 12-04-01470-а.

МИЩЕНКО И.А.¹, ТАРАН О.П.², ТАРАН С.В.², МИЩЕНКО Л.Т.³

¹Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Киев, Украина

²Институт картофелеводства НААН Украины, Немешаево, Украина

³Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ЭКОНОМИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПОЛУЧЕНИЯ ОЗДОРОВЛЕННОГО СЕМЕННОГО МАТЕРИАЛА КАРТОФЕЛЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОДЕЛИРОВАННОЙ МИКРОГРАВИТАЦИИ

Способность растительных клеток, тканей и органов развиваться в культуре *in vitro* лежит в основе многих современных биотехнологических приемов культивирования растений. С исследованиями культуры тканей связан прогресс в борьбе с фитовирусными заболеваниями различных растений, в том числе и картофеля, в результате чего стало возможным получать свободные от вирусов растения из посадочного материала, который был зараженным. Это позволяет повысить на 30-70% урожайность картофеля, который по объему потребления населением стоит на четвертом месте в мире и считается приоритетной культурой в международных программах борьбы с голодом.

Использование культуры верхушечных меристем для получения свободных от вирусов растений базировалось на предположении, что вирусы не могут проникать в меристематические ткани почек. Однако, позже было обнаружено, что вирусы могут проникать и в меристемы, но оздоровление происходит в процессе культивирования тканей *in vitro* (Faccioli, 2001). Современные гипотезы оздоровления от вирусов в процессе культуры *in vitro* указывают на то, что на взаимосвязь "вирус - клетка-хозяин" влияет много факторов, однако в меристемах происходят интенсивные окислительно-восстановительные процессы, которые создают среду, в которой репликация вирусов подавляется.

Традиционно для оздоровления картофеля от вирусной инфекции используют термотерапию. Материнские растения длительное время подвергают действию повышенных температур, после чего вычлениают меристемы, которые затем культивируют *in vitro* до получения регенерантов. Механизм освобождения от вирусов при воздействии тепла неизвестен. Кроме того, воздействие повышенных температур неудовлетворительно влияет на дальнейшее развитие меристем (Faccioli, 2001). Использование термотерапии иногда дает ложно отрицательные результаты, когда содержание вируса в регенерантах не определяется на первых этапах клонального микроразмножения. Это приносит убытки биотехнологическим лабораториям, поскольку через 6 месяцев размножения количество инфицированных вирусом растений будет превышать 16 тыс. шт (Зарицкий, 2005). Учитывая, что затраты на содержание одного растения *in vitro* составляют около 25\$ в год (Department of Plant Pathology and Plant-Microbe Biology Cornell University, 2011), задача повышения качества оздоровления и снижение затрат на производство растений *in vitro* является очень актуальной.

Экономические показатели свидетельствуют, что использование термотерапии при оздоровлении картофеля предполагает значительные затраты, поскольку для создания термического эффекта длительное время используется электроэнергия. Так, для термотерапии растений при температуре 33...37 °C в течении 40 суток необходимо 1152 кВт·ч электроэнергии. Исход процедуры не всегда будет положительным для оздоровления растений, поэтому необходим поиск менее энергозатратных методов. В наших работах продемонстрирована возможность элиминирования ВПМП (вирус полосатой мозаики пшеницы) в растениях пшеницы под влиянием моделированной

микрогравитации (Mishchenko, 2003; Mishchenko et al., 2004). Исследование этого явления позволило предположить, что освобождение растения от вируса под влиянием клиностатирования происходит в процессе формирования индуцированной устойчивости у растений. Совместное использование моделированной микрогравитации и метода клонального микроразмножения в опытах с картофелем сорта Крымская роза были получены регенеранты, свободные от X-вируса картофеля, которым были инфицированы исходные растения.

В исследованиях с картофелем использовалась установка для клиностатирования растений (Патент Украины № 19360), которая совместно с системой освещения использует 256 кВт·ч электроэнергии за период 40 суток. Таким образом, при использовании моделированной микрогравитации для оздоровления энергозатраты снижаются в 4,5 раза. Себестоимость растения *in vitro* составляет значительную часть в стоимости миниклубней – основного исходного материала для производства картофеля. Производство семенного картофеля эффективно, когда стоимость одного миниклубня не превышает 0,10\$ (Loebenstein, 2001). Снижение затрат на получение оздоровленных растений *in vitro* позволяет повысить эффективность всего процесса производства семенного картофеля и ускорить поступление новых ценных сортообразцов к потребителю.

МИЯНОВИЧ О.¹, ШАФИГУЛЛИНА А.К.², РИЗВАНОВ А.А.¹, КИЯСОВ А.П.²

¹Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия

²Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

ВЫДЕЛЕНИЕ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИОФИБРОБЛАСТОВ ПЕЧЕНИ КРЫС МЕТОДОМ ЭКСПЛАНТАЦИИ

Введение. Звёздчатые клетки печени (ЗКП, клетки Ито или перисинусоидальные клетки печени) – одни из самых малоисследованных популяций клеток в печени млекопитающих. Доказано, что они играют ключевую роль в обмене и накоплении витамина А, гистогенезе и регенерации печени. Вследствие их высокой биосинтетической активности и способности трансдифференцироваться в миофибробласты, которые синтезируют макромолекулы межклеточного матрикса соединительной ткани, ЗКП

считали главными виновниками развития цирроза и фиброза печени. Однако в последнее время появляется всё больше данных о том, что, помимо ЗКП, источником миофибробластов могут являться фибробласты портальных трактов или портальные фибробласты (ПФ). Таким образом, на сегодняшний день обе эти популяции клеток – ЗКП и ПФ рассматриваются как источник миофибробластов и соединительной ткани при фиброзе печени.

Процесс активации, трансформации клеток в миофибробласты, а также защиты от апоптоза регулируется транскрипционным фактором NF- κ B. Предполагают, что ингибирование данного фактора позволит запустить апоптоз активированных ЗКП и ПФ и предотвратить последующее отложение миофибробластами соединительной ткани в печени.

Миофибробласты в условии *in vitro* можно получить при культивировании ЗКП – трансформация происходит на 5-7 сутки. Общепринятый метод выделения ЗКП (коллагеназно-проназная перфузия печени с последующим разделением в градиенте плотности Histodenz) позволяет получить не все клетки, а лишь часть клеточной популяции, в цитоплазме которых есть жировые капли с витамином А. Метода выделения ЗКП, не содержащих в своей цитоплазме капли витамина А, не разработано. Мы предполагаем, что моделью активации ЗКП может быть эксплантационная культура, в которой клетки с высокой биосинтетической активностью мигрируют из ткани.

Исходя из этого, целью нашей работы было получение миофибробластов методом эксплантации из ткани печени новорожденных крыс, анализ фенотипа выделенных клеток и оценка активности транскрипционного фактора NF- κ B и его ингибитора I κ B α .

Материалы и методы. Проводили забор печени четырехдневного новорожденного крысенка (*Rattus norvegicus*, линия Wistar). Далее печень измельчали и кусочки органа помещали в двенадцатилуночный планшет. На третьи сутки кусочки тканей убирали, проводили фиксацию в парафин и иммуногистохимическое исследование гистологических срезов на десмин (маркёр ЗКП крыс) и α -ГМА (маркёр миофибробластов). Фенотип полученных клеток исследовали на 3, 5, 7 и 12 сутки методами иммуноблотинга и иммуноцитохимического окрашивания на десмин, α -ГМА, c-Kit, СК-18, СК-19, NF- κ B, I κ B α , CD45, альбумин, α -фетопроtein, каспазу 7 и матриксную металлопротеиназу 3. В качестве контроля при иммуноблотинге использовали антитела к актину.

Результаты. На 3 сутки мы наблюдали миграцию клеток из тканей печени. При исследовании фенотипа была показана устойчивая экспрессия маркера ЗКП крыс десмина на всех сроках эксперимента, что позволяет нам предположить, что мигрировавшие клетки были преимущественно ЗКП, лишь единичные клетки могли быть ПФ. Динамика экспрессии α -ГМА постепенно нарастала, что свидетельствовало о трансформации выделенных клеток в миофибробласты. На всех сроках была отмечена высокая экспрессия c-Kit – маркера прогениторных и стволовых клеток. Экспрессии СК-18 и СК-19 не было выявлено, что позволяет утверждать, что полученные клетки были не эпителиального происхождения. О высокой активности клеток можно было судить при окраске клеток на NF- κ B и I κ B α , для которых была отмечена устойчивая экспрессия во всех клетках. Экспрессии гемopoэтического маркера CD45 выявлено не было, что свидетельствует об отсутствии загрязнения культуры клетками крови. Отсутствие экспрессии альбумина и α -фетопротеина было показателем того, что полученные клетки не были зрелыми гепатоцитами. Отсутствие экспрессии матриксной металлопротеиназы 3 и каспазы 7 свидетельствовало о том, что клетки активно пролиферировали и не вступили в апоптоз.

При иммуногистохимическом исследовании срезов кусочков печени после культивирования *in vitro* мы наблюдали некротические изменения в центре кусочка, тогда как по периферии ткани было отмечено большое количество десмин-позитивных ЗКП. На α -ГМА окрашивались только единичные клетки сосудов. Таким образом, при эксплантации происходит преимущественно активация ЗКП, а не ПФ.

Вывод. Метод эксплантации позволяет получить культуру миофибробластов печени крысы. На основании анализа фенотипа полученных клеток можно утверждать, что полученные миофибробласты являются следствием трансформации преимущественно ЗКП, а не ПФ. Для данных клеток была характерна высокая активность транскрипционного фактора NF- κ B и его ингибитора I κ B α . Таким образом можно заключить, что модель эксплантации может быть использована при получении миофибробластов печени для проведения экспериментов по ингибированию NF- κ B и исследованию процессов, приводящих к фиброзу печени.

МОЙСЕЮК И.В., ДЕРКАЧ К.В., ЧИСТЯКОВА О.В., СУХОВ И.Б.,

БОНДАРЕВА В.М., ШПАКОВ А.О.

ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

АДЕНИЛАТЦИКЛАЗНАЯ СИСТЕМА В МОЗГЕ КРЫС С ДЛИТЕЛЬНЫМ СТРЕПТОЗОТОЦИНОВЫМ ДИАБЕТОМ

Нейродегенеративные заболевания являются наиболее частыми осложнениями сахарного диабета (СД) 1-го типа, что свидетельствует о тесной взаимосвязи между ними и метаболическими и функциональными нарушениями, возникающими при СД. Одной из первопричин развития нейродегенеративных заболеваний в условиях СД 1-го типа являются изменения активности сигнальных систем мозга, и в первую очередь гормоночувствительной аденилатциклазной сигнальной системы. Цель работы состояла в исследовании аденилатциклазной системы, регулируемой биогенными аминами, аденозином, соматостатином и гипофизарным аденилатциклазу активирующим полипептидом-38 (РАСАР-38), в мозге крыс с экспериментальным СД 1-го типа и в изучении влияния на эту систему интраназального инсулина (ИИ). Исследования проводили на стрептозотоциновой модели СД 1-го типа, которая развивалась на протяжении 6 месяцев, что существенно отличает ее от традиционно используемых моделей краткосрочного стрептозотоцинового СД, и которая наиболее близка СД 1-го типа человека. Для коррекции нейродегенеративных изменений был использован ИИ, который положительно влияет на функционирование мозга в условиях острой гипоинсулинемии, но, в отличие от периферического инсулина, не вызывает гипогликемических эпизодов, усиливающих нейродегенеративные изменения в ЦНС. Обнаружено, что в мозге крыс с длительным СД 1-го типа отсутствуют существенные изменения как базальной активности фермента аденилатциклазы (АЦ), так и ее стимуляции негормональными активаторам аденилатциклазной системы – гуаниновыми нуклеотидами и форсколином. Это свидетельствует в пользу сохранения каталитических функций АЦ и ее сопряжения с G-белками стимулирующего типа (G_s-белками). В мозге диабетических крыс снижались стимулирующие АЦ эффекты изопротеренола, РАСАР-38 и серотонина, в то время как эффекты EMD-386088, агониста серотониновых рецепторов

6-го типа, не менялись, что указывает на рецепторную специфичность изменений в G_s -сопряженных сигнальных каскадах. В мозге диабетических крыс также ослаблялись ингибирующие АЦ эффекты норадреналина, соматостатина и 5-нонилокситриптамина, агониста серотониновых рецепторов 1В-подтипа, действующих через G-белки ингибирующего типа (G_i -белки). Полученные результаты подтверждают нашу гипотезу о том, что при СД 1-го типа в наибольшей степени нарушаются сигнальные каскады, сопряженные с G_i -белками. Лечение диабетических крыс ИИ в течение 5 месяцев приводило к частичному или полному восстановлению АЦ эффектов гормонов. Учитывая тот факт, что нарушения в сигнальных системах мозга при СД 1-го типа являются ключевыми причинами нейродегенеративных заболеваний, обнаруженная нами способность ИИ восстанавливать функции аденилатциклазной системы в мозге диабетических крыс свидетельствует о перспективности применения интраназального способа доставки гормона для лечения и профилактики этих заболеваний.

Работа поддержана РФФИ (проект № 12-04-00434).

МОЙСЕЮК И.В., ДЕРКАЧ К.В., ЧИСТЯКОВА О.В., ШПАКОВ А.О.

ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

ДЕФИЦИТ АНДРОГЕНОВ У САМЦОВ КРЫС С НЕОНАТАЛЬНОЙ МОДЕЛЬЮ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2-ГО ТИПА

Нарушения функционирования репродуктивной системы у мужчин и женщин являются одними из наиболее часто встречаемых осложнений сахарного диабета (СД). Предполагается, что эти нарушения возникают как на уровне ЦНС, так и в генеративных тканях, и связаны с изменением активности гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси. Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе этих нарушений, особенно при СД 2-го типа, изучены недостаточно. Цель работы состояла в изучении суточной динамики изменений уровня тестостерона у самцов крыс с 240-дневным неонатальным стрептозотоциновым СД, сходным по ряду признаков с СД 2-го типа человека, а также в исследовании влияния интраназального введения люлиберина, гипоталамического

рилизинг-фактора лютеинизирующего гормона, на уровень тестостерона и регуляцию хорионическим гонадотропином человека активности аденилатциклазы (АЦ) и G-белков стимулирующего типа (G_s -белков) в семенниках диабетических крыс в сравнении с контрольными животными. Обнаружено снижение среднесуточного уровня тестостерона и утреннего подъема его концентрации у крыс с неонатальной моделью СД 2-го типа. У диабетических крыс был существенно снижен прирост уровня тестостерона через 30 мин после введения интраназального люлиберина, в то время через 2–6 часов различия в ответе на люлиберин у контрольных и диабетических крыс не выявлялись. В плазматических мембранах, полученных из семенников крыс с неонатальным СД, стимуляция активности АЦ и ГТФ-связывания G_s -белков хорионическим гонадотропином были снижены в сравнении с контролем. Таким образом, для самцов крыс с неонатальной моделью СД 2-го типа характерна выраженная андрогенная недостаточность, причинами которой могут быть нарушение функционирования гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси и снижение чувствительности аденилатциклазной системы семенников диабетических животных к гонадотропинам.

Работа поддержана РФФИ (проект № 12-04-00434).

МООР Н.А.¹, САФРО М.Г.²

¹*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия*

²*Department of Structural Biology, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel*

**БАКТЕРИАЛЬНЫЕ И ЭУКАРИОТИЧЕСКИЕ ФЕНИЛАЛАНИЛ-тРНК-
СИНТЕТАЗЫ КАТАЛИЗИРУЮТ АМИНОАЦИЛИРОВАНИЕ тРНК^{Phe}
ПРИРОДНЫМИ ОКИСЛЕННЫМИ АМИНОКИСЛОТАМИ**

В работе выполнены кинетические и структурные исследования способности различных форм фенилаланил-тРНК-синтетазы (PheRS) дискриминировать между фенилаланином (Phe) и продуктами окисления ароматических аминокислот: L-мета-тирозином (*m*-Туг), L-орто-Туг (*o*-Туг) и L-3,4-дигидрокси-Phe (леводопой, L-Dopa). Аккумуляция в природе окисленных аминокислот под воздействием активных форм

кислорода ассоциирует со многими патологиями и заболеваниями. L-Dopa-содержащие белки подвержены дальнейшей модификации в клетке с образованием устойчивых к деградации белковых агрегатов. Механизмы включения окисленных аминокислот в белки и участие в них аминоацил-tРНК-синтетаз практически не изучены. Аминоацил-tРНК-синтетазы катализируют двухстадийное аминоацилирование специфичной tРНК соответствующей аминокислотой, но не все ферменты полностью отбраковывают похожие по структуре неспецифичные аминокислоты. В таких случаях необходимая точность биосинтеза белка обеспечивается дополнительной активностью синтетаз, способных гидролизовать ошибочные продукты аминоацилирования в специальном «корректирующем» (editing/proofreading) центре. Для PheRS показано существование трех основных форм: гетеротетрамерной бактериальной ($\alpha\beta$)₂-типа, эукариотической цитоплазматической ($\alpha\beta$)₂-типа и мономерной митохондриальной. Гетеротетрамерные PheRSs прокариот и эукариот обладают корректирующей активностью по отношению к собственному продукту мисаминоацилирования tРНК^{Phe} неспецифичной стандартной аминокислотой *p*-Tyr благодаря наличию гидролитических центров, локализованных на β -субъединицах. Митохондриальные PheRSs лишены корректирующей активности.

Нами изучены субстратные свойства окисленных аминокислот в реакциях, катализируемых разными PheRSs: бактериальной из *Thermus thermophilus* (TtPheRS), цитоплазматической и митохондриальной человека (*Hsct*PheRS и *Hsmt*PheRS). Все три PheRSs активируют *m*-Tyr, *o*-Tyr и L-Dopa. Синтез L-Dopa-tРНК^{Phe}, регистрируемого методами стационарной кинетики, – общее свойство трех ферментов. *m*-Tyr-tРНК^{Phe} синтезируется эукариотическими PheRSs, синтез *o*-Tyr-tРНК^{Phe} не регистрируется. Сравнение каталитической эффективности включения L-dopa в tРНК^{Phe} с соответствующими значениями для специфичного Phe-субстрата свидетельствует о наиболее эффективной дискриминации неспецифичной аминокислоты бактериальным ферментом: величина k_{cat}/K_m для L-dopa меньше, чем для Phe, в 1500 раз в случае TtPheRS, в 770 раз в случае HsctPheRS и в 300 раз в случае HsmtPheRS. *m*-Tyr – лучший из окисленных аминокислот неспецифичный субстрат эукариотических ферментов: k_{cat}/K_m для него меньше, чем для Phe, в 50 раз в случае HsctPheRS и лишь в 5 раз в случае HsmtPheRS. Таким образом, митохондриальная форма вносит основной вклад в PheRS-опосредованное включение окисленных ароматических аминокислот в эукариотические

белки. С помощью рентгеноструктурного анализа нами показано связывание L-dopa и *m*-Туг в активном центре аминокислотирования *TtPheRS* и *HsmtPheRS* (в сайте, предназначенном для Phe) и в гидролитическом центре *TtPheRS* (в сайте, предназначенном для *p*-Туг). Исследования гидролитической активности *TtPheRS* и *HsctPheRS* по отношению к L-dopa-тРНК^{Phe} и Туг-тРНК^{Phe} в отсутствие или в присутствии низкомолекулярных субстратов позволяют предположить, что основной вклад в более эффективную коррекцию (препятствующую аккумуляции) Туг-тРНК^{Phe} по сравнению с L-dopa-тРНК^{Phe} вносит *cis*-механизм – путем транслокации ошибочного продукта из активного центра аминокислотирования в гидролитический внутри комплекса с ферментом (без предварительной диссоциации в раствор).

Полученные данные указывают на участие L-dopa-тРНК^{Phe} в биосинтезе белка в прокариотах и эукариотах и открывают дополнительный, ранее неизвестный путь утилизации L-dopa, используемого как медицинский препарат для лечения болезни Паркинсона. По эффективности включения L-dopa в тРНК *HsmtPheRS* не уступает тирозил-тРНК-синтетазе, которая до сих пор считалась единственным участником трансляционного синтеза L-dopa-содержащих белков. Результаты представляют также практический интерес для включения L-dopa как реакционноспособной пробы (L-dopa окисляется ионами переходных металлов в хинон, образующий сшивки с остатками цистеина) в рекомбинантные белки для структурных исследований белок-белковых комплексов (стабилизированных межмолекулярными сшивками).

Работа получила финансовую поддержку Российского фонда фундаментальных исследований (грант 10-04-01082) и Киммельман-центра по исследованиям структуры биомолекул в Институте Вейцмана.

МООР Н.А.¹, САФРО М.Г.²

¹*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия*

²*Department of Structural Biology, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel*

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ФЕНИЛАЛАНИЛ-тРНК-СИНТЕТАЗЫ В МИТОХОНДРИЯХ ЭУКАРИОТ

В работе исследован с помощью рентгеноструктурного анализа механизм функционирования митохондриальной фенилаланил-тРНК-синтетазы человека (*HsmtPheRS*) в сравнении с бактериальным (*T. thermophilus* PheRS, *TiPheRS*) и цитоплазматическим гомологами (*HsctPheRS*). На сегодняшний день это единственный случай, когда известна трехмерная структура полноразмерных аминоксил-тРНК-синтетаз одной специфичности из митохондрий и цитоплазмы человека и из эубактерий. В отличие от цитоплазматических эукариотических и бактериальных PheRSs, субъединичная структура которых ($\alpha\beta$)₂-типа эволюционно консервативна, *HsmtPheRS* функционирует как мономер, состоящий из каталитического (остатки 48-289) и С-концевого (остатки 323-415) доменов, связанных линкером (остатки 290-322), и небольшого N-концевого домена (остатки 1-47).

Каталитический домен (CAD) имеет характерную для синтетаз II-ого класса структурную топологию и содержит соответствующие сигнальные мотивы. Мотив 1, ответственный за димеризацию синтетаз класса II, обнаружен в мономерном ферменте впервые, что указывает на разнообразие его функций. Все функционально важные фрагменты *HsmtPheRS*, участвующие в связывании низкомолекулярных субстратов (АТФ и Phe) и их каталитическом превращении (мотивы 2 и 3, FPF-петля и спиральная петля), высоко гомологичны соответствующим мотивам *TiPheRS* на уровне первичной и вторичной структур. С-Концевой домен *HsmtPheRS* соответствует по структурной топологии антикодон-связывающему домену бактериального гомолога (*TiPheRS*). Структурный анализ кристаллических комплексов *HsmtPheRS* с промежуточным продуктом первой стадии реакции аминокислирования и с тРНК^{Phe} показал, что связывание высокомолекулярного субстрата практически не влияет на взаимную ориентацию CAD и N-концевого домена (NTD), но индуцирует глобальную

конформационную перестройку С-концевого антикодон-связывающего домена (ABD) – поворот на 140° относительно оси, параллельной спирали мотива 1. Эти результаты указывают на существование двух функциональных конформаций *HsmtPheRS*: «закрытой» в нативном белке или комплексе с аминокациладенилатом и «открытой» в комплексе с тРНК. В структуре самого ABD (равно как и CAD) не обнаружено существенных изменений. Как и *TtPheRS*, *HsmtPheRS* образует наибольшее число специфических контактов с нуклеотидами антикодона, не вызывая значительных структурных перестроек в антикодоновой ветви тРНК. Большинство ответственных за узнавание антикодона остатков высоко консервативны в митохондриальных и бактериальных PheRSs. Для *HsmtPheRS* выявлены дополнительные взаимодействия ABD с антикодоновой петлей по сравнению с *TtPheRS*. Другая особенность *HsmtPheRS* – интенсивные специфические взаимодействия петли мотива 2 (не характерные для *TtPheRS*) с акцепторной ветвью тРНК, конформация которой стабилизирована дополнительно электростатическими контактами с NTD и линкерным районом. Таким образом, функция ABD в узнавании антикодоновой петли тРНК^{Phe} усиливается в *HsmtPheRS* по сравнению с бактериальным гомологом, а концевой домен (NTD) с характерной для *HsmtPheRS* топологией выполняет функцию второй субъединицы димерных синтетаз класса II (или β-субъединицы *TtPheRS*) в связывании акцепторной ветви. Принципиальное отличие *HsmtPheRS* от синтетаз класса II – двойственная функция петли мотива 2. Наряду с основной высоко консервативной функцией (координированное взаимодействие с тремя субстратами на двух стадиях реакции аминоацилирования) этот мотив в *HsmtPheRS* координирует взаимодействие CAD и ABD с соответствующими районами тРНК (акцепторным концом и антикодоновой петлей). В целом, структурные исследования показали как узнавание и корректное связывание высокомолекулярного субстрата обеспечивается минимальным числом структурных доменов: синтетаза, состоящая фактически из каталитического и антикодон-связывающего доменов бактериальной PheRS, связанных линкером и дополненных в процессе эволюции небольшим доменом на N-конце каталитического домена, становится функционально активной в аминоацилировании тРНК благодаря существенной конформационной перестройке.

Работа получила финансовую поддержку Российского фонда фундаментальных исследований (грант 10-04-01082) и Киммельман-центра по исследованиям структуры биомолекул в Институте Вейцмана.

МОРЕВА Ж.Г.¹, ВАСИЛЬЕВ М.М.², САЩЕНКО В.П.³,
ГАРАСЬКО Е.В.¹, АЛЕНТЬЕВ А.Н.⁴

¹*Ивановская государственная медицинская академия, Иваново, Россия*

²*ГНЦ дерматовенерологии Росмедтехнологий, Москва, Россия*

³*Отделенческая больница на станции Иваново ОАО «РЖД», Иваново, Россия*

⁴*Ивановский государственный энергетический университет, Иваново, Россия*

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВЛАГАЛИЩНЫХ ТРИХОМОНАД

Культуральное исследование является ведущим методом в лабораторной диагностике мочеполового трихомониаза. Приемы культивирования влагалищных трихомонад были детально исследованы в ЦНИКВИ М.М. Васильевым в 1990-е годы. Культуральная диагностика включает посев клинического материала, взятого со слизистых оболочек мочеполовых органов, на жидкие питательные среды, обогащенные сывороткой крови человека или животных и содержащие различные стимулирующие рост трихомонад добавки, например оротовую кислоту. Лучшими ростовыми свойствами обладают сборные питательные среды на основе натуральных компонентов, например, среда Джонсона-Трасселя или Тераса, готовые промышленно выпускаемые среды несколько уступают по ростовым качествам. В случае хронического воспалительного процесса гениталий при трихомониазе, а также при тканевой локализации возбудителя, например в ткани эндометрия, в кистозных образованиях яичников и т.п., в крови трихомонады могут не выявляться даже на богатых питательных средах. Это связано с изменением морфологии возбудителя, находясь в несвойственном биотопе.

Была разработана методика, позволяющая выделять влагалищные трихомонады в случае отсутствия роста возбудителя при использовании классических приемов культивирования трихомонад. За основу предложенного приема взят метод выделения чистой культуры трихомонад путем серийных пересевов на новую питательную среду.

Сущность разработанного метода заключалась в проведении посева клинического материала в питательную среду Тераса и 2-3-х серийных пересевов в среды, обогащенные сывороткой крови человека, взятой с разным временем инактивации. Посев клинического материала проводили в питательную среду, обогащенную сывороткой, инактивированной в течение 10 минут, далее через 24-48 часов проводили пересев в питательную среду, обогащенную сывороткой, частично инактивированной в течение 20 минут. Второй пересев проводили в питательную среду, обогащенную сывороткой, полностью инактивированной в течение 30 минут. В случае слабого роста типичных форм трихомонад проводили еще 1-2 пересева в питательную среду, содержащую полностью инактивированную сыворотку. Разработанный прием является длительным по времени методом выделения возбудителя, однако он позволяет выявлять трихомонады с измененной морфологией за счет стимуляции их размножения в условиях питательной среды. Разработанный прием позволил увеличить выявляемость трихомониаза у исследуемой группы больных (85 женщин с хроническими воспалительными заболеваниями органов малого таза) на 23,10% по сравнению с обычным культуральным приемом и на 67,29% по сравнению с микроскопией окрашенных препаратов.

Проведено исследование по идентификации типичных и атипичных форм *Trichomonas vaginalis* методом люминесцентного анализа, в частности, путем непрямой реакции иммунофлюоресценции (нРИФ). Оценивали качественные показатели флюоресценции форм трихомонад в нРИФ при помощи люминесцентной микроскопии, а также количественные показатели - с использованием спектрофлюоресцентного анализа, в ходе которого последовательно снимали спектры поглощения и спектры флюоресценции клеток возбудителя, обработанных флюорофором. Исследование флюоресценции проводили на 35 штаммах *T. vaginalis*, взятых в концентрации 37×10^5 кл/мл; 15 штаммов имели типичную морфологию (грушевидная форма); 20 штаммов имели измененную морфологию (округлая форма). В результате проведенных исследований установлено, что флюоресценция типичных форм трихомонад проявлялась в виде ярко-зеленого свечения, более интенсивного по периферии клетки. Формы возбудителя с измененной морфологией также проявляли свечение, но оно отличалось меньшей яркостью, и было равномерное. Анализ спектров поглощения показывает, что величина оптической плотности в области длины волны $\lambda = 628$ нм у типичных трихомонад составила в среднем $4 \cdot 10^{-2}$, у атипичных

форм возбудителя - $0,9 \cdot 10^{-2}$. Спектры флюоресценции показывают, что интенсивность флюоресценции ($I_{ср.} = 2,76$ отн. ед.) типичных форм трихомонад была в 2-4 раза выше интенсивности флюоресценции ($I_{ср.} = 0,95$ отн. ед) атипичных форм возбудителя ($\lambda = 670 \pm 5$ нм).

Таким образом, разработанная технология культивирования трихомонад на питательных средах может повысить выявляемость трихомониаза, особенно из нетипичных мест обитания, в которых возбудитель не проявляет основных морфологических признаков. Метод люминесцентного анализа позволяет идентифицировать типичные и атипичные формы влагалищных трихомонад.

МОРОЗ И.В., МИХАЙЛОВА Р.В.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

СТАБИЛИЗАЦИЯ МОРФОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПРОДУЦЕНТА КАТАЛАЗЫ – *PENICILLIUM PICEUM* F-648 A3-2

Одним из перспективных направлений биотехнологии является получение ферментных препаратов микробного происхождения. Каталаза (КФ 1.11.1.6), катализирует реакцию разложения пероксида водорода до молекулярного кислорода и воды и применяется в процессах деградации остаточных количеств H_2O_2 , используемого в различных технологиях легкой, химической и пищевой промышленности. В биосенсорных технологиях фермент необходим для количественного определения содержания пероксида водорода и этанола. Каталаза используется в медицине в диагностических и терапевтических целях.

Биотехнология производства ферментов основана на использовании высокоактивных продуцентов. Важным показателем технологичности микроорганизмов-продуцентов ферментов является их стабильность.

Ранее нами получен высокоактивный продуцент внеклеточной каталазы *Penicillium piceum* F-648 A3, оптимизирован состав питательной среды и определены параметры культивирования гриба. В результате изучения спонтанной изменчивости *P. piceum* F-648 A3 установлено, что гриб вариабелен, расщепляется на 2 морфологические варианта. Для

дальнейшей работы был отобран вариант *P. piceum* F-648 A3-2, характеризующийся повышенными на 25 % и 14 % уровнем синтеза каталазы и продуцирующей способностью мицелия.

Цель данной работы – разработка метода длительного хранения продуцента каталазы *Penicillium piceum* F-648 A3-2, обеспечивающего сохранность его морфолого-биохимических свойств.

Известно, что усилить процесс диссоциации культуры или, наоборот, стабилизировать ее, можно изменением состава и концентрации компонентов питательной среды. При разработке способа стабилизации морфологических и биохимических свойств *P. piceum* F-648 A3-2 использовали модифицированные агаризованные среды Чапека с 6 % глюкозы, содержащие NaCl (0,5-3,0 %), H₂O₂ (0,16-0,64 мМ) и Fe₂SO₄ (0,01-0,1 %).

После шести последовательных пересевов периодичностью 2 раза в месяц, культуру рассевали до моноспоровых колоний на указанные среды, выращивали в течение 7 суток при 27°C и изучали их морфологические особенности. Анализ морфологических признаков колоний *P. piceum* F-648 A3-2 показал, что наличие в среде NaCl (0,5 %), H₂O₂ (0,16-0,32 мМ) и Fe₂SO₄ (0,01-0,05 %) способствует стабилизации культуры. Все колонии были однотипные, морфологические варианты не обнаружены. Следует отметить, что исследуемые соединения влияли на скорость линейного роста гриба. Установлена зависимость данного эффекта от используемой концентрации вещества. Максимальная скорость радиального роста *P. piceum* F-648 A3-2 (0,156 мм/ч) выявлена на среде с пероксидом водорода (0,16-0,32 мМ), а самая низкая (0,094 мм/ч) – с 2 % NaCl.

Сравнительное изучение биосинтетической способности *P. piceum* F-648 A3-2, поддерживаемого на модифицированных агаризованных средах, в условиях глубинного культивирования показало, что уровень образования фермента также зависел от природы и концентрации используемых соединений. Так, хранение и выращивание *P. piceum* F-648 A3-2 на средах с H₂O₂ и Fe₂SO₄ не только стабилизировало культуру по данному признаку, но и приводило к повышению уровня образования фермента. При этом в первом случае концентрация соединения не влияла на величину данного показателя, а во втором он снижался с повышением концентрации Fe₂SO₄. Введение в состав среды 0,5 % NaCl незначительно активизировало образование каталазы грибом, а дальнейшее повышение ее содержания ингибировало процесс. Максимальные уровень образования фермента

(153,6±7,49) и продуцирующая способность мицелия (18,26±0,95) отмечены у *P. piceum* F-648 А3-2, поддерживаемого на среде с 0,01% Fe₂SO₄, а минимальные значения данных показателей (92,3±4,7 и 9,20±0,46)- на среде с 2% NaCl.

Для проверки биохимической стабильности *P. piceum* F-648 А3-2 отбирали по 10 клонов 10-суточных моноспоровых колоний гриба и изучали их способность к синтезу каталазы в условиях глубинного культивирования. Установлено, что уровень образования каталазы клонами культуры, хранящейся на среде с 0,32 мМ пероксида водорода и с 0,01 % Fe₂SO₄, выше аналогичного показателя контрольного варианта в среднем на 13,4 % и 29,0 %. Культуры отличались от исходного штамма размахом вариабельности по способности к синтезу каталазы. Коэффициент вариации находился в пределах 6,4-7,3 %, что ниже данного показателя контрольного варианта (9,0 %).

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что для стабилизации морфолого-биохимических признаков продуцента каталазы – *P. piceum* F-648 А3-2 при длительном хранении методом периодических пересевов рекомендуется использовать модифицированные среды Чапека с 0,01 % Fe₂SO₄ или 0,32 мМ Н₂О₂.

Исследования проводились при финансовой поддержке БРФФИ (проект № Б08МЛД-018).

МОРОЗОВА О.В.^{1,2}, ИСАЕВА Е.И.², КОЗЛОВА Ю.Н.¹,

БАХВАЛОВА В.Н.¹, КОРОЛЁВА Л.С.¹, СИЛЬНИКОВ В.Н.¹

¹ *ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия*

² *ФГБУ Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздравсоцразвития России,
Москва, Россия*

СРАВНЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ И ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ ИСКУССТВЕННЫХ РНК-АЗ

Для вирусов, содержащих геномные одноцепочечные (вирус клещевого энцефалита (ВКЭ)) и двухцепочечные (вирус гриппа) РНК проведён анализ вирулицидных и противовирусных свойств низкомолекулярных искусственных РНК-аз. Для деградации

РНК синтезировали искусственные РНК-азы на основе природных L-аминокислот (АК): «АК-линкер-АК» (где АК - это Lys, Gln, Ser, His, Trp, Thr и др., линкеры – 1,12-диаминододекан и 4,9-диокса-1,12-диаминододекан), пептидов, пептидомиметиков и производных диазабициклооктана. Методами обратной транскрипции (ОТ) с последующей ПЦР с флуоресцентными зондами в реальном времени, иммуноферментного анализа (ИФА) на антигены вируса гриппа и ВКЭ, реакции гемагглютинации (РГА) показано полное расщепление суммарных вирусных и клеточных РНК, выделенных из культур клеток и тканей лабораторных животных, при отсутствии изменений антигенных структур вирусов.

Анализ токсичности 24 препаратов низкомолекулярных искусственных РНК-аз проводили для культур клеток почки эмбрионов свиньи (СПЭВ), почки зелёной мартышки Vero(B), почки собаки MDCK, фибробластов мыши L929, а также для мышей в результате подкожного и интраназального введения в диапазоне концентраций от 20 мМ до 0,00002 мМ. Микроскопические наблюдения с помощью инвертированного микроскопа и МТТ тест показали, что наиболее токсичны производные диазабициклооктана с предельно токсичными концентрациями для 50% клеток (CC_{50}) перевиваемых монослойных культур в диапазоне от 0,0001 до 0,1 мМ. При подкожном введении часть производных диазабициклооктана были токсичны в концентрации 20 мМ, при интраназальном введении гибель животных наблюдали после введения 0,02–20 мМ производных диазабициклооктана, возможно, из-за действия препаратов на лёгкие. Наименее токсичными оказались пептиды с пределами токсичности для культур клеток от 0,01 до 20 мМ. В результате подкожного введения токсичность аналогов пептидов обнаружена при концентрациях 0,02–20 мМ без гибели животных, после интраназального введения зарегистрирована гибель мышей в единичных случаях без корреляции с концентрациями.

Определение вирулицидных свойств 24 искусственных РНК-аз проводили для внеклеточных вирионов вируса гриппа (А/ H₃N₂ Aichi 1/68) и ВКЭ 3 генетических типов (дальневосточный (штамм Софьин, номер доступа в GenBank X07755), сибирский (штамм Айна, AF091006) и западноевропейский тип (штамм Абсеттаров, AF091005). Инкубацию внеклеточных вирусов гриппа и ВКЭ с различными концентрациями искусственных РНК-аз проводили 1-2 ч при 37⁰С. Методами титрования жизнеспособных вирусов, ОТ-ПЦР, ИФА и РГА показано частичное расщепление геномных РНК вируса гриппа и ВКЭ.

Вирулицидными свойствами в отношении вируса гриппа обладали 8 искусственных РНК-аз: пептиды А-367, А-432, КНС, В5, производные диазабициклооктана DL₅12, DL₅14, D_m12 и DIII-12. Для ВКЭ вирулицидные свойства РНК-аз были выявлены для 5 из 8 РНК-аз, обладающих вирулицидной активностью по отношению к вирусу гриппа, а именно КНС, DL₅12, DL₅14, D_m12, DIII-12 с остаточной инфекционностью с разницей lg титров ВКЭ от 2 до 3.

Определение противовирусных свойств проводили при добавлении искусственных РНК-аз за 24 ч до или после заражения, а также после одновременного введения препаратов и вирусов гриппа или клещевого энцефалита. При профилактическом применении РНК-аз противовирусной активностью обладали производные аминокислот А-337, А-366 и А-367 (0,2-0,3 мМ) и диазабициклооктана DL₅12 (0,05 мМ). При одновременном и терапевтическом использовании подавление активности вируса гриппа обнаружено для А-366, А-367, КНС (0,2-0,3 мМ). При одновременном заражении ВКЭ и введении искусственных РНК-аз полное подавление инфекционности выявлено для А-367 в концентрациях более 0,0005 мМ, при последовательном введении инфекционность ВКЭ частично сохраняется. Наиболее эффективными противовирусными препаратами являлись производные пептидов КНС и А-367, а также производное диазабициклооктана DIII12. Несмотря на полное расщепление суммарных РНК, выделенных из инфицированных клеток, в присутствии искусственных РНК-аз, деградация вирусных геномных РНК в составе внеклеточных вирионов и внутри инфицированных клеток была лишь частичной.

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного контракта 16.N08.12.1005.

МОРОЗОВА Ю. А., АЛИМОВА Ф.К.

ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Россия

ЦЕЛЛЮЛАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ИЗОЛЯТА РОДА *TRICHODERMA* ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА СПИРТОВОЙ БАРДЕ

Грибы рода *Trichoderma* являются продуцентами комплекса гидролитических ферментов – ксиланаз, целлюлаз, протеаз, глюканаз и обладают высокой секреторной

способностью. Указанные свойства делают ферменты штаммов *Trichoderma* универсальными для применения во многих биотехнологических процессах. Между тем, при производстве спирта из зерна получается довольно большое количество отработанной массы (послеспиртовой барды) прошедшего ферментацию зернового сырья, из которого путем дистилляции извлекается алкоголь. Барда содержит различные питательные компоненты: белки, жиры, углеводы, витамины и поэтому потенциально она может являться средой для культивирования микроорганизмов и получения ферментов.

В работе использовали микроскопический гриб *Trichoderma reesei* - M18.2. Целлюлазную активность измеряли по стандартной методике IUPAC, субстратом служила хроматографическая бумага Whatman № 1. Анализ концентрации ВС проводили по стандартной методике с помощью окрашивания их динитросалициловой кислотой.

Культивирование продуцента проводили на отцентрифугированной (4000 об./мин.) и неотцентрифугированной барде глубинным способом. Длительность ферментации составляла 7 суток. Результаты исследования активности на густой фазе барды показали, что максимальная целлюлазная активность в культуральной жидкости изолята *T. reesei* была достигнута на четвёртые сутки культивирования и составляла 1,35 FPU/ml. Максимальный пик активности на осаждённой центрифугированием послеспиртовой барде достигал также на четвёртые сутки и составлял 3,3 FPU/ml. Исследование изменения концентрации редуцирующих сахаров в культуральной жидкости в процессе ферментации продуцента показало, что содержание редуцирующих сахаров снижается на протяжении всего процесса. В начале культивирования концентрация сахаров составляла в среднем 6,5 г/л к концу процесса – 1,1 г/л.

Таким образом, нами была показана возможность синтеза целлюлаз *T. reesei* на послеспиртовой барде. Сравнивая результаты экспериментов, проведённых с использованием разных видов барды, можно сделать вывод, что на осаждённой центрифугированием среде происходит более активный синтез исследуемых ферментов. Активность исследуемых ферментов становится выше на 40%.

МОКШИН Е.В., ПЕТРОВА Ю.Г., ЛУКАТКИН А.С.

Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, Саранск, Россия

ИЗУЧЕНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ВОЗМОЖНОСТЕЙ *NARCISSUS HYBRIDUS* К МОРФОГЕНЕЗУ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

На сегодняшний день одним из перспективных направлений расширения видового разнообразия высокодекоративных растений закрытого и открытого грунта является метод клонального размножения в условиях *in vitro*. Данный способ позволяет размножить посадочный материал быстрее, чем традиционным семенным путем; кроме того, он позволяет значительно повысить коэффициент размножения и получить посадочный материал, свободный от различных видов инфекций.

Объектом исследования служили луковицы нарцисса гибридного (*Narcissus hybridus*), сорт Модерн Арт. Эксперимент включал в себя стерилизацию и введение в культуру. С целью получения хорошо растущей стерильной культуры растительный материал подвергали ступенчатой стерилизации, которая заключалась в следующем: 1) луковицу очищали от отмерших чешуй и некротических участков, делили на чешуи и промывали в мыльной воде; 2) чешуи стерилизовали, в качестве стерилизующих элементов использовали последовательно 0,1% KMnO_4 (25 минут), 70% этиловый спирт (1 минута), 6 и 10% хлорамин (5–25 минут), после чего трижды промывали стерильной дистиллированной водой; 3) подрезали места облома чешуй на расстоянии 1–1,5 мм от края; 4) экспланты помещали на агаризованную питательную среду. В качестве основной питательной среды использовали агаризованную (0,7%) среду с минеральной основой по Мурасиге и Скугу (рН 5,8–5,9), включающую витамины тиамин и пиридоксин (по 0,5 мг/л), аскорбиновую кислоту (15 мг/л), сахарозу (30 г/л), регуляторы роста (отдельно и совместно) – индолилуксусную кислоту (ИУК) – от 0,1 до 3,0 мг/л, 6-бензиламинопурин (6-БАП) – от 0,1 до 3,0 мг/л и Рибав-Экстра – от 0,001 до 1 мкл/л. Выращивание осуществляли при температуре 18–23°C и круглосуточном освещении белыми люминесцентными лампами с интенсивностью света 3 клк. Культивирование проводили в течение 8 недель.

На этапе введения в культуру *in vitro* определяющим является поиск эффективных условий стерилизации эксплантов. В результате исследования установлено, что лучшим

стерилизующим агентом для *N. hybridus* сорта Модерн Арт является 6% хлорамин с длительностью экспозиции 5 минут. Процент неинфицированных эксплантов в данном случае составил 70%.

Потенциальные возможности нарцисса к морфогенезу *in vitro* в присутствии различных регуляторов роста (ИУК, 6-БАП и Рибав-Экстра) оценивали по следующим параметрам: интенсивность образования микролуковичек эксплантами, их число в расчете на один эксплант, каллусогенез.

Эксперимент показал, что наиболее активными в отношении органообразования частями луковички нарцисса данного сорта являются основания чешуй с частью донца. Это связано с тем, что верхние части донца, а также чешуйки и листья в местах прикрепления к донцу (особенно их дорзальные части) слагаются из мелких плотно прилегающих друг к другу клеток меристематического характера, обладающих повышенной пролиферационной активностью.

Регуляторы роста оказали положительное воздействие на процессы морфогенеза нарцисса гибридного в культуре *in vitro*. Наиболее эффективным при образовании микролуковичек *de novo* оказался вариант с внесением в среду для культивирования 3,0 мг/л 6-БАП – 2 шт./эксплант. Использование других препаратов и их сочетаний оказалось менее эффективным для данного показателя.

Наряду с прямой регенерацией растений из первичного экспланта, большой интерес представляет возможность регенерации растений из каллусной ткани. Это связано с тем, что соматклоны, полученные из каллуса, могут иметь измененные морфологические признаки, представляющие интерес для селекционеров; кроме того, данный способ позволяет значительно увеличить коэффициент размножения. В результате исследования установлено, что наиболее интенсивный каллусогенез отмечался в вариантах с использованием 1 мкл/л Рибав-Экстра – 40%.

Таким образом, размножение *N. hybridus* методами *in vitro* способствует более полной реализации морфогенетических потенций этого декоративного растения. Выявленные закономерности могут быть использованы при выращивании данного сорта в культуре *in vitro*.

МОХОВ В.В., ФОМИЧЕВА Е.В.

ООО «ГРИНТЕК», Москва, Россия

ИНОВАЦИОННЫЕ БИООРГАНИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ РАСТЕНИЕВОДСТВА

В настоящее время человечество переживает сложный период развития. Одной из основных глобальных проблем, требующих безотлагательного решения является дефицит продовольствия. Борьба с голодом, обеспечение продовольственной безопасности, доступности продовольствия, повышение жизненного уровня беднейших слоев населения и устойчивого развития рассматриваются на самом высоком уровне ФАО и ООН.

Одним из путей решения данной проблемы является разработанная ФАО инициатива «Greening the Economy with Agriculture (GEA)», призванная обеспечить устойчивое развитие при помощи «зеленых» технологий в сельском хозяйстве.

Использование результатов новейших биотехнологических разработок в значительной мере могут способствовать созданию экологически чистых высокопродуктивных технологий производства продуктов питания и решения проблем голода в различных регионах.

Длительный опыт нашей научно-производственной компании дает нам основания полагать, что мы нашли одно из возможных решений, которое может снизить напряжение в сфере продовольственной безопасности.

Компания «ГРИНТЕК» занимается разработкой технологий переработки различных органических отходов с целью их утилизации и использования в качестве сырья для получения продуктов с высокой добавленной стоимостью.

Новые подходы к реализации процесса микробиологической переработки органического сырья и ряд примененных аппаратных и технологических новшеств, позволили в значительной степени интенсифицировать процесс, увеличить степень конверсии органического вещества и привели к созданию инновационной технологии микробиологического синтеза новых, уникальных по своим свойствам биоорганических препаратов для сельского хозяйства. (PCT публикация WO 2011/084085 A1).

К настоящему времени компанией «ГРИНТЕК» разработаны и готовы к широкомасштабному внедрению следующие препараты:

- для предпосевной обработки семян, клубней, луковиц - «Прорастин»;
- для внекорневых подкормок - «Полистин».

Представляемые препараты сочетают в себе свойства эффективного стимулятора роста и урожайности растений, антистрессового адаптогена и иммуномодулятора, обладают активностью против широкого спектра фитопатогенов и обеспечивают повышение качества и экологическую чистоту урожая, что подтверждено полевыми испытаниями в сезонах 2007-2011 годов на различных культурах.

Препараты являются уникальными продуктами, не имеющими конкурентов в мире по эффективности и соотношению цена-качество.

Высокая эффективность препаратов обусловлена их уникальным составом. Оба препарата содержат в своем составе значительные количества фитогормонов естественного происхождения (ауксинов, гиббереллинов, цитокининов) в сочетании с гуминовыми и фульво-кислотами, а также природными веществами, обладающими бактерицидными свойствами, и комбинацию штаммов ризосферных микроорганизмов – антагонистов фитопатогенов.

Технологии производства препаратов реализованы на промышленном уровне. Процесс переработки непрерывный, полностью автоматизированный, легко масштабируемый. Установки работают на местном возобновляемом сырье. Изготовление установки и ее монтаж занимают не более 0,5 года.

Пример расчета экономической эффективности при обработке семян яровой пшеницы «Прорастином».

Требуемое количество препарата на 1 га	50 мл
Дополнительные затраты на 1 га	30 рублей
Прибавка урожайности (минимальная, принятая для расчетов) на 1 га	150 кг
Стоимость дополнительного зерна при цене 3000 руб/т	450 рублей
Эффективность вложений, руб./руб. затрат	15 : 1

Действующее производство в Нижегородской области производительностью 0.5 т/сутки, может закрыть потребности в препарате для предпосевной обработки семян («Прорастин») на территории 3 млн. га и обеспечить прибавку к валовому урожаю не менее 500 000 т. Затраты на это составят 21 млн. руб., а стоимость дополнительного урожая - минимум 315 млн. руб. Представляется рациональным размещение по крайней мере 1 установки в любом сельскохозяйственном районе.

Применение препаратов в сельском хозяйстве позволит в значительной степени решить проблемы продовольственной безопасности и обеспечить устойчивого развития, повысить урожайность, экологическую чистоту и качество продукции.

МУРОМЦЕВ А.Б., ЗАВОДЧИКОВА Р.А.

ФГБОУ ВПО «Калининградский государственный технический университет»,

Калининград, Россия

ГОЛШТИНИЗАЦИЯ КАК МЕТОД ПОВЫШЕНИЯ МОЛОЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Молочное скотоводство - одна из основных отраслей сельского хозяйства Калининградской области. Большая часть крупного рогатого скота в области относится к черно-пестрой породе. Данная порода отличается относительно низкими продуктивными качествами.

Повышение генетического потенциала животных возможно путем проведения работ по созданию в Калининградской области высокопродуктивного стада с использованием специализированного генофонда скота молочного направления. Для этих целей рекомендуется использовать генофонд крупного рогатого скота голштинской породы.

Голштинизированный скот характеризуется более высокой интенсивностью роста и развития по сравнению с чистопородными животными. Они превосходят чистопородный черно-пестрый скот по среднесуточному приросту в среднем на 200 грамм.

С повышением кровности животные приобретают ярко выраженный молочный тип, свойственный улучшающей породе. Самыми высокими показателями продуктивности отличаются животные с кровностью 75 % по улучшающей породе. Так, у поместного на 75 % по голштинской породе скота наблюдается повышение удоя на 500 кг в сравнении с чистокровными сверстницами.

Еще одним фактором повышения продуктивности стада являются условия содержания и кормления животных. При существующих условиях содержания и

кормления в Калининградской области у помесных животных с повышением кровности падает резистентность и повышается вероятность заболевания инфекционными болезнями.

Наиболее высокой резистентностью обладает скот с кровностью по улучшающей породе до 63 %. Но при соблюдении требований содержания и качественном кормлении эта проблема становится менее значимой.

Таким образом, для повышения продуктивности молочного животноводства в Калининградской области необходимо создавать голштинизированное стадо с помесью от 63 до 75% по улучшающей породе с одновременным проведением мероприятий по улучшению условий содержания животных.

МУТТАР А.А.¹, ФИНОГЕНОВ А.Ю.², ФИНОГЕНОВА Е.Г.²,
ПОТАПЧЕНКО А.А.², ПОТАПОВИЧ М.И.¹, ПРОКУЛЕВИЧ В.А.¹

¹Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

²Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского,
Минск, Республика Беларусь

ПОЛУЧЕНИЕ ЛОШАДИНОГО РЕКОМБИНАНТНОГО α_2 -ИНТЕРФЕРОНА КАК ОСНОВА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ ВЕТЕРИНАРНЫХ ПРЕПАРАТОВ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

В последние годы уделяется много внимания неспецифической резистентности организма животных. Немаловажную роль в этом играют интерфероны (ИФН), осуществляющие широкие контрольно-регулирующие функции, важнейшими из которых являются антивирусная, иммуномодулирующая и антипролиферативная.

Лошади в большой степени подвержены заболеваниям инфекционного и неинфекционного характера. К числу инфекционных вирусных заболеваний лошадей относятся: лошадиный грипп, ринопневмония, инфекционная анемия, вирусный артрит, энцефаломиелиты, африканская чума, бешенство, оспа и др. Есть большие проблемы и с иммунодефицитными состояниями у лошадей. Многовековая селекция различных пород не велась с учетом усиления иммунной системы, а наоборот: развитие желаемых

качественных и количественных признаков имело обратную корреляцию с развитием защитных противоинфекционных и антистрессовых механизмов.

Таким образом, задача разработки ветеринарных препаратов обладающих выраженной антивирусной и иммуностимулирующей активностями весьма актуальна для коневодства.

В ходе работы ген лошадиного лейкоцитарного α_2 -интерферона с использованием сконструированных специфических праймеров амплифицирован методом ПЦР на матрице тотальной ДНК, выделенной из лошадиной крови. Полученная последовательность клонирована в составе вектора экспрессии pET24b(+) в клетках *E. coli* BL21 (DE3) После индукции ИПТГ в бактериальных клетках наблюдался высокий уровень накопления лошадиного α_2 -интерферона. Белок накапливался внутри клеток в виде так называемых «тельца включения».

Бактериальные клетки разрушали на проточном дезинтеграторе типа «френч-пресс» и тельца включения собирали центрифугированием. Отмытые тельца включения растворяли в буфере с гуанидингидрохлоридом и мочевиной, после чего проводили хроматографию на колонке с диэтил-аминоэтил целлюлозой. Дальнейшую очистку осуществляли с помощью ионообменной хроматографии на Q-сефарозе. По данным ВЭЖХ полученный раствор содержал более 97% мономеров лошадиного α_2 -интерферона. Антивирусную активность очищенного белка, которая составила $1,6 \times 10^9$ МЕ/мг, определяли с использованием клеток линии MDBK и вируса везикулярного стоматита.

На следующем этапе работы были проведены испытания полученного рекомбинантного интерферона на животных, в ходе которых оценивались такие показатели, как бактерицидная и лизоцимная активность сыворотки крови до и после инъекции. Было сформировано 4 группы по пять лошадей в каждой (три опытных группы и контрольная, средняя масса тела около 500 кг). Лошадям 1, 2 и 3 опытных групп вводили внутримышечно по 1 мл/100 кг массы тела α_2 -интерферона лошадиного рекомбинантного в концентрации $1,6 \times 10^6$ МЕ/мл, $4,8 \times 10^6$ МЕ/мл и $1,2 \times 10^7$ МЕ/мл, соответственно. Биохимические показатели крови измеряли до инъекции и затем через 6, 12, 24 и 48 часов.

Полученные результаты показывают, что бактерицидная активность сыворотки крови (БАСК) во всех опытных группах лошадей через 6 часов после введения незначительно увеличивается (на 7-10 %), через 12 часов во всех группах наблюдается

резкое увеличение БАСК (на 30-40 %, наибольший показатель в 3 группе), через 24 часа БАСК остается повышенной, а через 48 часов начинается ее постепенное снижение.

Что касается лизоцимной активности сыворотки крови (ЛАСК), то во всех опытных группах лошадей через 6 часов после введения наблюдается резкое повышение (на 40-60 %), через 12 часов во всех группах кроме первой лизоцимная активность продолжает повышаться (максимально в третьей группе - на 72% от первоначального уровня), через 24 часа в первой группе она остается на прежнем уровне, во второй продолжает повышаться, в третьей наблюдается незначительное снижение, а через 48 часов во всех группах ЛАСК снижается, но не доходит до первоначального уровня.

Таким образом, можно сделать вывод, что в результате инъекции лошадям лошадиного рекомбинантного α_2 -интерферона наблюдается резкое и достоверное увеличение основных биохимических показателей крови, влияющих на борьбу организма с инфекциями (БАСК и ЛАСК). В дальнейшем планируется оценить эффективность применения лошадиного рекомбинантного α_2 -интерферона в лечении конкретных заболеваний лошадей.

МУХАМЕДШИНА Я.О.¹, ШАЙМАРДАНОВА Г.Ф.², ЧЕЛЫШЕВ Ю.А.¹

¹ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет», Казань, Россия

²ФГБУН Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, Казань, Россия

УСИЛЕНИЕ МИГРАЦИИ МИЕЛИНОБРАЗУЮЩИХ ШВАННОВСКИХ КЛЕТОК В ОБЛАСТЬ ТРАВМЫ СПИННОГО МОЗГА КРЫСЫ ПРИ ГЕННО-КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ

Шванновские клетки играют важную роль в регенерации аксонов периферической нервной системы. На модели контузионной травмы спинного мозга у крысы показано, что к концу второй и четвертой неделям после повреждения в процессе ремиелинизации аксонов участвуют не только олигодендроциты, но и шванновские клетки (Keirstead H.S. et al, 2005; Шаймарданова Г.Ф. и др., 2011). В связи с возможностью участия шванновских клеток как в ремиелинизации центральных аксонов (Jasmin L. et al, 2000), так и в восстановлении проводимости (Franklin R.J. et al, 1999) привлечение наибольшего

количества данных клеток в область демиелинизации – один из подходов к стимулированию регенерации спинного мозга.

Цель исследования – оценить влияние локальной доставки моноклеарных клеток крови пуповины человека, трансфицированных генами *vegf* и *fgf2*, на миграцию эндогенных миелинообразующих шванновских клеток в область контузионной травмы спинного мозга крысы.

Эксперименты проведены на 40 белых лабораторных крысах, самках и самцах весом 200–250 г. Животным всех групп проводили ламинэктомию на уровне T8, после чего наносили дозированную контузионную травму спинного мозга (Шаймарданова Г.Ф. и др., 2011). Сразу после нанесения травмы животным вводили трансфицированные генами *vegf* и *fgf2* моноклеарные клетки крови пуповины человека по 1 млн в 5 мкл DPBS (БиолоТ) в 2 точки на расстоянии 1 мм роstralнее и каудальнее эпицентра травмы и 0,5 мм латеральнее срединной линии при помощи гамильтоновского шприца (опытная группа). Крысам контрольной группы с аналогичной операцией трансплантацию клеток не производили.

На криостатных поперечных срезах спинного мозга толщиной 20 мкм иммунофлуоресцентным методом идентифицировали эндогенные миелинообразующие шванновские клетки с антителами против белка периферического миелина P0 (Abcam). На аналогичных срезах на расстоянии 0,5–2 см каудально и роstralно от эпицентра травмы непрямым иммунопероксидазным методом выявляли экспрессию, поддерживающего миелинизацию шванновских клеток, фактора транскрипции Krox20 (Covance). Просмотр препаратов и оцифровку изображений проводили на световом микроскопе Axio Imager A1 (Carl Zeiss) и конфокальном сканирующем микроскопе LSM 510-Meta (Carl Zeiss).

К 30 суткам в контрольной и опытной группах на расстоянии до 2 см в роstralном и каудальном направлении от эпицентра травмы выявлены миелинообразующие шванновские клетки, экспрессирующие специфические маркеры. У животных опытной группы в белом веществе боковых канатиков на расстоянии 1 см в каудальном направлении от эпицентра травмы обнаружено значительное количество клеток, экспрессирующих белок периферического миелина P0. Krox20⁺-клетки присутствуют в сером и белом веществе на протяжении от 0,5 до 1,5 см роstralно и каудально от эпицентра травмы. В сером веществе на расстоянии 2 см эти клетки не найдены.

Стабильная по численности популяция Krox20⁺-клеток присутствует в задних канатиках на участке протяженностью до 2 см в обоих направлениях от эпицентра травмы. При трансплантации клеток, трансфицированных генами *vegf* и *fgf2*, количество Krox20⁺-клеток в белом веществе на расстоянии 1 см роstralно и каудально от эпицентра травмы увеличивается соответственно на 58,5% и 63,5% по сравнению с аналогичным показателем в контрольной группе животных без введения клеток. Появление численно большей популяции эндогенных миелинообразующих шванновских клеток в области травмы спинного мозга можно рассматривать как благоприятный фактор стимулирования нейрорегенерации при трансплантации моноклеарных клеток крови пуповины человека, трансфицированных плазмидой с генами *vegf* и *fgf2*.

МУХАМЕТВАФИНА А.А., АХМЕТОВА А.Ш.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Ботанический сад-институт Уфимского научного центра Российской академии наук,

Уфа, Башкортостан, Россия

ОСОБЕННОСТИ МОРФОГЕНЕЗА *STEMMACANTHA SERRATULOIDES* (GEORGI) M. DITTRICH. В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Одной из задач ботанических садов является сохранение биоразнообразия растений. Многие лекарственные виды практически не встречаются в естественных местах произрастания из-за усиления антропогенной нагрузки и изменения экологических условий. Такие растения, представляющие собой ценный генетический ресурс, сохраняют *ex situ* в ботанических коллекциях открытого грунта. Часто лекарственные виды в коллекциях представлены в единичных экземплярах и требуют создания особых условий содержания. Весьма перспективным представляется создание дублирующих коллекций лекарственных растений с помощью метода культуры *in vitro*.

В последние годы возрос интерес к представителям рода *Stemmacantha* как к перспективным источникам фитоэкидистероидов. Появились сведения о высоком содержании в надземных и подземных органах *Stemmacantha serratuloides* экидистероида – 20Е.

S. serratuloides относится к редким и исчезающим видам и включен в ряд региональных Красных книг: «Красная книга Республики Алтай» (1996), «Красная книга Курганской области» (2002), «Красная книга Челябинской области» (2005), «Красная книга Омской области» (2006). В «Красную книгу Республики Башкортостан» (2001) вид включен с категорией редкости II – уязвимый.

Учитывая ограниченные природные запасы и сложность его размножения семенами (лабораторная всхожесть составила 4-13%), возникает необходимость разработки методов сохранения *S. serratuloides*. Особое значение при этом отводится методу клонального микроразмножения.

Цель данной работы – выявить генетические потенции *S. serratuloides* к морфогенезу в условиях *in vitro* и оптимизировать условия их реализации.

Для индукции морфогенеза *in vitro* использовали фрагменты стерильного четырехнедельного проростка: семядоли, черешки семядолей, настоящий лист, гипокотиль с семядольным узлом и корни, и зародыши, вычлененные из семян восковой спелости.

Отработаны этапы клонального микроразмножения *S. serratuloides*. Этап эксплантации разработан с учетом особенностей биологии семян и жизненной формы *S. serratuloides*. В условиях *in vitro* для *S. serratuloides* характерны каллусогенез и геммогенез. *S. serratuloides* образует каллус на различных эксплантах проростка. Интенсивный каллусогенез и большой объем морфогенной каллусной ткани формируется преимущественно на базальной части гипокотыля и на корнях. Геммогенез проявлялся в виде активации пазушных почек из семядольных узлов и образования адвентивных почек на базальных срезах корешков и гипокотыля. Регенерация побегов происходила на питательной среде, содержащей цитокинины (БАП, кинетин) и ауксины (ИУК) в соотношениях 1:1:1. Наибольшая частота регенерации наблюдалась на эксплантах корней.

При введении зародыша на искусственную питательную среду происходит его дальнейший рост и один зародыш продуцирует только одно растение. Однако на определенных питательных средах у зародыша можно индуцировать прямой или непрямым соматический эмбриогенез, что увеличивает коэффициент размножения в несколько раз и ускоряет сам процесс размножения.

В результате поставленного эксперимента было выяснено, что определяющим условием индукции прорастания эмбриоидов являлся состав питательной среды, на которой был получен первичный каллус.

Выявлено, что в культуре изолированных зародышей, успешное каллусообразование и индукция прорастания эмбриоидов достигается при культивировании зародышей на свету и на питательной среде, содержащей БАП 1,0 мг/л + кинетин 1,0 мг/л + ИУК 1,0 мг/л; БАП 1,0 мг/л + НУК 0,5 мг/л.

S. serratuloides можно отнести к легко укореняемым видам. Укоренение регенерированных розеточных побегов наблюдали на питательной среде MS, содержащей ИУК в концентрации 0,2 мг/л.

МУХАМЕТЗЯНОВА А.Д., МАРЕНОВА И.И., ШАРИПОВА М.Р.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

ВЛИЯНИЕ ИНАКТИВАЦИИ ГЕНА ФИТАЗЫ НА ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТЬ ШТАММА *BACILLUS SUBTILIS*

Фитиновая кислота является резервуаром неорганического фосфора, который потенциально может быть использован микроорганизмами, растениями и животными, поэтому высвобождение фосфатов, связанных с молекулой фитиновой кислоты является важным процессом для многих организмов. Ферменты, обладающие способностью гидролизовать фитат, в течение последних лет привлекают особое внимание ученых и биотехнологов. Но на сегодняшний день изучение фитаз в основном направлено на их использование в коммерческих целях, тогда как информация о роли фермента *in vivo* практически отсутствует.

Одним из подходов определения функции исследуемого гена является его инактивация, позволяющая определить физиологическое значение продукта гена для микробных клеток. Инактивация генов дает возможность создавать биологические модели для выяснения функциональной значимости ферментов. Целью исследования является характеристика штамма *Bacillus subtilis* с нокаутированным геном фитазы.

Штамм *B.subtilis* dphy с инактивированным геном фитазы получен на основе штамма *B.subtilis* 168, в геноме которого гомологичной рекомбинацией нарушена рамка считывания гена фитазы встраиванием гена устойчивости к эритромицину.

Морфологию клеток анализировали микроскопированием: клетки мутантного и дикого штаммов - грам-положительные палочки, однако, колонии рекомбинантного штамма изменили форму – стали более округлыми и выпуклыми, но более мелкими, в отличие от колоний дикого штамма – плоских, неправильной формы и среднего размера. Данные динамики роста бактерий свидетельствуют о замедлении роста модифицированного штамма по отношению к исходному: характер динамики роста сохраняется, однако уровень накопления биомассы в среднем снижается на 40%. В условиях кислой рН среды (5.0), уровень накопления биомассы понизился в среднем на 35% у обоих штаммов, тогда как при щелочном значении рН (9.0) мы наблюдали практически полное ингибирование роста модифицированного штамма, а уровень накопления биомассы исходного штамма снижался в среднем на 38%. Ответ на культивирование в условиях повышенной температуры (43°С) выражался в ингибировании роста модифицированного штамма на 63%, а исходного – на 46%. Фосфатное голодание практически полностью ингибировало рост обоих штаммов.

Таким образом, нами установлены морфологические изменения модифицированного штамма по сравнению с исходным. Модифицированный штамм стал более чувствительным, что явилось следствием изменения динамики роста и ответа на стрессовые условия.

Работа выполнена при финансовой поддержке федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг и гранта РФФИ 12-08-00942а.

МУХАМЕТЗЯНОВА А.Д., МАРЕНОВА И.И., ШАРИПОВА М.Р.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И СВОЙСТВА ФИТАТ-ГИДРОЛИЗУЮЩЕГО ФЕРМЕНТА *P. AGGLOMERANS*

Из почв республики Татарстан нами были выделены бактерии, относящиеся к роду *Pantoea* и обладающие высокой фитазной активностью. Показано, что бактерии рода *Pantoea* избирательно отщепляют фосфаты у третьего атома углерода в инозитольном кольце, с образованием мио-инозитол(1,2,4,5,6) пентафосфата. Использование изолированных нами энтеробактерий представляет собой качественно новый этап в промышленном получении изомеров мио-инозитол фосфатов. Проводили HPLC-анализ культуральной жидкости на 5-ый день культивирования бактерий, который показал наличие в среде инозитол-пентафосфатов. Отщепление одного фосфата от молекулы фитата возможно лишь ферментативным путем, следовательно, это говорит о наличии фитат-гидролизующего фермента в системе.

Для получения внутриклеточного экстракта *P.agglomerans* был выбран 18 час культивирования клеток, приходящиеся на начало стационарной фазы роста культуры. Для разрушения клеток использовали метод замораживания-оттаивания с последующим добавлением лизоцима и ультразвуковой обработкой. Для выделения внутриклеточной фитазы *P.agglomerans* использовали ионообменную хроматографию на КМ-целлюлозе. Изучали свойства частично очищенного препарата фитазы. рН-оптимум фермента в 100 мМ Na-ацетатном буфере соответствует значению 4.5. Белок стабилен в интервале рН от 2.0 до 5,5.

Работа выполнена при финансовой поддержке федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг и гранта РФФИ 12-08-00942а.

МУЧКАЕВА И.А., ДАШИНИМАЕВ Э.Б., ДАВЫДОВА Д.А.,

ТЕРСКИХ В.В., ВАСИЛЬЕВ А.В.

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

ПОЛУЧЕНИЕ ИПСК ИЗ КЛЕТОК АМНИОТИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ ЧЕЛОВЕКА

Соматические клетки могут быть репрограммированы до плюрипотентного состояния посредством эктопической экспрессии в них факторов репрограммирования Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc. Исследование индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) связывают с изучением механизмов, работающих в раннем развитии. В прикладном аспекте иПСК могут быть полезным источником при разработке лекарственных препаратов, а также для нужд регенерационной медицины. В качестве исходной культуры были использованы стволовые клетки амниотической жидкости человека (СК АЖ) ввиду их доступности (клетки получают для пренатальной генетической диагностики), а также исходя из данных литературы о большей эффективности репрограммирования СК АЖ в сравнении с клетками, выделенными из тканей взрослого организма. Цель работы заключалась в получении и характеристике иПСК из СК АЖ человека. СК АЖ были трансфицированы лентивирусными векторами, несущими гены транскрипционных факторов Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc. Уже на 6-е сутки после инфицирования мы наблюдали появление колоний с отличной от исходной культуры морфологией. Через 2 недели нам удалось выделить несколько Tra-1-60-положительных клонов, что предполагает приобретение ими плюрипотентного статуса. С помощью иммуноцитохимического анализа было выявлено, что исследуемые колонии клеток экспрессировали транскрипционные факторы плюрипотентности: OCT4, SOX2, NANOG, а также поверхностные антигены SSEA-3, SSEA-4, Tra-1-60, Tra-1-81. Все клоны были положительны по экспрессии щелочной фосфатазы – одного из маркеров плюрипотентного статуса клеток. ОТ-ПЦР-анализ показал наличие транскриптов генов, играющих важную роль в раннем эмбриогенезе. Полученные клоны способны образовывать эмбриоидные тельца.

МЫРЗАГУЖИНОВА Д.К., БЕПЕЕВА А.Е., КАБДЕНОВА А.Т.
*Семипалатинский государственный университет имени Шакарима,
Семей, Казахстан*

ЗНАЧЕНИЕ БИФИДОФЛОРЫ ДЛЯ ЗДОРОВЬЯ ЧЕЛОВЕКА

Бифидобактерии (род *Bifidobacterium*) – обязательная и доминирующая микрофлора кишечника здорового человека, особенно детей, находящихся на грудном вскармливании.

В последние годы бифидобактерии широко используются во всем мире для лечения и профилактики различных желудочно-кишечных заболеваний, в т.ч. различных дисбактериозов, лечения ОРЗ, как активное средство повышения иммунитета и др.

Многочисленными исследованиями установлено, что лечебно- профилактический эффект как медицинских препаратов, так и пробиотических молочных продуктов находится в прямой зависимости от содержания в них активных (жизнеспособных) клеток бифидобактерий.

Поскольку коровье молоко не является оптимальной средой для развития бифидобактерий, вопрос активизации размножения этих бактерий при производстве пробиотических молочных продуктов (кефира, йогуртов, ряженки, сметаны и др.) является весьма актуальным. Особенно злободневным является вопрос сохранения жизнеспособности бифидобактерий в кисломолочных продуктах в процессе их хранения, т.к. в кислой среде эти бактерии быстро теряют свою активность.

Известно, что в процессе жизнедеятельности человека, на его организм и здоровье оказывают влияние множество различных факторов. Одним из важнейших таких факторов является окружающая среда, неблагоприятные воздействия которой препятствуют нормальному росту и развитию детей, провоцируют развитие многих заболеваний у взрослых. Не менее серьезным фактором является отсутствие здорового и сбалансированного в пищевом и биологическом отношении питания. В этой связи особого внимания заслуживает вопрос о поддержании микробиологического равновесия в желудочно-кишечном тракте как важнейшего защитного фактора в организме человека.

О положительном влиянии бифидофлоры на организм человека указывает ряд отечественных и зарубежных авторов. По их мнению, физиологическая роль бифидофлоры обусловлена её защитной и синтетической функциями.

Бифидобактерии препятствуют развитию условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, увеличивая неспецифическую резистентность организма хозяина к инфекционным заболеваниям.

Полезные для организма свойства бифидобактерий обусловлены также следующими ниже перечисленными факторами:

Летучие жирные кислоты, секретируемые бифидобактериями, могут действовать как перистальтические стимуляторы, что помогает здоровому функционированию толстой кишки.

Бифидобактерии способны вовлекать в метаболизм аммонийные ионы, что может повлиять на перемещение аммония из потока крови в толстую кишку. Этот пункт важен для больных циррозом печени.

Характерно, что бифидобактерии разрушают и предотвращают образование в кишечнике вредных продуктов обмена других микроорганизмов - индола, скатола, фенолов, а также аминов, обладающих канцерогенным действием. Обменную активность кишечных бактерий исследователи приравнивают к деятельности печени.

Ферментируя «сахара», бифидобактерии создают в кишечнике кислую среду, которая улучшает всасывание в кровь кальция, железа, а также витамина Д.

Бифидобактерии активно синтезируют в организме целый ряд витаминов. Кроме витаминов эти микроорганизмы являются активными поставщиками некоторых незаменимых аминокислот, используя в синтезе в качестве источника азота аммиак.

В силу того, что бифидобактерии выполняют ряд важных функций в организме человека, целесообразно включать их в состав кисломолочных продуктов функционального назначения, в т.ч. для питания детей школьного возраста.

МЯСОЕДОВА В.В.

ООО «Инжиниринговая компания ГРАНТЕК», Москва, Россия

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА ТОПЛИВНЫХ БРИКЕТОВ И ПЕЛЛЕТ НА ОСНОВЕ ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗНОГО СЫРЬЯ

Нами разработаны и запатентованы рецептуры и технологии для производства топливных пеллет, гранул, брикетов (как на основе воспроизводимого сырья, например, опилок и других отходов лесохимической и деревообрабатывающей промышленности, отходов ЦБК, однолетних растений агропромышленного комплекса, так и любых углеродсодержащих соединений - угля, торфа, отходов нефтепереработки): ЕР 1090095 и NO nr320094.

Особенности лигноцеллюлозных композитов предлагаемых составов, содержащих многофункциональные пластифицирующихся компоненты, открывают возможности совершенствования производства: снизить энергозатраты и значительно увеличить эффективность и технологичность на всех технологических стадиях переработки сырья.

В настоящее время осуществляется проведение комплексной опытно-промышленной апробации новых рецептур топливных брикетов (и пеллет), идет подготовка к тиражированию разработанных технологий на предприятиях.

Предлагаемые композиции для производства брикетированного и пеллетированного топлива обладают преимуществами:

- улучшается перерабатываемость возобновляемого сырья,
- снижение энергозатрат, вследствие снижения давления при прессовании и «подсушивающего эффекта» исходного сырья,
- повышение прочности (и снижение крошимости) брикетов и пеллет,
- улучшение блеска поверхности и в ряде составов повышение белизны их окраски,
- повышение значений плотности до 1,2 г/см³ и более,
- увеличение продолжительности горения (горит без выделения дыма, ровно),
- повышение теплотворной способности: тепловой эффект сгорания в 1,5 раза больше, чем у древесины и на уровне углей,

- в связи с низкой пожароопасностью удобны и хранение, и транспортировка (так как брикеты/гранулы обладают высоким значением насыпной массы); возможна автоматическая подача-загрузка в котел и автоматизация процесса получения тепловой энергии,

- отличаются экологической чистотой,

- многофункциональность и возможность использования для сжигания в котлах коммунально-бытового и производственного назначения, в энергетических установках тепловых и электрических станций, или, например, из тепловой в электрическую. Отапливать жилье и производственные помещения брикетами/пеллетами примерно в 3,5 раза дешевле, чем электричеством.

НАЗАРОВА А.А., ПОЛИЩУК С.Д.

Рязанский государственный агротехнологический университет имени П.А. Костычева,

Рязань, Россия

ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ЖИВОТНЫХ ПРИ ДОБАВЛЕНИИ В РАЦИОН НАНОЧАСТИЦ КОБАЛЬТА

В последнее десятилетие активно развивается индустрия биопрепаратов на основе различных биогенных наноматериалов, в том числе металлов. Одним из стимуляторов роста и активизации обменных процессов в организме являются биологически активные добавки в виде нанопорошков металлов. Отличительной особенностью нанопорошков является способность активизировать физиологические и биохимические процессы при использовании в очень малых дозах. Широкое применение нанопорошков металлов может явиться одним из путей успешного развития животноводства.

Наибольшей биологической активностью обладают нанопорошки, активными компонентами, которых являются железо, кобальт, медь, марганец и другие микроэлементы в наноразмерном состоянии. Проведенные в последние годы исследования, показали их эффективность в растениеводстве, кормопроизводстве и животноводстве.

На базе Центра нанотехнологий и наноматериалов для АПК (Рязанский государственный агротехнологический университет им. П.А. Костычева) были проведены широкомасштабные исследования по изучению влияния наночастиц биогенных металлов на процессы метаболизма в организме животных.

Целью проведенного исследования стало изучение влияния наночастиц кобальта при скармливании животным на показатели иммунной системы.

В лабораторных условиях кроликам породы «Советская шиншилла» в рацион включали нанопорошок кобальта в оптимальной концентрации (0,02 мг на кг живой массы в сутки). На протяжении 180 дней было проанализировано общее физиологическое состояние животных, а также показатели иммунитета в крови.

Биохимические показатели крови полностью отражают метаболизм белков, жиров, углеводов, витаминов, гормонов, водно-минеральные характеристики организма. Они позволяют интерпретировать рост и развитие организма, помогают выявить скрытые формы заболевания.

Результаты исследований показали, что на протяжении опыта наблюдалось повышение содержания лейкоцитов на 5,1%, и перестройка в лейкоцитарной формуле: увеличилось количество лимфоцитов на 8% выше контроля, и на 11% по сравнению с началом опыта. Данные изменения подтверждают повышение иммунной системы животного организма, так как основная функция В-лимфоцитов состоит в выработке антител или защитных иммуноглобулинов. Повышение содержания лимфоцитов вызвало заметное снижение гранулоцитов, а в частности нейтрофилов – на 9% ниже контроля. Увеличение содержания лимфоцитов в лейкоцитарной формуле доказывает усиление защитных функций организма. Под действием наночастиц идет рост и обновление клеток крови, усиливаются окислительные процессы и это является одним из критериев диагностики и оценки безопасности наноматериалов.

Содержание общего белка в крови опытных животных не изменилось, но повысилось количество γ -глобулинов на 7%, повышающих защитную систему организма, что вызвало снижение других белковых фракций. За счет увеличения γ -глобулинов по сравнению с контролем, повышается и иммунобиологическая реактивность, так как они являются защитными антителами (иммуноглобулинами), и отвечают за специфический иммунный ответ.

Также при исследовании показателей иммунитета наблюдалось повышение Т-лимфоцитов (на 1,8%), Т-хелперов (на 15%), Т-киллеров (на 12%).

В качестве индикатора, отражающего воздействие наноматериалов на организм, может служить иммунная система – структурно и функционально организованная совокупность лимфоидных клеток, кооперативно взаимодействующих друг с другом и вспомогательными клеточными элементами на отдельных этапах иммуногенеза. Если учесть, что кобальт в нанодисперсном состоянии активизирует иммунную, ферментные и гуморальные системы организма, способствует повышению обмена веществ, лучшему перевариванию и усвоению питательных веществ рациона, то, следовательно, его можно использовать как биодобавку.

НАЗАРОВА А.А., ПОЛИЩУК С.Д.

*Рязанский государственный агротехнологический университет имени П.А. Костычева,
Рязань, Россия*

БЕЗОПАСНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НАНОПОРОШКА МЕДИ В КОРМЛЕНИИ ЖИВОТНЫХ

В настоящее время среди факторов, определяющих полноценность роста и развития растений и животных, большое значение имеют биологически активные вещества, в том числе на основе нанодисперсных микроэлементов. Они входят в состав жизненно важных соединений, участвуют в процессах синтеза и распада, всасывания и выведения веществ, создают благоприятную среду для нормального действия ферментов, гормонов и витаминов.

Целью данной работы стало обоснование возможности применения нанопорошка меди в кормлении животных, изучение действия препарата на биологические свойства опытных объектов и на соответствие нормам СанПин 2.3.2.1078-01 индекс 1.1.1. продуктов убоя.

Для введения препарата в рацион животных суспензией наночастиц меди (0,04 мг/кг живой массы в сутки) был обработан комбикорм. По завершении исследования через

12 месяцев был произведен убой контрольных и опытных животных и проведены исследования продуктов убоя. Ветеринарно-санитарный осмотр животных и продуктов убоя был проведен штатным ветеринарным врачом убойного цеха, по результатам которого был составлен протокол о вскрытии тел контрольных и опытных животных. В процессе ветеринарного осмотра контрольных и опытных животных, и продуктов убоя патологии не были обнаружены.

Перед убоем было проведено определение упитанности бычков (ГОСТ 5110-87). По результатам осмотра все бычки контрольной и опытной групп были отнесены ко второй категории упитанности.

Пробы, взятые от контрольных животных и животных, получавших с кормом нанопорошок меди, были проверены на соответствие требованиям СанПиН 2.3.2.1078-01 индекс 1.1.1. Проведенные исследования показали, что в мясе животных, получавших с кормом нанопорошок меди, содержание меди и тяжелых металлов (свинец, кадмий, мышьяк, ртуть), радионуклидов, пестицидов не превышает допустимых значений, антибиотики в мясе не обнаружены, микробиологические показатели соответствуют существующим стандартам. В целом, все показатели не превышают СанПиН 2.3.2.1078-01.

Результаты ветеринарно-санитарной экспертизы позволяет сделать вывод, что нанопорошки меди могут быть использованы как биологически активная добавка в рационах сельскохозяйственных животных.

НГУЕН ТХИ ЧАНГ

ФГАОУ ВПО «Южный федеральный университет», Ростов-на-Дону, Россия

**АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНЫХ МАРКЕРОВ
ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА
С РАЗВИТИЕМ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА У ЛИЦ ПОЖИЛОГО И
СТАРЧЕСКОГО ВОЗРАСТА РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ**

В XXI веке медико-биологические исследования с участием пожилых, старых людей и долгожителей признаны ООН необходимыми для выявления факторов, маркеров

риска и подходов к адекватной терапии возраст-ассоциированных заболеваний, разработки стратегии увеличения продолжительности жизни и улучшения ее качества в пожилом и старческом возрасте, поиска предикторов потенциального возраста дожития, а также для развития фундаментальных представлений о самом феномене старения. Исходя из этого научно-исследовательская работа представляет интерес как в теоретическом, так и прикладном аспектах.

Целью работы являлось исследование интенсивности системы свободно-радикального окисления крови, показателей структурно-функционального состояния мембран эритроцитов и распределения частот генотипов и аллелей полиморфных локусов генов-кандидатов у больных ишемической болезнью сердца в группах лиц пожилого и старческого возраста, проживающих в Ростовской области.

Материалы и методы исследования: В исследовании использовали метод биофизический: Хемилюминесцентный анализ в системе H_2O_2 – люминол для определения интенсивности свободных радикалов; Латеральная диффузия гидрофобного зонда пирена для определения функционального состояния мембран эритроцитов. Метод биохимический для определения: Интенсивности молекулярных продуктов перекисного окисления липидов, активности антиоксидантных ферментов и антиоксидантных белков, структурной организации мембран эритроцитов по показателям внеэритроцитарного гемоглобина и суммарной пероксидантной активности. Генетический метод для анализа полиморфизмов генов-кандидатов (T174M и M235T гена AGT; L28P гена APOE; C3238G гена APOC3; L33P гена ITGB3; C807T гена ITGA2; C786T гена eNOS и Q192R гена PON1 ишемической болезни сердца. Статистическая обработка результатов исследования проведена с использованием критерия Т-Стьюдента, хи-квадрат и отношения шансов при доверительном интервале 95%. Экспериментальные данные получены на 3-х возрастных группах пациентов больных ишемической болезнью сердца (300 человек) и когорте здоровых доноров (300 человек): 1-ая группа – пациенты в возрасте 30 - 44 лет (зрелый возраст); 2-ая группа - пациенты в возрасте 45 - 59 лет (средний возраст); 3-ья группа - пациенты в возрасте 60 - 89 лет (пожилой и старческий возраст).

Результаты научно-исследовательской работы:

При развитии ишемической болезни сердца у лиц пожилого и старческого возраста, проживающих в Ростовской области, повышает скорость продукции активированных

форм кислорода, уровень метаболитов оксида азота, интенсивность процессов перекисного окисления липидов в плазме крови и эритроцитах, снижает активность супероксиддисмутазы, каталазы в эритроцитах и увеличивает оксидазную активность церулоплазмينا в плазме крови и показано нарушение стабильности и структурной организации мембран эритроцитов усиливается с возрастом и характеризуется повышением микровязкости липидного бислоя, текучести зон белок-липидных контактов, увеличением уровня структурных перестроек мембранных белков и повышением полярности внутренних гидрофобных областей мембраны эритроцитов.

Обнаружено, что у жителей пожилого и старческого возраста манифестация ишемической болезни сердца ассоциирована с полиморфными маркерами T174M гена ангиотензиногена (AGT); L33P гена рецептора интегрин бета 3 (ITGB3); L28P гена аполипопротеина E (APOE); C3238G гена аполипопротеина C3 (APOC3) и C786T гена эндотелиальной синтазы окси азота (eNOS).

Выявленные полиморфизмы в генах, регулирующих гемостаз и эндотелиальную функцию - T174M гена AGT, L33P гена ITGB3, L28P гена APOE, C3238G гена APOC3 и C786T гена eNOS - у больных ишемической болезнью сердца пожилого и старческого возраста ассоциируются с развитием окислительного стресса и нарушением структурного гомеостаза мембран эритроцитов.

Выводы: Выявленные полиморфные маркеры в генах-кандидатах, регулирующих гемостаз и эндотелиальную функцию и ассоциированных с ишемической болезнью сердца в группе пожилого и старческого возраста Ростовской популяции, являются предикторами нарушения свободнорадикального и структурного (на примере мембран эритроцитов) гомеостаза, что приводит к развитию окислительного стресса.

НГУЕН ТХИ ЧАНГ¹, КОВАЛЕВА Н.С.²

¹Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

²Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону, Россия

РАЗРАБОТКА СПОСОБА ОЦЕНКИ РИСКА РАЗВИТИЯ ИНСУЛЬТА НА ОСНОВЕ ГЕНОМНЫХ МАРКЕРОВ

В последние десятилетия достигнуты впечатляющие успехи в области молекулярной генетики человека, позволившие от формального описания законов наследования перейти к полной расшифровке человеческого генома. Одной из актуальных проблем современного здравоохранения является выяснение молекулярно-генетических основ развития сосудистых заболеваний. В связи с этим нами предприняты попытка создания нового способа определения индивидуального генетического риска развития инсульта на основании анализа полиморфных ДНК маркеров жителей Ростовской области.

За время исследования была сформирована выборка больных острым ишемическим инсультом, в которую включены 156 человек. А также создана контрольная популяционная выборка из 124 здоровых доноров. Материалом исследования являлись пробы из периферической крови обследуемых. Высокая производительность молекулярно-генетического метода выявления полиморфных аллелей исследуемых генов у больных инсультом позволяет оценить большое количество полиморфизмов одновременно.

В результате исследования было установлена ассоциация полиморфных маркеров следующих генов-кандидатов с развитием острого нарушения мозгового кровообращения: Гены системы свертывающей крови (L33P гена ITGB3, C807T гена ITGA2, A20210G гена F2, A1691G гена F5); Гены, участвующие в метаболизме липидов (C3238G гена APOC3, L28P гена APOE, Q192R гена PON1, I495V гена CETP, V771M гена ABCA1); Гены, регулирующие артериальное давление и состояние сосудов (M235T гена AGT, C1166A гена AGTRI, C786T гена eNOS). Частоты генотипов, полученные в результате исследования, демонстрируют наличие ассоциации с инсультом исследованных генов. Проведен сравнительный анализ распределения ДНК маркеров разных типов у больных инсультом и в контрольной выборке с использованием различных методов математической статистики, в результате чего были выявлены наиболее информативные маркеры острого инсульта для ростовской популяции.

В рамках нашего исследования была создана панель маркеров больных острым инсультом и здоровых лиц из ростовской популяции с использованием технологии, позволяющей одновременно анализировать несколько сотен однонуклеотидных сайтов и участков генома с варьирующим числом копий. Разработанная тест-система и проводимая на ее основе генодиагностики будет способствовать снижению заболеваемости острым инсультом в Российской популяции за счет осуществления комплексной направленной профилактики у лиц с генетически обусловленным повышенным риском развития инсульта.

НЕГАНОВА М.Е, ПЕТРОВА Л.Н., ШЕВЦОВА Е.Ф.,
СЕРКОВ И.В., ПРОШИН А.Н.

Институт физиологически активных веществ РАН, Черноголовка, Россия

N-АРИЛ-(3-СЕЛЕНА-1-АЗАБИЦИКЛО[3.3.1]НОН-2-ИЛИДЕН)АМИНЫ – ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ НЕЙРОПРОТЕКТОРЫ

В последнее время химия селеноорганических соединений является одним из бурно развивающихся направлений элементарной органической химии. Исследованиями последних лет было показано, что селен является важным компонентом в функционировании многих биологических систем. Низкая концентрация селена в плазме является фактором риска при различных патологических процессах: рак, сердечно-сосудистые заболевания, остеоартрит. Особое значение селен имеет для функционирования мозга. Снижение содержания этого элемента наблюдается как при старении, так и при целом ряде нейродегенеративных заболеваний. В этой связи направленный синтез селеноорганических соединений представляет значительный интерес для создания потенциальных нейропротекторов.

Нами синтезированы новые бициклические изоселеномочевины в ряду арил-(3-селена-1-азабицикло[3.3.1]нон-2-илиден)амин и изучены их нейропротекторная и антиоксидантная активности.

Одним из наиболее вероятных механизмов действия селен-содержащих соединений считается их антиоксидантная активность. Изучение антиоксидантной активности

синтезированных селенсодержащих соединений проводили по их влиянию на перекисное окисление липидов в гомогенате мозга крыс, инициируемое ионами железа. Но в данном тесте синтезированные вещества в концентрации до 30 мкМ оказались неактивны.

В то же время, изучение влияния синтезированных бициклических соединений на глутамат-зависимый захват $^{45}\text{Ca}^{2+}$ в синапсомы коры мозга крыс показало, что они проявляют высокую ингибирующую активность. Так, для (3'-хлор-4'-метилфенил)-(3-селена-1-азабицикло[3.3.1]нон-2-илиден)амин $K_{\text{инг.}} = 5.6\%$, $\text{IC}_{50} = 34.7$ мкМ ($K_{\text{инг.}}$ – процент захваченного $^{45}\text{Ca}^{2+}$ в синапсомы коры мозга крыс от контроля, контроль – 100%) и находится на уровне соединений, применяемых для лечения болезни Альцгеймера, например, препарата Мемантин ($K_{\text{инг.}} = 8\%$, $\text{IC}_{50} = 22.9$ мкМ).

Таким образом, можно предполагать, что данные соединения могут представлять интерес для дальнейших исследований в качестве потенциальных нейропротекторов, снижающих эксайтотоксическую гибель клеток и стимуляторов когнитивных функций.

Работа выполнена при финансовой поддержке госконтракта по ФЦП № 14.740.11.0810, гранта по Программе Президиума РАН № 7, гранта РФФИ № 11-03-00863-а.

НЕЗГОВОРОВ Д.В.

Северный государственный медицинский университет, Архангельск, Россия

РАЗРАБОТКА ИММУНОФЕМНЕТНОЙ ТЕСТ СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К МЕЛАНОМЕ

Меланома развивается из меланоцитов клеток кожи, которые синтезируют меланин. Меланин это пигмент, определяющий цвет кожи человека. Опухоль может возникнуть в любом возрасте, начиная с подросткового. В последнее время отмечается рост заболеваемости меланомой. К сожалению это очень опасное злокачественное заболевание, которое с трудом поддается лечению и регулярно уносит жизни людей. Известно, что меланома относится к иммунозависимым заболеваниям, и на основании этого возможно определение антител к меланоме на начальной стадии заболевания.

Материалы и методы. Меланому получали при плановой операции у больных с установленным диагнозом меланомы, которую определяли гистологически по белку S-100 в Архангельском областном онкологическом диспансере. Вырезанную опухоль помещали в стерильную пробирку со средой RPMI-1640. В этот же день производим выделение клеток меланомы, освобождаем опухоль от остатков соединительной ткани, растираем через мелкое металлическое сито в охлаждённом фосфатном буфере, и фильтруем через четырёхслойную марлю. Клетки ферментативно, разрушаем рядом ферментов и выделяем участки, отвечающие за антигенные свойства. В результате был получен образец обладающий данными качествами. Полученный образец наносили на полистирольный иммуноферментный планшет и иммобилизовали в течение ночи при 4 °С. На утро трижды промывали фосфатным буфером, для блокировки мест связывания использовали 0,1% раствор бычьего сывороточного альбумина в течение 2 часов и трижды промывали фосфатным буфером.

В качестве контрольной группы использовалась кровь студентов 1-5 курсов, 1 и 2 группы здоровья (33 человека), в исследуемую группу вошли больные меланомой 24 человека со II стадией (T3N0M0). Кровь забирали в вакутейнеры без реагента, плазму получали путём центрифугирования образцов крови при 3000 об/мин в течение 10 мин.

Для проведения ИФА на иммобилизованный планшет вносили по 100 мкл плазмы крови и инкубировали при температуре 20-25 градусов в течение 1 часа, промывали лунки 300 мкл фосфатного буфера 5 раз. Вносили по 100 мкл вторичных антител меченных пероксидазой хрена. Использовали межвидовые поликлональные бараны антитела к иммуноглобулинам G и M производства НПЦ “МедБиоСпектр” г. Москва. Инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре, промывали 5 раз фосфатным буфером. Вносили по 100 мкл тетраметилбензидин (ТМБ) инкубировали в темноте в течение 30 мин, добавляли 2 Н раствор серной кислоты для остановки ферментной реакции. Считывали оптическую плотность при 450 нм в иммуноферментном риддере Anthos 2020 производства Швеция.

Полученные результаты. В результате было получено, что в группе больных меланомой оптическая плотность, при определении специфических иммуноглобулинов G к меланоме составило $0,242 \pm 0,11$, а определение специфических иммуноглобулинов M к меланоме оптическая плотность составила $0,198 \pm 0,09$.

Исследование контрольной группы на антитела к меланоме классов G и M оптическая плотность составила $0,13 \pm 0,08$ (специфические Ig G к меланоме) и $0,11 \pm 0,06$ (специфические IgM к меланоме).

Таким образом, было получено, что у больных меланомой происходило увеличение количества специфических антител к меланоме классов G и M. При этом оптическая плотность у больных меланомой специфических антител иммуноглобулина G была выше на 46% чем в контрольной группе. Оптическая плотность специфических иммуноглобулинов M была выше в группе больных меланомой на 44% относительно контрольной группы.

На основании проведённого исследования было получено, что у больных меланомой происходит накопление специфических антител классов G и M, этот факт может служить основанием для создания иммуноферментных тест систем для ранней диагностики и подтверждения диагноза меланома кожи.

НЕЧИТАЙЛО Г.С.

Институт Биохимической физики РАН, Москва, Россия

ПРОВЕДЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ В УСЛОВИЯХ КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА НА ОРБИТАЛЬНЫХ СТАНЦИЯХ

Специфические условия действия факторов космического полета являются для любого организма экстремальными, что вызывает его структурно функциональную перестройку, связанную с мобилизацией адаптационных возможностей. В экспериментах с культурами ткани гороха, пшеницы и арабидопсиса, проведенных на орбитальных станциях были выявлены изменения как в анатомо-морфологических структурах, так и в биохимическом составе.

В последующих исследованиях, объектами исследований были культуры ткани растений стевии (*Stevia rebaudiana*), картофеля (*Solanum tuberosum*), каллусная культура и клубнелуковицы шафрана (*Crocus sativus*), каллусная культура жень-шеня (*Panax ginseng*)

Эксперименты со стевией проводились в специальных камерах. Продолжительность эксперимента 8-14 суток. Освещение обеспечивалось бортовым

светильником . После окончания эксперимента растения доращивались в этой же камере, а в возрасте 50 дней пересаживались на ионообменную искусственную почву. Одновременно производились биохимические исследования полученного материала. Анализ количественного содержания гликозидов свидетельствует о существенном различии в суммарном содержании гликозидов и в соотношении стевиозида и ребаудиозида .

В последующих после полета поколениях, в растениях стевии, сохранялось увеличенное суммарное содержание стевиозида и ребаудиозида.

Эксперименты с каллусной культурой шафрана проводились в пробирках.. Продолжительность экспериментов от 8 до 167 суток. Освещение обеспечивалось бортовым светильником. В каллусах шафрана был обнаружен пигмент пикроцитин, которого не удавалось обнаружить в контрольных вариантах.

Культуру ткани жень-шеня выращивали в специальном контейнере , который помещался в термостат с температурой $22\pm 0,5\text{ C}^\circ$. Продолжительность экспериментов от 8 до 167 суток. . Пребывания в неспецифических для роста культуры условиях космического полета привело к увеличению биологической активности в 5 раз по сравнению с контролем. Эта тенденция сохранялась при культивировании клеток в наземных условиях в течении года.

Каллусная ткань картофеля также экспонировалась в пробирках и доставлялась в термостат с температурой $22\pm 0,5\text{ C}^\circ$. Продолжительность эксперимента 8 и 14 суток.

Количество регенерантов превышало наземные образцы в пять раз. Следует отметить, что в норме регенерация у этих сортов на земле довольно слабая.

Анализ приведенных результатов позволяет сделать вывод о роли микрогравитации и других факторов космического полета на направленность биологических процессов и показывает принципиальную возможность получения методом индуцированного морфогенеза новых форм биопродуцентов с повышенными потребительскими свойствами.

НИГМАТУЛЛИНА Л.Р., МИРСАЯПОВА И.А., ИШМУХАМЕТОВА А.Н.,

БАЙМИЕВ А.Х., МАВЗЮТОВ А.Р.

Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОБИОТЫ, АССОЦИИРОВАННАЯ С ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ (ХОБЛ)

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) - хроническое воспалительное заболевание, возникающее под воздействием различных факторов экологической агрессии (факторов риска), главным из которых является табакокурение, протекающее с преимущественным поражением дистальных отделов дыхательных путей и паренхимы лёгких, формирование эмфиземы, характеризующееся частично обратимым и необратимым ограничением скорости воздушного потока, индуцированное воспалительной реакцией, отличающейся от воспаления при бронхиальной астме и существующее вне зависимости от степени тяжести заболевания.

Необходима точная детекция бактерий, сопутствующих обострению ХОБЛ для правильного лечения пациента. Поэтому целью исследования являлась разработка новой быстрой, более информативной тест-системы для молекулярно-генетической детекции микроорганизмов при ХОБЛ с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Для достижения поставленной в нашем исследовании цели, произвели подбор олигонуклеотидных праймеров к специфическим консервативным последовательностям ДНК бактерий, сопутствующих обострению ХОБЛ - генам 16S рРНК, депонированных в международных банке нуклеотидных последовательностей EMBL/GenBank/DDBJ. Сравнительный множественный анализ, найденных последовательностей проводили с использованием программы «MegAlign». При подборе праймеров использовали программу «PrimerSelect» из пакета компьютерных программ «Lasergene» («DNASTAR, Ins.», США).

Испытание на ДНК, выделенных из чистых культур соответствующих бактерий, показало, что разработанные праймеры являются высокоспецифичными и чувствительными, что является важным фактором при лабораторной диагностике.

Были сравнены результаты бактериологического анализа от литературных данных с результатами проведенного ПЦР-анализа. Выявлено, что метод ПЦР более специфичен, точен и занимает мало времени (2-3 часа).

1. На основании сравнительного анализа с помощью множественного выравнивания последовательностей ДНК бактерий, зарегистрированного в международных базах данных генов EMBL./GenBank/DDBJ подобраны специфические олигонуклеотидные праймеры к консервативным последовательностям генов 16S рРНК таких микроорганизмов, как *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*.

2. Проверка специфичности и чувствительности разработанных праймеров на ДНК, выделенной из чистых культур данных бактерий, показала, что они пригодны для достоверной детекции бактерий в клиническом материале.

3. В ходе исследования больных ХОБЛ различной степени тяжести, нами были обнаружены такие грамотрицательные бактерии, как *Klebsiella pneumoniae* (у 76% обследуемых), *Pseudomonas aeruginosa* (у 26%), *Haemophilus influenzae* (у 56%), *Moraxella catarrhalis* (у 3,7%); грамположительные бактерии - *Streptococcus pneumoniae* (у 1,8%), *Streptococcus pyogenes* (у 70%), *Listeria monocytogenes* (у 24%).

Таким образом, разработанная тест-система пригодна для практического применения в бактериологических лабораториях, что позволит сократить время детекции и идентификации микроорганизмов, увеличить точность и специфичность анализов.

НИКИТИН В.А.

Институт Биофизики клетки РАН, Пуццино, Россия

ОСОБЕННОСТИ РАБОТЫ С ЕДИНИЧНОЙ КЛЕТКОЙ

Одно из важнейших условий работы с единичной клеткой – это необходимость минимизировать её повреждения при всех манипуляциях. Удерживание клетки в поле зрения микроскопа – один из важнейших обязательных этапов проведения микроопераций. Рассматриваются различные, порядка десяти, известные подходы и методы фиксации клетки для микрохирургии, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки.

Представлены новые оригинальные инструментальные методы работы с единичной клеткой, позволяющие свести к минимуму возможные повреждения и сохранить её целостность. К этим методам: удерживание клетки при помощи торцевого микрокрючка-упора; фиксация клетки относится на микропипетке с различной силой удерживания за счет капиллярных сил; пристеночное удерживание крупных клеток (например, эмбрионов земноводных); использование микропетель переменного диаметра для удерживания клетки; использование микропинцетов для удерживания клеток; микродержатели-капсулы (без использования отрицательного давления); микродержатели-полусферы; микропетли для удерживания клеток; использование профильного держателя с просветом (например, для удерживания планарий); микропетли профильного типа; микровилочка - держатель плоский; микровилочка - держатель из капилляра для работы с хромосомами и органеллами; микровилочка V образная— держатель из профиля для работы с хромосомами; микровилочка П образная— держатель из профиля для работы с хромосомами; макро- и микропинцеты для переноса крупных клеток.

Обсуждаются проблемы, имеющие место при использовании каждого из методов удерживания единичных клеток, и перспективы дальнейшего усовершенствования проведения этого важного этапа микроопераций на единичной клетке. Даны также некоторые рекомендации по использованию различных методов при работе с различными клетками.

НОВИКОВА Е.М., САЗЫКИНА М.А., БУРАЕВА Е.А., КОСТИНА Н.В.

Научно-исследовательский институт биологии Южного федерального университета,

Ростов-на-Дону, Россия

ОЦЕНКА ЗАГРЯЗНЕНИЯ АТМОСФЕРНОГО ВОЗДУХА

Г. РОСТОВА-НА-ДОНУ (2009 г.)

Загрязнение атмосферного воздуха - один из самых мощных и постоянно действующих факторов воздействия на человека и окружающую его среду. Здоровье населения и качество атмосферного воздуха тесно взаимосвязаны. Поэтому необходим постоянный экологический мониторинг загрязнения атмосферного воздуха.

Целью данной работы было изучение загрязнения воздуха г. Ростова-на-Дону при помощи биолюминесцентной тест-системы, включающей ряд бактериальных lux-сенсоров.

Для отбора проб дисперсной фазы атмосферных аэрозолей использовалась фильтро-вентиляционная установка, входящая в состав стационарной аспирационной станции. Материалом исследований служили экстракты фильтров, на которых были сконцентрированы взвешенные частицы атмосферного воздуха г. Ростова-на-Дону в течение 2009 г. Мерой загрязнения воздуха служил фактор индукции, который определяли как отношение интенсивности свечения суспензии штамма светящихся бактерий, содержащей тестируемый образец, к интенсивности свечения контрольной суспензии штамма.

Для определения ДНК-тропных веществ применялись 3 бактериальных lux-биосенсора (*E. coli* MG1655 (pRecA-lux), *E. coli* MG1655 (ColD-lux), *E. coli* C600 (pPLS-1)). Наибольшее количество генотоксических эффектов удалось зарегистрировать при помощи биосенсора *E. coli* MG1655 (pRecA-lux). Во всех исследованных экстрактах воздушных фильтров был зарегистрирован генотоксичный эффект как без применения метаболической активации, так и с ее использованием, что говорит о присутствии как прямых мутагенов, так и веществ промутагенной природы.

При тестировании с биосенсором *E. coli* MG1655 (pKatG-lux), биолюминесцентный ответ был также зарегистрирован во всех исследованных экстрактах фильтров, что свидетельствует о содержании в воздухе веществ окислительной природы, образующих в клетке гидроперекиси.

Биотестирование с сенсором *E. coli* MG1655 (pSoxS-lux) не выявило наличие окислителей, образующих в клетке супероксид-анион.

Исследование со штаммами биолюминесцирующих бактерий *E. coli* MG1655 (pMerR-lux) и *E. coli* MG1655 (pArsR-lux) показало, что концентрации ртути и мышьяка, обнаруженные в экстрактах фильтров, не представляют опасности. Их содержание не превышает норм, установленных в Гигиенических нормативах ГН 2.1.6.1338-03 "Предельно допустимые концентрации (ПДК) загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населенных мест".

Для детекции ответа на тепловой шок тестирование проводилось при помощи двух

биосенсоров - *E. coli*MG1655 (pIbpA-lux) и *E. coli*MG1655 (pGrpE-lux). Наибольшее количество эффектов было зарегистрировано при помощи штамма *E. coli*MG1655 (pGrpE-lux)- в 12 экстрактах фильтров из 17 исследованных (70,6 %).

Таким образом, проведенное исследование позволило зарегистрировать в ряде исследованных образцов воздуха наличие ДНК-тропных соединений; веществ, вызывающих состояние окислительного стресса.

Вариант биотестирования с привлечением серии бактериальных lux-биосенсоров дал возможность максимально быстрой оценки токсичности воздуха и позволил отобрать для более детального химического анализа наиболее загрязненные пробы.

НОВИКОВА К.И., ДУКОВА В.С., ДЬЯКОВ М.Ю.

ГБОУ ВПО Смоленская государственная медицинская академия

Минздравсоцразвития России, Смоленск, Россия

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИСАХАРИДОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЛИЧИНОК ВОСКОВОЙ МОЛИ

В работе проводилось выделение и анализ антимикробного действия полисахаридов из личинок восковой моли.

В настоящее время в народной медицине широко используются экстракты из личинок восковой моли на 40° спирте для лечения различных заболеваний. Однако, в научной литературе описаны исследования экстрактов из личинок восковой моли на основе щелочей различных концентраций с последующим их деацелированием и доказано их антибактериальная активность на многие микроорганизмы. Нами были получены экстракты на 40°, 90° спирте и 3% щелочи, под номерами 1,2,3,4,5. Экстракты получали из расчета 20 г личинок восковой моли на 100 мл экстрагента. Экстрагирование проводилось методом настаивания (мацерации) в течении 7 суток. Образцы под номерами 1,2 подвергались экстрагированию 40° и 90° спиртом соответственно, без дальнейшего деацелирования, а образцы № 3,4,5 экстрагировались 3%-ной щелочью, 90° и 40° спиртом соответственно, с последующим депротенированием, обесцвечиванием и деацелированием с целью перевода хитина в хитозан. Обесцвечивание проводили под

действием 10 мл 3%-ного раствора перекиси водорода в присутствии 0,1н раствора щелочи, при температуре 70°C и продолжительностью процесса 4 ч. Процесс деацетилирования проводили помещая полученный экстракт в коническую колбу с добавлением 10 мл 50%-ного раствора щелочи и выдерживали на кипящей водяной бане в течение 4 ч при постоянном перемешивании. Для подтверждения наличия хитозана в полученных извлечениях проводили реакцию на амино- группу с раствором нингидрина. Для определения количественного содержания комплекса полисахаридов в полученных экстрактах применялся метод гравиметрии. Результаты показали, что наибольшее количественное содержание полисахаридов в образцах под №№3,5. Для образцов под №№3,4,5 проводилось определение степени деацетилирования кондуктометрическим титрованием и молекулярной массы хитозана визкозиметрическим методом. В результате, наибольшую степень деацетилирования и наименьшую молекулярную массу имели образцы под №№ 3,5.

Согласно литературным данным, уровень биологической активности извлечений зависит от многих факторов– молекулярной массы хитозана, степени его деацетилирования, концентрации хитозана в извлечении, а так же типа его модификации и присутствия в экстракте липаз и белковых молекул. Нашей задачей являлось проследить зависимость антибактериальной активности полученных извлечений от параметров экстракции, молекулярной массы и степени деацетилирования. Было проведено 3 серии опытов, исследуя водные растворы полученных образцов, первая из которых была предварительной, вторая- определение биологической активности диффузионным методом в агаре, которая показала отсутствие роста полученных извлечений. Третья серия опытов- определение антибактериального действия образцов извлечений по учету процента гибели бактериальных клеток, после их контакта с исследуемыми образцами в течении 24 часов при температуре 37°C. Для исследования были использованы микроорганизмы из международной коллекции ATCC: *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*. Образцы под №№ 3,5 вызывали 100% гибель всех исследуемых микроорганизмов, тогда как образцы под №№ 1,2,4 практически не влияли на их рост и размножение. Полученные результаты показали, что антимикробная активность тем выше, чем выше степень деацетилирования и чем ниже молекулярная масса. Нами была определена минимальная подавляющая концентрация (МПК) у образцов с наиболее выраженным антибактериальным эффектом (№3,5) на

микроорганизмах из международной коллекции ATCC: *E. coli*, *S. aureus*. МПК для извлечения №3 относительно *E. coli* равна 0,438 мг/мл, а для *S. aureus*- 0,875 мг/мл. МПК для образца №5 относительно *S. aureus* и *E. coli* равна 0,777 мг/мл.

Таким образом, показано, что низкомолекулярные препараты хитозана из личинок восковой моли, полученные щелочным, либо спиртовым экстрагированием с последующим деацетилированием, можно рекомендовать в качестве перспективных антибактериальных средств.

НОВИЧЕНКО О.В.

Астраханский государственный университет, Астрахань, Россия

ИЗУЧЕНИЕ СТУДНЕОБРАЗУЮЩИХ СВОЙСТВ ПЕКТИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ И СПОСОБЫ ИХ ИЗВЛЕЧЕНИЯ ИЗ ВЫСШИХ ВОДНЫХ РАСТЕНИЙ ВОЛГО-КАСПИЙСКОГО БАССЕЙНА

Химический состав морских и пресноводных трав зависит от вида, стадии развития и условий произрастания. Зная химические компоненты, входящие в состав высших растений, и их количественное содержание, можно целенаправленно планировать промышленные технологии комплексной переработки этого сырья для одновременного получения ряда ценных природных соединений, представляющих интерес для современных областей деятельности человека.

Особенностью химического состава морских и пресноводных трав Волго-Каспийского бассейна является присутствие в их тканях пектиноподобного вещества.

Специфической особенностью пектиновых веществ, имеющей важное практическое значение, является их способность образовывать гели-желе. Желеобразование - своеобразный процесс, обусловленный в первую очередь химическим строением желирующего агента. В процессе желирования нитевидные молекулы пектина, в присутствии различных добавок (сахар, кислота, ионы кальция), образуют трехмерный каркас.

Студнеобразующая способность пектина зависит от его молекулярной массы, степени этерификации, содержания функциональных групп, рН среды. Известна прямая

зависимость способности пектина к образованию прочного студня от его молекулярной массы. Для хорошего студнеобразования необходимо, чтобы пектиновая молекула имела молекулярную массу не менее 20 кДа. Низкоэтерифицированные и высокоэтерифицированные пектины образуют желе различных типов. Взаимоотношения между степенью этерификации пектина и качеством геля были исследованы Бейкером и др. (1941), а в более поздние годы Доусбергом (1950) и Пилником (1964).

Наличие в молекуле пектина карбоксильных групп обуславливает его способность образовывать соли - пектаты. При взаимодействии с гидратами окислов щелочных металлов пектин дает растворимые в воде пектаты, которые можно применять в пищевой, кондитерской промышленности, косметической отрасли, фармацевтике.

Целью данной работы является изучение возможности получения пектиновых веществ из морских и пресноводных растений Волго-Каспийского бассейна.

Объектами исследования явились: морская трава zostера каспийская (*Zostera nana*), пресноводные травы: рдест пронзеннолистный (*Potamogeton perfoliatus L.*) и тростник обыкновенный (*Phragmites communis Trin.*), экстракты с высоким содержанием пектиновых веществ и травяные остатки, а также полученные путем осаждения высушенные пектины данных растений.

При изучении возможности рациональной переработки высших водных растений авандельты реки Волги и Северного Каспия были проведены экспериментальные исследования в несколько этапов.

Были поставлены опыты по изучению химического и углеводного составов исходного сырья, которые показали возможность её переработки с целью получения оригинальных биотехнологических продуктов.

На втором этапе были получены экстракты из растительного сырья по модифицированной методике Мирошникова В.И. Был применен кислотно-щелочной гидролиз водных растений с дальнейшим осаждением полисахаридов этиловым спиртом.

На данном этапе после проведения экстракции высших водных растений проводится подробный хроматографический анализ экстрактов из высших водных

растений Волго-Каспия, обогащенных пектиновыми веществами, а также содержание моносахаридов в травяных остатках.

Морские и пресноводные травы Северного Каспия и дельты реки Волги, запасы которых представляют большой промышленный интерес, являются перспективным сырьём для получения экстрактов, так как содержат до 20 % и выше пектиновых веществ. Кроме того, они синтезируют большое количество биологически-активных веществ, не встречающихся в наземных растениях. Уникальный состав и комплекс биологически активных веществ высших водных растений определяет широкий спектр их применения и вызывает особый интерес специалистов различных отраслей промышленности.

НОВОЖИЛОВ А.В., КОРШАК О.В., ТАВРОВСКАЯ Т.В., МОРОЗОВ В.И.

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук,
Санкт-Петербург, Россия*

ВЛИЯНИЕ ОДНОКРАТНОГО ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО СТРЕССА НА ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЙ БАЛАНС КРОВИ КРЫС НА ФОНЕ ХРОНИЧЕСКОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ АНТИОКСИДАНТА КВЕРЦЕТИНА

Использование антиоксидантов широко распространено в настоящее время и диктуется неблагоприятными условиями труда, экологической обстановкой и другими причинами. Одним из таких соединений является антиоксидант семейства биофлавоноидов кверцетин. Показано, что он оказывает защитное действие на различные органы и ткани, подверженные воздействию токсических факторов, защищая от окислительного повреждения клеточные структуры и макромолекулы (мембраны, ДНК, белки). Это возможно благодаря способности кверцетина к хелатированию ионов металлов переменной валентности и улавливанию свободных радикалов. Его действие наиболее выражено при хроническом потреблении, так как он способен накапливаться в тканях. Однако в определенных условиях (различия в метаболизме, определяемые профилем экспрессируемых ферментов) кверцетин может выступать в роли прооксиданта, увеличивая выработку активных форм кислорода и снижая концентрацию важного

клеточного антиоксиданта восстановленного глутатиона, что может определять его цитотоксическое действие. В нашем исследовании самцы крыс линии Вистар получали кверцетин перорально в разведенном виде в молоке в дозе 20 мг/кг веса тела в течение 7 дней. Далее крысы были подвергнуты иммобилизационному стрессу в положении на спине в течение 1 ч (группа Q+S (кверцетин + иммобилизационный стресс)). Контролем для этой группы служили крысы, получавшие молоко (группа M+S (молоко + иммобилизационный стресс)). Дополнительно две группы крыс, одна из которых получала кверцетин, а другая молоко, служили контролем и не подвергались иммобилизации (Q и S, соответственно). Были определены показатели окислительного стресса: малоновый диальдегид (МДА) в плазме и восстановленный глутатион в крови (ВГ). Кроме того, определяли активность антиоксидантных ферментов в эритроцитах – каталазы (Кат), супероксиддисмутазы (СОД), глутатионпероксидазы (ГП) и глутатионредуктазы (ГР). Обнаружено, что концентрация МДА в группе Q+S была выше на 24% и на 16% по сравнению с группами M+S и Q, соответственно. Различий в контрольных группах по этому показателю не обнаружено. В группе Q+S выявлено значительное снижение концентрации ВГ (-17%), большее, чем в группе M+S (-12%). Активности Кат и СОД достоверно не отличались во всех группах животных. Кверцетин значительно повышал активность ГП в контроле (+17%) и при воздействии иммобилизационного стресса поддерживал ее активность на высоком уровне, не отличавшемся от контроля, тогда как в группе M+S наблюдалось значительное падение активности ГП по сравнению с группой M (-20%). Стоит отметить, что активность ГП в группе M+S была на 34% ниже, чем в группе Q+S. Активность ГР в группе Q оказалась выше, чем в группе M на 51%. Этот показатель не изменялся при воздействии иммобилизационного стресса на фоне потребления кверцетина, тогда как в группе M+S отмечено резкое увеличение активности ГР на 60% по сравнению с группой M. Отмеченное влияние кверцетина на систему глутатиона, вероятно, обусловлено ускоренным оборотом ВГ в клетке в присутствии кверцетина. Это может объяснить повышение активности ГР в контроле. В условиях иммобилизационного стресса расходование ВГ возрастает, а присутствие кверцетина еще больше усиливает расход ВГ, что ведет к более значительному снижению концентрации этого метаболита на фоне неизменной активности ферментов системы глутатиона ГП и ГР. Возможно, снижение антиоксидантного потенциала системы глутатиона определило повышение

содержания МДА в группе Q+S. Таким образом, можно заключить, что кверцетин в выбранной дозе проявил себя в системе крови как прооксидант.

НОВОСАДОВА Е.В.¹, ГРИВЕННИКОВ И.А.¹, БОБРЫШЕВА И.В.¹,
ГРИГОРЕНКО А.П.^{2,3,4}, АНДРЕЕВА Л.А.¹, РОГАЕВ Е.И.^{2,3,4}, ТАРАНТУЛ В.З.¹

¹ *Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной генетики Российской академии наук, Москва, Россия*

² *Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия*

³ *Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение "Научный Центр Психического Здоровья" Российской академии медицинских наук, Москва, Россия*

⁴ *Департамент психиатрии, Брудниковский Институт Нейропсихиатрических исследований, Медицинская школа Массачусеттского университета, Ворчестер, США*

ЛИНИЯ КЛЕТОК С МУТАНТНЫМ ГЕНОМ ПРЕСЕНИЛИНА 1 ЧЕЛОВЕКА КАК МОДЕЛЬНАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ПОИСКА И ТЕСТИРОВАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Среди широкого спектра различных нейродегенеративных заболеваний особое место по своему негативному значению для общества занимает болезнь Альцгеймера (БА). Характерной особенностью БА является постепенное неуклонное прогрессирование расстройств памяти и высших корковых функций вплоть до полного распада интеллекта и психической деятельности. Для семейных форм с ранним началом болезни характерен аутосомно-доминантный характер наследования, при котором причиной развития болезни является мутация в единственном гене. Мутации в гене, названном «пресенилин-1» (*hPS1*), вызывают заболевание к 30-60 годам, в течение 5-7 лет у пациента резко ухудшается память и происходит полная деградация личности. Никакие условия среды и внешние факторы не могут предотвратить или остановить болезнь. В настоящее время не существует лекарственных препаратов, способных вылечить БА. Для создания такого лекарства необходимо использовать системный подход, который позволит влиять на первопричину заболевания, а не на его последствия. Для этого, в свою очередь,

необходимо учитывать действия разных факторов, в том числе и мутации в генах, приводящих к БА. На уровне всего организма с учетом различных факторов проводить исследования затруднительно, поэтому в качестве альтернативной тест-системы можно использовать генетически измененные клеточные линии, несущие интересующие нас генные мутации.

Работа проводилась на линии клеток феохромоцитомы крысы PC12. Отличительной особенностью этих клеток является их способность к дифференцировке в нейрональном направлении в присутствии фактора роста нервов. В результате трансфекции и последующей селекции клеток PC12, получена стабильно трансфицированная линия клеток M146V-poly, несущая мутантный ген пресенилина-1 человека. Был проведен сравнительный анализ трансгенной (M146V-poly) и контрольной линии клеток PC12 к действию апоптотических стимулов. Показано, что клетки несущие трансген *hPS1* демонстрируют более высокую чувствительность к действию перекиси водорода. Так при внесении 25 мкМ H₂O₂ количество жизнеспособных клеток в контроле составляло более 70%, а в трансгенной линии M146V-poly только 40%. При добавлении 100 мкМ H₂O₂ количество жизнеспособных клеток в культуре M146V-poly было менее 5%, тогда как в контрольной линии достигало 35%. Проанализировано влияние ряда пептидов (Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro (Семакс), Pro-Gly-Pro и Pro-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro) с потенциальным нейропротекторным действием на жизнеспособность контрольных и трансгенных линий клеток. Среди исследованных пептидов только Семакс достоверно увеличивал жизнеспособность клеток линии M146V-poly и не оказывал значимого влияния на клетки контрольной линии PC12. Из полученных результатов можно сделать вывод, что клетки, несущие мутантный пресенилин *hPS1* и исходная культура клеток PC12 отличаются по чувствительности к окислительному стрессу, а также по-разному реагируют на действие вносимых пептидов: Семакс, PGP и DPG. Эти результаты наглядно демонстрируют необходимость создания клеточных тест-систем с индивидуальными изменениями в геноме, характерными для каждого конкретного заболевания. Таким образом, полученная и исследованная нами *hPS1*-трансфицированная клеточная культура M146V-poly может представлять интерес, как для дальнейшего изучения функций данного гена, так и в качестве модельной системы для поиска и тестирования лекарственных препаратов,

которые могут быть эффективны для терапии ранней семейной формы болезни Альцгеймера, связанной с мутациями в генах пресенилинов.

НОВОСЕЛОВА Н.Ю.¹, САПРОНОВ Н.С.², РЕЙХАРДТ Б.А.²

¹*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия*

²*Федеральное государственное бюджетное учреждение "Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины" Северо-Западного отделения Российской академии медицинских наук, Санкт-Петербург, Россия*

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДНОГО ТАУРИНА НА СОДЕРЖАНИЕ ФОСФОЛИПИДОВ СИНАПТОСОМ ЛЕВОГО И ПРАВОГО ПОЛУШАРИЙ МОЗГА КРЫС В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ

Известно, что гипоксия является сопутствующим неспецифическим состоянием практически любой патологии, в связи с чем поиск и разработка эффективных антигипоксантов представляет собой чрезвычайно актуальную задачу. С учетом имеющихся в литературе сведений о неравной чувствительности полушарий мозга к гипоксии (Наливаева и др., Журн. эволюц. биохим. и физиол. 1998. Т. 34, С. 485-491.) и церебральной ишемии (Pediconi et al., J. Neurochem., 1984, V. 43, P. 1-7.) несомненный интерес представляло изучение лево- и правополушарных механизмов антигипоксического действия нового препарата, являющегося синтетическим производным нейроактивной тормозной аминокислоты - таурина. Руководствуясь тем, что один из механизмов реализации антигипоксического действия тестируемого препарата может быть связан с его влиянием на мембранные фосфолипиды мозга, в настоящей работе проводился сравнительный анализ содержания фосфолипидов синапсом полушарий мозга беспородных крыс-самцов при экспериментальном инфаркте миокарда и иммобилизационном стрессе без и при введении исследуемого соединения. Согласно предыдущим исследованиям моделирование инфаркта миокарда окклюзией левой

нисходящей коронарной артерии приводило к более выраженному и длительному дефициту содержания фосфолипидов в правом полушарии по сравнению с левым, в то время как иммобилизационный стресс (фиксация на спине, 3 ч) сопровождался значительным снижением этого показателя в левом полушарии и напротив, его существенным увеличением в правом полушарии. Введение препарата увеличивало содержание фосфолипидов в левом полушарии и более существенно в правом на фоне экспериментального инфаркта миокарда, а также избирательно - в левом полушарии (в правом отмечалось недостоверное повышение содержания фосфолипидов) при иммобилизационном стрессе. Таким образом, препарат предотвращал гипоксический дефицит мембранных фосфолипидов полушарий при экспериментальных воздействиях, что сопровождалось при этом более выраженным увеличением их содержания в правом полушарии при экспериментальном инфаркте миокарда или в левом - при иммобилизационном стрессе.

ОБРУЧЕВА Н.В., ЛИТЯГИНА С.В., СИНЬКЕВИЧ И.А.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия

ИЗУЧЕНИЕ БЕЛКОВ, ОТВЕТСТВЕННЫХ ЗА НАЧАЛО ПРОРАСТАНИЯ СЕМЯН

Прорастание семян является пусковым процессом развития как хозяйственно-ценных, так и естественно произрастающих семенных растений. Для большинства семян растений, обитающих в естественной среде, после созревания характерно наличие периода покоя, выход из которого регулируется фитогормонами. В сельско-хозяйственной практике, благодаря усилиям селекционеров, выращивают растения с семенами, практически лишенными периода покоя, т.е. находящимися в вынужденном покое. И вышедшие из покоя семена и семена в вынужденном покое прорастают в благоприятных условиях температуры и аэрации, причем пусковым фактором является наличие доступной воды.

Проникая в семена при набухании, вода последовательно активизирует основные процессы метаболизма : при повышении влажности до 20% - гликолиз, цикл трикарбоновых кислот и синтез аминокислот; при достижении 45-55% влажности –

митохондриальное дыхание, сборку рибосом и начало синтеза белков, а также транскрипцию ДНК; кроме того, начинается использование запасных веществ – белка и крахмала. При дальнейшем повышении влажности до 65-68% происходит накопление осмотически-активных веществ, обеспечивающих дополнительное поглощение воды, а при 68-70% влажности повышается растяжимость клеточных оболочек – оба процесса необходимы для увеличения размеров клеток, приводящего к началу прорастания (проклеиванию семян). Однако, только пусковой роли воды недостаточно для начала прорастания, так как при ингибировании синтеза белков прорастания не происходит, несмотря на доступность воды. На основании этих наблюдений возникла необходимость поиска и идентификации белков, без синтеза которых не происходит прорастания. Исходя из того, что синтез белков начинается при достижении 45-55% влажности, мы уделили основное внимание процессам, начинающимся при более высокой влажности. В связи с поглощением воды эту роль могут выполнять белки аквапорины, формирующие водные каналы в мембранах. Мы изучили состав аквапоринов в плазматической и вакуолярной мембранах клеток осевых органов у семян кормовых бобов и конского каштана, контрастных по водному режиму, и обнаружили, что состав аквапоринов не меняется при набухании и начале прорастания, то есть что синтеза новых аквапоринов не происходит. Далее предстояло выяснить, функционируют ли водные каналы при прорастании семян или остаются закрытыми. Серия экспериментов с ингибированием поглощения воды ионами ртути показала, что водные каналы открываются и начинают функционировать после начала прорастания, когда усиливается поток воды в клетки; они не работают до и во время наклеивания. Тем самым было показано, что аквапорины нельзя рассматривать в качестве белков прорастания. Более перспективным является изучение белков, от которых зависит растяжимость клеточных оболочек. Их общее свойство – повышение активности при подкислении среды. В этой связи основное внимание привлекает фермент протонная АТФаза, локализованная в плазматической мембране; она выделяет протоны из цитоплазмы в клеточную стенку, способствуя ее подкислению и осуществляя тем самым механизм «кислого роста». Действительно, на семенах пшеницы, кормовых бобов и конского каштана было показано, что для инициации роста при прорастании необходима активация протонной АТФазы и что ингибирование синтеза белка приводит к ингибированию активации этого фермента. В настоящее время разрабатывается гипотеза о

том, что активация протонной АТФазы необходима для начала прорастания семян и достигается синтезом 14-3-3 белков, переводящих ее из неактивного в активное состояние.

ОВЧИННИКОВА С.И., МИХНЮК О.В.

*ФГБОУ ВПО «Мурманский государственный технический университет»,
Мурманск, Россия*

ИЗУЧЕНИЕ ЛИПИДНОГО СОСТАВА МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ ФОРЕЛИ

Были проведены исследования липидного состава мышечной ткани радужной форели, культивируемой в садках форелевых ферм на р. Тулома.

Определение химического состава тканей проводили с использованием стандартных методов биохимического анализа. Извлечение липидов из мышечной ткани осуществляли методом Блайя - Дайера. Фракционный состав липидов определяли методом одномерной тонкослойной хроматографии. В результате были выделены следующие группы липидов: диацилглицерины, триацилглицерины, стерины (холестерин), эфиры стеринов, фосфолипиды, общее количество свободных жирных кислот.

Экспериментальные данные выявили преобладание триацилглицеринов в мышечной ткани форели - 57,0 %.

Массовая доля фосфолипидов в мышечной ткани составила 31,1 % от общего количества липидов. Основными представителями фосфолипидов являются фосфатидилхолин (лецитин) и фосфатидилэтаноламин (кефалин). Содержание лецитина и кефалина в мышечной ткани составило 17,7 % и 9,9 %, соответственно.

Также было проанализировано содержание холестерина и эфиров стеринов в мышечной ткани форели. Установлено, что концентрация холестерина и эфиров стеринов в мышечной ткани составляет 6,7 % и 1,9 %, соответственно. Было рассчитано молярное соотношение содержания холестерина к количеству фосфолипидов (ХС / ФЛ). Для мышечной ткани ХС / ФЛ соответствует 0,21.

Полученные данные позволяют выявить особенности биохимии радужной форели, могут быть использованы в практических целях, при разработке рекомендаций для специалистов, занимающихся проблемами культивирования рыб семейства Лососевые.

ОГУЛЯ А.П., КНЯЗЕВА И.В.

ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»), Белгород, Россия

О СПЕЦИФИКЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОЛИМОРФИЗМА БЕЛКОВ СЕМЯН ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *DIANTHUS* L.

В работе рассматриваются особенности изучения электрофоретических спектров водорастворимых белков семян нескольких видов рода *Dianthus* L., принадлежащего к семейству *Caryophyllaceae* Juss. Приведено описание методики проведения вертикального электрофореза в полиакриламидном геле запасных белков семян указанного семейства. В исследовании принимали участие три вида данного рода: *D. fischeri* Spreng., *D. versicolor* Fisch. ex Link, *D. squarrosus* M. Bieb.

В настоящее время наиболее полно изучены белковые спектры. Информация по проведению электрофореза для определения белковой фазы по видам семейства *Caryophyllaceae* в литературных источниках практически не встречаются. Данный тип анализа запасных белков можно назвать универсальным методом контроля качества семенной продукции. Он позволяет определять генетический состав определенного сорта через биотипы. Метод электрофореза позволяет быстро и точно определять сортовую подлинность и чистоту семян, оценить генетическое качество семян. Он применяется при изучении исходного материала в селекции, установлении оригинальности и генетической однородности сорта в государственном сортоиспытании, определении типичности и генетической однородности при отборе лучших растений в семеноводстве. Преимуществом электрофореза по сравнению с другими биохимическими методами является его доступность и высокая экономическая целесообразность.

Данные были получены с помощью прибора для вертикального электрофореза Mini-PROTEAN Tetra Cell. (США). Измельченную массу одного семени заливается раствором для извлечения белка (0,001% раствор пиронина G в 2М мочевины и 0,5М уксусной кислоты), содержимое пробирки центрифугировали 4 минуты при 15000 об./мин. Полученная надосадочная жидкость была готова к нанесению для фракционирования с помощью электрофореза в кислой среде. Использовали 10% полиакриламидный гель следующего состава на 100 мл готового раствора: 0,5 г N,N'-метиленабисакриламида, 12 г

акриламида, 2 мл уксусной кислоты, 48 г мочевины, 10 мл 1% раствора глицина, 3,4 мл 1% раствора аскорбиновой кислоты, 1,4 мл железа сернокислого закисного семиводного (50 мг в 71,4 мл раствора), 1,4 мл 1% раствора персульфата калия. Буфер pH 3.2 представлял собой 4 г глицина и 4 мл ледяной уксусной кислоты, растворенных в 1 л дистиллированной воды. Диссоциация белка на полипептиды в данных условиях осуществляется мочевиной, движение белков – от анода к катоду. После выгонки двух меток проводилось окрашивание белков в геле в течение 12 часов в красителе на основе кумаси бриллиантового голубого R250. Для приготовления данного красителя к 0,1 г кумаси добавляли по 50 мл ацетона и воды и 100 мл 60% трихлорэтановой кислоты, затем к полученному раствору приливали 30 мл ацетона, 20 мл этилового спирта, 50 мл уксусной кислоты и 700 мл дистиллированной воды. Затем гели отмывались водопроводной водой в течении нескольких часов.

Проанализировав полученные электрофореграммы, у всех трех испытываемых видов выделено две зоны разгонки белков – зона А (зона наиболее тяжелых белков) и зона В (зона белков, имеющих сравнительно небольшой молекулярный вес). Для зоны А у перечисленных видов выделено по три варианта электрофореграммы. При этом зона А₁ у всех трех видов преобладает (68,2±4,2%, 77±3,1%, 62,2±5,6% соответственно у видов *D. fischeri*, *D. versicolor*, *D. squarrosus*). Несколько меньшей частотой характеризуется зона А₂ (29,8±3,2%, 14±4,3%, 17,3±5,8%), и оставшуюся долю занимает зона А₃. Таким образом, можно оценить не только выраженность гетерогенности внутри популяции, но и близости белковых групп разных представителей рода *Dianthus*. Тем не менее, сравнения белков у разных видов не всегда возможно - так, у вида *D. fischeri* выделено 8 типов разгонки белков зоны В, в то время, как у *D. versicolor* и *D. squarrosus* в этой области четко выражены только три типа. В популяции *D. fischeri* почти половина образцов разгонки белка характеризуется зоной В₁ (49.5±5.02). Зоны В₂ и В₃ составляют примерно одинаковую долю (13.13% и 12.12 % соответственно). Другие варианты разгонки белков в данной зоне составляют менее 10 процентов. Картина по второй зоне у оставшихся двух видов примерно соответствуют типам зоны А у тех же видов. Полученные данные позволяют оценить степень полиморфизма по популяциям каждого из видов. Приняв каждый из типов зон по одному образцу за аллель, можно рассчитать частоту встречаемости каждого аллеля.

Таким образом, внутривидовой полиморфизм видов *Dianthus* имеет специфические свойства, выраженные в виде изменчивости двух зон спектров, которая находит прямое отражение в особенностях проявления признаков разновидностей. На данном этапе исследований отработанные методы используются для изучения электрофоретических спектров белков на коллекции семейства *Caryophyllaceae*, созданной на базе ботанического сада природного парка «Нежеголь» БелГУ.

ОРЛОВА И.Г.¹, АТАМАНЧЕНКО М.П.², ЛАПЕНКО М.А.¹, ПИВОВАРОВА И.А.¹

¹ФГБУ ВПО «Ставропольский государственный университет», Ставрополь, Россия

НОЦ «Технологии живых систем и биологические материалы», Ставрополь, Россия

²ГНУ Ставропольский научно-исследовательский институт сельского хозяйства РАСХН,
Ставрополь, Россия

КУЛЬТУРА IN VITRO РАЗНЫХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ МЕСТНОЙ И ИНТРОДУЦИРОВАННОЙ ФЛОРЫ

В работе приводятся экспериментальные данные по введению в культуру in vitro фармакопейных видов лекарственных растений местной флоры: ландыша закавказского (*Convallaria transcaucasica* Utkin), л. майского (*C. majalis* L.), горицвета весеннего (*Adonis vernalis* L.), зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum* L.) и растения-интродуцента руты душистой (*Ruta graveolens* L.). Из растений, применяемых в народной медицине, нами изучались пион узколистный (*Paeonia tenuifolia* L.), ирис карликовый (*Iris pumila* L. s.), лаванда узколистная (*Lavandula angustifolia* Mill.).

Лекарственная ценность изучаемых видов не вызывает сомнений и обусловлена высоким содержанием в тканях различных биологически активных веществ, в том числе ценных сердечных гликозидов, алкалоидов, дубильных веществ, эфирных масел, органических кислот и т.д.

В качестве эксплантов использовались фрагменты корневищ, стеблей, листьев, черешков, соцветий, почек и т. д. Растения отбирались в местах естественного произрастания (ботанических заказниках – урочища Шалево и Новомарьевской поляны, расположенных вблизи г. Ставрополя), коллекциях Ставропольского ботанического сада

в течение вегетации. Испытывались разные соотношения фитогормонов ауксинов (2,4D, ИУК), цитокининов (кинетин, 6-БАП), а также антиоксидантов (активированный уголь, аскорбиновая кислота) на основе питательной среды Мурасиге-Скуга. Для стерилизации эксплантов применяли: этиловый спирт (1-2 мин.), 6% раствор аптечного хлорамина Б и 0,05% раствор хлоргексидина (10-20 мин.).

Получены положительные экспериментальные результаты со всеми изучаемыми объектами. Наиболее легко индуцировался каллус из проростков зверобоя, лаванды, и руты. Каллус руты обладал высокой регенерационной способностью, поэтому наряду с каллусогенезом отмечалось активное побегообразование и формирование растений-регенерантов. Укореняли растения - регенеранты на среде Уайта без гормонов с половинным содержанием витаминов и сахарозы.

Первичный каллус ландыша был получен при повторном пассировании на свежую питательную среду МС с соотношением ауксинов и цитокининов 10:1. Жизнеспособность каллуса ландыша оказалась невысокой, и рост клеток прекратился через 1-1,5 месяца. Из почек *P. tenuifolia* удалось индуцировать каллус, но он не отличался высокой жизнеспособностью и выдержал лишь два пассирования на свежую питательную среду. Нами был получен каллус у *A. vernalis*, морфологически он мог быть как рыхлым, так и компактным и его жизнеспособность была еще ниже, чем у пиона. Необходимо отметить высокий процент гибели эксплантов пиона, горицвета. Через три-пять дней отмечалось потемнение тканей и гибель эксплантов. Антиоксиданты (аскорбиновая кислота, активированный уголь) не оказали должного эффекта.

У *Iris pumila* и *Convallaria majalis* не был индуцирован каллус, но отмечалось образование побегов, эмбриоидов, микроклонов.

У лаванды узколистной каллусогенез наблюдался менее чем через две недели, и можно было на первичной среде наработать каллусной ткани 2/3 объема колбы на 250 мл. Наилучшие показатели каллусогенеза получены при содержании в питательной среде МС 2,4D в концентрации 1 мг/л, ИУК - 0,5 мг/л и кинетина - 0,5 мг/л. Каллусная ткань лаванды сохраняла метаболическую активность. Биохимические анализы (титрометрический метод и ТСХ) каллуса подтвердили содержание всего набора биологически активных веществ (флавоноиды, дубильные вещества, органические кислоты, сахара), присутствующих в интактном растении. Кроме того, клеточный сок 7- и

15-дневного каллуса и культуральной жидкости агаровой среды выращивания обладал антибактериальной активностью в отношении *E. coli* М 17 и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (Бостанова и др., 2006).

Из-за проблематичности прорастания семян ландыша, пиона, горицвета, ириса были трудности по введению в культуру *in vitro*. этих видов растений. Из 13 изучаемых факторов воздействия на жесткие покровы семян пиона эффективными оказались два фактора - попеременное воздействие высоких и низких температур и обработка семян жидким азотом (Орлова, Атаманченко, 2010). Семена пиона, ириса, ландыша характеризовались высокой инфицированностью, поэтому их проростки быстро погибали.

Практическое применение в фитобиотехнологии имеет суспензионная культура, но нами не было получено положительных экспериментальных результатов по культивированию каллусных тканей изучаемых видов растений в жидкой питательной среде, поэтому требуется дальнейшее продолжение научных исследований в этом направлении.

ОРЛОВА Н.А.¹, КОВНИР С.В.¹, ВОРОБЬЕВ И.И.¹, ГАБИБОВ А.Г.¹, ВОРОБЬЕВ А.И.²

¹Институт Биоорганической химии РАН, Москва, Россия

²ФГБУ Гематологический научный центр МЗСР РФ, Москва, Россия

**ВЫСОКОПРОДУКТИВНАЯ ЛИНИИ-ПРОДУЦЕНТ ФАКТОРА
СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ VIII ЧЕЛОВЕКА НА ОСНОВЕ ВЕКТОРА С
НЕТРАНСЛИРУЕМЫМИ ОБЛАСТЯМИ ГЕНА ФАКТОРА ЭЛОНГАЦИИ
ТРАНСЛЯЦИИ 1 АЛЬФА КИТАЙСКОГО ХОМЯЧКА**

Фактор свертывания крови VIII человека является основным лекарственным средством при лечении гемофилии А. Ранее нами были получены линии клеток CHO, секретирующие делеционный вариант фактора VIII с продуктивностью около 0,5 МЕ/мл. Целью настоящей работы являлось получение и характеристика более продуктивных линий-продуцентов фактора VIII с использованием нетранслируемых областей гена фактора элонгации трансляции 1 альфа китайского хомячка.

Был сконструирован специализированный плазмидный вектор p1.1, включающий участки нетранслируемых областей гена фактора элонгации трансляции 1 альфа китайского хомячка и фрагмент конкатемера длинного концевого повтора вируса Эпштейна-Барр. Было исследовано два способа генерации клональных линий-продуцентов фактора VIII – получение пула стабильно трансфицированных клеток с последующей селекцией клонов при различных концентрациях метотрексата и прямая генерация клональных линий при концентрации метотрексата 50 нМ. При использовании первого способа были отобраны три линии-продуцента с продуктивностью 6-10 МЕ/мл в адгезионной культуре, при использовании второго способа – одна линия с продуктивностью $5,4 \pm 0,5$ МЕ/мл. После реадaptации линий к суспензионному культивированию для линии 1-С8, полученной при помощи первого способа, была установлена удельная продуктивность 15 мкМЕ/(клт*д) и для плотной культуры в перемешиваемой колбе зафиксирована максимальная концентрация фактора VIII 25 МЕ/мл. Целевой белок был охарактеризован методами иммуноблоттинга и коагулометрии.

Выводы: Линии-продуценты фактора VIII, полученные с помощью плазмидного вектора, содержащего фрагменты гена фактора элонгации трансляции 1 альфа китайского хомячка обладают высокой продуктивностью и секретируют процессированный и биологически активный продукт.

ОСТРОУМОВ С.А.¹, КОТЕЛЕВЦЕВ С.В.¹, ГЛАЗЕР В.М.¹, ГОРШКОВА О. М.¹, ГРИЧУК Д.В.¹, ДЕМИНА Л.Л.², ЕРМАКОВ В.В.³, ЖБАНОВ А.Е.¹, ЗАВГОРОДНЯЯ Ю.А.¹, ЗУБКОВА Е.И.⁴, ЙОВАНОВИЧ Л.⁵, КАМНЕВ А.Н.¹, ЛАЗАРЕВА Е.В.¹, МАТОРИН Д.Н.¹, МАККАТЧЕН С.⁷, ПАНИН М.С., ПОКЛОНОВ В.А.¹, САДЧИКОВ А.П.¹, СИЗОВ А.Д.¹, СМУРОВ А.В.¹, СОЛДАТОВ А.А.⁶, СОЛОМОНОВА Е.А.¹, ТОДЕРАШ И.К.⁴, ТРОПИН И.В.¹, ШЕЛЕЙКОВСКИЙ В.Л.⁸, ШЕСТАКОВА Т. В.¹, ШПИГУН О.А.¹

¹*МГУ им. М. В. Ломоносова, Ленгоры, Москва, Россия*

²*Институт океанологии РАН, Москва, Россия*

³*Институт геохимии и аналитической химии им. В.И.Вернадского РАН, Москва, Россия*

⁴*Институт зоологии АН Молдовы, Кишинев, Молдова*

⁵*Университет EDUKONS, Каменица, Сербия*

⁶*Институт биологии южных морей Национальной АН Украины (НАНУ), Севастополь, Украина*

⁷*Университет штата Джорджия, США (U.S.A.)*

⁸*Главный ботанический сад РАН, Москва, Россия*

ХИМИКО-БИОТИЧЕСКИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В БИОСФЕРЕ С УЧАСТИЕМ ЗАГРЯЗНЯЮЩИХ ВЕЩЕСТВ, ВКЛЮЧАЯ МЕМБРАНОТРОПНЫЕ И ГЕНОТОКСИЧЕСКИЕ КСЕНОБИОТИКИ, А ТАКЖЕ НАНОМАТЕРИАЛЫ

Изучение биологического действия загрязняющих веществ и ксенобиотиков, которые важны для разработки прикладной экологии, расширяет научные основы мониторинга и реабилитации. Целью данного исследования было охарактеризовать биологические эффекты некоторых органических и неорганических ксенобиотиков (поверхностно-активные вещества, моющие средства, тяжелые металлы и др.) и их взаимодействия с организмами и биогенными материалами. Методология включала различные методы, в том числе методы биотестирования, анализ биопроб, микрокосмов, выявление элементов с помощью инструментальных методов. В экспериментах использовали растения, двустворчатые моллюски, системы с микрокосмами. В результате обнаружен ряд биологических эффектов, измерены концентрации поллютантов. Например, изучали эффекты при воздействии синтетических поверхностно-активных веществ и смеси тяжелых металлов (Cu, Zn, Cd, Pb) на организмы. Исследовали

сублетальные и летальные последствия при воздействии токсикантов на водные растения (макрофиты роголистник *Ceratophyllum demersum*, *Potamogeton* sp., *Echinodorus quadricostatus* F.; *Lilaeopsis brasiliensis* A.; *Synnema triflorum* K.; *Hydrotriche hottoniiflora* Z.; *Elodea canadensis* Mchk.; *Ludwigia repens* F.; *Micranthemum micranthemoides* W.; *Micranthemum umbrosum* B., *Fontinalis antipyretica* Hedw., *Najas guadelupensis* L., *Salvinia natans* L., *Salvinia auriculata* Aubl. и другие виды), наземные растения (проростки) и другие биообъекты. Изучали действие мембранотропных ксенобиотиков (синтетических поверхностно-активных веществ и моющих средств) и других химических веществ (тяжелые металлы, наночастицы). Поверхностно-активные вещества и тяжелые металлы тормозили скорость фильтрации морских двустворчатых моллюсков (мидии *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis*, устрицы *Crassostrea gigas*, пресноводные униониды) и других фильтраторов. Наночастицы оксидов металлов, а также наночастицы золота производили определенное негативное влияние на водные растения. Генотоксический эффект нескольких ксенобиотиков охарактеризован с помощью теста Эймса с бактериями *Salmonella typhimurium*. Новые данные подтверждают теорию полифункциональной роли биотического сообщества в удалении загрязняющих веществ из воды и улучшения качества воды. Это способствует более глубокому пониманию химико-биотических взаимодействий, расширяет научные основы борьбы с загрязнением. Результаты вносят вклад в разработку биотехнологических подходов для контроля загрязнения водной среды. Предварительные результаты авторов докладывались на нескольких научных конференциях в РФ, Сербии, США.

ОСТРОУМОВ С.А.

Московский государственный университет (МГУ) им. М.В.Ломоносова, биологический факультет, лаборатория физхимии биомембран, Москва, Россия

**НОВОЕ В ИЗУЧЕНИИ ПРОБЛЕМ ЭКОЛОГИИ И БИОЛОГИЧЕСКИХ
АСПЕКТОВ НАУК ОБ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ,
ВКЛЮЧАЯ ВОПРОСЫ ЭКОБИОТЕХНОЛОГИИ**

В последние годы в изучении проблем экологии и наук об окружающей среде были получены новые результаты. Наряду с разработкой фундаментальных вопросов экологии,

внесен вклад в изучение практически важных вопросов, в том числе в детализацию знаний об антропогенных воздействиях, о химико-биотических взаимодействиях, в понимание природных механизмов самоочищения среды. Это способствует созданию научных основ новых биотехнологий для решения проблем очищения компонентов окружающей среды, включая водную среду. Новые достижения получены многим исследователями, охватывают многие направления этих наук и в кратких тезисах невозможно их перечислить. Некоторые примеры небольшой части этих работ суммированы ниже, на конкретных примерах исследований, проводившихся в Московском государственном университете (МГУ) им. М.В.Ломоносова, к которым имел отношение автор и работавшие с ним аспиранты и сотрудники (подробнее на сайте: <http://www.scribd.com/doc/75290116>). Среди этих результатов:

(1) Вклад в выявление новых фактов об экологически опасных биологических эффектах при воздействии органических и неорганических химических веществ на организмы: бактерии, цианобактерии, простейшие, водоросли, высшие растения, беспозвоночные животные (подробнее см. сайты: о фактах, полученных на растениях <http://www.scribd.com/doc/74257181/>; о фактах, полученных на гетеротрофных организмах: <http://www.scribd.com/doc/74344178/>);

(2) Впервые получена обширная группа новых фактов об экологической опасности ранее недостаточно изученного класса химических веществ (синтетических поверхностно-активных веществ).

(3) Впервые получены новые факты о результатах воздействия наночастиц на конкретные виды водных и наземных макрофитов, которые ранее не исследовались, - например, впервые получены факты о фитотоксичности конкретных видов наноматериалов, в том числе наночастиц золота.

(4) Разработка новой методологии ингибиторного анализа взаимоотношений организмов в экосистемах. Новые факты о роли беспозвоночных и высших водных растений в очищении воды. Вклад в разработку теории полифункциональной роли водных организмов в поддержании стабильности водных экосистем, поддержании чистоты водной среды. Вклад в разработку теории самоочищения воды.

(5) Вклад в научные основы инновационных экотехнологий. Новые факты об удалении загрязняющих веществ из воды благодаря жизнедеятельности водных

организмов. Вклад в разработку вопроса о допустимых нагрузках химических веществ на системы с водными макрофитами, которые используются для очищения воды. Новая методология количественного определения допустимых нагрузок в условиях неоднократного поступления химических веществ в водную среду. Новые факты о фиторемедиационном потенциале видов макрофитов, которые ранее не исследовались.

(6) Вклад в анализ ранее недооцениваемых факторов эвтрофирования водоемов и водотоков. На этой основе предложения о новых подходах к решению проблемы эвтрофирования.

(7) Новые варианты определений фундаментальных понятий: экосистема, биогеоценоз, биосфера.

(8) В цикле публикаций, в том числе в двух книгах, концептуально изложены основы новой научной дисциплины, биохимической экологии; эти публикации в нескольких университетах РФ и других стран включены в литературу, рекомендуемую студентам и магистрам.

(9) В цикле публикаций, упомянутых в п.8, сформулированы новые концепции и предложены соответствующие термины: экологические хемомедиаторы и экологические хеморегуляторы.

(10) В развитие представлений В.И.Вернадского о биокосном веществе, выдвинуто новое представление о биокосной регуляции миграции элементов и перемещений вещества в биосфере.

(11) Предложена новая типология основных видов миграции элементов и перемещений вещества в экосистемах и биосфере.

(12) Дополнена типология основных видов вещества в биосфере и окружающей среде.

Дополнительные сведения о новых результатах в указанных направлениях и библиография даны на сайте: <http://www.scribd.com/doc/75290116>. Необходимо отметить, что более глубокое понимание фундаментальных вопросов функционирования экосистем и проблем химико-биотических взаимодействий вносит вклад в разработку научных основ инновационных экобиотехнологий, основанных на использовании биообъектов и биологических сообществ организмов для очищения среды, в том числе для очищения воды.

ПАВЛОВ В.Г.

Мурманский государственный технический университет, Мурманск, Россия

ПРОИЗВОДСТВО ТЕПЛА И ЭЛЕКТРОЭНЕРГИИ ИЗ ОРГАНИЧЕСКИХ ОТХОДОВ НА КРАЙНЕМ СЕВЕРЕ

Биоэнергетика (или энергия, получаемая из биомассы) – это отрасль возобновляемой энергетики, которая может быть определена, как солнечная энергия, сохраненная в форме биомассы (т.е. органического вещества); это энергия, которая содержится в живых или недавно погибших биологических организмах как растительного, так и животного происхождения. Данный тип энергии может послужить для удовлетворения бытовых и промышленных нужд за счет выработки тепла и/или электричества, а также производства твердых или жидких видов топлива. Для этого его, безусловно, необходимо преобразовать. В зависимости от агрегатного состояния органического сырья (биомассы), которое используется в сфере биоэнергетики, выделяют три основных сектора: сжигание твердой биомассы; производство жидких видов топлива на основе использования биомассы; производство газообразных видов топлива из биомассы.

В данной работе уделяется внимание последнему из выше перечисленных секторов и рассматривается направление производства биогаза. Важно отметить, что под производством биогаза здесь имеется в виду только технология анаэробной переработки органического сырья (т.е. процесс метанового сбраживания в ферментерах). О производстве свалочного газа речь в этом исследовании не ведется.

Рассматриваемое направление биоэнергетики обладает широким рядом преимуществ, является экономически выгодным и экологически целесообразным. Кроме того, мнение Межправительственной группы экспертов по изменению климата – лидирующей международной организации по оценке климатических изменений, которая призвана обеспечить мировое сообщество достоверной научной информацией по проблеме изменения климата и его влияния на окружающую среду и социально-экономическое развитие общества – говорит о том, что производство биогаза, как сфера энергетики, в настоящее время набирает темпы, а сама технология является хорошо изученной и может быть применена в разных масштабах.

Во многих странах анаэробная переработка органических отходов в тепло, электроэнергию и биометан (улучшенный биогаз) уже получила большое распространение: некоторые страны Европы (Германия, Франция, Австрия, Великобритания, Нидерланды, Дания, Бельгия, Чехия, Польша, Швеция), Азии (Китай, Индия, Киргизия) Северной Америки (США), а также Австралии и Океании (Австралия, Новая Зеландия). Более того, идет нарастающее развитие этой сферы биоэнергетики.

Среди мировых лидеров по производству биогаза можно выделить Китай, США и Германию. Россия пока отстает по этому показателю. Большое количество органических отходов в стране не используется в настоящее время. Но потенциал России, по оценкам специалистов, является значительным и гораздо выше возможностей потенциала Европы. По сведениям Департамента научно-технологической политики и образования МинСельхоза РФ агропромышленный комплекс России накапливает до 773 млн т органических отходов в год. Это при переводе в кубометры биогаза составляет 75 млрд в год (или же 59 млн т нефтяного эквивалента (тнэ) в год). Для сравнения, в Европе по статистике на 2007 г. образуется только 120 млн т органических отходов (или примерно 8 млн тнэ).

Развитие данного направления биоэнергетики в РФ является весьма вероятным в скором будущем. Мало того, в стране в конце 2011 г. по инициативе корпорации «БиоГазЭнергоСтрой» была создана российская профильная биогазовая ассоциация - «Национальный союз по биоэнергетике, возобновляемым источникам энергии и экологии». Благодаря ее действиям в начале 2012 г. был заключен ряд многообещающих контрактов с ведущими представителями европейских проектных организаций данной отрасли. Стартовали проекты строительства заводов по производству биогаза в южных районах страны.

Основным же лейтмотивом данной работы является то, что подобные заводы также могут функционировать и на Крайнем Севере. На сегодняшний день пока не существует ни одного прецедента производства биогаза в условиях Арктики. Однако это не говорит о невозможности работы там данного вида биоэнергетики. К примеру, в Норвегии в г. Тромсё к 2015 г. планируется запуск 30 автобусов, работающих на биометане. Последний предполагается получать на заводе по производству биогаза из органических отходов города (отходы рыбной промышленности, избыточный активный ил, пищевые отходы).

Если брать РФ, то, например, в г. Мурманске, расположенном примерно на той же широте, что и г. Тромсё, получение биогаза также является реально выполнимой задачей. Основным сырьем здесь могут стать пищевые отходы, ежегодно образующиеся в городе.

ПАВЛОВА А.П., ПОСТНИКОВА М.В.

*Пермский национальный исследовательский политехнический университет,
Пермь, Россия*

ПРИМЕНЕНИЕ ЦЕЛЛЮЛОЗНОГО ДРЕВЕСНОГО СЫРЬЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЭТАНОЛА

В условиях повышения цен на нефть и природный газ, а также истощения мировых запасов этого сырья неуклонно возрастает интерес к использованию альтернативных источников энергии. Одним из экологически безопасных источников энергии является биоэтанол – это безводный этиловый спирт, получаемый при сбраживании сахаров микроорганизмами. Для производства этанола используются многие виды крахмалистого и сахаристого сырья: зерно, картофель, меласса. Чтобы обойти проблему использования в качестве сырья для биоэтанола пищевых продуктов, в России, стране, обладающей огромными древесными ресурсами, целесообразно и перспективно применение в производстве биоэтанола древесной биомассы. Лигноцеллюлозную древесную биомассу можно рассматривать в качестве источника сырья для производства биоэтанола, так как является широко распространенной и достаточно дешевой в сравнении с зерном или плодами растительных культур. В России для развития производства топливного этанола из лигноцеллюлозной биомассы (древесного сырья) имеются необходимые научно-технические и промышленные предпосылки.

Для использования в производстве биоэтанола древесного сырья, из него необходимо тем или иным способом извлечь сахара, способные к сбраживанию. Большие перспективы для использования целлюлозы в качестве сырья для получения сахаров и биоэтанола открывает ферментативный гидролиз, осуществляемый комплексами целлюлаз и гемицеллюлаз, продуцируемые некоторыми грибами и бактериями. Лигноцеллюлозное древесное сырье (древесина) имеет сложную структуру и содержит, кроме целлюлозы,

гемицеллюлозы и лигнин, которые затрудняют доступ ферментов к поверхности целлюлозных волокон. Поэтому для создания технологии ферментативного гидролиза растительного сырья с целью выделения из него сахаров для сбраживания их в спирт необходима его предварительная подготовка, связанная с частичным или полным удалением лигнина и изменением структуры сырья. Одним из методов разделения компонентов растительной клетки является процесс делигнификации, предусматривающий получение целлюлозы. При разработке условий проведения процессов делигнификации для получения целлюлозного материала, пригодного для ферментации, важно применять экологически безопасные методы предобработки. Наиболее приемлемым в экологическом отношении реагентом для процессов делигнификации древесного и растительного сырья является перекись водорода. Поэтому нами для проведения данных исследований был выбран способ получения волокнистого целлюлозного материала (целлюлозы), пригодного для ферментативного гидролиза, с использованием перекиси водорода. В данной работе изучался процесс получения из лигноцеллюлозного сырья (древесных опилок) сахаров, которые в дальнейшем могут быть использованы в производстве биоэтанола.

С целью получения волокнистого целлюлозного материала, пригодного для ферментативного гидролиза, проводилось изучение процесса делигнификации древесных опилок перекисными растворами. На основании этих исследований было установлено, что с целью снижения расхода перекисного реагента при получении волокнистого материала с низким содержанием лигнина (присутствие большого количества лигнина отрицательно влияет на ферментативный гидролиз) перед перекисной обработкой можно использовать легкий подмол гидролизованных и пропитанных едким натром опилок. Полученный после размолы волокнистый материал из гидролизованных и пропитанных щелочным раствором опилок после промывки и сгущения подвергался окислительной перекисной обработке. Обработка проводилась при температуре 70-100°C, расход перекиси водорода составлял 2-10%, рН=9-10 концентрация массы при обработке составляла 10%.

При расходе на окислительную обработку раствора перекиси водорода 8,8% и проведении окислительной обработки при температуре 95°C в течение 120 минут были получены образцы, в которых содержание целлюлозы 89,1%, а лигнина 3,2%. Лучшие образцы полученного целлюлозного материала были использованы в качестве субстрата

для ферментативного гидролиза. Ферментативный гидролиз проводился с использованием целлюлазного фермента в течение 48ч при перемешивании, температуре 48-50°C, pH=4,7 (ацетатный буфер) и концентрации субстрата 10г/л. О ферментативной гидролизуемости полученного нами субстрата судили по накоплению сахаров в гидролизате. Проведенные исследования ферментативного гидролиза показали, что полученная нами целлюлозная древесная масса пригодна для ферментативного гидролиза с целью получения сбраживаемых в спирт сахаров, необходимых для производства биоэтанола.

ПАВЛОВА А.С., ЗАРЫТОВА В.Ф.

*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия*

КОНЬЮГАТЫ ТРИПЛЕКС-ФОРМИРУЮЩЕГО ОЛИГОНУКЛЕОТИДА С БЛЕОМИЦИНОМ ДЛЯ ПРЯМОГО РАСЩЕПЛЕНИЯ ДВУЦЕПОЧЕЧНОЙ ДНК

Реакционноспособные производные триплекс-формирующих олигонуклеотидов (ТФО) являются перспективными антиген-направленными соединениями. Особенно перспективным представляется использовать конъюгаты ТФО с группировками, способными вызывать прямые двуцепочечные разрывы ДНК.

Были синтезированы конъюгаты 15-звенного ТФО с остатком блеомицина А5 на 5'-конце и бифункциональные конъюгаты ТФО, содержащие помимо остатка блеомицина дополнительно остаток *N*-(2-гидроксиэтил)феназиния или 6-хлор-2-метоксиакридина на 3'-конце ТФО. С помощью метода задержки в геле рассчитаны значения констант диссоциации соответствующих триплексов и показано, что введение остатка акридина в состав конъюгата ТФО с блеомицином на порядок повышает стабильность формируемого триплекса. Показано, что все синтезированные конъюгаты способны осуществлять специфическое и неспецифическое расщепление ДНК-мишени с образованием прямых разрывов и щелочеллабильных сайтов. Степень специфического расщепления ДНК-мишени составляет 15% в случае 5-кратного избытка конъюгатов по отношению к дуплексу ДНК. Показано, что сайт-направленное расщепление ДНК-мишени в составе триплекса протекает в основном (>90%) с образованием прямых разрывов обеих цепей ДНК.

Полученные данные свидетельствуют о перспективности использования блеомицин-содержащих олигонуклеотидов в качестве антиген-направленных соединений.

Работа поддержана грантами РФФИ: № 08-04-01045-а и № 11-04-01408-а.

ПАВЛОВА В.А., НЕФЕДЬЕВА Е.Э., ЛЫСАК В.И.

Волгоградский государственный технический университет, Волгоград, Россия

ВЛИЯНИЕ ИМПУЛЬСНОГО ДАВЛЕНИЯ НА СОСТОЯНИЕ БИОПОЛИМЕРОВ СЕМЯН

В качестве фактора, действующего на растения, было выбрано импульсное давление (ИД), создаваемое прохождением ударной волны. ИД в интервале 3-35 МПа способствует стимулированию физиологических процессов в семенах и растениях, ведущих к увеличению урожая, и отбору устойчивых к данному воздействию форм (в дозах, снижающих всхожесть).

У организмов в состоянии покоя (воздушно-сухие семена, пыльца, споры) физические воздействия оставляют скрытые (потенциальные) повреждения, которые реализуются во время перехода клеток в жизнедеятельное состояние. Аналогично в семени при обработке ИД образуются повреждения, которые развиваются в дальнейшем при хранении. Эти эффекты могут быть связаны с дроблением, появлением трещин, которые будут продолжать расти в процессе хранения, разрушением кристаллической решетки или фазовыми переходами полимеров.

Полимеры (и, в частности, биополимеры в семенах) могут находиться в различных фазово-агрегатных состояниях. Для полимеров характерны кристаллическое, и аморфное состояния, причем к последнему относятся стеклообразное, высокоэластическое, вязкотекучее состояния. Переходы между тремя последними состояниями называют релаксационными. Их температуры существенно зависят от скорости деформации полимера и могут смещаться на десятки градусов. Переходы из одного состояния в другое зависят от температуры и давления. При всестороннем сжатии полимера при некотором давлении $P_{ст}$ (давлении стеклования) полимер переходит в стеклообразное состояние. Известно, что переход биополимеров в стеклообразное состояние продляет жизнь семян.

В экспериментах использовали растения гречихи (*Fagopyrum esculentum Moench.*) сорта Саулык. Контрольные семена известной массы помещали в воду на 2 часа, а опытные, также предварительно взвешенные, подвергали ударно-волновой обработке, после чего продолжали выдерживать в воде. Через 1 час и 2 часа все партии семян взвешивали и определяли содержание воды.

В первые часы набухания вода поглощается в основном за счет матричного потенциала биополимеров, а также путем адсорбции на поверхности частиц. Только при достижении 60%-ной оводненности начинается гидролиз запасных веществ, появляются осмотически активные молекулы, создающие водный потенциал. Следовательно, поглощение воды в первые часы связано с состоянием биополимеров.

Предположим, что под действием ИД происходили следующие изменения состояния биополимеров: 1) разрыхление структуры и увеличение пространства между частицами; 2) рост имевшихся до воздействия микротрещин и разламывание частиц; 3) дополнительное увеличение адсорбирующей поверхности за счет разломов и микротрещин.

Через 1 час после действия ИД поглощение воды нарастало линейно, поскольку вода, видимо, поступала в промежутки между макрочастицами. Через 2 час обнаружены три экстремума на кривой зависимости поглощения воды от величины воздействующего ИД. Следовательно, на поглощение воды действовали, по крайней мере, три процесса, которые изменялись по-разному в зависимости от величины ИД. Отметим, что в это время поглощение и удержание воды связано с процессами адсорбции и взаимодействия гидрофильных группировок. Усиление поглощения воды при низких ИД (11-20 МПа) было связано с расширением промежутков между частицами и увеличением доступности гидрофильных групп для воды. Торможение поглощения воды при ИД 23-29 МПа могло быть вызвано смещением или разломом гидрофильных частиц. Эффект проявлялся не сразу, а в процессе набухания, когда биополимеры переходили в коллоидное состояние, формировали третичную и четвертичную структуру, активно включая гидрофильно-гидрофобные взаимодействия. ИД 35-41 МПа вызывали сильные изменения структуры, при которых большинство семян утрачивали способность к прорастанию, однако способствовали росту адсорбирующей поверхности и усилению поглощения воды через 1-

2 час набухания. В дальнейшем, когда в процесс поглощения воды вовлекались осмотически активные продукты гидролиза, он останавливался.

Как видно из вышеизложенного, изменение состояния полимеров чрезвычайно сложно, однако оно зависит от параметров на фронте ударной волны – давления, температуры и скорости их изменения. Следовательно, оказывая влияние на параметры стеклообразного состояния биополимеров семян путем обработки ИД, мы способствуем изменениям биополимеров и параметров выхода из состояния покоя. В результате развивается последствие ИД у проростков и взрослых растений.

ПАВЛОВСКАЯ Н.Е., ГОРЬКОВА И.В., ГАГАРИНА И.Н., ГОРЬКОВ А.А.,

ПОЛЕХИН С.А., КОСТРОМИЧЕВА Е. В., ГАГАРИНА А.Ю.

ФГБОУ ВПО «Орловский государственный аграрный университет», Орел, Россия

ИНДУЦИРОВАНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ГОРОХА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИМИ ПРЕПАРАТАМИ НА ОСНОВЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ

Потери урожая гороха от болезней в годы эпифитотий достигают 80-90%. Интенсивные технологии возделывания и использование большого разнообразия сортов сельскохозяйственных растений провоцирует появление новых более агрессивных штаммов патогенов, что требует защиты уже внедренных в производство сортов.

Основной особенностью экологизированной системы защиты растений - широкая биологизация технологий, в первую очередь защиты растений.

Перспективным способом защиты растений в последнее время считается применение биологически активных препаратов и физиологически активных веществ, которые позволяют выработать защитные механизмы у растений, иммунитет.

Индуктировать устойчивость растений заставляет нас сложнейшая экологическая обстановка, сложившаяся на нашей планете. Сельскохозяйственные растения постоянно находятся в условиях экологического стресса, поскольку страдают от болезней и вредителей, бесконтрольного применения пестицидов, переизбытка или недостатка

удобрений. Никакие пестициды не могут заменить иммунную систему, а в ряде случаев способны ее подавить.

Цель данной работы заключается в выделении и изучении влияния биологической активности экстрактов на ростовые показатели проростков гороха.

В лабораторных условиях обрабатывали семена гороха сорта «Вега» в течении 2-х часов перед проращиванием 1 % водными экстрактами лекарственных растений. Эксперимент проводили в течение 10-и суток. Контрольный вариант без обработки (замачивание в воде).

В ходе эксперимента выявлено, что все исследованные экстракты проявляют биологическую активность и улучшают ростовые показатели семян гороха по сравнению с контролем. Отмечена максимальная биологическая активность у экстрактов из листьев папоротника, повышающая ростовые показатели, такие как, длина и масса проростков, длина и масса корешков, количество боковых корешков в 1,5-2 раза. Выделяются также варианты с применением экстракта из хвои лиственницы, корней папоротника, полыни.

Полученные данные позволяют проводить дальнейшие исследования по изучению биологической активности полученных экстрактов для создания перспективных средств борьбы с болезнями гороха. Использование таких средств в защите сельскохозяйственных культур от вредителей и болезней, взамен дорогостоящих, опасных для человека, животных и окружающей среды синтетических пестицидов, остатки которых накапливаются в окружающей среде и губительно действуют на экологию, значительно снизит экологическую нагрузку на окружающую среду.

ПАВЛОВСКАЯ Н.Е., ГОРЬКОВА И.В., ГАГАРИНА И.Н., ГОРЬКОВ А.А.,

ПОЛЕХИН С.А., КОСТРОМИЧЕВА Е.В., ГАГАРИНА А.Ю.

ФГБОУ ВПО «Орловский государственный аграрный университет», Орел, Россия

ФОРМИРОВАНИЕ СОСТАВА ИММУНОКОРРЕКТИРУЮЩИХ БИОПРЕПАРАТОВ

Анализ социально-экономической ситуации в аграрном секторе свидетельствует, что применение устаревших технологий, несовершенных методов земледелия и

растениеводства приводит к снижению продуктивности сельскохозяйственных культур и деградации земельных угодий. Отсутствие внедренческой деятельности, системы научно-технической информации, эффективной схемы взаимодействия научных учреждений с внедренческими структурами приводит к усугублению деградации отраслей комплекса, ведет к росту себестоимости и низкой конкурентоспособности продукции, тормозит социально-экономическое развитие сельской местности, резко снижает качество жизни на селе.

Перспективным направлением в сложившейся ситуации является разработка методов защиты растений на основе применения биологически активных препаратов и физиологически активных веществ, усиливающих защитные механизмы у растений. Биологические средства защиты заслуживают все большего внимания как альтернатива химическим пестицидам в качестве их полной замены или использования в интегрированных системах защиты растений.

Цель данной работы заключается в создании биопрепаратов на основе композиции биофлавоноидов, выделенных из лекарственных растений.

Полученные водные экстракты из смеси папоротника, пижмы, полыни, хвои ели и лиственницы, гречихи, сои и др. были проанализированы на наличие биологически активных веществ, обуславливающих их антиоксидантную систему.

Обнаружено, что действующими веществами являются биофлавоноиды,

Было выявлено, что биопрепарат обладает относительной стабильностью к окислению, имеет нейтральную среду, $pH = 7,4$. В процессе хранения pH изменяется всего на 0,2 ед. Это связано с частичным гидролизом органических веществ, в результате которого образуется гидрохинон и глюкоза.

Лабораторные испытания биопрепарата, проводимые на семенах гороха сорта Фараон, показали проявление его биологической активности по отношению к контролю (вода). В качестве тест-системы была выбрана антиоксидантная. Изучали изменение активности ферментов протеолитического ряда и низкомолекулярных соединений, препятствующих образованию свободных радикалов.

Выявлена синхронность падения каталазной активности с одновременным ростом пероксидазной. Повышение супероксиддисмутазы, витаминов С и Е доказывает эффективность применения препарата.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что испытываемые экстракты проявляют биологическую активность, следовательно, их представляется возможным применять в качестве усилителей иммунитета.

ПАВЛОВСКАЯ Н.Е.¹, ЮШКОВА Е.И.², БОТУЗ Н.И.¹, КУЛЕШОВА Е.С.²

¹*Орловский государственный аграрный университет, Орел, Россия*

²*Орловский государственный университет, Орел, Россия*

ПРИРОДНЫЕ СЫРЬЕВЫЕ РЕСУРСЫ ДЛЯ СОЗДАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПРЕПАРАТОВ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

Зернобобовые культуры, картофель, сахарная свекла – основные сельскохозяйственные растения, возделываемые в Орловской области. Однако часто из-за поражения этих культур вредителями и болезнями происходят значительные потери урожая. Одним из наиболее многообещающих способов защиты растений является индуцирование их устойчивости. Этот способ основан не на прямом подавлении патогенов, а на индуцировании естественного потенциала растительной ткани. При возделывании неустойчивых и среднеустойчивых сортов, индуцирование устойчивости у которых к вредителям и болезням имеет решающее значение с экономической и экологической точек зрения, это приобретает особенно большую актуальность. Иммуностимуляторы часто содержатся в самих растениях и являются компонентами или продуктами микроорганизмов, которые живут в симбиотическом взаимодействии с растениями.

На протяжении ряда лет в Орловском государственном аграрном университете совместно с Орловским государственным университетом ведется комплекс исследований по выделению биологически активных веществ из природных объектов и изучению их физико-химических и физиолого-биохимических свойств. Опираясь на результаты проведенных исследований, была доказана и объяснена с точки зрения биохимических процессов биологическая активность препарата гуминового комплекса, выделенного из вермикулита, позволяющего повысить иммунитет сельскохозяйственных растений, таких как горох,

пшеница, картофель, что сказалось на урожайности и устойчивости последних к воздействию неблагоприятных условий внешней среды.

Еще одним направлением исследований является выделение и изучение растительных антибиотиков. Природные антибиотики, как правило, не имеют побочных эффектов, надежно предотвращают заболевания и успешно применяются в растениеводстве в качестве активных средств борьбы и профилактики бактериальных и грибковых заболеваний растений. Практически все без исключения натуральные антибиотики получают из растений, которые используют эти вещества для защиты от патогенов.

Ячмень — самая древняя возделываемая зерновая культура. Установлено, что ячмень отличается повышенным содержанием противовирусных и антибактериальных веществ. Проведенные ранее исследования выявили наличие в зернах ячменя малотоксичного антибиотика гордецина.

Задачей нашего исследования было установление содержания гордецина в генотипах ячменя: Волгодон, № 546, Нудум-1, Ураган, Эректум-1, Фараон, Атаман, Медикум, отличающихся между собой комплексной устойчивостью к болезням. Анализ устойчивости генотипов ячменя к возбудителям болезней показал, взаимосвязь содержания гордецина с устойчивостью ячменя к таким заболеваниям как ринхоспориоз, пыльная головня, корневые гнили, ржавчина, мучнистая роса, гельминтоспориоз.

Эпифиты антагонисты так же представляют практический интерес для биологической защиты растений от болезней. Установлено, что плесени, поражающие корневую систему ячменя при проращивании, являются продуцентами антибиотических веществ. Идентификация плесеней, полученных на корешках проростков ячменя, позволила выявить наличие *Streptomyces*. Идентификация бактериальной массы позволила установить наличие бактерии *Klebsiella pneumoniae*.

Антибиотики могут оказывать стимулирующее влияние на рост и развитие растений, определенным образом активировать отдельные процессы и функции. Чаще всего это действие выражается в ускорении роста растений и повышении прироста зеленой массы. Установлено положительное действие вытяжки из плесени ячменя на подавление развития гриба *Fusarium oxysporum* и стимуляцию роста и развития проростков гороха.

Дальнейшие исследования позволят установить все продуценты антибиотиков на корнях ячменя и выявить взаимосвязь накопления данной группы веществ с устойчивостью ячменя к возбудителям и болезням.

Биотехнология открывает новые возможности в деле создания препаратов на основе природных антибиотиков, губительно влияющих на возбудителей болезней растений, отличающихся высокой эффективностью и безвредностью для человека и животных.

ПАНОВА А.А.

Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

ВЛИЯНИЕ ИНДИВИДУАЛЬНОГО ОПЫТА НА ЛОКОМОТОРНУЮ АКТИВНОСТЬ И ПОВЕДЕНИЕ УХАЖИВАНИЯ САМЦОВ ДРОЗОФИЛЫ

Взаимодействия с другими особями, чаще своего вида, в процессе которых они обмениваются стимулами, называют социальным поведением. Социальное окружение оказывает влияние не только на позвоночных и общественных беспозвоночных, но и на насекомых, не обладающих развитой социальностью, каким является *Drosophila melanogaster*. Большинство взаимодействий между особями этого вида сводится к половому или агрессивному поведению и чаще всего происходит в условиях агрегаций (скоплений), в которые мухи собираются активно или пассивно. Исследования, проведенные на самках дрозофилы, показали, что при попадании в групповую ситуацию насекомые стараются избегать тесных контактов, т.к. они наказываются другими особями ударами ног и крыльев. В результате мухи проявляют две безусловнорефлекторные реакции: убегание от чрезмерно приблизившейся особи, что приводит к увеличению частоты побегов, и прекращение побежки при встрече с другой мухой, что приводит к снижению длительности побегов. Методом проб и ошибок дрозофилы обучаются подавлять свою активность, в результате уменьшается частота побегов и, как следствие, неприятные контакты с другими самками. Данное изменение поведения было отнесено к оперантному обучению (инструментальный условный рефлекс). Последствия содержания самок в группе найдено не было. В отношении самцов дрозофилы было обнаружено, что содержание в группе приводит к уменьшению интенсивности полового и

агрессивного поведения. Влияние светового режима при содержании на последующее поведение дрозофилы изучено слабо.

В данной работе был проведен анализ влияний условий содержания (содержания в группе из 10-20 особей или поодиночке) и светового режима (содержание в постоянной темноте или при стандартном 12-часовом световом дне) на локомоторную активность, половое поведение и звукопродукцию самцов дрозофилы.

Экспериментальных самцов дрозофилы линии дикого типа Canton-S собирали без обездвиживания в течение 3 часов после вылупления и содержали в течение 3-5 суток в стаканчиках со стандартной средой по одной из 4 схем: поодиночке при стандартном световом режиме; поодиночке в постоянной темноте; в группе при стандартном световом режиме; в группе в постоянной темноте. Изоляцию из группы и перемещение из темноты на свет проводили непосредственно перед посадкой на опыт.

Для анализа двигательной активности самцов поодиночке помещали в камеры, где с помощью программы *Drosophila Tracks* (с. Н.Г. Камышев) в течение часа регистрировали их локомоторное поведение. Были получены индекс ухаживания (доля времени, занятая побегом), частоту и длительность побегов, длительность периодов покоя. При регистрации поведения ухаживания и звукопродукции самцов поодиночке на 5 минут помещали в камеру с оплодотворенной самкой. Для регистрации и анализа поведения ухаживания использовали программу *Drosophila Courtship* (с. Н. Г. Камышев). Были получены индекс ухаживания (доля времени, занятая ухаживанием), частота, длительность и доля времени, занятая отдельными элементами ухаживания. Для регистрации и анализа звукопродукции использовали программу *Drosophila Courtship Song Analysis* (с. Н.Г. Камышев). Были получены индексы, частоты и длительности синусоидальной и импульсной песен.

Проведенное исследование показало, что световой режим не оказывает существенного влияния на локомоторную активность и поведение ухаживания самцов. В случае звукопродукции, содержание в темноте и содержание в группе, действуя синергично, приводят к сильному уменьшению исполнения самцом песни ухаживания. Кроме того, самцы, содержащиеся в групповой ситуации, менее интенсивно ухаживают за оплодотворенной самкой, при этом уровень их двигательной активности остается высоким. При тестировании локомоторной активности, когда самец находится в

экспериментальной камере один, содержание в группе приводит к уменьшению исходной активности в первые 5 минут наблюдения и сильному снижению уровня спонтанной активности (последние 5 минут часового наблюдения) по сравнению с самцами, содержащимися поодиночке. Величина реактивности (разница между начальной активностью и спонтанной активностью) более чем в 2 раза больше у самцов, содержащихся в группе. Низкий уровень спонтанной активности у таких самцов сохраняется минимум в течение 3 часов после изоляции из группы.

Сохранение низкого уровня спонтанной активности самцов после их изоляции из группы, по-видимому, является результатом оперантного обучения, описанного для самок, при котором их побежки наказываются агрессией со стороны других особей (пассивное избегание). Обучение приводит также к снижению интенсивности ухаживания за самкой вследствие усиления реакции активного избегания.

ПАНОВА Г.Г., ЧЕРНОУСОВ И.Н., ЖЕЛТОВ Ю.И., СУДАКОВ В.Л., КАНАШ Е.В.,
КАРМАНОВ И.В., АНИКИНА Л.М., УДАЛОВА О.Р., АЛЕКСАНДРОВ А.В.

*Государственное научное учреждение Агрофизический научно-исследовательский институт
Российской академии сельскохозяйственных наук, Санкт-Петербург, Россия*

НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СОЗДАНИЯ АГРОБИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ КОМПЛЕКСОВ ПО КРУГЛОГОДИЧНОМУ РЕСУРСОСБЕРЕГАЮЩЕМУ ПРОИЗВОДСТВУ ВЫСОКОКАЧЕСТВЕННОЙ РАСТИТЕЛЬНОЙ ПРОДУКЦИИ

Для решения острой проблемы обеспечения населения свежей качественной экологически безопасной растениеводческой продукцией, особенно во внесезонный период, актуальным является разработка новых наукоемких технологий ее производства. В этом отношении наряду с модернизацией традиционных тепличных сооружений защищенного грунта весьма перспективно создание высокоэффективных агробиотехнологических комплексов по круглогодичному интенсивному ресурсосберегающему экологически безопасному и рентабельному производству высококачественной растительной продукции, организация которых возможна в имеющихся на предприятиях или организациях

помещениях. Агробиотехнологический комплекс должен представлять собой систему энергоэкономичных вегетационных светоустановок различных модификаций (модулей) с наукоемкими ресурсосберегающими агротехнологиями выращивания растений, размещенных в помещении с микроклиматическим оборудованием, обеспечивающим требуемые режимы температуры, влажности, циркуляции воздуха в зависимости от особенностей выращиваемой культуры.

Преимущества агробиотехнологических комплексов заключаются в более высокой производительности, качестве получаемой продукции, экологической безопасности производства, надежности работы систем жизнеобеспечения растений, экономном расходовании ресурсов.

В ГНУ АФИ Россельхозакадемии на основе комплекса знаний о продукционном, адаптационном и средообразующем потенциале растений, о закономерностях их взаимодействия со средой обитания в регулируемых условиях созданы научно-технические предпосылки (Панова 2009; Панова с соавт., 2009; 2011; Пат. РФ №108705, 2011) для создания таких комплексов, а именно:

- разработан типоразмерный ряд автоматизированного вегетационно-облучательного оборудования нового поколения с энергосберегающими световыми модулями, с оригинальной ресурсосберегающей системой питательный раствор - корнеобитаемая среда на основе малообъемных органоминеральных почвозаменителей с оптимальными свойствами для реализации продукционного потенциала растений;
- разработаны агротехнологические приемы выращивания растений в вегетационно-облучательном оборудовании;
- разработаны и апробированы биофизические контактные и дистанционные методы, технические средства (информационно-технические устройства «Фитоскан», «Оптиматор») для экспресс-диагностики физиологического состояния растений, оценки параметров среды их обитания и на основе анализа получаемой информации совершенствования технологий производства качественной растительной продукции;
- разработаны и апробированы приемы оперативного управления продукционным процессом растений, качеством растительной продукции с помощью биологически активных кремнийсодержащих хелатных препаратов и фотобиологических воздействий на метаболизм растений;

– составлен реестр овощных, лекарственных и декоративных культур, дающих высокие урожаи качественной продукции при реализации разработанных технологий их производства на вегетационно-облучательном оборудовании.

Агробиологические испытания разработанного вегетационно-облучательного оборудования показали, что в течение года с 1 м² установок можно получить несколько урожаев растительной продукции с общей массой, например, салата или горчицы - до 85 кг, укропа или петрушки - до 72 кг, огурца - до 180 кг, томата - до 100 кг. Получаемая овощная продукция имеет высокие качественные показатели по содержанию витаминов, минеральных элементов и другим характеристикам пищевой ценности.

Полученные результаты подтверждают перспективность создания агробиотехнологических комплексов по круглогодичному интенсивному рентабельному производству растительной продукции в непосредственной близости от потребителя, что будет способствовать решению проблемы обеспечения населения отечественной растительной продукцией высокого качества.

ПАНОВА Г.Г., ПОНОМАРЕВА Л.В., СТЕПАНОВА О.А.,
ЦВЕТКОВА Н.П., АНИКИНА Л.М.

*Государственное научное учреждение Агрофизический научно-исследовательский институт
Российской академии сельскохозяйственных наук, Санкт-Петербург, Россия*

ПРИЕМЫ ЭКОЛОГИЧЕСКИ АДАПТИВНОЙ РЕМЕДИАЦИИ ЗАГРЯЗНЕННЫХ ТОКСИКАНТАМИ ЗЕМЕЛЬ

В современных условиях глобального антропогенного загрязнения природной среды и связанного с этим ухудшения здоровья людей одной из приоритетных задач является разработка эффективных и экологически безопасных методов реабилитации нарушенных экосистем. Полученные нами в результате комплексных исследований знания о закономерностях взаимодействия почвенно-растительных систем с нефтепродуктами, с высокотоксичным компонентом жидкого ракетного топлива несимметричным диметилгидразином и их производными послужили основой для разработки приемов

ремедиации химически загрязненных земель (Ермаков с соавт., 2005; Панова с соавт., 2009). Разработанные приемы основаны на использовании средообразующего и адаптационного потенциала растений, микроорганизмов, а также природных сорбентов и биологически активных средств с фитопротекторными свойствами.

Технологический прием использования растений для реабилитации почв в местах локального химического загрязнения основан на их способности интенсифицировать деструкцию токсикантов в почве вследствие активизации деятельности микроорганизмов и процессов трансформации органического вещества. Метод фиторемедиации включает три этапа: 1) размещение на поверхности загрязненного участка рассчитанного по толщине слоя оригинального органо-минерального почвозаменителя с высокой удельной поверхностью и сорбционной способностью (Пат. №2067969 РФ, 1996) для предотвращения поступления летучих токсичных соединений в атмосферу за счет испарения. Почвозаменитель разработан на основе верхового торфа низкой степени разложения с добавлением различных минеральных компонентов, улучшающих физико-химические свойства субстрата и необходимых для оптимального развития растений и микроорганизмов; 2) размещение поверх этого слоя специальных пластинчатых контейнеров, представляющих собой органо-минеральный почвозаменитель в спрессованном виде (Пат. №2073417 РФ, 1997; Пат. № 2101898 РФ, 1998) с семенами растений, толерантных к загрязнению и адаптированных к конкретным условиям региона; 3) некорневая обработка фитоценозов кремнийсодержащими хелатными препаратами для снижения токсикантов в растениях (Ермаков с соавт., 2007; Панова, 2009).

Реализация технологических операций по реабилитации загрязненных химическими токсикантами почв на полигоне космодрома «Плесецк» в природных условиях Архангельской области и в регулируемых условиях лабораторного биополигона ГНУ АФИ Россельхозакадемии, обеспечивала прекращение поступления их в воздушную среду и позволяла ускорить очищение почв в 2-15 раз. Некорневая обработка растений на загрязненных территориях разработанными биологически активными препаратами обеспечивала повышение устойчивости растений к загрязнению и интенсифицировала в 2-3 раза процессы деструкции токсикантов в них (Ермаков с соавт., 2005; 2007; Панова с соавт., 2009).

Способ ремедиации почв, загрязненных нефтью или продуктами её переработки, включает использование эффективных микроорганизмов-деструкторов нефтяных углеводородов, а также комплекс агротехнических и агрохимических мероприятий, обеспечивающих эффективность процессов биодеструкции (Пономарева с соавт., 2005). Микроорганизмы-деструкторы представлены выделенной из нефтезагрязненной почвы ассоциативной культурой ГХ-IV, включающей бактерии родов *Arthrobacter* и *Micrococcus*. Апробация метода биоремедиации нефтезагрязненных почв на нефтебазах в городах Курске и Брянске показала его высокую эффективность. Степень очистки почв при выполнении всего комплекса технологических операций составляла 65-75% от величины исходного загрязнения, что в 2,5 – 8,5 раз выше по сравнению со степенью естественной очистки почв 7-28%. При этом в течение первого месяца рекультивационных мероприятий содержание загрязнителя в почве сокращалось в два раза, интродуцированная в почвы микрофлора быстро адаптировалась к условиям загрязнения и сохраняла углеводородокисляющую активность на протяжении времени. Разработанный способ биоремедиации почв обеспечивает эффективную очистку не только верхнего слоя почвы (0-10 см), но и более глубоких ее слоев (10-45 см).

Разработанные приемы экологически адаптивной биоремедиации почвенно-растительных систем могут найти широкое применение в регионах, загрязненных нефтепродуктами, компонентами ракетного топлива, ядохимикатами сельскохозяйственного назначения, токсичными отходами химических предприятий.

ПАНТЮХОВ П.В.¹, ЛИХАЧЕВ А.Н.², ТЕРТЫШНАЯ Ю.В.³, ПОПОВ А.А.¹

¹ *Российский экономический университет имени Г.В. Плеханова, Москва, Россия*

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

³ *Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия*

КОМПОЗИЦИОННЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИ РАЗРУШАЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ. ОСОБЕННОСТИ ВЫБОРА НАПОЛНИТЕЛЕЙ

После использования изделия из полимерных материалов оказываются на свалках и захоронениях твердых бытовых отходов. Период полного биологического разрушения

синтетических полимеров в условиях окружающей среды не известен, однако по теоретическим расчетам он превышает сотни лет. Для того чтобы очистить свалки от полимерного мусора, создаются так называемые биоразлагаемые полимерные материалы, которые заменяют традиционные полимеры в использовании, однако после использования, оказавшись в условиях окружающей среды, под воздействием микробиоты, они распадаются на углекислый газ и воду. К таким материалам относятся как полностью синтезированные, так и композиционные материалы. Композиционные материалы имеют матрицу из синтетического полимера и биоразлагаемый наполнитель.

В качестве биоразлагаемого наполнителя обычно используют отходы различных производств, основу химического состава которых составляют лигнин и целлюлоза. Такие наполнители имеют низкую рыночную стоимость, при этом они обладают достаточной биоразлагаемостью. Для подтверждения последнего тезиса авторами был выбран ряд лигноцеллюлозных отходов производств и проведен эксперимент по их биодеструкции с помощью плесневых грибов. Были исследованы следующие материалы: льняная костра, лузга подсолнечника, лигносульфонат натрия. Льняная костра является отходом при производстве льняных полотен, лузга подсолнечника является отходом при производстве растительного масла, а лигносульфонат натрия выделяется в качестве отхода при производстве бумаги.

Среди факторов окружающей среды максимальное воздействие на образцы оказывают почвенные микроорганизмы. Известно, что наиболее значимым биодеструктором в почве являются плесневые грибы. Согласно ГОСТ 9.049-91 наиболее активными деструкторами полимерных материалов являются 9 видов плесневых грибов, 4 из которых (*Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Penicillium chrysogenum*, *Trichoderma viride*) были использованы в данной работе.

Масса образовавшегося мицелия гриба на водной вытяжке различных наполнителей позволяет судить о биоразлагаемости водорастворимой части наполнителей. Самые высокие показатели по всем грибам наблюдаются у лигносульфоната, от 60 до 100 мг мицелия образовалось в пробирках, содержащих 10 масс. % наполнителя и 90% би-дистиллированной воды. Существенно ниже этот показатель у лузги и костры, от 5 до 20 мг. Такую закономерность легко объяснить высокой водорасстворимостью лигносульфоната и низкой водорастворимостью костры и лузги. Таким образом, можно сделать вывод, что

плесневые грибы способны использовать в качестве единственного источника питания данные наполнители, значит материалы с ними будут биоразлагаемыми. При наличии влаги в большей степени будет разрушаться материал, содержащий лигносульфонат.

Для оценки биоразлагаемости материалов в целом (не только водорастворимой части) использовался метод посева грибов на агаризованные среды, содержащие разные наполнители. По скорости роста мицелия и площади обрастания чашек Петри была оценена биоразлагаемость каждого наполнителя для каждого из 4 грибов. Согласно усредненным показателям обрастания, биоразлагаемость всех трех наполнителей примерно одинакова, наиболее активными деструкторами среди грибов являются *Penicillium chrysogenum* и *Trichoderma viride*.

Таким образом, наполнители, являющиеся отходами производств, состоящие из лигнина и целлюлозы являются оптимальными по параметру биоразлагаемости для создания композиционных биологически разрушаемых материалов.

ПАРАМОНОВА Н.Ю., ФИРИЧЕНКОВА С.В.

ФГБОУ ВПО «Костромская государственная сельскохозяйственная академия»,

Кострома, Россия

АНАЛИЗ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЕНТЕРОБАКТЕРИЙ К АНТИБИОТИКАМ

В современных условиях проблема лекарственной устойчивости микроорганизмов приобрела глобальный характер. Полирезистентные микроорганизмы являются причиной возникновения тяжелых форм инфекций, вызванных условно-патогенными микроорганизмами, а также разнообразных инфекционных болезней (колибактериоз, сальмонеллез, пастерелез и др.). Нерациональная антибиотикотерапия приводит к летальным исходам, наносит существенный экономический ущерб. Это диктует необходимость внедрения в работу ветеринарных врачей комплекса аналитических исследований и организованных мероприятий по проведению динамического мониторинга за структурой и уровнем лекарственной устойчивости микроорганизмов.

Сведения о распространенности устойчивых микроорганизмов на территории России, к сожалению, ограничены и часто значительно различаются в зависимости от

профиля ветеринарного учреждения и вида обследуемых животных. Так, например чувствительность *E.coli* к цефалексину, варьирует от 68,8% до 100%. В связи с этим при разработке схем рациональной антибактериальной терапии встает вопрос о месте препаратов, длительно применяемых в ветеринарной клинике.

Цель работы - выявить закономерности выработки устойчивости к антибиотикам патогенных микроорганизмов из семейства **Enterobacteriaceae**, выделенных от животных в Костромской области.

В работе использовали 1638 патогенных штаммов энтеробактерий, выделенных от больных животных и птиц. Исследования проводили с 2002 по 2011 год. Идентификацию возбудителей проводили по общепринятым методикам. Уровень антибиотикорезистентности изучали к 17 антибиотикам с различным механизмом действия и широте применения в ветеринарной практике: ингибирующие синтез клеточной стенки микроорганизмов (β -лактамы), синтез белка и функции рибосом (аминогликозиды, левомицетин, макролиды, тетрациклин). Для определения чувствительности бактерий к антибиотикам применяли диффузный метод с использованием стандартных индикаторных дисков «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» (МУК 4.2.189004, 2004 г).

Среди сравниваемых антибиотиков наименьшей активностью в отношении энтеробактерий обладают макролиды (олеандомицин и эритромицин, соответственно 98,9 и 90,9% устойчивых штаммов). Наибольшая активность отмечается у аминогликозидов II поколения - гентамицина (45,8% чувствительных микроорганизмов). Так за девять лет штаммы *E.coli* выработала резистентность к пенициллинам, тетрациклинам, аминогликозидам I поколения, цефалоспорином I поколения. Больше половины изолятов микроорганизма вырабатывают резистентность к самым широко используемым антибиотикам. Очевидно, что ценность этих препаратов как антибиотиков для лечения инфекций, вызванных грамотрицательным патогеном, снижается.

Проведенное исследование показало, что выделенные от больных животных представители семейства *Enterobacteriaceae* формируют высокую резистентность к антибиотикам. Эти препараты рекомендовать для эмпирической терапии нецелесообразно, в связи с риском инфекции, вызванной устойчивыми возбудителями.

Несомненно, что в такой огромной стране, как Россия, существуют значительные территориальные вариации распространения резистентности к антимикробным препаратам. При планировании политики антимикробной терапии более рационально опираться на данные, полученные в конкретном регионе (региональные данные). В связи с этим неоспоримо значение территориального мониторинга резистентности и доведение его результатов до практикующих ветеринарных врачей.

Антибиотикограммы возбудителей, выделенных от животных конкретного региона, должны регистрироваться не только в лабораторных журналах и историях болезни, но и формировать базу данных и использоваться различными специалистами.

Очевидна необходимость разработки схем эмпирической антибиотикотерапии на основе данных мониторинга антибиотикочувствительности микроорганизмов.

ПАРИСЕНКОВА О.В., КОШЕЛЕВА Ю.С., ШАЛИМОВА О.А.

ФГБОУ ВПО «Орловский государственный аграрный университет», г. Орел, Россия

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ПИЩЕВОЙ ДОБАВКИ ИЗ ЖМЫХОВ ЦИТРУСОВЫХ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА МЯСНЫХ ПАШТЕТОВ

В мировой практике одним из распространенных способов корректировки состава продуктов стало комбинирование сырья с компонентами растительного и животного происхождения. В последние годы потребители все больше обращают внимания на продукты питания, содержащие полезные для здоровья человека ингредиенты. Наряду с витаминами, минеральными веществами, антиоксидантами к ним причислены и пищевые волокна. Для нормальной жизнедеятельности человека в пище должны присутствовать структурные элементы клеточных стенок растений, которые практически не усваиваются в желудочно-кишечном тракте, но выполняют важные функции в процессах пищеварения как балластные вещества. Механизм поведения пищевых волокон в процессе пищеварения сложен и включает химические, физико-химические преобразования и их взаимодействие с другими компонентами пищи.

В лабораторных условиях исследовали химический состав пищевой добавки из жмыха апельсина и сравнивали с аналогичной пищевой добавкой из облепихового шрота.

Энергетическую ценность определяли расчетным методом на основании изученного химического состава.

Показатели	Химические показатели пищевой добавки из	
	жмыха апельсина	облепихового шрота
Белки, %	3,99	28,7
Жиры, %	11,44	23,0
Углеводы, в т.ч. клетчатка %	9,44	10,55
Клетчатка, %	2,02	15,0
Лигнин, %	68,13	30,75
Влажность, %	7,00	7,00
Зола, %	1,8	2,17
Энергетическая ценность, ккал	140,5	327

Пищевая добавка из жмыха апельсина характеризуется пониженной пищевой и энергетической ценностью (140,5 ккал), но повышенным содержанием лигнинов, что позволяет использовать добавку для диетического питания. Предполагаем, что высокое содержание лигнинов будет способствовать более высокому удержанию влаги в многокомпонентных мясных системах, и соответственно – более высоким функционально-технологическим показателям фаршевых систем с использованием разрабатываемой добавки.

Влагоудерживающая способность пищевой добавки из жмыха апельсина – 16,5 %, что в 1,6 раз выше этого показателя пищевой добавки из облепихового шрота. Журоудерживающая способность пищевой добавки из жмыха апельсина – 1,05%, что в 2 раза выше аналогичного показателя пищевой добавки из облепихового шрота. По показателю поглощения воды (10 %) пищевые добавки соответствуют друг другу. Низкая влажность продукта позволяет хранить пищевую добавку из жмыха апельсина в обычных условиях при комнатной температуре. На данную пищевую добавку подана заявка на патент.

Технология производства паштета «Полезный» аналогична технологии производства «Паштета высшего сорта из печени со сливочным маслом». Отличие технологии производства нового продукта заключается во введении дополнительной операции – приготовление и добавление суспензии пищевой добавки (20% от паштетной массы) на стадии составления паштетной массы. Для приготовления суспензии пищевую добавку заливают водой в соотношении добавки к воде 1:10 на 2 часа при постоянном

перемешивании. Замена 10% паштетной массы на суспензию добавки из жмыха апельсина улучшает органолептические свойства контрольного образца по такому показателю, как консистенция. Замена 20% паштетной массы на суспензию добавки из жмыха апельсина позволяет повысить значения органолептических показателей, таких как внешний вид и консистенция.

Согласно полученным данным, биологическая ценность паштета «Полезный» (67,27%) меньше биологической ценности «Паштета высшего сорта из печени со сливочным маслом» в 1,25 раза. На паштет «Полезный» разработан проект ТУ 9213-007-05013607-2010.

ПАХОМОВ Ю.Д.¹, БЛИНКОВА Л.П.¹, СТОЯНОВА Л.Г.²,
АЛЬТШУЛЕР М.Л.¹, ШМЫГАЛЕВА Т.П.¹, НИКИФОРОВА О.В.²

¹ФГБУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН, Москва, Россия

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

АНТИБИОТИКИ И НЕКУЛЬТИВИРУЕМЫЕ ФОРМЫ БАКТЕРИЙ

Некультивируемые формы (НФ) бактерий предлагаются исследователями как новая модель поиска новых антибиотиков, поскольку многие из них не действуют на неразмножающиеся микробы. Состояние, в котором микробные клетки обратимо теряют способность к делению, является частью цикла существования бактерий в окружающей среде (в организме человека и животных, в почве, водоемах и др.). На образование НФ влияют стрессовые факторы, действующие во внешней среде: температура, трофическое голодание, вещества, выделяемые сопутствующими бактериями, повышенная соленость воды, лекарства и т.д. Наличие НФ подтверждено для многих клинически значимых бактерий: *M. tuberculosis*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *P. vulgaris*, *E. coli*, *S. enterica Typhimurium*, *Enterococcus faecalis* и др. Феномен некультивируемости тесно связан с понятием персистенции патогенных микробов в организме, поскольку терапия антимикробными препаратами может приводить к переходу популяции в НФ или близкое к ним состояние (L-формы). Проблема некультивируемости касается также

пробиотических штаммов, используемых для колонизации кишечника после антимикробной терапии, когда лекарства еще содержатся в организме.

Цель работы. Изучение сроков и особенностей перехода патогенных и пробиотических бактерий в НФ.

Материалы и методы. Использованы методы определения общего числа клеток, культивируемых (КОЕ/мл), живых но некультивируемых (краситель Live/Dead) клеток. Бактериальными моделями являлись неспорообразующие *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris*, *E. durans*, *P. aeruginosa*, *L. lactis*, *Bifidobacterium* spp.

Результаты. Нами показано, что образование НФ может происходить в условиях, не всегда типичных для данного микроба. В опытах выявлено, что длительная инкубация (до 1 года) в условиях трофического стресса (синтетическая среда, искусственная морская вода и др.) приводят к достоверному изменению численности жизнеспособных клеток у разных видов, сопровождающемуся переходом большей части популяции в НФ. Установлено, что штамм *E. coli*, продуцировавший 2 колицина и находившийся в искусственном анабиозе около 45 лет, после реанимации утратил способность синтезировать один из бактериоцинов, синтез которого контролировался плазмидой, переданной в штамм путем конъюгации. По-видимому, хранение культуры способствовало элиминации плазмиды.

Выводы. Переход в НФ неспоровых бактерий и изменение некоторых свойств после восстановления является штаммовзависимым признаком, что следует учитывать при выборе НФ мишени для испытания действия лекарств.

ПЕРЕТОЛЧИН Д.В., РОГОЖИН В.В.

Якутская сельскохозяйственная академия, Якутск, Россия

МЕХАНИЗМ РЕАКЦИИ СОВМЕСТНОГО ПЕРОКСИДАЗНОГО ОКИСЛЕНИЯ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА И ФЕРРОЦИАНИДА КАЛИЯ

Пероксидаза является ферментом, катализирующим окисление неорганических и органических соединений в реакциях с участием кислорода (оксидазные) и перекиси водорода (пероксидазные). Особое значение имеют исследования реакций пероксидазного

окисления с участием нескольких субстратов, которые получили названия субстрат-субстратных взаимодействий. Субстраты пероксидазы различаются по структуре и химическим свойствам. Поэтому в действии пероксидазы заложены различные механизмы. В частности, в случае присутствия в растворе различных субстратов пероксидазы могут наблюдаться эффекты взаимной активации и ингибирования фермента, которые проявляются в виде конкурентного типа ингибирования или дифференцированного окисления субстратов. Кроме того, присутствие в среде двух субстратов в действии пероксидазы может проявиться механизм активации реакций окисления медленного окисляемого субстрата быстро окисляемым. Изучение субстрат-субстратной активации позволяет определить специфичность механизма действия пероксидазы в реакциях совместного окисления субстратов, в которых проявляется избирательность действия фермента в каталитическом процессе по отношению окисления только одного из субстратов. Данный механизм может быть реализован в биологических системах живых организмов, в клетках которых могут одновременно присутствовать несколько субстратов пероксидазы. Кроме того, изучение механизмов совместного окисления пероксидазного окисления субстратов, позволяет исследовать активный центр фермента, определив расположение участков специфичного связывания субстратов, выявить особенности протекания каталитического процесса и определить роль второго субстрата.

Нами изучена стационарная кинетика индивидуального и совместного пероксидазного окисления ферроцианида калия и дигидрохверцетина, катализируемая пероксидазой хрена. Показано, что ферроцианид (ФК) и дигидрохверцетин (ДГКВ) являются медленно окисляемыми субстратами пероксидазы. В интервале рН 4,5-8,0 определены величины $k_{кат}$ и K_m для этих субстратов пероксидазы. В реакциях совместного окисления субстратов выявлено, что при рН 4,5-7,0 дигидрохверцетин ускорял окисление ферроцианида. При рН $\geq 7,5$ наблюдалось окисление только дигидрохверцетина.

Таким образом, при совместном присутствии в среде ДГКВ и ФК, окислению подвергается ферроцианид калия. Наблюдаемый синергистический тип активации свидетельствует о том, что связывание ДГКВ с активным центром пероксидазы увеличивает сродство фермента к ферроцианиду, и наоборот. Исследование механизмов реакций индивидуального и совместного окисления субстратов позволило выявить, что в

действию пероксидазы заложен сложный регуляторный механизм. При этом в реакциях окисления ферроцианида и дигидрохверцетина выявлены максимумы каталитической пероксидазы для этих субстратов, которые проявились в реакциях окисления ферроцианида в кислой области рН, а у дигидрохверцетина - в щелочной. Проявление низкой активности фермента в индивидуальных реакциях окисления дигидрохверцетина в кислой области рН, по-видимому, обусловлено присутствием в среде мало активной цис-формы субстрата. При совместном присутствии в среде ФК и ДГКВ, последний улучшает связывание ферроцианида, ускоряя его дальнейшее превращение. В щелочных рН в среде преобладает транс-форма ДГКВ, которая способна конкурировать с ФК за центр связывания. Поэтому преимущественное связывание транс-формы ДГКВ с активным центром, обуславливает протекание процесса его пероксидазного окисления при $\text{pH} \geq 7,5$.

Таким образом, присутствие в кислой среде цис-формы ДГКВ, обуславливает преимущественное окисление медленно окисляемого субстрата (ферроцианида). При этом ДГКВ способен ускорять протекание каталитического процесса. Однако смещение рН в щелочную область обуславливает появление транс-форму дигидрохверцетина, которая способна конкурировать с ферроцианидом за участок связывания в активном центре и самостоятельно участвовать в каталитическом процессе. Данный механизм обусловлен тем, что участки связывания цис- и транс-формы ДГКВ в активном центре пероксидазы различны, связывание транс-формы ДГКВ происходит в участке связывания ферроцианида, что обуславливает конкуренцию субстратов, тогда как цис-форма, связываясь в другом участке активного центра, ускоряет протекание его окисления. При этом ДГКВ способен в биогенных системах выполнять роль триггера и в зависимости от рН инициировать или останавливать реакции пероксидазного окисления медленно окисляемых субстратов, включаясь в процесс пероксидазного окисления.

ПЕРК А.А.

ФГБУН Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, Якутск, Россия

ГУМИНОВЫЕ ПРЕПАРАТЫ МЕРЗЛОТНЫХ САПРОПЕЛЕЙ ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ ЗЕЛЕНОГО ГИДРОПОННОГО КОРМА

Экстремальные климатические факторы Якутии (длительная и суровая зима при коротком световом дне) определяют значительную продолжительность стойлового периода, во время которого животные вынуждены довольствоваться концентрированными кормами при низкой доле зеленых подкормок. В преодоление дефицита в кормовом рационе определенную роль могут сыграть гидропонные технологии, позволяющие в короткие сроки выращивать зеленую массу в закрытых помещениях без грунта. Гидропоника не нова и ее экономичность определяется, прежде всего, затратами на лотковое оборудование, электроэнергию, семена и удобрительные компоненты. Технология позволяет производить продукцию в течение всего года, независимо от погодных условий, с полным циклом от посева семян до получения молодых растений, причем используется надземная и корневая часть их. Гидропонный корм при суточной дозе 3-4% от веса животного можно вносить как эффективную добавку к их рациону.

Цикл выращивания зеленой массы в водной культуре короток (до 7-10 суток), а стартовые питательные вещества берутся из запасов семян, поэтому удобрительные компоненты могут применяться в ограниченном масштабе. Вместе с тем, для повышения качества продукции и при проращивании семян с низкой жизнеспособностью, целесообразно использовать экономически недорогие и экологически безопасные стимуляторы роста растений, к которым принадлежат гуминовые вещества. Источниками сырья в производстве гуматов являются, по большей части, торф и бурый уголь. Другим ценным и пока еще мало используемым источником могут служить донные органические осадки водоемов – сапропели, довольно широко распространенные в Республике Саха (Якутия) с суммарными запасами в 1,7 млрд. т.

Впервые из мерзлотных сапропелей, не имеющих аналогов в других природно-климатических зонах, в Институте биологических проблем криолитозоны СО РАН выделены препараты широкого биологического спектра действия, характеризующиеся

высоким уровнем содержания гуминовых соединений и сопутствующих минеральных компонентов, перспективные для использования в сельском хозяйстве и медицине.

Изучалось действие разных концентраций (0,0005-0,01%) натриевых гуминовых препаратов (ГП) мерзлотных сапропелей при искусственном освещении (5000 лк, фотопериод 16/8 ч) на продуктивность и аминокислотный состав растений, выращиваемых на зеленый корм в гидропонной культуре из семян яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Скороспелка улучшенная на 7 сутки. Для более зримого выявления стимулирующего эффекта при проращивании использовали семена низких посевных кондиций – всхожестью 90%.

При всех опытных концентрациях ГП сырая масса растений была выше контроля на 19-34%, сухая – на 19-25%, в том числе, сырая масса надземной части – на 10-29%, сухая – на 17-25%, сырая масса корней – на 34-51%, сухая – в среднем на 20-25%. Максимальная прирост наблюдался при концентрации 0,005%, а наибольшее отношение корня/стебель – при концентрации 0,001% ГП. В надземной части растений максимальное суммарное содержание аминокислот при использовании ГП в концентрации 0,001% составляло $97,1 \pm 2,0$ г/кг сухого вещества (СВ) против $71,7 \pm 5,0$ г/кг СВ в контроле (увеличение на 35,4%). В корнях содержание аминокислот по сравнению с надземной частью было существенно меньше – в контроле $42,8 \pm 0,8$ г/кг СВ и достигало максимальных значений при более высокой концентрации 0,005% ГП – $53,2 \pm 1,7$ г/кг СВ (увеличение на 24,3%). При этой же концентрации как в ростках, так и в корнях накапливалось максимальный ($34,4 \pm 1,2$ г/кг СВ и $17,4 \pm 0,2$ г/кг СВ соответственно), по сравнению с контрольными растениями ($24,9 \pm 1,8$ г/кг СВ и $14,6 \pm 0,3$ г/кг СВ), пул незаменимых аминокислот. Таким образом, прирост содержания незаменимых аминокислот составил для надземной части 38,2% и корней – 19,2%. К наиболее ценным аминокислотам относится лизин. Содержание его в обработанных растениях при оптимальных дозах ГП увеличилось с $5,3 \pm 0,4$ до $7,1 \pm 0,1$ г/кг СВ в ростках и с $3,2 \pm 0,1$ до $4,0 \pm 0,1$ г/кг СВ в корнях. Незаменимые аминокислоты являются лимитирующими в рационе при выращивании птицы, свиней, а также молодняка и, в меньшей степени, взрослых жвачных животных (крупный рогатый скот, овцы и т.д.).

Таким образом, использование гуминового препарата из мерзлотных сапропелей Якутии в оптимальных концентрациях (0,001-0,005%) приводит не только к значительному приросту зеленой массы пшеницы, но и повышает качество урожая за счет

увеличения содержания аминокислот, в том числе незаменимых. Это делает его перспективным стимулятором роста растений для гидропонной культуры.

ПЕТЕНКОВА А.А., КОВАЛЕНКО Р.И., ЮСУПОВА Э.Р.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ТКАНЕВЫХ СИСТЕМ РЕГУЛЯЦИИ СИНТЕЗА ОКСИДА АЗОТА В ПРАВОМ И ЛЕВОМ ЖЕЛУДОЧКАХ СЕРДЦА

Известно, что оксид азота (NO) играет двойственную роль в деятельности сердечно-сосудистой системы. В сердце NO способен тонко регулировать нервную холинергическую передачу и вызывать окислительный стресс, участвовать в релаксации кардиомиоцитов и способствовать их элиминации путем апоптоза, вызывать дилатацию коронарных сосудов и усугублять течение инфаркта миокарда. Не менее противоречивы и функциональные эффекты этой молекулы: NO может уменьшать и увеличивать частоту потенциалов действия пейсмекерных клеток, ослаблять сократимость миокарда в систолу и усиливать диастолическую релаксацию. В связи с этим многие проблемы регуляции сердечно-сосудистой системы с помощью нитроглицерина и других фармакологических препаратов, в которых активной группой являются ионы NO_2^- , по-прежнему остаются актуальными и требуют дальнейших исследований с помощью современных методических приемов, позволяющих оценивать экспрессию различных ферментов и гемсодержащих белков (миоглобин, цитохромоксидаза, цитохром P-450), участвующих в регуляции содержания в миокарде $\text{NO}/\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$. NO-регуляторные системы в сердце участвуют в определении чувствительности кардиомиоцитов и других клеток сердца к недостатку кислорода, контролируют биоэнергетический метаболизм, силу и частоту сердечных сокращений. Нами были предприняты исследования на переживающих тканевых препаратах левого и правого желудочков сердца самцов крыс линии Вистар массой 140-180г (n=50), инкубировавшихся при 37°C в течение 3-х часов в аутологичной плазме крови. Тканевые препараты формировались из небольших фрагментов ткани сердца, каждый из которых состоял из 3-х слоев: эндокарда, миокарда и эпикарда. Об изменении уровня $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ в инкубационной среде судили с помощью колориметрического метода

с использованием коммерческих наборов (Abscam, Великобритания). Оценивали влияние вносимого в инкубационную среду нитрита натрия (NaNO_2) на синтез NO эксплантатами тканей сердца. В контрольных инкубационных средах с эксплантатами тканей правого и левого желудочков сердца достоверных изменений содержания этих веществ в динамике 3-часовой инкубации не выявлено. Через 30 минут после внесения NaNO_2 (10^{-7}M) достоверно ($p < 0,01$) увеличивалось содержание в среде суммарного количества нитритов и нитратов относительно контроля – в 3,5 раза в ткани левого и в 2,3 раза правого желудочка. Через 60 минут содержание $\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$ в инкубационной среде с эксплантатом левого желудочка сердца уменьшался до контрольного уровня и сохранялся на протяжении всего периода инкубации. В инкубационной среде с эксплантатом ткани правого желудочка уровень $\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$ оставался повышенным в 3,8 раза ($p < 0,01$) по сравнению с контролем. Через 90 минут после аппликации NaNO_2 достоверное увеличение уровня нитритов/нитратов в инкубационной среде с эксплантатом ткани правого желудочка отсутствовало, а полное восстановление до контрольных значений зарегистрировано через 120 минут после воздействия. При этом обнаруженное повышение азотсодержащих веществ в инкубационной среде преимущественно происходит за счет увеличения образования нитратов. На основании полученных данных можно сделать вывод, что добавление к инкубационной среде малых количеств NaNO_2 стимулирует продукцию NO тканевыми препаратами сердца. Весьма вероятно, что возрастание продукции NO происходит за счет активации конститутивных NO-синтаз, а именно eNOS и nNOS, и увеличивает содержания в среде ионов NO_2^- и NO_3^- . Быстрое снижение содержания нитритов и нитратов может быть связано с активацией нитрит- и нитратредуктазных систем, что создает условия для функционирования каскадных реакций, обеспечивающих восстановление NO и выведение конечных продуктов азотистого обмена, например аммиака. Сравнительный анализ полученных нами данных о влиянии NaNO_2 на эксплантаты левого и правого желудочков сердца показал, что усиление работы NO-синтазных систем в ткани левого желудочка происходит интенсивнее и быстрее, чем в правом желудочке сердца. В правом интенсификация синтеза NO идет медленнее, но является более пролонгированной. Это свидетельствует о большей чувствительности NO-синтаз к повышению в среде NaNO_2 и большей мощности нитрит и нитратредуктазных систем ткани левого желудочка сердца. Выявленное отличие может быть связано со

структурно-функциональными различиями в тканях левого и правого желудочков сердца, в частности с более развитым слоем миокарда в стенке левого желудочка, содержащим более крупные и функционально более активные кардиомиоциты, а также с присутствием в большом количестве нейроэндокринных клеток, продуцирующих антиоксидантные гормоны. Таким образом, впервые обнаружено, что правый и левый желудочки сердца крысы характеризуются разной мощностью NO-регуляторных систем.

ПЕТРОВ К.А., ПЕРК А.А., ЧЕПАЛОВ В.А.

ФГБУН Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, Якутск, Россия

**ОСОБЕННОСТИ ЖИРНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА КРИОКОРМОВ,
ПОЛУЧЕННЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕСУРСОВ ЕСТЕСТВЕННОГО
ХОЛОДА В УСЛОВИЯХ ЯКУТИИ**

Многие северные регионы России, в том числе Якутия, располагают неограниченными ресурсами естественного холода, которые могут использоваться для массовой криоконсервации зеленых кормов. Такие корма (криокорма) имеют как естественное, так и сеяное происхождение. К первым относятся травянистые растения, которые, не завершив вегетацию после стравливания (пастбища) и скашивания (луга-покосы), благодаря ранней морозной осени, уходят под снег в зеленом состоянии. Природные криокорма интенсивно используются некоторыми породами лошадей, например, якутской, во время тебеневки путем выкапывания растений из-под снега. Ко вторым относятся кормовые культуры, специально сеянные в середине и конце лета (июль-август). Для возделывания применяют районированные сорта овса, рапса, гороха и др., хорошо переносящие воздействие не только низких положительных, но и отрицательных температур (до -7°C). В этом случае происходит сезонный сдвиг в заготовке кормов в сторону более поздних сроков, их убирают в зеленом состоянии перед образованием устойчивого снежного покрова. Представляется, что криокорма могут являться ценным источником пополнения рациона сельскохозяйственных животных.

Для выявления питательной ценности криокормов нами методом колоночной хроматографии изучался жирнокислотный состав надземной части растений Якутии, собранных в периоды, предшествующие криоконсервации и после нее.

Объектами служили следующие виды растений: многолетние – хвощи пестрый и камышковый (*Equisetum variegatum* Schleich. ex Web., *E. scirpoides* Michx.) из Северо-Восточной Якутии, пырей ползучий (*Elytrigia repens* (L.) Nevski) и однолетний – овес посевной (*Avena sativa* L., с. Якутский) из Центральной Якутии. Первые три вида – природного происхождения, овес – летнего посева (середина июля). Пырей и овес обладают высокими кормовыми качествами, но заготавливаются, как правило, в стандартные летне-осенние сроки. Хвощи также относятся к ценным кормам для лошадей, способным в короткие сроки восстанавливать силу и упитанность животных. Их используют только в зимний пастбищный период (тебеневка). Все растения анализировали в три срока: конец лета, осень, начало зимы (устойчивый снежный покров – криокорм). Прежде всего, изученные растения различались по качественному составу жирных кислот (ЖК) липидов. Наличие разных ЖК было связано с конкретным сезоном. Всего было идентифицировано следующее количество ЖК: у хвоща пестрого – 19, хвоща камышкового – 20, пырея ползучего – 15, овса посевного – 8. Если летом у *E. variegatum* обнаруживалось 10 ЖК (с суммарным содержанием $11,3 \pm 1,3$ мг/г сухого вещества (СВ)), *E. scirpoides* – 11 ЖК ($12,2 \pm 0,4$ мг/г СВ), *E. repens* – 9 ЖК ($12,1 \pm 0,2$ мг/г СВ), *A. sativa* – 7 ($20,7 \pm 0,5$ мг/г СВ), то у замороженных растений уже имелось 15 ЖК ($11,6 \pm 0,7$ мг/г СВ), 14 ЖК ($12,8 \pm 0,7$ мг/г СВ), 12 ЖК ($9,3 \pm 0,5$ мг/г СВ) и 7 ЖК ($12,3 \pm 1,2$ мг/г СВ) соответственно. В целом, многолетние виды обладали более разнообразным жирнокислотным составом из-за адаптационных особенностей, связанных с перезимовкой. Одновременно, суммарное содержание ЖК летом было значительно выше у овса, но быстро падало в начале зимы, достигая величин, соизмеримых с многолетними видами. Основными ЖК у всех растений, независимо от сезона, были: насыщенная пальмитиновая (C16:0) и ненасыщенные линолевая (C18:2) и линоленовая (C18:3) кислоты. Последние две ЖК являются не только энергетически значимыми компонентами кормов, но и составляют основу F-витаминного комплекса, играющего важную роль в поддержании репродуктивных функций животных. Относительное содержание ненасыщенных ЖК в конце лета у *E. variegatum* составляло $53,1 \pm 6,8\%$, *E. scirpoides* – $60,3 \pm 4,8\%$, *E. repens* – $72,7 \pm 1,6\%$, *A. sativa* – $76,4 \pm 1,5\%$. К зиме у

хвошей пестрого и камышкового оно несколько возросло $60,0\pm 3,0\%$ и $63,8\pm 1,9\%$ соответственно, а у злаков – падало, причем, у пырея более резко – до $56,1\pm 2,6\%$, чем у овса – до $71,3\pm 0,9\%$. Таким образом, у замороженных растений сохранялся не только относительно высокий суммарный уровень ЖК, но и наиболее ценные ненасыщенные ЖК. Ранее нами было показано, что у растений криолитозоны в предзимний период также происходит активное накопление первичных и вторичных каротиноидов с выраженными антиоксидантными свойствами, которые могут стабилизировать жирнокислотный состав. Все это существенно повышает питательную ценность криокормов, полученных с использованием ресурсов естественного холода в условиях Якутии, и предполагает более широкое их внедрение в сельскохозяйственное производство на Севере.

ПЕТРОВА И.В., ФАРХУТДИНОВ Р.Р., КАТАЕВ В.А.

Башкирский государственный медицинский университет Росздрава, Уфа, Россия

ИЗУЧЕНИЕ СПЕКТРА АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ УРАЦИЛА IN VITRO

Изучение спектра фармакологической активности новых соединений составляет одно из приоритетных направлений исследований, связанных с целенаправленным конструированием селективных и более безопасных лекарственных препаратов. Урацил – одно из азотных оснований, из которых состоят нуклеиновые кислоты. В организме урацил используется для синтеза многих ферментов, необходимых для нормального функционирования клеток. Урацил или его производные могут использоваться как для транспортировки лекарств, так и в качестве лекарственного средства. К настоящему времени известно незначительное количество публикаций об исследованиях, посвященных исследованию антиокислительной эффективности урацилов. В этой связи изучение антиокислительных свойств вновь синтезированных препаратов на основе урацила и его производных является актуальным.

В работе изучалось влияние новых синтезированных производных урацила на процессы свободнорадикального окисления (СРО) *in vitro* методом регистрации хемилюминесценции (ХЛ) в модельных системах, генерирующих активные формы

кислорода (АФК), имитирующих реакции перекисного окисления липидов (ПОЛ), а также оценивалось влияние урацилов* на генерацию АФК в клетках крови (модель фагоцитоза). Дана сравнительная характеристика 15 вновь синтезированных производных урацила.

В модельной системе, где генерировались АФК, влияние урацилов* изменяло показатели ХЛ, уменьшая спонтанное свечение и быструю вспышку в той или иной степени (В наибольшей степени уменьшали препараты 1;6;7;8). Угнетение ХЛ зависело от концентрации препарата (0,01 мг/мл; 0,1 мг/мл; 1,0 мг/мл). Чем она была выше, тем сильнее подавлялось свечение, это свидетельствовало о связи ХЛ со свободнорадикальным окислением. В модельной системе липосом урацилы* также подавляли уровень спонтанного свечения, уменьшали вспышку и светосумму ХЛ (В наибольшей степени уменьшали препараты 1;8;9). В крови образование АФК сопровождалось ХЛ, усиливающейся в присутствии люминола. Интенсивность ХЛ коррелирует с потреблением клетками кислорода и степенью завершенности фагоцитоза. Добавление урацилов* вызвало увеличение светосуммы и максимальной светимости люминолзависимой хемилюминесценции по сравнению с уровнем обозначенных параметров интактных клеток крови (Отмечены препараты 1;4;7;8). Это говорит о том, что данный препарат в некоторой степени стимулирует фагоцитарную активность клеток крови.

Т.о., в нашем исследовании методом регистрации ХЛ в ряду новых синтезированных производных урацила была выявлена способность некоторых из них значительно подавлять генерацию АФК и ПОЛ в модельных системах. В плане фагоцитарной активности было выявлено модулирующее влияние урацилов* на параметры ЛЗХЛ крови. Проведенные исследования дают важную информацию для отбора эффективных корректоров СРО in vivo и обсуждения механизмов их действия.

* - новые синтезированные производные урацила

ПЕХТАШЕВА Е.Л.¹, МАСТАЛЫГИНА Е.Е.¹, ЛУСИНЯН И.В.²

¹ РЭУ им. Г.В. Плеханова, Москва, Россия

² ОАО «ЦНИТИ», Москва, Россия

ПРИМЕНЕНИЕ ОСНОВНЫХ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КЛЕЙКОСТИ ХЛОПКОВОГО ВОЛОКНА И СОПОСТАВЛЕНИЕ ИХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Настоящая работа посвящена изучению дефекта «клейкость хлопкового волокна». Согласно ГОСТ Р 53030-2008 под термином «клейкость», или «медовая роса», подразумевается совокупность различных сахаров на поверхности хлопкового волокна, главным источником которых являются секреторные выделения насекомых. Клейкость хлопкового волокна вызывает нежелательные явления налипания на рабочие органы оборудования, что приводит к поломкам машин и снижению качества и выхода готовой пряжи.

Целями проведённого исследования являлись разработка методической базы определения клейкости хлопковых волокон, решение проблемы корреляции результатов, полученных при оценке клейкости с помощью различных методов, а также исследование взаимосвязи клейкости и биостойкости хлопка.

В настоящей работе изучены три метода определения клейкости хлопкового волокна: химический метод окислительно-восстановительной реакции; метод термодетекции; метод цветовой реакции. На основании анализа полученных результатов исследования определены объективность и эффективность изучаемых методов обнаружения клейкости, их достоинства и недостатки.

В работе была использована следующая нормативно-техническая документация: ГОСТ Р 53224-2008 «Волокно хлопковое. Технические условия», ГОСТ Р 53234-2008 «Волокно хлопковое. Методы определения цвета и внешнего вида», ГОСТ Р 53553-2009 «Волокно хлопковое. Методы определения пороков и сорных примесей», ГОСТ Р 53030-2008 «Волокно хлопковое. Порядок измерения показателей на системе HVI», ГОСТ Р 53236-2009 «Хлопковое волокно. Методы отбора проб», ГОСТ Р 53030-2008 «Волокно хлопковое. Методы определения клейкости и бактериально-грибкового заражения», ISO/DIS 12027 Textiles — Cotton-fibre stickiness — Determination of sugar by colour reaction

– International Organization for standardization (Материалы текстильные – Клейкость хлопкового волокна – Определение сахаров цветовой реакцией).

Для проведения работы были задействованы кафедра товароведения и товарной экспертизы и кафедра химии и физики РЭУ им. Г.В. Плеханова, а также научно-исследовательский институт текстильной промышленности России (ЦНИТИ).

ПИВНЕНКО Т.Н.¹, КОВАЛЕВ Н.Н., МИРОШНИЧЕНКО О.В.²,
ШУТИКОВА А.Л.², МЕЛЬНИКОВ В.И.⁴

¹*Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр (ТИНРО-Центр),
Владивосток, Россия*

²*Владивостокский государственный медицинский университет, Владивосток, Россия*

³*Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии СО РАМН, Россия*

⁴*Морской государственный университет, Владивосток, Россия*

АМИНОКИСЛОТЫ ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ: БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И ПРИМЕНЕНИЕ

В настоящее время большое значение для нормализации обмена веществ и повышения антиоксидантного статуса организма придается препаратам природного происхождения. В ТИНРО-центре разработан препарат (БАД к пище «Моллюскам»), полученный методом ферментативного гидролиза из двустворчатых моллюсков (мидия, гребешок, мактра, мерценария), содержащие до 70 % свободных аминокислот. Уникальный состав компонентов аминокислотной природы этих объектов характеризуется наличием таурина, цитруллина, орнитина, β-аланина, а также гистидинсодержащих дипептидов: карнозина, анзерина, гомокарнозина.

Первоначальные эксперименты по оценке медико-биологической активности были направлены по пути возмещения недостатка отдельных аминокислот. Так, наличие таурина послужило основанием для применения препарата в офтальмологии. Вместе с тем, проводимые в клиниках биохимические анализы крови пациентов, явно указывали на наличие у испытуемого препарата антиоксидантной активности. При взаимодействии с гипохлорит-анионом были выявлены неактивные хлораминовые комплексы. Согласно

современным взглядам на патогенез ряда заболеваний в качестве основного поражающего агента может выступать гипохлорит-анион. Присутствующая в хрусталике и сетчатке глаза миелопероксидаза при осуществлении своих функций образует гипогалиты, способные повреждать ткани. Вероятно, функция таурина, присутствующего в сетчатке, включает нейтрализацию гипохлорит-аниона, чем объясняется установленный антикатаральный и антиглаукомный эффект таурина, карнозина и БАД «Моллюскам». У больных с первичной открытоугольной глаукомой, получавших «Моллюскам», отмечалось повышение остроты зрения, расширение суммарных границ поля зрения, снижение внутриглазного давления, снижение коэффициента Беккера, а также улучшение самочувствия, повышение работоспособности, уменьшение головных болей и головокружений.

Полученные препараты показали способность ингибировать реакцию образования ABTS⁺. Величина антиоксидантной активности, в виде тролоксового эквивалента антиоксидантной емкости (ТЕАС), составила 45,0 мг/г. Защитный эффект «Моллюскама» проявлялся и в препятствии накопления малонового диальдегида в сыворотке крови. Мягкое антиоксидантное действие препаратов позволяет использовать их в дозировках, необходимых для обеспечения включения аминокислот в метаболизм различных тканей и органов при рекомендуемых направлениях применения (кардиология, офтальмология, неврология, иммунология).

Исследовали фагоцитарную активность нейтрофилов в модельной системе, позволяющей оценить прямое действие веществ на фагоцитирующие клетки. В качестве объектов фагоцитоза были взяты *Y. pseudotuberculosis*, и *St. aureus*. Инкубирование нейтрофилов крови с «Моллюскамом» приводило к увеличению количества фагоцитирующих клеток и усилению их способности поглощать и переваривать микроорганизмы, что позволяет использовать препарат в комплексе лечения инфекционных процессов, при которых фагоцитоз является ведущим фактором в освобождении организма от возбудителя болезни. Введение «Моллюскама» оказывало защитное действие на эпителий слизистой оболочки трахеи экспериментальных животных, предупреждая изменения, характерные для холодового воздействия (нарушение регулярности расположения ресничек, исчезновение поперечных волн их движения, гиперсекрецию слизи). Эффективность «Моллюскама» проявилась в действии на процессы

перекисного окисления липидов, уровня естественной антиоксидантной защиты и показатели гуморального иммунитета у пожилых людей. У пожилых людей с пониженными показателями АОЗ, имеющих заболевания бронхолегочной системы, на фоне приема препарата отмечена хорошая клиническая переносимость, улучшение самочувствия, нормализация активности ферментов глутатионового цикла, содержания восстановленного глутатиона, витамина А и токоферола.

На фоне применения БАД исследовали клинический анализ крови и уровень регуляторных пептидов - цитокинов ИЛ-2, ИЛ-4, ИФН γ и растворимых рецепторов ИЛ-2 (SRИЛ-2) у спортсменов-гребцов. Отмечено состояние гемограммы в рамках реакции спокойной активации. Исследовали также содержание лактата, уровень которого в 2 раза превышал значения референсных величин и коррелировал с развитием утомления при физической нагрузке. При первичном обследовании показатели лактата крови были повышены в 2 раза. Через 15 дней тренировочного процесса и приема БАД они снизились и у 50% достигал нормы. Это позволяет констатировать метаболические процессы. Исследования спортсменов в период интенсивных тренировок показали положительное влияние препарата на метаболические процессы и энергетический обмен при снижении уровня лактата в крови, усилении продукции ИФН γ и моноцитов в крови, чем обеспечивается усиление фагоцитарно-клеточной защиты.

Являясь активными регуляторами функций организма, аминокислоты двустворчатых моллюсков обладают разными механизмами фармакологического действия и могут быть использованы при недостатке поступления аминокислот с пищей при состояниях, сопровождающихся формированием вторичного иммунодефицита, угнетением процессов кроветворения и явлениями гипоксии, при исходной гиперактивации системы перекисного окисления липидов.

ПИКУЛЕНКО М.М.

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

ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ ПО ПАРАМЕТРАМ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ РАСТЕНИЯ

Биология – наука, открытия которой в XXI веке влияют на глобальные изменения в развитии нашей цивилизации. Сейчас объём наших знаний в биологии удваивается каждые три года. По мнению некоторых экспертов (Дэйв Эванс, Игорь Артюхов, Данила Медведев), будущее базируется на нескольких протекающих параллельно (и во взаимодействии) научно-технических революциях : первая революция – в информационных технологиях, вторая – в биомедицинских науках и технологиях, третья – в нанотехнологиях, четвертая – в когнитивных науках.

Достижения XX века (электричество, автомобиль, самолет, телевидение, компьютер, освоение космоса), без которых трудно представить современную жизнь, осуществлены благодаря открытиям в физике и математике. Столь же значимые изменения произошли и в биологии (установлен механизм наследственности, расшифрован генетический код, «прочтен» геном человека и других видов, осуществлено клонирование), преобразившейся из описательной науки в экспериментальную и даже инженерную. Реальная оценка возрастающего антропогенного воздействия, оценка риска существования биологических объектов, управление и формирование природными комплексами невозможны без диагностики и контроля качества среды обитания.

С момента возникновения жизни на Земле изменения физико-химических параметров среды приводят к изменениям состояния живых организмов на клеточном уровне. Фотосинтез лежит в основе биологических процессов, чувствителен к широкому кругу факторов. Показатели эффективности фотосинтеза, основанные на измерении параметров флуоресценции растений, предлагаются многими авторами (Маторин Д.Н., Погосян С.И., Рубин А.Б., Левич А.П., Смуров А.В., Пикуленко М.М.) как наиболее фундаментальные и распространенные индикаторы качества среды в самых различных биотопах.

Оценка состояния окружающей среды и фотосинтезирующих объектов включает мониторинг состояния организма, клеток и субклеточных органелл. Это позволяет

осуществлять наблюдение за динамикой степени интегральной токсичности среды по изменениям наиболее чувствительных физиологических параметров клеток, систем энергообеспечения. В случае фотосинтезирующих растений значительную информацию удастся получить, анализируя характеристики флуоресценции хлорофилла, которые на клеточном уровне дают возможность регистрировать влияние изменений окружающей среды на начальных стадиях. Параметры флуоресценции растений характеризуют эффективность первичного разделения зарядов в фотосистеме II (ФСII), скорость нециклического потока электронов, а также уровень “энергетического тушения” флуоресценции, связанного с величиной трансмембранного градиента pH на тилакоидных мембранах хлоропластов. Наряду с трансмембранным градиентом pH, к числу основных энергетических характеристик относится трансмембранный электрический потенциал тилакоидов. Выбор мха *Anthoceros* в качестве тест - объекта для оценки состояния окружающей среды обусловлено такими преимуществами, как возможность одновременного измерения мембранного потенциала хлоропласта, сдвигов электрического потенциала на клеточной мембране и изменений параметров флуоресценции хлорофилла при воздействии света. Благодаря малой толщине слоевища *Anthoceros*, облегчается доступ веществ к поверхности клетки из наружной среды, что имеет существенное значение для тестирования действия физиологически активных соединений на фотопотенциалы хлоропласта и плазматической мембраны. Использование чувствительных флуориметрических приборов, рассчитанных на сбор света с поверхности площадью от ~0.001 до ~10 мм² (PEA, Hansatech, Англия), анализатора фотосинтетической эффективности, рассчитанного на анализ индукционных кривых флуоресценции с временным разрешением ~10 мкс и специализированного микрофлуориметра Microscopy-РАМ (Walz, Effeitrich, Германия), использующего метод насыщающих импульсов, позволяет измерить на микроучастках слоевища такие параметры, как квантовый выход первичного разделения зарядов в фотосистеме II ($\Delta F/F_m'$), коэффициенты фотохимического и нефотохимического тушения, отражающие окислительно-восстановительное состояние первичного акцептора ФСII и энергозависимое тушение флуоресценции. Комплексная оценка физиологического состояния растительной клетки по параметрам фотосинтетической активности и разработка методико-информационного обеспечения позволит применять разработанные методы как on-line контроль окружающей

среды по состоянию растительного объекта при изменении физико-химических параметров.

ПИСКУРЕВА В.А., ЯКОВЛЕВА И.В.

ФГБОУ ВПО «Орловский государственный аграрный университет», Орел, Россия

СВЕКЛОВИЧНЫЙ ЖОМ КАК ОСНОВНОЙ ИСТОЧНИК ПЕКТИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ В ОРЛОВСКОЙ ОБЛАСТИ

В Орловской области исторически развивалась перерабатывающая промышленность сахарной свеклы. В настоящее время площади под сахарной свеклой увеличиваются, и производство сахара соответственно растет из года в год. На сегодняшний день в области работает 3 крупных сахароперерабатывающих комбината: ЗАО «Отрадинский», ЗАО «Колпнянский» и ООО «Ливны-сахар».

Проведенный анализ данных управления сельского хозяйства и продовольствия Орловской области показал, что количество тонн перерабатываемой сахарной свеклы с 2005 года по 2009 увеличилось почти в четыре раза. Если в 2005 году было использовано по области 285883 тонны, то в 2009 году – 962787 тонн, и соответственно выработано сахара-песка 52695 тонн и 135319 тонны. Таким образом, выход сахара в процентах составил 12,6% и 16,31%.

Экологическая составляющая технологии сахара из свеклы присутствовала изначально. Со временем менялась технология, росли мощности сахарных заводов, и к началу 21 века на фоне всеобщего загрязнения окружающей среды, отрасль стала источником техногенного воздействия на водный и воздушный бассейны, почву.

Сахар – основной продукт переработки данной культуры, который широко используется в народном хозяйстве. Однако в этом производстве потери сахарной свеклы при хранении составляют всего 2,16%, а 80-83% от всего количества исходного сырья приходится на отходы производства, которыми являются меласса (3,5%) и свекловичный жом (80-83% по весу свеклы). На наших сахарных комбинатах эти отходы не перерабатываются.

В Орловской области только за 2009 г. при переработке 962, 787 тонн сахарной свеклы получено 799113 тонн (по весу свеклы) свежего свекловичного жома.

В Орловской области в основном получают свежий жом, которых остаётся невостребованным, так как емкости жомохранилищ весьма ограничены, только 15 – 20% жома успевают использовать на корм КРС. Не реализованный в свежем виде жом утрачивает свои потребительские свойства и переводится в разряд отходов производства 5 класса опасности, которые необходимо утилизировать или проводить мероприятия по уменьшению их вредного воздействия на окружающую среду. Поэтому рациональное использование свежеполученного свекловичного жома, не использованного на жомосушение, чрезвычайно актуально для сахарных комбинатов Орловской области.

Один из менее затратных способов продлить хранение жома – получать отжатый жом до 80 % содержания воды, который в настоящее время получают на ЗАО «Колпнянский».

Сушеный гранулированный жом в настоящее время – это высоко востребованный продукт, как на внутреннем рынке, так и на внешнем рынке. Это самая высокорентабельная продукция свекловичного производства, хотя и является побочной. В Орловском региональном центре биотехнологии Орел ГАУ были проведены исследования химического состава сырого, отжатого и сушеного жома.

В каждом виде жома есть свои положительные и отрицательные качества. Одним из отрицательных качеств свежего жома является содержание большого количества воды, поэтому в нем активно развиваются микроорганизмы, уменьшаются сроки хранения, удорожается транспортировка, а так же сушка.

По химическим показателям сушеный жом содержит значительно больше сухого протеина и клетчатки, что делает его наиболее ценным продуктом.

По содержанию пектиновых веществ свежий жом имеет наибольшее количество пектина 3,8% и протопектина – 9,6%. В отжатом жоме количество протопектина меньше на 18,1%, а сумма пектиновых веществ меньше на 15%. В сухом жоме пектиновых веществ меньше на 25% по сравнению со свежим жомом.

Это объясняется тем, что в процессе отжатия жом теряет до 10% растворимых питательных веществ. В отжатом жоме меньше сахара и пектиновых веществ, а это отрицательно сказывается на его сохранности и качестве.

Таким образом, есть основания полагать, что в ближайшие годы отрасль сможет снизить техногенные воздействия на окружающую среду за счет комплексных мероприятий направленных на рациональное использование свекловичного жома. Который можно использовать для получения пектиносодержащих концентратов, пищевых волокон, кормовых добавок и др. немаловажных продуктов.

ПЛЕХАНОВА А.С., ЕГОРОВА М.А.

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова Российской академии наук,
Санкт-Петербург, Россия*

ИССЛЕДОВАНИЕ АКУСТИЧЕСКОЙ КОММУНИКАЦИИ ДОМОВОЙ МЫШИ (MUS MUSCULUS)

Изучение акустического коммуникативного поведения животных является одним из центральных направлений в этологии (Панов, 1978; Griffin, 1977). Выяснение механизмов взаимной регуляции поведения животных в сообществе, т. е. объяснение принципов внутривидовой акустической коммуникации или социального общения охватывает множество проблем и вопросов, имеющих первостепенное биологическое значение. Решение этих задач достигается путем изучения сигнальных репертуаров отдельных видов, наделенных рядом качеств, делающих их удобными модельными объектами, как для изучения отдельных коммуникативных форм поведения, так и социального поведения в целом.

Домовые мыши, как общественные животные, обладают сложной социальной структурой и, в связи с этим, отличаются хорошо развитыми сигнальными системами, особенно системой акустической коммуникации, что делает их традиционным объектом этологических исследований. Однако, данные о вокализации мышей представлены в литературе преимущественно работами, посвященными акустической структуре и поведенческому значению криков их детенышей (Егорова, Акимов, 2010; Naack, Markl, 1983; Ehret, Vernecker, 1986). Сведения о вокальном репертуаре взрослых особей весьма отрывочны (Константинов, Мовчан, 1985; Whitney, Nyby, 1983) и не дают полного

представления об акустических характеристиках и смысловой нагрузке этих сигналов, а также о ценности всего акустического поведения и его роли в выживании отдельных особей. Основная цель данной работы состояла в систематическом исследовании акустической структуры и поведенческого значения вокализаций домовых мыши *Mus musculus*.

В исследовании производили аудио-видео регистрацию акустического поведения мышей в условиях их лабораторного содержания, при имитации элементов исследовательского, агонистического, полового и родительского поведения. Во время эксперимента мыши находились в стеклянном боксе, разделенном на две части подвижной перегородкой, которую убирали с началом аудио и видеозаписи. Бокс помещался в звукозаглушенной экспериментальной камере с затенённым освещением. Аудиозапись вокализаций производили с использованием измерительной системы Брюль&Кьер и студийного магнитофона Rascal 4-DC. Многопараметрический спектрально-временной анализ акустической структуры сигналов производили на базе 16 - разрядного интерфейса CED1401-plus и персонального компьютера в программе «Waterfall» и Cool Edit Pro 2.1.

Полученные результаты показали, что вокальный репертуар домовых мышей имеет широкий частотный диапазон (2 – 100 кГц) и включает звуковые (2-20 кГц) и ультразвуковые (30-70 кГц) крики. Зарегистрированные вокализации отражали весь спектр поведенческой активности мышей – их индивидуальное, репродуктивное и социальное поведение. Наиболее «озвученным» среди них было насыщенное эмоциями и коммуникацией репродуктивное поведение. Среди акустических компонентов репродуктивного поведения зарегистрированы четыре типа сигналов: оборонительный крик самки, ультразвуковой крик самца и два различных крика детенышей - гнездовой крик дискомфорта мышат и ультразвуковой крик «покинутого». При реализации социального поведения мышей вокализациями сопровождалось агонистическое поведение самцов, при исследовании которого был зарегистрирован крик подчиненного самца. Индивидуальное поведение мышей редко сопровождалось вокализациями, за исключением исследовательской активности самок, отличавшейся богатством акустического репертуара, образованного, как минимум, из восьми различных криков.

Выполненный нами анализ акустической структуры всех зарегистрированных вокализаций позволил выделить основные признаки коммуникационных сигналов,

лежащие в основе их распознавания. Среди последних - частотный диапазон крика, его длительность, частота основного тона, количество гармоник, наличие амплитудной и частотной модуляции, а также выраженность субгармоник и шумовых компонентов. Обсуждается смысловая нагрузка вокализаций домовой мыши и их адаптивное значение для оптимальной реализации различных поведенческих актов.

ПЛОТНИКОВА Н.П., КАЗАКОВ Д.А., БОРОВКОВА И.С., ВОЛЬХИН В.В.

Пермский национальный исследовательский политехнический университет,

Пермь, Россия

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНЫХ В ОТНОШЕНИИ МАССОПЕРЕНОСА КИСЛОРОДА СВОЙСТВ ДИСПЕРСНОЙ ТВЕРДОЙ ФАЗЫ

Аэробные процессы – это самый главный ключ к получению продуктов в биотехнологии. Большинство ферментов, антибиотиков получают, используя аэрируемые биореакторы. Процессы переноса газов имеют место также при жидкофазном каталитическом окислении органических и неорганических соединений, биохимической очистке сточных вод и загрязненного воздуха. Но транспорт кислорода в таких системах весьма затруднен, поскольку кислород является малорастворимым газом. Таким образом, массоперенос неполярного газа лимитирует скорость всего технологического процесса, тем самым снижая эффективность производства.

В настоящей работе в качестве перспективного способа интенсификации массопереноса кислорода в системах газ-жидкость рассматривается введение в жидкость дисперсной твердой фазы.

В качестве объектов исследования были выбраны суспензии, содержащие частицы активированного угля разных марок: березовый, каменноугольный, кокосовый и косточковый. Активированные угли характеризуются гидрофобностью, высокой пористостью и удельной поверхностью. Такое сочетание свойств позволяет рассматривать активированные угли как возможные активаторы массопереноса газов.

Исследование интенсивности транспорта O_2 в суспензии проводили с использованием барботажного абсорбера с механическим перемешиванием жидкости

Biostat A plus (Sartorius, Германия) при 30 °С. Общий объём суспензии составлял 400 мл. Твёрдые частицы (размером 0,063-0,1 мм) вводили в водную фазу в количестве 0,125 г/л. Скорость перемешивания суспензий составляла 200 об/мин. Концентрацию кислорода в водной фазе измеряли с использованием амперометрического датчика кислорода Oxuferm FDA-160 (Hamilton, Швейцария). В качестве параметра, характеризующего влияние твёрдых частиц на интенсивность абсорбции кислорода, использовали коэффициент усиления массопереноса (E), который рассчитывали по формуле:

$$E = \frac{K_L a}{K_L a_0}, \quad (1)$$

где $K_L a, K_L a_0$ – соответственно объёмные коэффициенты массопередачи кислорода в присутствии и отсутствии твёрдых частиц, ч⁻¹.

В ходе исследования было изучено влияние удельной поверхности, суммарного объема пор и относительной гидрофобности частиц активированных углей на их способность усиливать межфазный перенос кислорода.

Установлено, что коэффициент усиления массопереноса кислорода (E) в присутствии частиц активированного угля повышается с увеличением их суммарного объема пор и относительной гидрофобности. Так, березовый активированный уголь БАУ, характеризующийся максимальными значениями суммарного объема пор и относительной гидрофобности (1,66 см³/г и 6,00, соответственно), дал наибольшее усиление массопереноса кислорода ($E=3,72$), тогда как при использовании косточкового АУ с наименьшими значениями тех же свойств (0,56 см³/г и 1,17, соответственно) усиление транспорта оказалось минимальным (1,7 раза). Установлено, что величина удельной поверхности имеет второстепенное значение с точки зрения способности активированных углей усиливать массоперенос кислорода, так как при увеличении удельной поверхности не происходит повышения коэффициента усиления, а, напротив, наблюдается его снижение.

Полученные результаты позволяют определить оптимальные свойства активированных углей при их использовании в качестве активатора массопереноса кислорода в системе газ-жидкость.

ПЛЫНСКАЯ Ж.А., ВЕЛИЧКО Н.А.

Красноярский государственный аграрный университет, Красноярск, Россия

EPHEDRA MONOSPERMA - ПРОДУЦЕНТ ЭКЗОМЕТАБОЛИТОВ

Эфедрa односемянная - двудомный густоветвистый кустарник высотой до 30 см, содержит уникальный комплекс биологически активных веществ, используемых в медицине. *Ephedra monosperma* - представитель семейства хвойниковых (*Ephedraceae*) интересна как источник природных возбудителей центральной нервной системы в частности алкалоидов. С помощью метода культивирования тканей и органов растений в настоящее время создан ряд клеточных технологий, позволяющих извлекать ценные вторичные продукты метаболизма растений, такие, как гликозиды, алкалоиды, некоторые другие биологически активные вещества, имеющие широкое применение в качестве лекарственных препаратов, пищевых красителей и др.

Основной проблемой метода культуры тканей по-прежнему является низкий выход полезного продукта. Перспективным в отношении аппаратуры для культивирования растительных тканей *in vitro* является использование в качестве продуцентов культуры, выделяющие экзoметаболиты, что позволяет применить технологию непрерывного культивирования.

В лабораторных условиях получен высокопродуктивный клон каллусной культуры *Ephedra monosperma* (продуцента экзoметаболитов), на среде Мурасига-Скугу, содержащей НУК (2,5 мг/л), 6-БАП (0,2 мг/л) и повышенной концентрации тиаминa. Суспензионная культура выращивалась на среде, без цитокининов с 2,4-Д (0,04 мг/г), и отличалась мелкодисперсностью и наиболее быстрым ростом. Однако, эти условия не способствовали интенсивному синтезу вторичных продуктов и их выделению. При поверхностном культивировании на агаре и на пенополиуретане содержание алкалоидов было выше, чем при суспензионном культивировании и составило 1,39 г/л и 1,72 г/л соответственно. Таким образом, можно заключить, что структурная организация клеток и скорость их роста являются факторами, определяющими активность вторичного метаболизма этих клеток. Имобилизация клеток на инертный носитель обеспечивает ряд преимуществ при разработке технологии непрерывного культивирования. Облегчаются манипуляции с клетками, появляется возможность отделять их от среды, изменяя условия

культивирования. Была разработана методика иммобилизации клеток *Ephedra monosperma*. из суспензионной культуры на кубики пенополиуретана.

Сравнительный анализ динамики роста и выделения алкалоидов в среду при культивировании суспензии и иммобилизованных клеток показал, что иммобилизация стимулировала вторичный синтез, хотя и несколько замедляла рост культуры так иммобилизованные клетки выделяли 1,59 г/л алкалоидов, а суспендированные 0,98 г/л. Добавление в среду НУК дополнительно стимулировало выделение алкалоидов иммобилизованными клетками. Выход повышался до 2,65 г/л алкалоидов.

ПОВАРНИЦЫНА Т.В., МЕЛЬНИК Т.Н., ГЛУХОВ А.С., МЕЛЬНИК Б.С.

Институт белка РАН, Пуццино, Россия

ИССЛЕДОВАНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ МУТАНТНЫХ ФОРМ GFP

Основной целью наших исследований является изучение стабильности и скоростей сворачивания/разворачивания «сложных белков», то есть белков с несколькими промежуточными состояниями. В настоящее время для многих исследованных белков имеется достоверная информация об их стабильности и скоростях сворачивания/разворачивания. Своим объектом исследования мы выбрали зеленый флуоресцентный белок (GFP), который впервые был обнаружен у медузы *Aequorea victoria* в 1962 году. В этом белке присутствует хромофор, обладающий сильной флуоресценцией, благодаря чему он широко используется для флуоресцентного мечения. Но, несмотря на широкое применение GFP в прикладных задачах, работ по изучению его физико-химических свойств мало, при этом полученные данные имеют противоречивый характер. В предыдущей работе (Melnik B.S., Povarnitsyna T.V., Melnik T.N., BBRC. 2009. 390, 1167-1170) мы показали, что этот белок полностью развернут уже в 4.5М мочевины, а процесс его разворачивания в 7М мочеvine заканчивается через 30 часов. Нами были подобраны наиболее оптимальные методы исследования GFP. Проводя электрофорез в градиенте мочевины, мы получаем информацию о стабильности GFP. Неравновесное плавление GFP позволяет получить информацию о скорости разворачивания этого белка. В данной работе проводятся калориметрические исследования мутантных форм GFP с одиночными

заменами аминокислотных остатков и с введенной дисульфидной связью. Одиночные замены аминокислотных остатков позволяют изучить влияние отдельных гидрофобных аминокислотных остатков с большим количеством контактов на стабильность и скорости разворачивания GFP, а введение дисульфидной связи - влияния отдельных структурных элементов белка на его стабильность и скорость разворачивания.

Работа поддержана федеральной целевой программой «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (грант П304), программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

ПОГОРЕЛЬСКИЙ И.П.¹, ФРОЛОВ Г.А.², ЛЕЩЕНКО А.А.¹,
ЛАЗЫКИН А.Г.¹, ЛОГВИНОВ С.В.¹

¹ *Вятский государственный университет, Киров, Россия*

² *Национальный исследовательский технологический университет. Московский институт стали и сплавов, Москва, Россия*

БИОЛОГИЧЕСКАЯ НАПРАВЛЕННОСТЬ ДЕЙСТВИЯ КЛАСТЕРОВ И НАНОРАЗМЕРНЫХ ЧАСТИЦ МЕТАЛЛОВ

В конце XX – в начале XXI вв. появились первые публикации, касающиеся использования достижений нанотехнологии в пищевых отраслях. Области применения современных нанотехнологий в пищевой промышленности многообразны. Это приготовление употребляемых в пищу растений в виде нанопорошков и эмульсий, создание функциональных нанодобавок, пищевых ингредиентов и обогащенных ими продуктов; получение нового поколения консервантов; антибактериальные покрытия из металлов и белков; выделение чистых пищевых ингредиентов и тонкая очистка жидких пищевых систем; ультромикроскопические наносенсоры для быстрой идентификации вирусов и других наногиенов.

В меньшей степени известны исследования, связанные с использованием достижений нанотехнологии в защите растений от фитопатогенных бактерий, а также для проращивания семян культурных растений, что имеет немаловажное значение для повышения урожайности и обеспечения продуктами питания населения страны.

Нами накоплен определённый опыт биологической защиты семян и проростков хвойных при сочетанном использовании нанокластеров серебра, оксида марганца и цианобактерий. Такой агротехнический прием способствует получению жизнеспособных полноценных саженцев сосны и ели. Представлялось целесообразным распространить опыт предпосевной обработки семян сосны и ели растворами кластеров и наноразмерных частиц металлов на семена ряда сельскохозяйственных культур, в частности льна, пшеницы, свеклы и моркови.

Известно, что изменившиеся условия жизни и антропогенное загрязнение окружающей среды стали причиной появления в среде обитания множества технофильных микроорганизмов, составляющих так называемое ингредиентное (органическое) загрязнение окружающей среды. Вместе с минеральным ингредиентным загрязнением они оказывают губительное воздействие на семена и всходы сельскохозяйственных культур. Проблема всхожести семян является актуальной для аграрного сектора экономики. Обеднение почвы, распространение фитопатогенных бактерий и грибов сводят на нет усилия работников сельского хозяйства. На истощенных почвах в зоне рискованного земледелия даже хорошо сохранившиеся семена сельскохозяйственных культур обладают низкой всхожестью. Бурно развивающаяся нанобиология представила уникальную возможность для проращивания семян и защиты посадочного материала. Ряд физико-химических особенностей кластеров и наноразмерных частиц металлов, в частности имеющих биологическую направленность, являются основой разработки эффективных технологий управления активностью таких биообъектов, как микроорганизмы и растения в интересах человека.

Целью работы является оценка влияния наноразмерных частиц серебра, кобальта, железа, оксидов марганца и титана на всхожесть и развитие семян льна, пшеницы, свеклы и моркови. В работе исследованы семена, полученные из фонда Вятской сельскохозяйственной академии. Нанокластеры и наноразмерные частицы металлов были любезно предоставлены для исследований специалистами ООО «Фрактал-М» и ООО «Ангстрем-Центр Нанотех» (КМЕТ им. А.А. Байкова РАН). Концентрация наноразмерных частиц и нанокластеров металлов достигала 40-60 мг/л. Предпосевную обработку семян проводили путем замачивания в течение 40-50 минут при температуре 38-40⁰С в соответствующей ультрадисперсной системе.

Проведенные нами микрополевые эксперименты свидетельствуют о выраженном стимулирующем эффекте на проращивание семян льна наноразмерных частиц железа, а на семена пшеницы, свеклы и льна – наноразмерных частиц серебра, кобальта, оксида титана. Всхожесть семян под влиянием наноразмерных частиц и их оксидов достигала 97-98%.

При этом в опыте ростки были выше (на 30%) и более крепкими. Важно отметить следующее. Предпосевная обработка семян изучаемых сельскохозяйственных культур обеспечивает прорастание семян на обедненных почвах и в последующем хорошее развитие проростков, в то время как не прошедшие предпосевную обработку семена либо вообще не прорастали либо всхожесть была не выше 30-38%.

Полученные результаты микрополевых экспериментов позволяют рекомендовать использование уникальных свойств кластеров и наноразмерных частиц металлов и их оксидов в практике предпосевной обработки семян сельскохозяйственных культур.

ПОДЧЕРНЯЕВА Р.Я.¹, СУЕТИНА И.А.¹, ГУЩИНА Е.А.¹,
ЛОПАТИНА О.А.¹, ОСТРОУМОВ С. А.²

¹ *ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздравсоцразвития РФ, Москва, Россия*

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

ПРИМЕНЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ БИОТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И ОЦЕНКИ ТОКСИЧНОСТИ НАНОМАТЕРИАЛОВ

Нарастающее использование наноматериалов делает необходимым исследование потенциальной опасности наночастиц для окружающей среды и человека.

Цель данной работы – апробировать новые варианты клеточных биотехнологий для характеристики токсичности наноматериалов, оценить возможную токсичность наночастиц (НЧ) окислов металлов (наночастиц CuO и двух видов оксидов железа) в системах с клетками человека и животных.

Проведены опыты на культуре клеток человека HeLa. Для изучения токсичности наночастиц и их воздействия на пролиферативную активность клеток HeLa применяли метод МТТ. Растировку препаратов проводили на 96 - луночных планшетах (панелях)

фирмы Wink с 24 - часовым монослоем клеток HeLa. Клетки HeLa рассеивали на 96-луночную панель в концентрации 200000 кл/мл в каждую лунку в объёме 100мкл среды 199 с 10% эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС) и инкубировали в течение 24 часов в термостате с CO₂ при 37°C. Перед внесением препаратов инкубационную среду меняли, добавляя по 100 мкл среды 199 с 1 % ЭТС в лунку.

Исследуемые препараты титровали в разведении: 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024 с помощью внесения их по 100 мкл в лунку и с 2-мя повторами на точку. Инкубация клеток с препаратами проводилась 24 часа в среде 199 с ЭТС. Для контроля титрование исходной H₂O на клетках проводилось параллельно с препаратами.

После инкубации клеток с препаратами в течение 24 часов в термостате с CO₂ при 37°C среду 199 с 1% ЭТС отсасывали из лунок и добавляли по 100 мкл среды 199 с 20 мкл МТТ (фирма Sigma, в исходной концентрации 5 мг/ мл) и проводили инкубацию клеток с МТТ в течение 4 часов. Затем среду с МТТ удаляли и добавляли по 100 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) для растворения восстановленного клетками HeLa формазана. Осадок клеток ресуспендировали в течение 5 мин пипетированием и измеряли оптическую плотность (ОП) при длине волны 492 нм с использованием фотометра «Stat Fax 3200».

На основании результатов тестирования с помощью МТТ-теста были рассчитаны коэффициенты пролиферации. Для контроля титрование исходной H₂O на клетках HeLa проводилось параллельно с препаратами.

Все три препарата вызвали снижение коэффициента пролиферации при разведениях 1/2 и 1/4. Препараты 1 и 3 снижали коэффициент пролиферации также и при больших разведениях – вплоть до разведения 1/256. При всех этих разведениях препарат 1 сильнее снижал коэффициент пролиферации, чем препарат 3, т.е. препарат 1 проявил более высокую токсичность.

Наиболее сильным ингибирующим воздействием на пролиферацию клеток обладал препарат № 1 (НЧ оксида меди). Наименьшей токсичностью из этих трех препаратов обладал препарат № 5 (НЧ Fe₂O₃). Препарат № 3 [НЧ Fe₂O₃ (alpha)], занимал промежуточное положение.

Электронная микроскопия выявила патологические нарушения морфологии клеточных структур при воздействии НЧ Fe₂O₃ (alpha) на клетки. НЧ были обнаружены в цитоплазме и вакуолях, но не в ядрах клеток HeLa.

Аналогичные исследования проведены нами также на других культурах клеток человека, млекопитающих и птиц. Более высокая токсичность препарата № 1 (НЧ оксида меди) по сравнению с препаратом № 3 [НЧ Fe₂O₃ (alpha)] показана в наших опытах на следующих культурах клеток: ФЭК (первично-трипсинизированные клетки куриных эмбрионов), ТЯ (первично-трипсинизированные клетки тестикулов ягненка), ФЭЧ (диплоидные клетки фибробластов эмбриона человека), Vero (почки африканской зеленой марышки), ВНК (почки сирийского хомячка), A549 (карцинома легкого человека).

Полученные результаты расширяют методический арсенал исследований биологической активности наноматериалов и вносят вклад в количественную характеристику токсичности наночастиц оксидов металлов.

ПОДЧЕРНЯЕВА Р.Я.², СУЕТИНА И.А.², ЛОПАТИНА О.А.², ДЖОНСОН М.Е.³,
ТАЙСОН ДЖ.Ф.³, ШИН Б.³, ОСТРОУМОВ С.А.¹

¹ МГУ им. М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Москва, Россия

² ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздрава России, Москва, Россия

³ Университет Массачусетса, Амхерст, США

ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ ОКИСЛОВ МЕДИ И ДРУГИХ МЕТАЛЛОВ С БИОЛОГИЧЕСКИМИ ОБЪЕКТАМИ

Поступление в окружающую среду тяжелых металлов – одни из приоритетных видов загрязнения биосферы. Медь является одним из ключевых тяжелых металлов, которые загрязняют окружающую среду и представляют серьезную угрозу для здоровья человека и экосистем. Медь может попадать в окружающую среду и в растворимой форме, и в форме наночастиц.

В ряде исследований было установлено, что наночастицы, в том числе оксида меди и оксидов ряда других металлов, способны воздействовать на живые организмы различных биологических видов и производить токсические эффекты. В данном

исследовании дан анализ существующей научной литературы и результатов новых экспериментов.

Новые опыты авторов выявили дополнительные данные о токсических эффектах наночастиц оксида меди на биологические объекты, - такие, как различные виды растений и клетки человека, млекопитающих и птиц. В дополнение к экспериментам по изучению того, как наночастицы взаимодействуют с живыми организмами и клетками, мы провели также опыты по исследованию взаимодействий наноматериалов с неживым биогенным материалом. Авторы обнаружили, что эти взаимодействия приводят к увеличению концентрации металла в живой биомассе и в неживых биогенных материалах. Авторы количественно изучили это увеличение, используя оптический эмиссионный спектрометр с индуктивно-связанной плазмой (ICP-OES).

В той части исследований, которая касалась выявления и оценки потенциальной токсичности наночастиц оксида меди, были проведены опыты на водных растениях и на культурах клеток: HeLa (культура клеток человека), ФЭК (первично-трипсинизированные клетки куриных эмбрионов), ТЯ (первично-трипсинизированные клетки тестикулов ягненка), ФЭЧ (диплоидные клетки фибробластов эмбриона человека), Vero (почки африканской зеленой мартышки), ВНК (почки сирийского хомячка), A549 (карцинома легкого человека). На всех изученных биообъектах выявлена токсичность наночастиц оксида меди, получены количественные характеристики токсичности. Широкий диапазон использованных биологических объектов дает основания для вывода о том, что наночастицы оксида меди обладают токсичностью для животных и растений и опасны как для здоровья человека, так и для окружающей среды.

Предварительные результаты части этих исследований докладывались на конференциях: 2-я Международная школа «Наноматериалы и нанотехнологии в живых системах, безопасность и наномедицина» (19-24 сентября 2011; организаторы ОАО Роснано и МГУ); международная научно-практическая конференция «Фармацевтические и медицинские биотехнологии» (20-22 марта 2012 г., Москва; Pharmaceutical and Medical Biotechnology, International scientific conference March 20-22, 2012, Moscow).

Результаты обсуждаются в связи с современными проблемами биотехнологии, токсикологии, экотоксикологии и наук об окружающей среде.

ПОЗДИНА С.Ю.¹, ПУНГУС И.Ф.², ДЕЛЕГАН Я.А.³

¹*Тульский государственный университет, Тула, Россия*

²*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН, Пуцино, Россия*

³*Пуцинский государственный естественнонаучный институт, Пуцино, Россия*

ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫЕ СВОЙСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ ДЕСТРУКТОРОВ НЕФТЕПРОДУКТОВ

Нефтяная и нефтеперерабатывающая промышленность являются источниками образования миллионов тонн жидких и твердых отходов. Места их хранения, а также аварии, связанные с добычей, переработкой и хранением нефти и нефтепродуктов представляют серьезную опасность для окружающей природы. Наиболее широкое распространение в восстановлении окружающей среды получили методы биоремедиации, основанные на активации аборигенной микробной популяции за счёт применения ряда агротехнических мероприятий, а также интродукции в место загрязнения специально отобранных микроорганизмов, активно утилизирующих загрязнитель. Низкая биодоступность для микробной деструкции нефти и продуктов её разложения в значительной степени обусловлена их крайне малой растворимостью в воде. Проблему повышения растворимости загрязнителей можно решить, используя поверхностно-активные вещества, способствующие солюбилизации углеводов, образованию мелкодисперсной эмульсии, в результате чего облегчается контакт микробных клеток с гидрофобным субстратом и поступление его внутрь клетки. Однако, применение синтетических ПАВ может привести к появлению дополнительных загрязнителей окружающей среды. Альтернатива этому - использование «биосурфактантов» (биоПАВ) - разнообразных поверхностных веществ, синтезируемых микроорганизмами. В последнее время микроорганизмы, продуцирующие биосурфактанты, все шире используются для очистки от загрязнения нефтепродуктами как закрытых (например, танкеры, трубопроводы), так и открытых систем. Изучение свойств, строения, условий биосинтеза этих соединений позволит создать биопрепараты на основе отобранных микроорганизмов-продуцентов.

Целью нашей работы являлось исследование особенностей образования биологических поверхностно-активных соединений, продуцируемых бактериями родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus*, выбор оптимальных условий культивирования данных микроорганизмов с целью получения биоПАВ.

На основании проведенного скрининга на способность к образованию биоэмульгаторов в качестве исследуемых объектов были выбраны грамотрицательные *Pseudomonas fluorescens* 142NF(pNF142), *Pseudomonas putida* BS3701(pBS1141)(pBS1142), содержащие плазмиды биодegradации нафталина; грамположительный *Rhodococcus* sp. S67. Эти штаммы ранее охарактеризованы как эффективные микроорганизмы-нефтедеструкторы и включены в состав запатентованных ассоциации и биопрепарата «МикроБак» для очистки нефтезагрязнённых территорий.

Для оценки способности микроорганизмов синтезировать биоПАВ использовались следующие методики: определение содержания гликолипидных биосурфактантов, измерение поверхностного натяжения культуральной жидкости, определение индекса эмульгирования и эмульгирующей активности. Для определения концентрации гликолипидов микроорганизмы выращивали на среде Эванса с добавлением различных субстратов. По результатам исследования, для всех изученных штаммов наиболее предпочтительным субстратом является гексадекан. При росте на глюкозе или нафталине изученные в данной работе штаммы псевдомонад также способны выделять гликолипиды, однако в невысоком количестве.

Поверхностное натяжение культуральной жидкости всех трех изученных в нашей работе микроорганизмов при росте на гексадекане составило 33-34 мН/м, при поверхностном натяжении раствора сравнения (среда Э) 77 мН/м, что свидетельствует о высокой поверхностной активности продуцируемых биоПАВ. Глюкоза как субстрат индуцирует синтез биосурфактантов значительно менее эффективно.

При сравнении индексов эмульгирования и эмульгирующей активности микроорганизмов более эффективное образование биоПАВ отмечено при росте на гексадекане, причем все три изученных в работе микроорганизма образуют внеклеточные биоПАВ при росте на этом субстрате, что делает возможным экстракцию этих соединений из бесклеточного супернатанта после удаления клеток.

При росте псевдомонад на глюкозе отмечено образование экзо-биоПАВ, что характерно для представителей этого рода, так как данные об образовании ими эндо-биоПАВ отсутствуют. Родококки на данном субстрате синтезируют биоПАВ эндо-типа. Таким образом, все исследованные микроорганизмы-нефтедеструкторы, входящие в состав биопрепарата «Микробак» для очистки территорий от загрязнений нефтепродуктами, способны образовывать биоПАВ, предположительно гликолипидной природы.

На этапе выделения и очистки биосурфактантов в результате подбора условий было получено три очищенных препарата биоПАВ, продуцируемых каждым из исследуемых микроорганизмов.

Основываясь на результате анализа очищенных экстрактов методом ТСХ и литературных данных о величине удерживания гликолипидов, было выдвинуто предположение, что микроорганизмы двух штаммов псевдомонад продуцируют одинаковые дирамнолипиды.

Результат ТСХ анализа образца родококков показал возможное образование этими микроорганизмами четырех различных соединений. Идентификация трегалолипидов, продуцируемых родококками, по величине удерживания затруднена, поскольку отсутствует достаточный объем опубликованных данных по этой тематике.

При изучении природы биосурфактантов, продуцируемых бактериями *P. fluorescens* 142NF(pNF142) при росте на минеральной синтетической среде М9 с гексадеканом полученные поверхностно – активные характеристики штамма, анализ образца методом ТСХ и ЯМР-спектроскопией позволили нам выдвинуть предположение, что роль биосурфактантов выполняют продукты расщепления гексадекана-карбоновые кислотами (C₆-C₈ углерод. атомов), обладающие соответствующими свойствами. При культивировании штамма-нефтедеструктора *P. fluorescens* 142NF на минеральной среде М9 с добавлением гексадекана, а также глюкозы и дрожжевого экстракта наблюдается явное потребление более легкого, гидрофильного субстрата-глюкозы и так же не отмечено образование биосурфактантов гликолипидной природы.

ПОЗДНЯКОВА Н.В., ЖУРИНА М.В., ПЛАКУНОВ В.К., ЭЛЬ-РЕГИСТАН Г.И.
*ФГБУН Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского Российской академии наук,
Москва, Россия*

ПОДАВЛЕНИЕ ФОРМИРОВАНИЯ МИКРОБНЫХ БИОПЛЕНОК, БИОМЕДИЦИНСКИЙ АСПЕКТ

Недостатки современных приемов антибиотикотерапии обусловлены быстрой изменчивостью патогенных микроорганизмов, в результате которой последние становятся устойчивыми к действию самых мощных антибиотиков, что заставляет вводить в практику все новые препараты. Вторая, не менее серьезная, опасность связана с формированием в зараженном макроорганизме специфических микробных структур – биопленок, в составе которых микроорганизмы становятся устойчивыми не только к действию антимикробных препаратов, но и к иммунным механизмам макроорганизма. В результате возникают практически неизлечимые хронические инфекции (например, муковисцидоз), часто приводящие к летальному исходу.

Проведенные нами исследования устойчивости ряда грамположительных и грамотрицательных бактерий (аналогов патогенных микроорганизмов) к современным антибиотикам с различным механизмом действия (оксациллину, рифампицину, ципрофлоксацину, азитромицину и др.) показали, что биопленки в 100-1000 раз более устойчивы ко всем этим антибиотикам, чем планктонные (суспензионные) культуры.

В последнее время обнаружено еще одно явление, затрудняющее борьбу с биопленками. Оказалось, что некоторые вещества, образуемые растениями, а также ряд антибиотиков в субингибиторных концентрациях (создающихся в макроорганизме при нарушении режима антибиотикотерапии) не только не подавляют рост биопленок, но даже стимулируют его.

Поэтому чрезвычайно актуальным становится подбор веществ, которые предотвращают формирование биопленок или дестабилизируют их. В частности, в качестве таких вспомогательных препаратов предложено использовать гидролитические ферменты (протеиназы, ДНКазу, полисахаридгидролазы), а также ингибиторы, которые либо подавляют регуляторную систему “quorum sensing”, участвующую в начальных

этапах формирования биопленок, либо вызывают инактивацию ацилгомосеринлактонов, представляющих собой сигнальные молекулы этой системы.

Однако указанные вещества обладают побочными эффектами, а главное, неспособны предотвратить стимулирующее действие антибиотиков на формирование биопленок.

Мы испытали в качестве «усилителей» действия антибиотиков алкилоксибензолы (АОБ), которые представляют собой природные ауторегуляторные молекулы. Ранее было обнаружено, что АОБы могут переводить клетки патогенного микроорганизма в «покоящееся» состояние, предотвращая таким образом адаптацию к антимикробному эффекту антибиотиков. Очень важно, что действие АОБов универсально и видонеспецифично. Они активны против грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также дрожжей.

Изучение действия одного из представителей АОБов на формирование биопленок у грамположительных бактерий показало, что это соединение в равной степени эффективно (в микрограммовых концентрациях) подавляет рост не только планктонных культур, но и формирование биопленок у этих микроорганизмов. Более того, этот гомолог АОБ предотвращает стимулирующий эффект низких концентраций антибиотиков на формирование биопленок. В случае грамотрицательных бактерий он менее эффективен как ингибитор роста, но его способность предотвращать стимулирующий эффект низких концентраций антибиотиков проявляется в полной мере.

Таким образом, АОБы могут рассматриваться как перспективные компоненты комбинированных антимикробных препаратов нового поколения, включающих антибиотики, которые могут быть эффективными в случае патогенов, способных к формированию биопленок.

ПОЗДЫШЕВА Т.И., ГРЕТЧЕНКО Г.А., ГАРАСЬКО Е.В., МОРЕВ С.И.

Ивановская государственная медицинская академия, Иваново, Россия

САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ПИЩЕВОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

Возрастающая роль биотехнологии в пищевой промышленности и обеспечении оптимального питания достигается благодаря выпуску и реализации доброкачественных и безопасных в эпидемиологическом отношении продуктов. Вопросы оценки качества и безопасности пищевых продуктов по микробиологическим показателям в настоящее время рассматриваются совершенно иначе, чем раньше, большое значение приобретают разработка современных методов микробиологического анализа пищевых продуктов и создание обоснованных нормативных показателей на них, определяющих эффективность контроля качества пищевых продуктов. Санитарно-микробиологические исследования пищевых продуктов направлены на профилактику пищевых отравлений, желудочно-кишечных заболеваний, связанных с употреблением в пищу контаминированных различными возбудителями продуктов питания, что является конечной целью санитарно-бактериологического контроля.

Результаты исследований 6779 проб, выполненных испытательной микробиологической лабораторией ИвГМА за последние 5 лет показали, что критериям безопасности качества пищевых продуктов не соответствовали 399 (5,9%) проб. В том числе: мясо и мясные полуфабрикаты – 43 (10,7%); птица, яйца и продукты их переработки – 26 (6,5%); молоко и молочные продукты – 50 (12,5%); рыба, нерыбные объекты промысла и продукты, вырабатываемые из них – 70 (17,5%); масличное сырье и жировые продукты – 13 (3,2%); колбасные и кулинарные изделия из мяса – 72 (18%), кондитерские изделия – 85 (21,3%); напитки – 5 (1,3%); продукция общественного питания, в том числе салаты – 35 (8,7%).

По группе потенциально патогенных (*S.aureus*) чаще всего не соответствовали критериям безопасности рыбные продукты – 6 (2,23%) проб; по группе патогенных (*Salmonella*) не соответствовали птица и продукты переработки – 22 (8,2%) проб; по группе условно-патогенных (Бактерии группы кишечной палочки) не соответствовали

молочные продукты – 41 (15,3%), продукция общественного питания, в т.ч. салаты – 24 (8,9%), колбасные и кулинарные изделия из мяса – 42 (15,6%).

Проблема безопасности пищевых продуктов для потребителей сохраняет свою актуальность. Удельный вес проб пищевых продуктов, не отвечающих требованиям гигиенических нормативов по микробиологическим показателям, на протяжении последних пяти лет имеет в целом тенденцию к снижению. Проведение санитарно-микробиологического контроля качества пищевых продуктов способствует своевременному выявлению и устранению конкретных факторов инфицирования продуктов питания и организации специальных мероприятий по улучшению состояния санитарной культуры в пищевой индустрии.

ПОКЛОНОВ В.А.¹, КОТЕЛЕВЦЕВ С.В.¹, ШЕСТАКОВА Т.В.¹,
ШЕЛЕЙКОВСКИЙ В.Л.², ОСТРОУМОВ С.А.¹

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

²*Главный ботанический сад РАН, Москва, Россия*

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ С ВОДНЫМИ РАСТЕНИЯМИ

Тяжелые металлы и другие токсиканты в тест-системах с растениями проявляют фитотоксичность.

Изучение взаимодействий поллютантов с растениями включает в себя два аспекта: 1) изучение токсичности при воздействии поллютантов на организмы; 2) изучение фиторемедиационного потенциала растений.

В данной работе в условиях модельных экосистем изучали второй аспект взаимодействий с водными растениями неорганических поллютантов, на примере тяжелых металлов (ТМ).

Исследовали изменения концентраций ТМ в воде модельных экосистем (микрокосмов), содержащих водные растения. Концентрации ТМ Cu, Zn, Cd, Pb в воде экспериментальных микрокосмов измеряли методом инверсионной вольтамперометрии. Далее описаны опыты в системах с *Ceratophyllum demersum* L. В микрокосмах № 1 и 2

были добавления смеси тяжелых металлов по 5 мл раствора, содержащего смесь четырех ТМ (Cu, Zn, Cd, Pb) . В микрокосмах № 3 и 4 были добавления смеси тяжелых металлов по 10 мл раствора. В микрокосмах № 5, 6 не было добавок, эти микрокосмы служили контролем. В микрокосмах инкубировали макрофиты *Ceratophyllum demersum* L. Концентрации металлов в микрокосмах с макрофитами снижались значительно быстрее, чем в контрольных микрокосмах без растений. Иными словами, присутствие макрофитов в водной системе ускоряло снижение концентраций этих ТМ в воде.

На второй день эксперимента стали заметны изменения в микрокосмах с ТМ. Побеги макрофитов изменили свою локализацию в микрокосмах, были локализованы в придонной части микрокосмов. Цвет побегов изменился, они немного пожелтели. Растения были погружены на дно в тех сосудах, куда была добавлена смесь тяжелых металлов. В контрольных сосудах побеги растений выглядели зелеными, без признаков угнетения. Спустя 6 дней после добавки смеси тяжелых металлов, побеги растений побурели. В микрокосмах №5 и 6 (контроль) растения занимали верхнюю часть столба воды. Растения в этих (контрольных) микрокосмах сохранили зеленый цвет. В микрокосмах с добавленными ТМ побеги макрофитов изменили свою локализацию, были локализованы в придонной части микрокосмов. За 12 дней инкубации в сосудах с добавлением смеси тяжелых металлов, растения побурели. Заметны признаки фитотоксичности. Аналогичные исследования были проведены на следующих видах: *Utricularia gibba* L.; *Echinodorus quadricostatus* F.; *Lilaeopsis* sp.; *Lilaeopsis brasiliensis* A.; *Synnema triflorum* K.; *Hydrotriche hottoniiflora* Z.; *Elodea canadensis* Mchk.; *Ludwigia repens* F.; *Micranthemum micranthemoides* W.; *Micranthemum umbrosum* B.

Полученные результаты вносят вклад в базу научных данных для разработки биотехнологии очищения воды от ТМ.

Авторы выражают благодарность Соломоновой Е.А. за помощь.

ПОЛИКАРПОВА А.В., СОЛОВЬЕВА В.В.

Казанский (Приволжский) Федеральный университет, Казань, Россия

СПЛАЙСОСОМО-ЗАВИСИМЫЙ ТРАНС-СПЛАЙСИНГ НЕБУЛИНА

Изменения в структуре гена небулина приводят к развитию немалиновой миопатии. В настоящее время не существует эффективного лечения немалиновой миопатии, за исключением симптоматического: механическая вентиляция легких, кормление назогастральным способом, физиотерапия. Одним из перспективных методов лечения служит генная терапия, а именно технология SMART- сплайсосомо-зависимый транс-сплайсинг РНК.

Цель исследования – разработка методов транс-сплайсинга мРНК небулина с применением генной модификации клеток путем введения пре-мРНК трансплайсируемых молекул (ПТМ).

Эксперименты проведены на клеточной культуре HeLa. Выделяли ПТМ (экзоны 122-123) и часть гена небулина с мутантными локусами (экзоны 120-124, делеция в 122 экзоне, приводящая к терминации трансляции) из плазмиды pUC57, проводили рекомбинацию с плазмидой pcDNA3.1. Далее клонировали плазмиды со вставками в культуре клеток E.coli, осуществляли сбор рекомбинатных плазмид, используя селекцию по ампициллину и путем секвенирования. Трансфецировали клетки HeLa, используя липидный комплекс MetaFectine, плазмидные ДНК со вставками участка гена NEB и ПТМ в соотношении 0,5:0,5, 0,5:1,0 и 0,5:1,5 соответственно. Контролем служили клетки, трансфицированные pcDNA3.1, содержащими NEB 120-124 mut, а также плацебо. После трансфекции клетки инкубировали в течение 24 часов в культуральной среде. Из части клеток выделяли РНК, путем обратной транскрипции получали ДНК, секвенировали или проверяли путем рестрикции (у NEB 120-124mut имеется сайт рестрикции XbaI). Проводили иммунофлуоресцентное окрашивание оставшихся клеток с помощью Anti-His (C-term)-FITC Antibody.

По данным рестрикционного анализа кДНК, полученной из клеток HeLa, при котором успешно трансплайсированные молекулы кДНК не подвергались действию рестриктазы XbaI, подтверждает способность ПТМ замещать мутантные участки гена NEB. В результате иммунофлуоресцентного окрашивания культуры клеток HeLa мы

выявили NEB-позитивные трансфицированные клетки. Также при окраске клеток HeLa трансфицированных одновременно ПТМ и NEB 120-124mut наблюдали характерные гранулы белкового продукта. При этом, наиболее выраженное увеличение количества гранул наблюдали при трансфекции NEB120-124mut и ПТМ в соотношении 0,5:1,0.

На основании данных результатов можно заключить, что трансфекция клеточной культуры плазмидной ДНК, содержащей ПТМ приводит к транс-сплайсингу ПТМ и NEB 120-124mut с образованием нормального белкового продукта, что может послужить основой лечению немалиновой миопатии.

ПОЛИЩУК С.Д., НАЗАРОВА А.А.

*Рязанский государственный агротехнологический университет
имени П.А. Костычева, Рязань, Россия*

ТОКСИЧНОЕ ДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЦИНКА НА СЕМЕНА И ПРОРОСТКИ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР

Активное развитие нанотехнологий в России и за рубежом ставит остро вопрос безопасности наноматериалов для живых организмов. Многочисленные исследования показывают, что наноразмерные материалы проявляют свойства, отличные от свойств материала в классической форме. Актуальны исследования фитотоксичности наночастиц, так как растения, как важнейшие продуценты, находятся в основании множества пищевых цепей. Появление в тканях растений промышленных наночастиц может привести к их бионакоплению и негативным последствиям. Механизмами токсического действия наночастиц может служить механическое разрушение наноструктурами органов и тканей, развитие мембранных нарушений и комплекса реакций оксидативного стресса.

Особую значимость приобретают исследования влияния наночастиц промышленного происхождения на сельскохозяйственные растения, используемые для производства продуктов питания или в качестве кормовых культур.

Цель проведенных исследований – определение порога токсичности наночастиц оксида цинка для растений пищевого и кормового назначения по витальным и морфофизиологическим показателям проростков.

Исследование проведено в лабораторных условиях в соответствии с ГОСТ 12038-84. Семена закладывались в чашки Петри по 50 семян в каждой, помещались в термостат, где прорастали при постоянной температуре 23°C. Были использованы семена яровой пшеницы сорта «Лада» и гибрида кукурузы «Росс-145». Определяли энергию прорастания, всхожесть, длину и массу ростков и корней при различных концентрациях наночастиц оксида цинка от 0,1 до 1000 г на гектарную норму посева семян.

Результаты испытания показали, что энергия прорастания семян кукурузы была ниже контрольного значения во всех вариантах с наночастицами оксида цинка, достигая минимального значения при концентрации ZnO - 1000 г (-36,4%). Показатель всхожести семян кукурузы изменялся аналогично. Энергия прорастания семян яровой пшеницы не зависела от увеличения концентрации наночастиц оксида цинка, во всем интервале концентраций она была ниже контроля максимально на 5% при концентрации ZnO - 10 г на гектарную норму посева. Всхожесть семян пшеницы при всех концентрациях оксида цинка была выше контроля на 1-2%.

Длина надземной части 4-дневного проростка кукурузы при низких концентрациях наночастиц оксида цинка превышала контроль, а при высоких снизилась на 32,7% (при ZnO – 1000 г). Длина подземной части проростка кукурузы изменялась аналогично, при максимальной концентрации уменьшилась на 20,5% ниже контрольного значения. Длина надземной части 3-дневного проростка пшеницы также при низких концентрациях оксида цинка превышала контроль, а при высоких (ZnO - 1000 г) – снизилась на 29,9%. Длина подземной части проростка пшеницы, напротив, при всех вариантах превышала контроль, достигнув максимального значения при ZnO – 1000 г на 70,4%. Линейный рост растений является важным показателем, косвенно характеризующим интенсивность деления или растяжения клеток. С этим показателем тесно коррелируют масса и объем органов растения.

Масса 7-дневного проростка кукурузы под влиянием наночастиц оксида цинка как надземной, так и подземной частей была ниже контроля на всех вариантах, максимально при концентрации ZnO – 1000 г (-36,5%). Подобным образом наночастицы оксида цинка повлияли на весовые показатели 3-дневного проростка яровой пшеницы, максимально снизив массу подземных и надземных частей проростков при ZnO – 500 г на 15,3% и 18,2% соответственно.

В целом, по всем изучаемым показателям, как для проростков яровой пшеницы, так и кукурузы, определенный токсический эффект наблюдался, начиная с концентрации наночастиц оксида цинка ZnO - 500-1000 г на гектарную норму посева семян.

ПОЛИЩУК С.Д., НАЗАРОВА А.А.

*Рязанский государственный агротехнологический университет
имени П.А. Костычева, Рязань, Россия*

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И ПРОДУКТИВНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ РАСТЕНИЙ ПОДСОЛНЕЧНИКА ПРИ ОБРАБОТКЕ СЕМЯН НАНОПОРОШКАМИ КОБАЛЬТА И СМЕСИ КОБАЛЬТА И ЖЕЛЕЗА

Современные нанотехнологии обладают огромным потенциалом и имеют большое значение для развития общества. Однако применение наноматериалов ставит ряд задач, которые относятся, прежде всего, к проблеме воздействия их на окружающую среду, животный и растительный мир, на качество сельскохозяйственной продукции. Известно, что наноматериалы, обладая малыми размерами, легче вступают в химические превращения, они способны образовывать соединения с неизвестными ранее свойствами. Появление таких наноматериалов в окружающей среде может способствовать активному поглощению загрязнителей и их широкому распространению. Особенности химического взаимодействия наночастиц с жидкой средой является одним из определяющих факторов в стимулировании развития растений.

В последние годы широко изучается воздействие порошкообразных наноразмерных металлов на различные виды живых систем: микроорганизмы, растения, животные. Биологически активные наночастицы металлов (железо, кобальт, медь и их смеси) могут стать альтернативой солям микроэлементов, используемых как микроудобрения.

Цель проведенного опыта – изучение физиологических и продуктивных показателей растений подсолнечника при обработке семян наночастицами кобальта и смеси кобальта и железа.

Опыт был заложен в полевых условиях (ООО «Агротехнология», Рязанская область). Использовались оптимальные концентрации наночастиц металлов, определенные в предыдущих исследованиях – 0,1 г на гектарную норму посева семян.

В целом, исследования показали, что предпосевная обработка семян подсолнечника наночастицами кобальта способствовала повышению полевой всхожести на 5%, росту растений в фазе молочной спелости на 4%, увеличению диаметра корзинок на 9,9%, увеличению площади листовой поверхности на 18,4%. Также увеличилась урожайность семян подсолнечника на 21,5% и масличность семян на 3,8%.

Предпосевная обработка семян подсолнечника смесью наночастиц кобальта и железа в оптимальной концентрации способствовала повышению полевой всхожести на 6%, высота растений в процессе вегетации незначительно отличалась от контроля, но увеличился диаметр корзинок (на 7,5%) и площадь листовой поверхности (на 12,3%). Урожайность семян подсолнечника превышала контроль на 15,8%, а масличность семян не отличалась от контроля.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что использование наночастиц кобальта в предпосевной обработке семян в качестве микроудобрения, стимулирует процессы роста и развития растений и имеет преимущество при использовании смеси наночастиц, в частности железа и кобальта.

ПОНОМАРЕВ А.П., ГАРАСЬКО Е.В., УРУСОВА Н.А.

Ивановская государственная медицинская академия, Иваново, Россия

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», Владимир, Россия

АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ НАНОБИОТЕХНОЛОГИЙ, СВЯЗАННЫЕ С КАЛЬЦИНИРУЮЩИМИ БИОАГЕНТАМИ

Несмотря на то что, что одним из наиболее спорных вопросов современной микробиологии является природа происхождения кальцинирующих биоагентов, а официальная медицина ставит под сомнение факт их существования, присутствие нанобактерий в крови человека и животных остается объективной реальностью. По определению О. Каяндера они являются «саморазмножающимися кальцифицирующими

макромолекулярными комплексами», а отложения фосфаткальциевых конкрементов и обызвествление сосудов, сопровождаются развитием атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний. На основании электронно-микроскопических исследований установлено, что морфология клеток крови лимфоцитов, может быть нарушена, как при естественном процессе деструкции, так и под воздействием нанобактерий.

Около 28% населения страны потребляет питьевую воду с уровнем общей минерализации от 1,6 до 10,0 г/л, что повышает риск заболевания населения сердечно-сосудистой патологией и мочекаменной болезнью. Из этого следует, что проблема чистой воды включает в свое понятие не только наличие примесей неорганической природы, но и присутствие в воде биологически активных наноструктур в форме нанобактерий, причастных к широкому диапазону заболеваний человека и животных. Данная проблема требует дополнительных исследований на предмет выявления в питьевой воде нанобактерий и их причастности к состоянию здоровья человека и животных.

Особую актуальность представляют проблемы, связанные с кальцинирующими биоагентами и дефицитом кальция в организме. В настоящее время кальций признан универсальным вторичным мессенджером, участвующим практически во всех регуляторных процессах – от мышечного сокращения и нервного проведения сигнала до передачи митогенного стимула в клетках иммунной системы. Причиной ряда заболеваний может стать как дефицит, так и избыток кальция в крови (менее 2,2 или более 2,6 ммол/л). Касаясь минерального состава клеток нанобактерий, следует отметить, что наиболее существенно в клетке представлены четыре вида катионов: Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} и K^+ . При относительном суммарном содержании Ca^{2+} и Na^+ от 60 до 70% превалирует кальций, содержание которого колеблется в пределах от 35 до 55%. Это свидетельствует о том, что нанобактерии в живом организме они являются активными потребителями кальция, влияя тем самым на кальциевый гомеостаз. Потребляя ионизированный Ca^{2+} в качестве строительного материала, нанобактерии растут и размножаются, создавая тем самым дефицит кальция в организме. Расходуя кальций не по назначению, нанобактерии способствуют возникновению и развитию заболеваний обусловленных дефицитом кальция. Естественно, с увеличением концентрации нанобактерий в крови возникают проблемы обусловленные избытком связанного кальция, что ставит нанобиотехнологическую проблему поиска путей их эрадикации.

Дискуссии среди ученых, неоднозначно воспринявших сообщение о природе выявленных наноструктур и их причастности к наиболее социально значимым заболеваниям, продолжаются до настоящего времени. Одной из составляющих неприятия в отношении новых сведений является то, что данная информация не укладывается в понимание сущности живого, так как согласно микробиологической догме – организма меньше 0,2 мкм в природе не существует. Резюмируя вышесказанное, следует заключить, что положительные решения по оздоровлению человека и животных могут быть достигнуты при следующих условиях:

- первостепенное значение имеет очистка питьевой воды от нанобактерий. Данная задача может быть успешно решена при использовании для очистки воды метода ультрафильтрации через мембраны с диаметром пор не более 15 нм, что позволяет сохранить минеральный состав воды и задержать нанобактерии с размерами от 20 нм и выше;

- поиски путей и методов снижения до минимально возможного уровня нанобактерий в крови человека и животных, как основных потребителей ионизированного кальция. Это следует из данных по минеральному составу клеток нанобактерий - в их составе большое относительное процентное содержание кальция, составляющее от 35 до 55%; кроме того, учитывая причастность нанобактерий к патогенезу целого ряда заболеваний, включая новообразования и лейкоз, возникает необходимость контроля донорской крови на присутствие нанобактерий;

- необходимо решить проблему эрадикации нанобактерий в организме в целях защиты лимфоцитов от их поражения. Это является основополагающим условием оздоровления организма, так как даст возможность лимфоцитам, являющихся центральным звеном иммунной системы, в полной мере выполнять свои защитные функции. Для эрадикации нанобактерий финские исследователи использовали препарат, представляющий собой комбинацию тетрациклина и ЭДТА, эффективность которых подтверждена в настоящем исследовании.

ПОПКОВ П.Н., ПУШКАРЁВ С.А., КУЧИН И.С.,
ДУБАСОВ А.Ю., СТАСЮК А.А., ФРАНЦЕВА А.С.

Челябинская государственная медицинская академия, Челябинск, Россия

МЕТОДОЛОГИЯ ОЦЕНКИ НООТРОПНОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТА GINKGO BILOBA

Многогранность фармакологических эффектов лекарственных растений в сочетании с низкой токсичностью расширяет список заболеваний, при которых показано применение фитоадаптогенов. Препараты на основе экстракта из листьев гинкго двулопастного (*Ginkgo biloba* L.) обладают высокой биодоступностью, проявляют выраженную нейропротекторную и ноотропную активность и могут быть использованы для профилактической и поддерживающей терапии. Экстракт листа гинкго относится к группе вентонизирующих, антиагрегатных и антигипоксических средств.

В 1994 году продукты гинкго билоба были признаны самыми популярными в Германии, а во Франции вошли в пятерку самых лучших фармацевтических препаратов. В США препараты гинкго входят в пятерку самых продаваемых препаратов. Однако анализ публикаций 2000-х годов показал, что более половины исследованных современных импортных коммерческих экстрактов было либо низкого качества, либо прямой фальсификацией продукции, что наглядно демонстрирует необходимость обязательной проверки предлагаемого сырья перед его применением в производстве БАД.

В связи с этим большой интерес представляет опыт расширения культивируемого ареала гинкго на север, в том числе в зону рискованного земледелия. Смягчение климата на Южном Урале в последнее десятилетие способствует увеличению вегетационного периода и успешной зимовке. Работы по интродукции гинкго в защищенном грунте на территории учебного ботанического сада Челябинского государственного университета ведутся с 2007 года. В этих условиях возникает необходимость оценки содержания характерных биологически активных веществ в листьях, а так же возможности использования их в качестве полноценного лекарственного сырья.

В настоящее время в лаборатории кафедры химии Челябинской государственной медицинской академии отработаны методы подготовки сухого листа и технология получения экстрактов на сертифицированном сырье от «Азбука трав» (Барнаул). В основе

технологии многократная реперколяция водно-спиртовой смесью в экстракторе Сокслета при соотношении сырье – экстрагент 1:10. Опытным путем установлено, что содержание спирта в экстрактивной смеси не должно быть ниже 78%, в противном случае образуется коллоидный раствор.

Для оценки биологического действия полученного экстракта проводилось исследование влияния полученного экстракта на поведенческий статус грызунов. В эксперименте использовалась черная мышь линии «C57\Black». Самцы этой линии острее реагируют на длительный социальный стресс (перенаселение) – у них сильнее активизируется при этом гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система, один из главных компонентов стресс-реакции. Низкорезактивные самки лучше переносят эмоциональный стресс, однако хуже противостоят стрессовым факторам физической природы. Разовая доза вводимого перорально экстракта составила 20 мкл при 30% содержании спирта, процедура введения повторялась 4 раза через день. Для уменьшения субъективности фиксации поведенческих реакций был использован компьютеризованный видео-комплекс. Были отобраны тесты «Вынужденное плавание», а так же «Подвешивание за хвост». С целью гуманизации метода подвешивание животных производилось посредством укрепления в зажиме пластыря, наклеенного на хвост животного, а не самого хвоста. Для изучения поведения грызунов в условиях переменной стрессогенности мы считаем необходимым тест «Приподнятый крестообразный лабиринт», позволяющий оценить уровень тревожности животного. Для оценки тревожности и исследовательской активности был использован тест «Открытое поле». Предварительные исследования показали, что предпочтительным является использование круглой установки, которая исключает реакцию затаивания в углу. Как наиболее простой и информативный из возможных методов оценки обучаемости животных был выбран анализ поведения в Т-образном лабиринте в тесте «подкрепляемого чередования».

Подтверждена антидепрессантная и психостимулирующая активность исследуемого экстракта, выраженная в уменьшении тревожности и повышении обучаемости. Действие экстракта в зависимости от половой принадлежности и возраста уточняется.

ПОПОВ А.А.

РЭУ им. Г.В.Плеханова, Москва, Россия

БИОРАЗЛАГАЕМЫЕ ПОЛИМЕРНЫЕ МАТЕРИАЛЫ. ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

В работе приведена классификация биоразлагаемых полимерных материалов и рассмотрены перспективы развития их производства для нужд народного хозяйства с точки зрения решения экологических проблем, касающихся загрязнения окружающей среды. Кроме того даётся сравнительная оценка эффективности процесса биоразложения смесевых полимерных композиций, полученных на основе полиолефинов и различных природных полимеров и добавок. Работа выполнена на кафедре химии и физики РЭУ им. Г.В. Плеханова совместно с ИБХФ РАН.

ПОПОВ А.Л.^{1,2}

*¹ФГУБН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
Пушино, Россия*

²Пушчинский государственный естественно - научный университет, Пушино, Россия

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ЦЕРИЯ, СИНТЕЗИРОВАННЫХ В ОБОЛОЧКЕ ЦИТРАТНЫХ ИОНОВ, НА КУЛЬТУРЕ ПЕРВИЧНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ МЫШИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЙ АРГОНОВОЙ ПЛАЗМЫ

Использование наноматериалов в области здравоохранения, показали наличие огромного положительного экономического потенциала в этой области. Несомненно, что одной из важнейших возможностей нанотехнологий является развитие новых эффективных способов лечения пациентов с различными заболеваниями. Их использование может также значительно расширить ограниченные на сегодняшний день возможности молекулярной диагностики. Особенности свойств частиц в ультрадисперсном состоянии открывают широкие перспективы для создания новых эффективных лекарственных препаратов. Совокупность размерных особенностей

диоксида церия определяет уникальность его свойств в наноразмерном состоянии. Ранее показано, что наночастицы CeO_2 способны непосредственно связывать ROS, что обусловлено кислородной нестехиометрией нанокристаллов. Диоксид церия проявляет уникальную зависимость окислительно-восстановительных свойств от размеров частиц именно в диапазоне 1-100 нм.

В качестве модельного объекта для исследования были использованы первичные фибробласты мыши, выделенные из эмбрионов мыши (линия SHK) на 14 день беременности по стандартной методике. Диапазон исследованных концентраций наночастиц CeO_2 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9} М. Перед внесением в культуру клеток оценивался гидродинамический радиус наночастиц на приборе Beckman Coulter Nanosizer N5, который составил 5-7 нм. Клетки высевались в 4 луночные планшеты в плотности 25 тыс/см². После 6 часов культивирования среда заменялась на среду, содержащую наночастицы. Затем проводилось облучение НТАП в течение 5 минут.

Через 24 часа оценивали жизнеспособность с использованием МТТ-теста и окраской флуоресцентными красителями- SYTO 9, иодид пропидия, Хехст 33342. Проведенный анализ показал, что концентрации 10^{-5} М максимально защищает клетки при воздействии НТАП. Использование высоких концентрации наночастиц, по-видимому, максимально сильно защищает клетки при модуляции такого рода окислительного стресса. Окраска пропидий йодидом выявила минимальную гибель клеток в концентрации 10^{-5} М. В лунках, содержащих наночастицы CeO_2 в концентрациях от 10^{-7} до 10^{-9} жизнеспособность по данным МТТ- теста была выше 20 % относительно контроля. Также, при окраске клеток красителем Хехст 33342 во всем диапазоне не наблюдалось повреждения ядерного аппарата и его деструкция. Это показывает полное отсутствие генотоксического эффекта наночастиц диоксида церия в широком диапазоне концентраций и его протекторный эффект при воздействии НТАП.

ПОПОВА А.А., ЛИПАСОВА В.А., ХМЕЛЬ И.А., КОКШАРОВА О.А.

Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

БИОЛОГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ЛЕТУЧИХ ВЕЩЕСТВ ПОЧВЕННЫХ БАКТЕРИЙ

Бактерии способны синтезировать летучие органические соединения (ЛОС), которые могут подавлять рост других микроорганизмов. Предполагается, что летучие вещества бактерий могут играть существенную роль в антагонистических отношениях бактерий с другими микроорганизмами, занимающими те же экологические ниши. Кроме того, летучие вещества, образуемые бактериями, могут стимулировать рост растений, и продукция этих веществ может быть важной для защиты растений ассоциированными с ними бактериями от фитопатогенных микроорганизмов.

Нами было проведено исследование действия ЛОС бактерий *Pseudomonas* и *Serratia* и их мутантов на фитопатогенные бактерии, фитопатогенные грибы, цианобактерии *Synechococcus* sp. PCC 7942 и *Anabaena* sp. PCC 7120. Было определено, что летучие вещества бактерий *Pseudomonas* и *Serratia* подавляют рост фитопатогенных бактерий и грибов, высоко чувствительны к ним оказались также цианобактерии. Изучено влияние мутаций в ряде бактериальных генов, кодирующих глобальные регуляторы генной экспрессии, на синтез ЛОС.

Для штамма *P. chlororaphis* 449 и ряда штаммов бактерий рода *Serratia* были определены компоненты смеси летучих веществ с помощью масс-спектрометрического анализа. Было выяснено, что в наибольшем количестве синтезируется вещество диметилдисульфид (ДМДС), а также ряд кетонов и алкенов. Было проанализировано действие индивидуальных ЛОС, синтезируемых продуцентами, а именно действие веществ: нонанона-2, гептанона-2, ундецена-1, ундеканона-2 и ДМДС.

При действии на *Agrobacterium* ДМДС, гептанон и нонанон сильно подавляют рост бактерий, причем в случае ДМДС воздействие бактериостатическое, а в случае кетонов – бактерицидное. Действие ундеканона-2 и ундецена-1 незначительно влияет на рост бактериальной культуры. Наиболее значительное ингибирование роста грибов *Rhizoctonia solani* наблюдалось при воздействии кетонов – нонанона-2 и гептанона-2, а также в значительной мере – ундеканона-2.

ПРАЗДНОВА Е.В.¹, ЧИСТЯКОВ В.А.^{1,2}, ГУТНИКОВА Л.В.¹,

САЗЫКИНА М.А.¹, САЗЫКИН И.С.¹

¹НИИ биологии Южного федерального университета, Ростов-на-Дону, Россия

²Центральная научно-исследовательская лаборатория Ростовского государственного
медицинского университета, Ростов-на-Дону, Россия

СУПЕРОКСИДУСТРАНЯЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНОГО ПЛАСТОХИНОНА – 10-(6'-ПЛАСТОХИНОНИЛ) ДЕЦИЛТРИФЕНИЛ ФОСФОНИЯ (SkQ1)

Липофильный катион (6'-пластохинонил)децилтрифенилфосфоний (SkQ1) является самым эффективным на сегодняшний день геропротектором. В основе этой активности лежит способность SkQ1 снижать интенсивность патологических процессов, связанных с генерацией активных форм кислорода. Биохимические механизмы, лежащие в основе антиоксидантной активности этого вещества, изучены далеко не полностью. В частности, данные по способности SkQ1 «перехватывать» супероксид-анион радикал ($O_2^{\cdot-}$) в достаточной степени фрагментарны. Между тем $O_2^{\cdot-}$ является первичным свободнорадикальным продуктом, генерируемым при работе дыхательной цепи. Именно его образование делает митохондрии «грязным местом клетки» и запускает процессы, ведущие к фенотипу. Целью данной работы было исследование способности SkQ1 «перехватывать» $O_2^{\cdot-}$.

Супероксидустраниющую активность SkQ1 определяли *invitro* при помощи стандартной тест-системы SOD determination kit (Sigma), и *invivo* по снижению индукции Sox-оперона *E. coli*, вызванной обработкой бактерий чистым кислородом при 0,3 МПа. Объектом исследования был генноинженерный штамм *E. coli* MG1655(pSoxS-lux), предоставленный И.В. Мануховым (ГосНИИ Генетика, Москва). Клетки данного штамма (lux-биосенсора) сигнализируют об индукции Sox-оперона усилением свечения.

Было установлено, что *invitro* SkQ1 в концентрациях 10^{-4} и 10^{-5} М проявляет супероксид-устраняющую активность (0,29 и 0,46 усл.ед соответственно).

Обработка бактерий кислородом под давлением вызывает сильную индукцию Sox-оперона, что считается следствием роста внутриклеточного уровня супероксид-анион радикала. Было показано, что введение SkQ1 в концентрации 10^{-5} существенно (в среднем

на 61,3 %) снижает Sox-индукцию. Статистически значимые эффекты отмечаются и для меньших концентраций, вплоть до 10^{-14} М. Следует отметить, что минимальная действующая концентрация аскорбата в той же системе -10^{-11} М. Максимальный протекторный эффект, достигаемый при помощи SkQ1, составляет 61,26%, а при помощи аскорбата—30,19 %. Супероксидустраняющая активность SkQ1 проявляется *invitro* в концентрациях на 9 порядков меньше, чем *invivo*. По-видимому, это связано, с одной стороны, с накоплением вещества в клетках бактерий за счет подробно описанного электрохимического механизма, и, с другой стороны, за счет формирования циклов окисления/восстановления, сопряженных с ферментами дыхательной цепи, в результате чего баланс окисленной и восстановленной форм остается постоянным без жесткой зависимости от концентрации.

Таким образом, было показано, что (6'-пластохинонил)децилтрифенилфосфония (SkQ1) обладает способностью перехватывать супероксид-анион радикал. Данная способность проявляется как *invitro*, так и *invivo* в опытах на аэробных бактериях. Аналогичные процессы идут, по-видимому, и в митохондриях. Косвенно об этом свидетельствуют многочисленные данные по снижению SkQ1 генерации митохондриями перекиси водорода, которая является в основном продуктом дисмутации супероксидных радикалов. Модель бактерии/ГБО может быть перспективной для экспресс-скрининга новых антиоксидантов группы липофильных катионов.

Авторы выражают искреннюю благодарность В.П. Скулачеву за помощь в организации исследований и интерпретации результатов экспериментов.

Работа выполнена при финансовой поддержке НИИ митоинженерии МГУ.

ПРОНКИН П.Г., ТАТИКОЛОВ А.С.

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

ОКСАКАРБОЦИАНИНОВЫЕ КРАСИТЕЛИ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ СПЕКТРАЛЬНО – ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ЗОНДЫ ДЛЯ ДНК

Благодаря зависимости фотофизических и фотохимических свойств от молекулярного окружения и способности к комплексообразованию с ДНК и белками

цианиновые красители широко используются в качестве молекулярных зондов в биомедицинской практике.

В настоящей работе приводятся результаты подробного исследования нековалентного взаимодействия ДНК и ряда оксакарбоцианиновых красителей, имеющих заместители (CH_3 - и C_2H_5 -группы) в *мезо*-положении полиметиновой цепи.

Уникальные свойства цианиновых красителей определяются наличием сопряженной полиметиновой цепочки, которая является важнейшей составной частью молекулярной структуры этих соединений.

Комплексообразование оксакарбоцианиновых красителей с ДНК сопровождается резким изменением их фотофизических свойств, что определяет возможность их использования в качестве зондов. В спектрах поглощения при низких концентрациях ДНК ($\sim 5.0 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-5}$ моль л^{-1}), наблюдается заметное падение наблюдаемого коэффициента экстинкции красителей и уширение полосы, дальнейшее увеличение концентрации биополимера приводит к длинноволновому сдвигу и некоторому росту интенсивности полосы поглощения. Взаимодействие с ДНК сопровождается батохромным смещением максимумов полос в спектрах флуоресценции красителей ($\sim 7 - 10$ нм). Связывание с ДНК также приводит к значительному росту флуоресценции: при $c_{\text{ДНК}} = 2.5 \times 10^{-4}$ моль л^{-1} интенсивность флуоресценции оксокарбоцианинов, имеющих в *мезо*-положении C_2H_5 -группы, возрастает в 27 – 55 раз (в отсутствие ДНК красители флуоресцируют крайне слабо). По данным флуоресценции были определены эффективные значения констант равновесия реакций комплексообразования краситель-ДНК: для замещенных оксокарбоцианинов они находятся в пределах $2.0 - 4.2 \times 10^4$ л моль $^{-1}$.

Изменения спектрально-флуоресцентных свойств оксакарбоцианинов, наблюдаемые при комплексообразовании с ДНК, ранее объяснялись с позиций сольватационного влияния ДНК и увеличением жесткости структуры лиганда (рост квантового выхода флуоресценции за счет пространственной фиксации красителя на ДНК). Однако при взаимодействии с ДНК может также происходить сдвиг изомерного равновесия (*цис-транс*), что должно вносить вклад в изменения спектрально-флуоресцентных свойств красителей.

За счет вращения частей молекулы относительно связей полиметиновой цепи цианиновые красители способны образовывать изомерные формы. Для незамещенных

соединений в растворах более выгодным с энергетической точки зрения является полностью *транс*-(ЕЕЕЕ)-изомер. В случае *мезо*-замещенных красителей стерическое влияние заместителей приводит к наличию в растворах красителей *транс*- и *цис*-изомеров, находящихся в равновесии, зависящем от полярности среды. В спектрах наблюдаются две полосы: длинноволновая соответствует *транс*-, а коротковолновая – *цис*-изомеру. Известно, что для *цис*-изомеров характерна крайне слабая флуоресценция по сравнению с *транс*-изомерами, рост флуоресценции оксакарбоциновых красителей в присутствии ДНК можно объяснить частичным переходом красителей из *цис*-формы, в которой они находятся в растворе, в *транс*-изомер, связанный с ДНК.

Обработка спектров красителей с применением метода моментов, выполненная в настоящей работе, позволяет сделать вывод о том, что у замещенных оксокарбоцианинов в присутствии ДНК наблюдается сдвиг изомерного *цис-транс*-равновесия в сторону образования *транс*-изомера, что во многом определяет наблюдаемый при комплексообразовании оксакарбоцианиновых красителей спектральные эффекты. Резкий рост флуоресценции (благодаря связыванию *транс*-изомера) в комплексе с ДНК является благоприятным фактором для использования оксакарбоцианиновых красителей в качестве зондов для определения ДНК.

Авторы выражают благодарность проф. Б.И. Шапиро (НЦ НИИХИМФОТОПРОЕКТ) за предоставление красителей.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 10-03-00647а).

ПРУДНИКОВ П.С.

ГНУ ВНИИ селекции плодовых культур, Орел, Россия

ИДЕНТИФИКАЦИЯ УСТОЙЧИВОСТИ ГЕНОТИПОВ ЯБЛОНИ К МОНИЛИОЗУ НА ОСНОВЕ ИСКУССТВЕННОГО ЗАРАЖЕНИЯ И ФИЗИОЛОГО- БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ

Для идентификации устойчивых к монилиозу генотипов яблони была предпринята попытка сравнительного анализа физиолого-биохимических реакций в ответ на заражение

M. fructigena контрастных по устойчивости сортов яблони. Искусственному заражению патогеном подвергались плоды сортов Орловское полосатое (восприимчивый к монилиозу) и Синап орловский (устойчивый). Анализ проводили на плодах снятых и подвешенных на ветви в кроны деревьев, а также на плодах функционально связанных с деревом. Инъекции конидиальной суспензией *M. Fructigena* выполняли одноразовым шприцом на глубину 1...3 мм до появления на поверхности плода, удерживающейся капли жидкости.

Чистую конидиальную взвесь получали капельным смывом с поверхности спороносящего монилиозного яблока, снятого из кроны накануне или в день искусственного заражения. Концентрация спор для инокуляции составляла 40...50 конидий в поле зрения светового микроскопа при увеличении 80х. Контролем в опытах служили инъекции дистиллированной водой.

Количество малонового диальдегида (МДА) – конечного продукта перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по реакции взаимодействия с тиобарбитуровой кислотой; гидроперекисей (промежуточных продуктов ПОЛ) – по цветной реакции с роданидом аммония.

В результате инъекций суспензией спор, на плодах функционально связанных с деревом, у обоих сортов вокруг точки укола образовывались красные ореолы, чего не наблюдалось в контроле. В кронах Синапа орловского у 30% инокулированных плодов через 3 суток наблюдался сухой некроз диаметром 3 мм без дальнейшего развития некротического пятна или патогена. У Орловского полосатого также наблюдалась некротизация тканей яблок (20% из общего числа зараженных) в кроне, но пятна проявлялись через 6 суток и имели размер в диаметре 10...18 мм. Спороношение патогенна, наблюдалось в редких случаях. Напротив, у снятых плодов, и подвешенных в крону дерева, заражение монилиозом произошло более успешно, о чем свидетельствовало массовое спороношение *M. Fructigena* на поверхности яблок. Срез зараженных плодов через точку инъекции выявил, что патоген распространялся радиально по околоплоднику, гниль достигала сердечка у обоих сортов. В контроле после укола водой наступало быстрое рубцевание травмы плода.

Для определения содержания в тканях околоплодника малонового диальдегида и гидроперекисей – одних из основных показателей окислительного стресса, было отобрано по 3 плода в каждом варианте через 24 и 48 часов после инъекции.

Данные анализа показывают повышение интенсивности перекисного окисления липидов в ответ на инфицирование растущих и снятых плодов конидиями *M. fructigena*. В течение первых суток, при сохранении связи плода с деревом, у восприимчивого к инфекции сорта Орловского полосатого накопление МДА шло более резко (40% против контроля), чем у устойчивого – Синапа орловского (11%). Отделенные и оставленные в кроне дерева плоды Орловского полосатого повысили содержание МДА на 17%, а Синапа орловского – на 25%.

Через двое суток в яблоках обоих сортов, функционально связанных с кроной, содержание МДА снизилось практически до уровня показателей контроля. Вместе с тем уровень малонового диальдегида оставался повышенным в плодах, отделенных от дерева на 10% в съеме Орловского полосатого и на 6% - в съеме Синапа орловского. Определение содержания в анализируемых плодах гидроперекисей как промежуточных продуктов ПОЛ показал аналогичную МДА зависимость возрастания количества.

Таким образом, приведенные результаты искусственного заражения монилиозной плодовой гнилью и физиолого-биохимических показателей яблок подтверждают литературные данные о том, что определенные уровни сортовой устойчивости проявляются при функциональном контакте плода с деревом, а съемные плоды представляют собой питательный субстрат для проникшего в них патогена. Определение содержания продуктов ПОЛ может быть одним из возможных методов идентификации устойчивых к монилиозу генотипов яблони.

ПРУДНИКОВА Е.Г.¹, ПРУДНИКОВ П.С.²

¹ФГБОУ ВПО «Орловский государственный аграрный университет», Орел, Россия

²ГНУ ВНИИ селекции плодовых культур, Орел, Россия

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ ФИТОГОРМОНОВ НА ПРОДУКТИВНОСТЬ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР

Известно, что продуктивность сортов сельскохозяйственных культур зависит, с одной стороны, от экспрессии генома растений, с другой – от условий произрастания. Сорты различаются не только по устойчивости к стрессовым воздействиям, реакции на уровень питания, но и по содержанию фитогормонов, чувствительности к экзогенным регуляторам. Экзогенные регуляторы роста влияют на физиологические процессы не прямо, а опосредованно, через гормональную систему, изменяя концентрацию отдельных гормонов и их соотношение.

Гормон – это химический сигнал, на который живая система может ответить по-разному в зависимости от ее состояния и интенсивности сигнала. Так ауксином свойственна важная регуляторная роль в разнообразных ростовых и формообразовательных процессах. Показана положительная корреляция между содержанием индолилуксусной кислоты (ИУК) в колосе пшеницы и накоплением в нем сухого вещества.

В литературе имеются данные о том, что образование ауксина в растении стимулируют цитокинины. Цитокинины – полифункциональные гормоны, оказывающие влияние на самые разнообразные физиологические процессы, протекающие в растениях. Многие исследователи отмечают повышение устойчивости растений при экзогенной обработке цитокининами.

Обработка семян кукурузы синтетическим цитокинином – 6-бензиламинопурином (6-БАП) ($10^{-4}\%$) повышала урожайность зеленой массы и початков. Растения ячменя, обработанные 6-БАП, отличались повышением озерненности колосьев и зерновой продуктивностью.

В отличие от цитокининов и ауксинов обработка абсцизовой кислотой (АБК) уменьшает сырую массу проростков многих злаков приблизительно на 23-27%. Сухая масса или уменьшается, или остается на уровне контрольного варианта. Это происходит на

фоне повышения эндогенной АБК в проростках. В опытах с ячменем при однократном воздействии АБК на флаговый лист показано увеличение сухой массы зерен. Отмечены многочисленные данные об ингибирующей функции АБК на рост стебля и побегов растений. Прежде всего, необходимо отметить ингибирование роста в высоту стеблей гороха, ячменя, побегов сосны, плюща, проростков кукурузы, овса.

Известно, что продукционный процесс растений является интегральным показателем напряженности физиолого-биохимических процессов и в частности белково-углеводного обмена. Важное место в регуляции последнего занимают фитогормоны. Вместе с тем, действие гормонов высокоспецифично и поэтому процессы белково-углеводного обмена можно контролировать путем применения синтетических регуляторов роста – аналогов фитогормонов.

Результаты твердофазного иммуноферментного анализа показали, что сорта озимой пшеницы Московская 39, Мироновская 808, Труженица существенно различаются по содержанию эндогенных фитогормонов (ИУК, зеатин, АБК).

В результате проведенных исследований на продуктивность и качество семян пшеницы выявлено, что содержание белка под влиянием обработки ИУК имеет тенденцию к уменьшению у всех исследованных сортов на 0,2-1,2% (в пределах ошибки опыта) на фоне повышения содержания углеводов. Наибольший эффект в снижении крахмала, АБК и кинетин вызвали в сорте пшеницы Мироновская 808.

При обработке ИУК и кинетином у сорта яровой пшеницы Крестьянка - произошло увеличение количества колосков в колосе, урожайности; у сорта озимой пшеницы Московская 39 - числа зерен в колосе, количества колосков в колосе; у сортов озимой пшеницы Мироновская 808 и Труженица - урожайности, массы зерна с 1 колоса. На показатель массы 1000 зерен у всех сортов наибольшее действие оказал ауксин.

Таким образом, на фоне изменения фитогормонального статуса растений в результате обработки экзогенными гормонами, отмечено изменение белково-углеводного обмена и усиление продукционного процесса.

ПРЯДЕХИНА Е.В., ЛАПШИН П.В., ЮРЬЕВА Н.О., ЗАГОСКИНА Н.В.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия

РАСТЕНИЯ КАРТОФЕЛЯ, ТРАНСФОРМИРОВАННЫЕ ГЕНОМ $\Delta 12$ -АЦИЛ-ЛИПИДНОЙ ДЕСАТУРАЗЫ ЦИАНОБАКТЕРИИ *SYNECHOCYSTIS SP*

Одной из важнейших задач сельскохозяйственного производства является создание новых сортов, обладающих повышенной продуктивностью и устойчивостью к стрессовым воздействиям. К числу перспективных культур производственного назначения относится картофель – один из главных компонентов пищевого рациона человека. В то же время ежегодно мировые потери его урожая составляют свыше 20-25% валового сбора, что является следствием засорения полей сорняками, действием патогенов и других стрессовых факторов, в том числе и низких температур. Все это свидетельствует о необходимости разработки новых технологий для повышения эффективности производства этой культуры. К их числу можно отнести методы биотехнологии, позволяющие не только сохранять редкие и исчезающие виды растений в условиях *in vitro*, но и получать новые – в том числе и за счет генно-инженерных разработок. И в этом плане большой интерес могут представлять коллекции трансгенных культур, в том числе и сельскохозяйственного назначения. К ним с успехом можно отнести и картофель, а также полученные из него разнообразные трансгенные линии, коллекция которых успешно поддерживается в отделе биотехнологии Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Следует также отметить, что трансгенные формы картофеля используются не только для проведения научных исследований, но и проходят испытания во Всероссийском научно-исследовательском институте картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха (г. Коренево, Московская область).

Важным аспектом при создании трансгенных растений является необходимость изучения их физиолого-биохимических характеристик и сравнение с таковыми контрольных растений. Целью нашего исследования являлось изучение физиолого-биохимических характеристик растений картофеля и полученных из них линий с различным уровнем экспрессии гена $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы из цианобактерии *Synechocystis sp.*(*desA*).

Растения картофеля (*Solanum tuberosum* L.) раннеспелого сорта Скороплодный, а также полученные из него трансгенной линии, несущее ген *desA*, культивировали в условиях *in vitro* на агаризованной питательной среде Мурасиге-Скуга, содержащей 2% сахарозы и витамины, при 23°C и 16-часовом фотопериоде. Последовательность введенного в них гена десатуразы была трансляционно слита с последовательностью репортерного гена *lucVM3*, кодирующего термостабильную лихеназу. У 35-дневных растений измеряли высоту, число междоузлий, а также определяли содержание фотосинтетических пигментов (хлорофилла *a* и *b*) в листьях.

Установили, что трансгенные растения картофеля имели лучшие фенотипические характеристики (рост, число междоузлий, площадь листьев) и более высокое содержание фотосинтетических пигментов, по сравнению с контрольными растениями. Для них характерен также более быстрый переход к завершающим этапам онтогенеза, проявляющимся в клубнеобразовании. Все это свидетельствует о том, что трансформация растений картофеля геном *desA* приводит к изменениям их физиолого-биохимических характеристик.

ПУТИНЦЕВА О.В.¹, АРТЮХОВ В.Г.¹, ВДОВИНА В.А.², ЯНЦ М.А.¹

¹Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

²Воронежская медицинская академия им. Н.Н. Бурденко, Воронеж, Россия

ВЛИЯНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО α_{2b} -ИНТЕРФЕРОНА НА ЭКСПРЕССИЮ CD21 МОЛЕКУЛЯРНОГО КОМПОНЕНТА В-КЛЕТОЧНОГО РЕЦЕПТОРА ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

В современной медицине для лечения больных с различной патологией эффективно применяется терапия генно-инженерными препаратами α -интерферона, в частности рекомбинантным α_{2b} -интерфероном. Данный цитокин вносит определенный вклад в формирование первичной противовирусной защиты и последующее развитие специфического иммунного ответа. Реализацию гуморального звена иммунного ответа осуществляют В-лимфоциты, важнейшим структурным элементом их мембран является антигенраспознающий В-клеточный рецептор (BCR), в состав которого входят такие

молекулярные компоненты, как CD19, CD20 и CD21. Нами было выявлено активирующее действие некоторых концентраций α_{2b} -интерферона на В-лимфоциты, сопровождающееся повышением экспрессии CD19 и CD20 молекул (В.Г. Артюхов и др., 2010). Данная работа является продолжением ранее проведенных исследований и в ней анализируется влияние рекомбинантного α_{2b} -интерферона на уровень экспрессии CD21 рецепторов, участвующих в процессах распознавания чужеродных антигенов и внутриклеточного проведения сигнала от BCR.

Объектами исследования служили В-лимфоциты, выделенные из периферической крови доноров методом седиментации в градиенте плотности фиколл-урографин (Д.Кэтти, 1991). Суспензию В-клеток получали по методу Р. Terasaki, используя заполненные синтетической нейлоновой ватой колонки (Ю.М. Зарецкая, 1983). Модификацию суспензий В-лимфоцитов осуществляли препаратом рекомбинантного α_{2b} -интерферона (НПП «Фармаклон») в концентрациях 0,01; 0,1; 1; 10 и 100 МЕ/мл. Нативные и интерферонмодифицированные лимфоциты инкубировали в среде RPMI 1640 в течение 24 ч при 37 °С. Для определения уровня экспрессии CD21 антигенов на поверхности мембран нативных и модифицированных В-лимфоцитов применяли непрямой твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) с использованием моноклональных антител LT21 и конъюгата козьих антител против IgG, меченных пероксидазой хрена (ООО «Сорбент», Москва). В качестве субстрата использовали раствор 3,3',5,5' тетраметилбензидина в 0,15 моль/л цитратно-ацетатном буфере, рН 5,0. Результаты экспериментов регистрировали спектрофотометрически при длине волны 450 нм на вертикальном фотометре «Униплан» (Пикон, Россия) и выражали в единицах оптической плотности (опт. ед.). Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета прикладных программ «STATISTICA 6.0». Достоверность различий контрольных и опытных значений сравниваемых показателей определяли по t-критерию Стьюдента.

Уровень экспрессии CD21 маркеров на поверхности мембран нативных В-лимфоцитов в среднем составил $0,176 \pm 0,008$ опт. ед. После инкубации В-клеток с α_{2b} -интерфероном в малой концентрации (0,01 МЕ/мл) не было выявлено статистически достоверных отличий от нативных образцов. Добавление α_{2b} -интерферона к В-лимфоцитам в концентрациях 0,1; 1; 10 и 100 МЕ/мл индуцировало увеличение уровня

экспрессии исследуемого показателя по сравнению с контролем на 12, 27, 44 и 39 % соответственно.

Таким образом, было выявлено, что рекомбинантный α_{2b} -интерферон в концентрациях 0,1÷100 МЕ/мл оказывает иммуностимулирующий эффект на экспрессию CD21 рецепторов В-клетками крови человека.

Известно, что молекулы CD21, являясь корецепторной субъединицей BCR, одновременно служат и рецептором для комплемента (CR 2), способным связывать фрагменты С3-компонента (iC3b, С3d). Связывание активных субфрагментов комплемента со специфическими клеточными рецепторами приводит к локальной модуляции физиологических процессов, координации функциональной активности и кооперации иммунцитов, что направлено на поддержание местного гомеостаза. В связи с этим, повышение уровня экспрессии данного маркера на поверхности мембран В-клеток под влиянием рекомбинантного α_{2b} -интерферона (0,1÷100 МЕ/мл) будет способствовать не только усилению антигенраспознающей и сигнальной функций BCR, но и более активному участию В-лимфоцитов в иммунном ответе за счет контакта с каскадными иммунными реакциями врожденного иммунитета.

ПУЧКОВА Л.И., АФОНИНА В.С., АНДРЕЕВА И.С.

Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «ВЕКТОР», пос. Кольцово, Россия

ПОИСК БАКТЕРИЙ - ПРОДУЦЕНТОВ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ НУКЛЕАЗ

По данным ВОЗ, смертность от инфекций продолжает занимать лидирующее место на земном шаре и фактически инфекционные болезни уносят жизни около 15 миллионов человек ежегодно. Вторая половина XX и начало XXI столетия характеризуются увеличением частоты заболеваний, вызываемых вирусами, а также выявлением вирусной природы болезней неясной ранее этиологии и открытием новых вирусов, которые могут мутировать с высокой частотой. В связи с этим вопрос о необходимости разработки и поиска новых средств защиты от вирусной инфекции, включающих как профилактические, так и лечебные препараты, представляется крайне важным и актуальным.

В литературе обсуждается возможная роль неспецифических нуклеаз бактерий в защите клеток от проникновения чужеродной генетической информации, в частности вирусных нуклеиновых кислот, а результаты проведенных целым рядом авторов испытаний противовирусных свойств нуклеаз показывают, что эти ферменты могут стать одним из достаточно эффективных средств для профилактики и лечения различных вирусных заболеваний. Одним из источников этих ферментов являются почвенные бактерии. Микроорганизмы различных таксономических групп могут образовывать эндонуклеазы и экстрагировать их в окружающую среду. Сегодня нуклеазы официально признаны эффективными противовирусными средствами и широко используются для лечения целого ряда тяжелых заболеваний человека и животных (<http://www.nsc.ru/win/sbras/dates/salganik.html>).

Во ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» создана и постоянно пополняется коллекция микроорганизмов, выделенных из природных источников различных регионов России, многие из них являются продуцентами биологически активных веществ, антагонистами патогенных микроорганизмов. В их числе в коллекции широко представлены штаммы *Bacillus thuringiensis* 23-х типовых подвидов, таких как *B. thuringiensis* ssp. *thuringiensis*, *kurstaki*, *galleriae*, *israelensis*, *yunnanensis* и других, а также атипичные штаммы *Bt*, свойства которых не позволяют отнести их к какому-либо, ранее известному подвиду. В предварительных исследованиях коллекционных штаммов *Bt* выявлены штаммы, содержащие ферменты, гидролизующие РНК, обладающие противовирусными свойствами.

Целью данной работы явился поиск новых штаммов - продуцентов неспецифических нуклеаз для дальнейшего их использования в качестве противовирусных агентов, а также отработка новых методов поиска микроорганизмов - продуцентов РНК-аз и ДНК-аз.

Для скрининга нуклеазной активности разработана методика гидролиза ферментами микроорганизмов ДНК различных бактериофагов и клеточных РНК.

Первоначально ДНК-азную активность определяли на плотной среде с тимусной ДНК и толуидиновым синим. Положительную реакцию определяли по появлению ярко-розовой зоны вокруг бактериальной колонии. Затем штаммы, обладающие нуклеазной активностью, выращивали в L-бульоне. Нарботанные бульонные культуры

центрифугировали, биомассы разрушали лизоцимом или ультразвуком. Для исследования использовали как клеточные экстракты изучаемых бактерий (КЭ), так и культуральные жидкости (КЖ), освобожденные от бактериальных клеток центрифугированием и ультрафильтрацией. В работе использовано около двухсот, предварительно отобранных, штаммов. Нуклеазную активность КЭ и КЖ определяли в различных реакционных средах, содержащих в качестве субстрата фаговые (T7, λ) или плазмидные (pUC19) ДНК. Результат определяли по электрофоретической картине гидролиза ДНК в 1%-ном агарозном геле.

Для сравнения проводили анализ РНКазной и ДНКазной активности общепринятыми спектрофотометрическими методами по кислоторастворимой фракции, в которых использовали дрожжевую РНК и ДНК из молок лосося в качестве субстрата. Полученные данные показали, что оба метода могут быть использованы для поиска ферментов. Электрофоретический метод анализа дает широкие возможности для поиска новых высокоактивных ферментов, вызывающих неспецифический гидролиз нуклеиновых кислот РНК-аз и ДНК-аз одновременно, без выделения этих ферментов.

В результате скрининга КЭ и КЖ отобрано несколько перспективных штаммов, обладающих высокоактивной РНК-азной и ДНК-азной активностью для изучения их противовирусного эффекта.

ПУШКАРЁВ С.А., ПОПКОВ П.Н., ДУБАСОВ А.Ю., СТАСЮК А.А.,
ФРАНЦЕВА А.С., ЧЕРНОВА И.Г. РЯБИНИН В.Е.

Челябинская государственная медицинская академия, Челябинск, Россия

О ПОЛУЧЕНИИ КУЛЬТУРЫ ГЕПАТОЦИТОВ, ПРИГОДНОЙ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В СИСТЕМЕ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОЙ ДЕТОКСИКАЦИИ КРОВИ «БИОИСКУССТВЕННАЯ ПЕЧЕНЬ»

В последние два десятилетия благодаря прогрессу биотехнологии, молекулярной и клеточной биологии мощное развитие получили клеточная и тканевая инженерия. Одним из важнейших направлений развития этих отраслей является использование живых клеток

и биологически активных веществ в составе терапевтических устройств, замещающих дефектные органы и ткани.

Особенно большое значение имеет разработка систем искусственного жизнеобеспечения, использующих зрелые, фетальные или стволовые клетки, таких как аппарат «Биоискусственная печень». Внедрение в клиническую практику подобных систем, позволило бы сохранить жизнь пациентов, ожидающих донорскую печень, а в ряде случаев полностью устранить потребность в трансплантации (Рябинин В.Е. и др., 2003). Однако на пути широкого клинического использования этих систем имеется ряд нерешённых проблем, связанных с вопросами сохранения функциональной активности биологического материала в процессе хранения, возможности его доставки к месту лечения, определения оптимальных режимов культивирования клеток.

Перспективной разработкой является система экстракорпоральной детоксикации крови, созданная в Челябинской Государственной Медицинской Академии под руководством профессора В.Е. Рябина. В экспериментальных исследованиях было показано, что использование способа очистки крови от токсинов с использованием цитозоля печени свиней, приводит к снижению уровня эндотоксемии и нормализации обменных процессов (Рябинин В.Е. и др., 2003; Грбовой С.И. и др., 2003; Полевщикова Е.Е. и др., 2004).

Следующим шагом в исследованиях, направленных на усовершенствование аппарата «Биоискусственная печень», является разработка системы детоксикации, использующей живые функционально активные клетки печени. В соответствии с поставленной целью, настоящее время в нашей лаборатории ведётся работа по усовершенствованию методов выделения, идентификации, культивирования и хранения клеток печени животных.

В рамках данной работы нами была освоена техника выделения гепатоцитов крысы путём двухэтапной перфузии печени по методу Сеглена (Seglen et al., 1976) с некоторыми модификациями, направленными на упрощение и удешевление данной методики. На первом этапе перфузии использовался стерильный физиологический раствор (0,9 % р-р NaCl), содержащий 2 М HEPES-буфера, 0,25 % ЭДТА, а так же раствор пенициллина/стрептомицина (50 ед./мл). На втором этапе перфузии использовался стерильный раствор Рингера, содержащий 0,01 % коллагеназы III, 2 М HEPES-буфера, а

так же пенициллин/стрептомицин (50 ед./мл). После извлечения печень помещали в стерильную ёмкость, которая содержала 40 мл охлаждённой среды Игла с глутамином, 2 М HEPES-буфера, а так же пенициллин/стрептомицин (100 ед./мл). Клеточную суспензию, полученную после механического измельчения тканей печени, пропускали через нейлоновый фильтр. Клетки выделяли из суспензии с помощью центрифугирования. Одновременно с подсчётом клеточности проводили определение жизнеспособности клеток в тесте на включение трипанового синего. Суспензию, содержащую 2×10^6 клеток, помещали в покрытые коллагеном пластиковые чашки и культивировали в течение 3-4 суток в среде DMEM с дексаметазоном, содержащей так же 20 % ФТС. Замену среды производили каждые 24 ч.

Применённая процедура позволила получить из печени одной крысы в общей сложности около 1×10^8 клеток, что сопоставимо с количествами, указываемыми в ряде литературных источников (Seglen et al., 1976; Bader et al. 1999).

По результатам микроскопии клетки в полученной культуре по своим морфологическим признакам соответствовали описаниям и микрофотографиям приводимым в литературных источниках (Seglen et al., 1976).

Полученная суспензия клеток печени содержала 70 % жизнеспособных клеток, что так же приближается к результатам, приводимым в литературных источниках (85-95 % по данным (Seglen et al., 1976, Лукьянова Л.Д., 1985; Bader et al. 1999)).

В полученной культуре наличие живых прикреплённых клеток имело место в течение 96 ч. инкубации.

Таким образом, в ходе работы нам удалось добиться показателей выхода клеток, а так же их выживаемости в монослойной культуре, сопоставимых с данными зарубежных и отечественных авторов. Достигнутый результат позволит нам в дальнейшем эффективно выделять необходимый клеточный материал и использовать его в усовершенствованной системе экстракорпоральной детоксикации крови «Биоискусственная печень».

ПЫШНЫЙ М.Ф., КУЗНЕЦОВ А.А., ПЫШНАЯ С.В.

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

УЛЬТРАЗВУКОВАЯ ВИЗУАЛИЗАЦИЯ МАГНИТНЫХ МИКРООБЪЕКТОВ В МЯГКИХ ТКАНЯХ

В современной медицине активно разрабатываются и внедряются в клиническую практику методы направленного транспорта лекарственных препаратов и гипертермии с применением магнитных частиц микронных и субмикронных размеров. В связи с этим проблема разработки методов контроля распределения таких частиц в тканях пациента приобрела высокую актуальность.

Известные методы медицинской ультразвуковой визуализации не позволяют достоверно определить наличие твердотельных микрочастиц и их скоплений, размеры которых не превышают сотен микрон. В связи с этим авторами разработан ряд специализированных методик, относящихся к области ультразвуковой тканевой доплерографии. Все они базируются на вибрации магнитных частиц в низкочастотном переменном магнитном поле, которые передаются тканям, находящимся в непосредственной близости от частиц. Доплеровское смещение частоты ультразвуковых волн, отраженных вибрирующими частицами и окружающими тканями, регистрируется приемником ультразвукового эхотомоскопа и затем используется при построении акустического изображения.

Указанные методики можно разделить на две группы. К первой группе относятся методики двумерного сканирования, позволяющие сформировать двумерное полутонное изображение сечения исследуемого объекта, на фоне которого в условных цветах или с помощью специальной подсветки отображаются области скопления магнитных микрочастиц. Процесс сканирования в основном подобен обычным методикам ультразвукового В-сканирования, но нами использовались зондирующие импульсы большей длительности (3-5 периодов несущей частоты).

Ко второй группе относятся методики одномерного доплеровского сканирования, как правило, совмещенные с обычным В-сканированием аналогично дуплексному режиму (сначала формируется обычное полутонное изображение, затем выполняется несколько тысяч циклов доплеровского зондирования вдоль единственного направления

акустического луча). Допплеровская информация отображается в виде одномерных кривых или полутоновой строки, замещающей соответствующий участок В-изображения.

Существенной особенностью методик первой группы является необходимость синхронизации процесса ультразвукового зондирования и частоты магнитной модуляции, вызывающей вибрацию частиц.

Методики были апробированы на ультразвуковых фантомах, изготовленных из мышечной ткани и печени свиньи. В ткань и сосуды фантомов вводились суспензии и порошки магнитных железоуглеродистых частиц, изготовленных для магнитоуправляемого направленного транспорта лекарственных препаратов и гипертермии. Для экспериментов использовались опытные образцы ультразвуковых сканеров, разработанных и изготовленных ООО «Центр медицинского акустического видения» со специализированным программным обеспечением, реализующим соответствующие методики. Переменное магнитное поле (напряженность в рабочей области достигала ориентировочно 1500 Э) создавалось с помощью магнита (изготовлен из сплава неодим-железо-бор, размер 40x40x20 мм), вращаемого электродвигателем.

Эксперименты показали осуществимость указанных методик и указали на некоторые проблемы их применения. В частности, наблюдались артефакты, связанные с распространением осцилляций мягких тканей на некоторое расстояние от мест скопления микрочастиц. Количество артефактов снижается с ростом частоты магнитной модуляции, но при этом снижается и чувствительность методик к присутствию частиц в поле зрения прибора. Приемлемая чувствительность к наличию частиц при относительно небольшом числе артефактов является ключевым показателем применимости данных методик. Методики второй группы с этой точки зрения имеют существенные преимущества. В связи с возможностью усреднения большого количества измерений их чувствительность к микроперемещениям мягких тканей (и, соответственно, к присутствию магнитных микрочастиц) оказалась значительно выше. Кроме того, они не требуют модификации аппаратной части эхотомоскопа. Поэтому они представляются наиболее перспективными для практических приложений.

РАДНАГУРУЕВА А.А.¹, ЛАВРЕНТЬЕВА Е.В.¹, БАНЗАРАКЦАЕВА Т.Г.¹,
ДУНАЕВСКИЙ Я.Е.², НАМСАРАЕВ Б.Б.¹

¹ Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ, Россия

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

ПЕПТИДАЗЫ АЛКАЛИФИЛЬНЫХ ТЕРМОТОЛЕРАНТНЫХ БАКТЕРИЙ ТЕРМАЛЬНЫХ ИСТОЧНИКОВ ЗАБАЙКАЛЬЯ

Алкалифильные и термотолерантные бактерии термальных источников могут стать уникальными источниками щелочных и термоустойчивых ферментов, многие из которых могут демонстрировать существенную разницу от известных наземных фило типов. Ферменты, функционирующие в экстремофильных условиях, определяют метаболические процессы и специфические биологические функции этих микроорганизмов в местах обитания. Среди секретируемых ими внеклеточных ферментов важная роль принадлежит пептидазам, принимающим активное участие в использовании микроорганизмами органических субстратов.

Исследования по выделению, идентификации и классификации протеолитических ферментов в последние годы проводятся особенно интенсивно, что объясняется востребованностью и многообразием различающихся специфичностью пептидаз. Выделенные пептидазы находят применение в различных областях биотехнологии – от промышленного производства гидролитических ферментов для детергентов до использования в генетических и молекулярно-биологических исследованиях.

Целью представленной работы было изучение секретируемой внеклеточной протеолитической активности алкалифильных и термотолерантных органотрофных культур, выделенных из термальных источников Забайкалья.

В работе были использованы культуры Um-09m, Gor-10s, Га-35 и Se-1-10. В результате анализа сиквенса гена 16S рНК было показано, что штамм Um-09m имеет 99,8 % сходства с *Bacillus licheniformis* штамм BPRIST006. Наибольшее сходство у культур Га-35 и Gor-10s выявлено с *Paenibacillus dendritiformis* штамм P411 (100%). Уровень сходства последовательностей исследуемого штамма Se-1-10 и типовых штаммов *Anoxybacillus flavithermus* strain DSM 2641 (Z26932) и *Anoxybacillus eryuanensis* E112 (GQ153549)

составили 98,4 и 98,9%, соответственно. Полученные данные позволяют предположить, что штамм Se-1-10 может являться представителем нового вида рода *Anoxybacillus* sp. nov.

Штаммы были исследованы на способность секретировать внеклеточные пептидазы, активные на различных пара-нитроанилидных субстратах 4 групп пептидаз – трипсин-подобных, химотрипсин-подобных, субтилизин-подобных и цистеиновых (ВАРА, GlpFpNA, GlpAALpNA и GlpFAPNA, соответственно) и на белковом субстрате азоказеин, используемый для определения общей активности. Установлено, что максимальная активность по азоказеину у штаммов Um-09m, Га-35, Gor-10s и Se-1-10 проявляется на среде с триптоном на 48-60 ч культивирования. Максимум активности в штаммах Um-09m, Га-35, Gor-10s и Se-1-10 выявлены по субстрату GlpAALpNa (7,1; 3,7; 12,6 и 18,5 ед/мг белка, соответственно). Полученные данные свидетельствуют о том, что существенный вклад в пептидазную активность культур, по-видимому, вносят пептидазы с субтилизин-подобной специфичностью.

С помощью использованных методов диализа и ионообменной хроматографии в условиях FPLC на колонке Mono Q удалось частично очистить фермент штамма Gor-10s *Paenibacillus dendritiformis* в 23,8 раз с молекулярной массой 19-20 кДа и выходом 4,2%. Внеклеточная пептидаза штамма Se-1-10 была очищена в 42,7 раз. Выход составил около 1%.

Исследования физико-химических свойств ферментов показал, что максимальная активность ферментов по гидролизу синтетического субстрата GlpAALpNa наблюдается для пептидаз штаммов Um-09m и Gor-10s при pH от 11,0 до 11,3, для пептидазы штамма Га-35 при pH 9,8. Ферменты стабильны в широком диапазоне pH от 6,3 до 11,4. Температурные оптимумы пептидаз колеблются от 30 до 60°C. Температурный оптимум пептидазы штамма Se-1-10 *Anoxybacillus* sp. nov. составляет 50°C, оптимум pH активности исследуемого штамма находится в щелочной области и составляет 8,0 – 11,4, с максимумом при pH 11,0, что, по-видимому, отражает адаптацию ферментативного аппарата штамма Se-1-10 *Anoxybacillus* sp. nov. к обитанию в щелочных условиях.

Анализ функциональных групп активного центра пептидаз показал, что специфический ингибитор сериновых пептидаз PMSF полностью подавлял активность ферментов штаммов Gor-10s, Га-35 и Se-1-10, кроме штамма Um-09m, в культуральной

жидкости которого содержится, по крайней мере, два фермента, относящихся к классам сериновых и металлопептидаз.

Работа выполнена при поддержке Интеграционных проектов СО РАН № 39 и 94.

РАЛДУГИНА Г.Н.¹, МАРЕАЙ М.М.², ШУМКОВА Г.А.¹, ГОМАА А.М.²,
БУРМИСТРОВА Н.А.¹, РАДИОНОВ Н.В.¹

¹*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им.К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия*

²*Российский университет дружбы народов, Москва, Россия*

**ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ РАПСА (*Brassica napus* L.), ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ
ГЕН ТРАНСФАКТОРНОГО БЕЛКА РИСА *OSMYB4*, ОТЛИЧАЮТСЯ
ПОВЫШЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ДЕЙСТВИЮ СОЛЕЙ ТЯЖЕЛЫХ
МЕТАЛЛОВ И К ДЕЙСТВИЮ ПОНИЖЕННЫХ ТЕМПЕРАТУР**

Введение в растения генов трансфакторных белков позволяет создавать растения, устойчивые одновременно к действию нескольких стрессоров. Трансфакторные белки регулируют экспрессию большого числа генов, задействованных в ответах на стресс. Одним из самых распространенных в растениях является семейство факторов транскрипции MYB. К семейству MYB генов трансфакторных белков относится и ген *Osmyb4* (Y11414), выделенный из генома растений риса. Трансгенные растения ярового рапса (*Brassica napus* L.) сорта Вестар были получены в ИФР РАН путем агробактериальной трансформации семядольных эксплантов проростков рапса по методу, разработанному ранее Малышенко с соавт. (2003). Конструкция была любезно предоставлена сотрудниками Института биологии и сельскохозяйственной биотехнологии (Милан, Италия) и содержала выделенный из риса ген *Osmyb4*, поставленный под холодоиндуцируемый промотор COR, а также селективный ген *ntpII*, придающий устойчивость к антибиотику канамицину (Км). После определения с помощью ПЦР в растениях-регенерантах наличия целевого гена *Osmyb4* растения укореняли и высаживали в почву. Растения были фертильны и после самоопыления завязали семена. Семена одного из растений были высажены в условиях *in vitro*. Каждый из проростков был проверен на

содержание и экспрессию целевого гена *Osmyb4*. Из растений 1-го поколения были выбраны 2 хорошо экспрессирующие линии, которые были высажены в почву и с них также были собраны семена 2-го поколения. Работу по определению устойчивости трансгенных растений к воздействию холода (+4°C -6°C) и солей тяжелых металлов (ТМ), ZnSO₄ (500 – 5000 мкМ) и CuSO₄ (25-150 мкМ) проводили на растениях, полученных из этих семян и выращиваемых в водной культуре. После воздействия фактора изучали накопление биомассы, металлов, фотосинтетических пигментов, интенсивность перекисного окисления липидов, аккумуляцию соединений антиоксидантного комплекса: общих фенолов, антоцианов, а также антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы и гваякольной пероксидазы. При действии солей тяжелых металлов сильные различия в ответах трансгенных и сравниваемых с ними нетрансформированных растений наблюдали только при высоких концентрациях солей. У трансгенных растений было большее накопление биомассы, большая оводненность, меньшее разрушение каротина и ксантофилла. Они аккумулировали в своих листьях большее количество металла, особенно Zn, достигая накопления его почти 7 мг на г сухой биомассы, что приближает эти растения к гипераккумуляторам цинка. В тканях трансгенных растений при действии высоких концентраций солей и охлаждения значительно увеличивалось содержание общих фенолов и антоцианов, низкомолекулярных соединений, отвечающих за защиту от АФК. Все эти результаты свидетельствуют о большей устойчивости трансгенных растений к действию тяжелых металлов и охлаждения, о чем говорит также и меньшая активность в их тканях малонового диальдегида (МДА), соединения свидетельствующего о процессах перекисного окисления липидов, в свою очередь говорящего о степени повреждающего действия стрессора. В тканях трансгенных растений при действии всех испытанных стрессоров МДА аккумулировалось значительно меньше, чем в тканях нетрансформированных растений. При переносе растений в условия оптимального роста содержание МДА у трансгенных растений восстанавливалось практически до исходных значений, тогда как у нетрансформированных такого восстановления не наблюдали. Трансгенные растения рапса с геном *Osmyb4* риса обнаруживали не только большую холодо-, но и морозоустойчивость. После экспозиции в течение 2-х суток при -6°C их жизнеспособность восстанавливалась при переносе в оптимальные температурные условия (+24°C). При действии самых высоких испытанных концентраций солей ТМ трансгенные

растения рапса оставались живыми достаточно длительное время тогда, как нетрансформированные растения через 12-13 суток погибали. Таким образом, встраивание в растения гена транскрипционного фактора, действительно, повысило устойчивость трансгенных растений к стрессорному действию ТМ и низких температур.

РАМАЗАНОВ Р.Р.¹, ЩЁГОЛЕВ Б.Ф.^{2,3}, КАСЬЯНЕНКО Н.А.¹

¹Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург, Россия

²ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

³ФГУ «Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова»

Минздравсоцразвития РФ, Санкт-Петербург, Россия

ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ОЦЕНКИ ПРОЦЕССОВ АКВАТАЦИИ КООРДИНАЦИОННЫХ СОЕДИНЕНИЙ ПЛАТИНЫ(II) И ПАЛЛАДИЯ(II)

Координационные соединения платины(II) проявляют противоопухолевую активность, обусловленную их взаимодействием с молекулой ДНК в клетке. В структуре некоторых комплексов Pt содержится один или два лабильных атома Cl, которые в процессе взаимодействия с ДНК замещаются на молекулы воды при попадании в клетку, с последующим замещением их на атомы азота гуанинов, входящие в ДНК. Согласно общим представлениям, такие комплексы с ДНК препятствуют процессу транскрипции, что приводит к гибели клетки опухоли. В настоящее время растет интерес к рассмотрению координационных комплексов на основе других переходных металлов, таких как палладий(II), которые могут оказывать подобный биологический эффект, обладая при этом меньшим побочным действием. Предположение о потенциальной активности других переходных металлов основывается на сходстве геометрического и электронного строения платиновых и палладиевых комплексов. Вместе с тем, несмотря на многочисленные экспериментальные исследования, вопрос о механизме поэтапного взаимодействия комплексов переходных металлов с ДНК все еще до конца не ясен. Сравнительный теоретический анализ термодинамических параметров процесса акватации для ряда координационных комплексов на основе платины(II) и палладия(II) позволяет сделать некоторые предположения о возможности их последующего взаимодействия с ДНК, а

также оценить различие в кинетике этих процессов. В настоящей работе рассматривались цис-ДДП (цис-диамминодихлорплатина), транс-ДДП и их палладиевые аналоги.

Квантово-химические расчеты для ряда координационных комплексов Pt и Pd проводились методом Хартри-Фока-Рутаана с учетом корреляции электронов в рамках метода теории возмущений второго порядка Мюллера-Плессета в газовой фазе в программе PCGAMESS(firefly) v 7.1G. с полной оптимизацией пространственного строения всех комплексов без ограничений по симметрии. Для тяжелых переходных металлов использовался базисный набор с эффективным псевдопотенциалом ECP SBK для атомов платины, с релятивистским псевдопотенциалом штутгартской группы MCDHF RSC ECP для палладия. Для легких элементов использовался валентно-расщепленный базисный набор 6-31G, дополненный поляризующими функциями. Полученные в расчетах структурные параметры комплексов хорошо согласуются с экспериментальными данными по структуре этих соединений, полученными в кристаллографии. Исследование профиля энергии по схеме реакции замещения лигандов в процессе гидролиза проводилось в рамках концепции «координаты реакции на профиле потенциальной энергии». Оптимизация пространственного строения комплексов, расчет энергий продуктов и реагентов по схеме реакции аквафикации, поиск переходного состояния и расчет частот нормальных колебаний для анализа координаты реакции проводились при одном выбранном наборе базисных волновых функций.

В результате расчета энергий активации комплексов цис-ДДП, транс-ДДП и цис-дихлордиамминопалладия в процессе двухстадийного замещения атомов хлора на воду было показано незначительное различие этих энергий для платиновых комплексов и существенное отличие для палладиевого аналога. Так значения энергий активации цис-ДДП для двух стадий последовательного замещения составляло $E_{a1}=26,24$ ккал/моль, $E_{a2}=30,29$ ккал/моль, для транс-ДДП составляло - $E_{a1}=29,45$ ккал/моль, $E_{a2}=35,19$ ккал/моль, а для цис-диамминодихлорпалладия - $E_{a1}=20,85$ ккал/моль и $E_{a2}=26,24$ ккал/моль соответственно. Незначительное различие между цис- и транс- изомерами платинового комплекса качественно объясняется принципом транс-влияния, согласно которому лабильность атома хлора во внутренней координационной сфере определяется инертностью лиганда, находящегося по отношению к нему в транс-положении. В свою очередь, отличие энергий активации для двух стадий аквафикации палладиевого комплекса

на величину порядка 6-8 ккал/моль по сравнению с платиновыми можно объяснить особенностями электронного строения атома палладия. Эта закономерность косвенно подтверждается в эксперименте *in vitro*, в котором палладиевые комплексы проявляют более значительную активность, чем платиновые на разных стадиях взаимодействия с ДНК. Расчет термодинамических параметров соответствующих реакций при температуре 298,15 К продемонстрировал общую закономерность для всех комплексов. Реакции акватации проходят с увеличением свободной энергии Гиббса: для *цис*-ДДП $\Delta G_1=10,76$ ккал/моль и $\Delta G_2= 21,23$ ккал/моль , для *транс*-ДДП $\Delta G_1=18,58$ ккал/моль и $\Delta G_2=20,66$ ккал/моль , для палладиевого комплекса $\Delta G_1=12,56$ ккал/моль и $\Delta G_2=22,20$ ккал/моль. Согласно имеющимся представлениям, координационные комплексы платины и палладия вступают во взаимодействие с ДНК в акватированной форме, что противоречит полученным оценкам изменений свободной энергии в ходе самопроизвольной акватации в растворе. Изложенное предполагает проведение дальнейших исследований с целью установления реальной картины связывания.

РАХМАТУЛЛИНА Д.Ф., ОГОРОДНИКОВА Т.И., АЛЯБЬЕВ А.Ю.,

ПОНОМАРЕВА А.А., АНДРЕЕВА И.Н., КАРИМОВА Ф.Г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки, Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук, Казань, Россия

ДЕЙСТВИЕ АЗЕЛАИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ОБМЕН И УЛЬТРАСТРУКТУРУ КЛЕТОК ПШЕНИЦЫ

Недавно было показано, что бактериальная инфекция приводит к увеличенному накоплению азелаиновой кислоты в сосудах растений, что приводит к локальному и системному сопротивлению против возбудителя. Несмотря на то, что азелаиновая кислота используется в течение длительного времени в терапии и косметологии, мало известно о ее влиянии на клетки растений в стрессовых условиях, когда эффективность использования энергии имеет большое значение. Энергообеспеченность и устойчивость

клеток к действию различных стрессовых факторов в значительной степени зависит от адаптивных возможностей процесса дыхания.

Основной задачей данной работы было изучение влияния азелаиновой кислоты на теплопродукцию, дыхание и ультраструктуру клеток корней пшеницы. Объектом исследования служили отсеченные корни 5-дневных проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.) выращенные на растворе CaCl_2 (0,25 мМ). Во всех растворах инкубации CaCl_2 присутствовал в качестве соединения, стабилизирующего мембраны клеток.

Наши результаты показали, что в присутствии азелаиновой кислоты (10 мМ) увеличилось потребление кислорода. Вероятно, это увеличение потребления кислорода было связано с использованием азелаиновой кислоты в качестве субстрата дыхания. Известно, что как экзогенная так и эндогенная азелаиновая кислота в основном метаболизируется в митохондриях, подвергаясь β -окислению. В результате образуются пимелиновая и глутаровая кислоты, превращаясь затем в ацетил-КоА, который является субстратом цикла Кребса, где он метаболизируется до CO_2 и малонил-КоА, участвующего в синтезе жирных кислот. Таким образом, азелаиновая кислота является промежуточным продуктом метаболизма липидов и не превращается в какие-либо соединения, обладающие явной токсичностью.

В наших экспериментах теплопродукция корней пшеницы изменялась незначительно, что свидетельствовало о сбалансированности энергетического обмена в присутствии азелаиновой кислоты. Известно, что небольшое увеличение интенсивности потребления кислорода и теплопродукции при отсутствии разобщенности процессов окисления и фосфорилирования свидетельствует об адаптивных процессах в клетке.

Исследование ультраструктурной организации клеток показало, что при инкубации отсеченных корней пшеницы в присутствии азелаиновой кислоты в течение 5 часов сохранялась высокая активность процессов синтеза белков и липидов. Цитоплазма содержала многочисленные рибосомы в форме полисом, а также осмиофильные липидные капли. ЭПР был представлен шороховатой формой. Одновременно с округлыми митохондриями наблюдали чашевидные и гантелевидные митохондрии, что свидетельствует о высоком уровне энергообмена клеток корней, инкубируемых в растворе азелаиновой кислоты.

Одним из механизмов адаптации клеток растений к стрессовым условиям является переключение работы ЭТЦ митохондрий на нефосфорилирующий путь переноса электронов с участием цианидрезистентной альтернативной оксидазы. Наши эксперименты с использованием антимицина А - ингибитора III комплекса ЭТЦ и азелаиновой кислоты показали, что при инкубации отсеченных корней происходило увеличение потребления кислорода и теплопродукции клеток корней пшеницы. Можно предположить, что азелаиновая кислота способна стимулировать альтернативную оксидазу. Этот фермент позволяет электронам обходить заблокированный антимицином цитохромный путь, состоящий из антимицин чувствительных комплексов bc1 и цитохромоксидазы. Стимуляции потребления кислорода в этих условиях устранялась ингибитором альтернативной оксидазы салицилгидроксамовой кислотой. Известно, что активация альтернативной оксидазы приводит к увеличению теплопродукции в тканях растений. Мы предполагаем, что возможность активации азелаиновой кислотой альтернативной оксидазы, снижающей эффективность функционирования окислительного фосфорилирования путем рассеивания тепла, может иметь большое значение для предотвращения окислительного стресса и поддержания адаптивных процессов в тканях растений.

РЕПКОВА М.Н.¹, ЛЕВИНА А.С.¹, ПАВЛОВА А.С.¹, ШАЦКАЯ Н.В.¹,
ШИКИНА Н.В.², ИСМАГИЛОВ З.Р.², БАЙБОРОДИН С.И.³, ЗАРЫТОВА В.Ф.¹

¹*Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения
РАН, Новосибирск, Россия*

²*Институт катализа Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия*

³*Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*

НАНОРАЗМЕРНАЯ СИСТЕМА ДОСТАВКИ АНТИБИОТИКОВ РЯДА БЛЕОМИЦИНА В КЛЕТКИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Антибиотики блеомицинового ряда активно используются в терапии различных видов рака. Известно, что противораковый гликопептидный антибиотик блеомицин (Blm) способен деструктурировать одно- и двуцепочечные ДНК, с образованием прямых

разрывов и щелочеллабильных сайтов. Однако в силу того, что блеомицины плохо проникают через клеточную мембрану, в терапии применяются высокие концентрации, токсичные для организма в целом. Поэтому для снижения дозы антибиотика необходимо организовать его эффективную доставку внутрь клетки. В последние годы с развитием нанотехнологии большое внимание уделяется наночастицам как носителям для доставки лекарственных препаратов в клетки. Известно, что наночастицы диоксида титана способны проникать в клетки, т.е. их можно использовать в качестве транспортеров для доставки лекарственных препаратов.

Целью данной работы было использование наночастиц диоксида титана размером ~5 нм для доставки блеомицина в клетки млекопитающих и исследование его действия на внутриклеточные ДНК.

Разработан подход к созданию нанокompозитов $\text{TiO}_2\sim\text{Vlm}$, в состав которых входят наночастицы и антибиотик блеомицин. Иммуобилизация антибиотиков на наночастицах диоксида титана ранее не описана. Исследована зависимость адсорбции Vlm на поверхность TiO_2 -наночастиц от количества добавленного блеомицина. При добавлении блеомицина до концентрации 50 нмоль/мг сорбируется ~70% антибиотика; при дальнейшем увеличении концентрации антибиотика степень иммуобилизации уменьшается и кривая адсорбции выходит на плато; достигая максимального значения 40 нмоль/мг.

Показано, что блеомицин в составе нанокompозитов $\text{TiO}_2\sim\text{Vlm}$ сохраняет способность деструктурировать ДНК-мишень по тем же сайтам, что и свободный блеомицин. Эффективность деструкции ДНК зависит от концентрации нанокompозита $\text{TiO}_2\sim\text{Vlm}$ и его емкости по блеомицину.

Продемонстрировано, что созданные нанокompозиты, содержащие флуоресцентную метку ($\text{TiO}_2\sim\text{Vlm}^*$), проникают в эукариотические клетки. Свободный Vlm^* также способен проникать в клетки, но в значительно меньшей степени, поэтому внутри клетки визуализировать его не удалось. Таким образом, наночастицы диоксида титана обеспечивают более эффективное проникновение блеомицина в клетки, повышая его биодоступность.

Показано, что блеомицин в составе нанокompозита $\text{TiO}_2\sim\text{Vlm}$ более эффективно расщепляет внутриклеточные ДНК по сравнению со свободным блеомицином. Степень расщепления ДНК возрастает с увеличением концентрации несвязанного Vlm, однако даже

при концентрации 650 нмоль/мл наблюдается лишь слабое расщепление ДНК. В присутствии TiO_2 этот процесс усиливается: уже при концентрации 130 нмоль/мл наблюдается заметное расщепление ДНК.

Усиление действия блеомицина на клетки в составе препарата TiO_2 ~В1m было дополнительно подтверждено экспериментами по подсчету числа клеток с морфологическими изменениями хроматина. В присутствии TiO_2 ~В1m количество клеток с выраженными изменениями конденсации хроматина в ядре увеличивалось примерно в 6 раз по сравнению с действием свободного блеомицина для разных концентраций В1m.

Работа поддержана грантом РФФИ № 11-04-01408-а, проектом № 2.1.1/5642 в рамках программы «Развитие научного потенциала высшей школы» и Интеграционным грантом СО РАН № 61.

РЕПКОВА М.Н.¹, ЛЕВИНА А.С.¹, ИСМАГИЛОВ З.Р.², ШИКИНА Н.В.²,
МАЗУРКОВА Н.А.³, ЗАРЫТОВА В.Ф.¹

*¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения
РАН, Новосибирск, Россия*

²Институт катализа Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия

³ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор", пос. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

ПРОТИВОВИРУСНЫЕ СВОЙСТВА НАНОКОМПОЗИТОВ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ТИТАНА, СОДЕРЖАЩИХ АНТИСМЫСЛОВЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ

Доставка лекарственных препаратов на основе нуклеиновых кислот (DNA-based drugs) в клетки является актуальной проблемой, ждущей своего решения. Неорганические наночастицы, способные проникать через клеточные мембраны, могут быть использованы в качестве транспортеров ДНК-фрагментов в клетки.

Целью работы было исследование биологического эффекта наноконкомпозитов, состоящих из TiO_2 -наночастиц и иммобилизованных на них олигонуклеотидов на примере ингибирования репродукции вируса гриппа А человека.

Разработаны методы нековалентной иммобилизации ДНК-фрагментов на наночастицах диоксида титана (TiO_2) с целью получения нанокompозитов $\text{TiO}_2\sim\text{DNA}$, способных проникать через клеточные мембраны. Представлены два способа получения нанокompозитов: 1) сорбция полилизин-содержащих олигонуклеотидов на наночастицах с образованием нанокompозитов $\text{TiO}_2\text{-PL-DNA}$ и 2) электростатическое присоединение олигонуклеотидов к наночастицам с предварительно иммобилизованным полилизином с образованием нанокompозитов $\text{TiO}_2\text{-PL}\cdot\text{DNA}$. Оба способа обеспечивают эффективную и достаточно прочную фиксацию ДНК-фрагментов на наночастицах и позволяют получать нанокompозиты с емкостью по олигонуклеотиду до 40 нмол/мг. Показано, что ДНК-фрагменты, иммобилизованные на наночастицы, сохраняют способность к комплементарным взаимодействиям. Методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии показано, что ДНК-фрагменты, иммобилизованные на наночастицы любым из рассмотренных методов, в составе нанокompозитов могут быть доставлены в клетки без использования трансфекционных агентов и физических методов воздействия.

Исследована противовирусная активность нанокompозитов $\text{TiO}_2\text{-PL-DNA}$ и $\text{TiO}_2\text{-PL}\cdot\text{DNA}$ на клетках MDCK, инфицированных вирусом гриппа А человека Aichi/2/68 (H3N2). Были использованы нанокompозиты, содержащие ДНК-фрагменты, комплементарные различным областям вирусной или комплементарной ей РНК. Наиболее эффективный нанокompозит, несущий ДНК-фрагмент, направленный на 3'-некодирующую область вирусной РНК, уменьшал репродукцию вируса на >99.9%. ДНК-фрагмент в составе нанокompозита $\text{TiO}_2\text{-PL-DNA}$ проявил бóльшую активность, чем тот же фрагмент в присутствии липофектамина, широко используемого трансфекционного агента. Нанокompозит, несущий ДНК-фрагмент со случайной последовательностью (т.е. некомплементарный вирусной РНК) был намного менее эффективен соответствующих нанокompозитов, содержащих олигонуклеотид, направленный на вирусную РНК. Контрольные образцы ДНК-фрагмента, не связанного с наночастицами, были практически не активны.

Таким образом, созданные нанокompозиты могут рассматриваться как новые перспективные лекарственные препараты.

Работа поддержана грантом РФФИ № 11-04-01408-а и Государственным контрактом № 16.512.11.2267 (Шифр 2011-1.2-512-090-06) в рамках Федеральной целевой программы по приоритетному направлению «Живые системы».

РЕПКОВА М.Н.¹, ЛЕВИНА А.С.¹, ИСМАГИЛОВ З.Р.², ШИКИНА Н.В.²,
НЕТЕСОВА Н.А.³, ЕВДОКИМОВ А.А.³, МАЗУРКОВА Н.А.³,
ЗАГРЕБЕЛЬНЫЙ С.Н.⁴, ЗАРЫТОВА В.Ф.¹

*¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины
Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия*

²Институт катализа Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия

³ФГУН ГНЦ ВБ "Вектор", пос. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

⁴Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

ПРОТИВОВИРУСНЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ ДЕЗОКСИРИБОЗИМОВ И НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ТИТАНА

В последние годы значительное развитие получили работы по созданию новых терапевтических средств, в том числе противовирусных препаратов, основанных на применении адресованных молекул нуклеиновых кислот (антисмысловых олигонуклеотидов, РНКзимов, ДНКзимов, малых интерферирующих РНК и т.д.), способных воздействовать на внутриклеточный генетический материал. Однако серьезной проблемой на пути практического применения нуклеиновых кислот является их доставка в клетки. Одним из способов решения этой проблемы является использование наночастиц оксидов металлов в качестве средств доставки.

В задачу исследования входила разработка противовирусных нанокомпозитов для направленной инактивации РНК вирусов гриппа А H5N1 (грипп птиц) и H3N2 (грипп человека). В данной работе созданы новые нанокомпозиты на основе наночастиц диоксида титана и ДНКзимов ($TiO_2 \sim dz$) с использованием различных способов иммобилизации олигонуклеотидов на наночастицы. Показано, что ДНКзимы в составе нанокомпозитов сайт-специфично расщепляют РНК-мишень в комплементарном комплексе с эффективностью до 95%.

Был проведен скрининг противовирусной активности 46 синтезированных вирус-специфических ДНКзимов типа «10-23» на клетках MDCK, инфицированных вирусом гриппа птиц H5N1, с использованием липофектина в качестве трансфекционного агента. Были выбраны наиболее активные ДНКзимы, специфичные к 5-му сегменту вирусной РНК, кодирующему нуклеопротеин NP. Выбранные ДНКзимы были иммобилизованы на TiO₂-наночастицы, и была оценена противовирусная активность полученных нанокомпозитов. Наиболее эффективный нанокомпозит вида TiO₂-PL-dz превосходил по активности комплекс ДНКзим-липофектин и подавлял репродукцию вируса более чем на 99%.

Таким образом, разработан экспериментальный ген-направленный препарат нового поколения, эффективный для ингибирования репродукции вирусов гриппа А в опытах *in vitro*.

Работа поддержана грантом РФФИ № 11-04-01408а, Государственными контрактами № 02.512.12.2038 (шифр 2009-02-1.2-04-42-012) и № 16.512.11.2267 (шифр 2011-1.2-512-090-069) в рамках Федеральной целевой программы по приоритетному направлению «Живые системы» и проектом № 2.1.1/5642 в рамках программы «Развитие научного потенциала высшей школы».

РИНЧИНОВ А.С., ДАНИЛОВА Т.Е., ЦЫРЕНОВ В.Ж.

*Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления,
Улан-Удэ, Россия*

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТИРОВАННОГО НАПИТКА ИЗ RHEUMUNDULATUM L.

В регионе Сибири и Дальнего Востока не нашло развития производство вина, в силу отсутствия сырьевой базы. Не смотря на массовое вхождение культуры винограда в практику сибирского региона по-прежнему имеется дефицит в новых идеях, методических и особенно методологических разработках в области сибирского виноделия.

Одной из альтернатив винограду в регионе Сибири и Дальнего Востока является плодово-ягодное сырье. Среди природного растительного сырья следует выделить

культуру ревеня волнистого (*Rheumundulatum L.*). Характерной особенностью данного растения является наличие в составе сока ревеня волнистого редких биологически активных веществ (БАВ), применяемых для лечения таких заболеваний как псориаз, туберкулез, малокровие, термического поражение кожного покрова.

Ревень волнистый произрастает в Восточной Сибири. Введен в культуру как раннее овощное растение, очень холодостоек, возможно культивирование в северных районах. В практике народной медицины используют корни, черешки и листья растения.

Отсутствие комплексной промышленной технологии по получению БАВ из малоиспользуемого растительного сырья, каковым является ревеня волнистый, стимулировало разработки технологий получения разнообразных лечебных и профилактических продуктов на его основе. Сохранение лекарственных свойств веществ, входящих в состав ревеня имеет чрезвычайно важное значение.

Одним из щадящих и физиологических путей сохранения БАВ ревенного сырья является биотехнологический способ. Нами предлагается использование ревеня волнистого для получения винных напитков, технология изготовления которых основывается на процессах брожения.

Цель работы – исследование химического состава сока *Rheumundulatum L.* (ревень волнистый) для оценки на пригодность к использованию его в виноделии.

Базовыми показателями пригодности растительного сырья для процесса брожения в виноделии являются общая концентрация титруемых кислот и количественное содержание сахаров.

Экспериментально установлено, что сок ревеня характеризуется низким содержанием сахара и высоким содержанием органических кислот, фенольных соединений, витаминов (особенно витамина С) и минеральных веществ. В случае низкой сахаристости допускается прибавление свекловичного сахара до кондиции, обеспечивающей необходимую спиртуозность для консервации БАВ. Определено, что органические кислоты и другие составные компоненты ревенного сока влияют на процесс брожения: интенсивность брожения, динамика выделения углекислого газа, тинкториальные, морфологические и физиолого-биохимические свойства продуцента. По вкусо-ароматическим свойствам полученный ферментированный напиток не уступает аналогам других плодово-ягодных вин, а по содержанию БАВ является уникальным.

Таким образом, изучение химического состава ревеня волнистого и процессов культивирования на ревенном соке дрожжевых клеток показала возможность получения напитков функционального назначения. Результаты исследований легли в основу биотехнологии переработки ревенного сырья.

РОГАТКИН Д.А., АБАЕВА Л.Ф., ПЕТРИЦКАЯ Е.Н., РУСАНОВА Е.В.

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

К ВОПРОСУ О ВЛИЯНИИ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА И НЕКОТОРЫХ МЕДИЦИНСКИХ ПРЕПАРАТОВ СЕРЕБРА НА РОСТ МИКРООРГАНИЗМОВ

Широкое распространение находит применение наночастиц серебра в медицине, в пищевой промышленности и в других областях благодаря их антимикробным, антисептическим свойствам.

Изучение антимикробной активности наночастиц серебра является актуальным. Ряд исследователей считает, что наночастицы серебра размером 5-50 нм обладают сильной антибактериальной и цитотоксической активностью *in vitro* по отношению к гепатоцитам крыс [1]. Механизм развития токсичности связан с окислительным стрессом, нарушением функций митохондрий и увеличением проницаемости мембраны (2). С учетом этого задачей нашего исследования было изучение бактерицидного влияния коллоидных растворов наночастиц серебра на жизнедеятельность микроорганизмов. В эксперименте было использовано коллоидное серебро «Серебряный щит» производства ООО «Фрактал-М» с концентрацией наночастиц 50 мг/л и 100 мг/л и размером 15 нм. Определение формы и размера наночастиц серебра проводили оптическим методом и различного вида методами микроскопии на предприятии-изготовителе (ООО «Фрактал М»). Ранее у ряда авторов было показано, что бактерицидность наночастиц серебра проявляется в основном в отношении только грамотрицательных микроорганизмов [3,4,5]. В связи с этим нами был расширен спектр изучаемых микроорганизмов. Из грамотрицательных бактерий были использованы контрольные штаммы *E.coli* (26941), а также *K.pneumoniae* (АТСС №43062), обладающая капсулой; из грамположительных

также был выбран золотистый стафилококк (*S.aureus* 209 P) как микроорганизм с факторами патогенности выше, чем у других стафилококков; из грибов использовали клинические штаммы *C.albicans*.

В качестве объекта для исследования использовали коллоидный раствор наночастиц серебра с концентрацией 100 мг/л и 50 мг/л, раствор ионов серебра, полученный с помощью прибора «Георгий» с концентрацией 0,5 мг/л, 1% раствор протаргола и, в качестве контроля - раствор фурацилина 1:5000. Исследование проводилось в 2 сериях по 3 опыта. При проведении первой серии опытов использовались суспензии 5ЕД по оптическому стандарту мутности, полученные из суточной агаровой культуры, эмульгированной в физиологическом растворе. Полученную суспензию равномерно засеивали по поверхности чашки Петри с кровавым агаром для культивирования *S.aureus*, *E.coli*, *K.pneumoniae* и среда Сабуро для *C.albicans*. Далее засеянные чашки маркировали, разделяя на сектора. Сектор №1 – контроль. В сектор №2 наносили 30 мкл (2 капли) коллоидного раствора наночастиц серебра с концентрацией 50 мг/л (размер наночастиц 15нм), на сектор №3 – с концентрацией 100 мг/л (размер наночастиц 15 нм). Чашки помещали в термостат на 24 часа при 37 градусах Цельсия. При проведении второй серии опытов использовались суспензии 5ЕД по оптическому стандарту мутности, полученные из суточной агаровой культуры, эмульгированной в растворе наночастиц серебра с концентрациями 50мг/л и 100 мг/л. Затем полученную суспензию высевали на агар сразу после получения, через 2 часа и через 24 часа инкубации при 37 градусах. Чашки помещали в термостат на 24 часа. Также для сравнения проводили стандартный тест на чувствительность к антибиотикам на используемом кровавом агаре. По окончании инкубации отмечался равномерный рост культуры на всех засеянных секторах первой серии опыта и ровный газон во второй серии. На кровавом агаре, не засеянном микробной культурой, - отсутствие роста. На агаре с дисками антибиотиков (оксациллин, ампициллин, цефотаксим, имипенем, рифампицин) – есть зона подавления роста микроорганизма вокруг диска.

Таким образом, можно сформулировать основные выводы по нашему исследованию: 1. Коллоидный раствор использовавшегося нами нанофазного серебра в концентрации до 100 мг/л не обладает антимикробным действием. 2. Напротив, протаргол в разведении 1% $AgNO_3$ обладает ярко выраженным бактериолитическим свойством.

3. Ионы серебра стандартных фармпрепаратов, скорее всего, ингибируют рост бактерий не специфически, а в синергизме с нитрат-анионами. 4. Чистое же серебро в качестве антимикробного средства, включая нанофазное серебро, малоэффективно вследствие его недостаточной предельной растворимости.

Список литературы.

1. *Lewinski N., Colvin V., Drezek R. Cytotoxicity of Nanoparticles // Small-journal 2008, 4, No. 1, 26 – 49*

2. *Shahverdy AR, Fakhimi Ali, Minaian Sara Synthesis and effect of silver nanoparacles on the antibacterial activity of different antibiotics against Staphylococcus and Escherichia coli// Nanomedicine-Nanotechnology biology and medicine 3(2): 168-171 Jun 2007.*

3. *Nanotechnology in medicine and Antibacterial Effect of Silver Nanoparticiles / M. Singh, S. Singh, S. Prasad, I.S. Gambhir. // Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures . – Vol 3, – № 3, September 2008. – P 115–122.*

4. *Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles / S. Shrivastava, T. Bera, A. Roy, G. Singh, P. Ramachandrarao, D. Dash. // Nanotechnology. –2007, №18. – P 1–9.*

5. *Bactericidal effect Ag particles / J.B. Morones, J.L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J.B. Kouri, J.T. Ramirez, M.J. Yacaman // Nanotechnology. – 2005, №16 – P. 2346-2353.*

РОГАЧЕВА О.Н.¹, ЩЕГОЛЕВ Б.Ф.², СТЕФАНОВ В.Е.¹,

МИХАЙЛОВ Г.В.³, САВВАТЕЕВА-ПОПОВА Е.В.²

¹*ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия*

²*СПбГУ, Биолого-почвенный факультет, Санкт-Петербург, Россия*

³*СПбФ МСЦ РАН, Санкт-Петербург, Россия*

ПОСТРОЕНИЕ МОДЕЛИ КОНФОРМАЦИОННОГО ПЕРЕХОДА А-ДОМЕНА РЕГУЛЯТОРНОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ ПРОТЕИНКИНАЗЫ A I α .

Протеинкиназа А (ПКА) – ключевой белок, лежащий в основании множества сигнальных каскадов. Известно его участие в дифференцировке клеток, развитии

иммунного ответа, контроле путей метаболизма и многих других процессах. ПККА считается возможной мишенью при лечении различных заболеваний, в том числе СПИДа.

В отсутствие внешнего сигнала ПККА образует комплекс с регуляторной субъединицей (R-субъединицей) и таким образом остается неактивной. R-субъединица изменяет свою конформацию при связывании внутриклеточного мессенджера цАМФ (циклического аденозин-3':5'-монофосфата), что приводит к освобождению активной ПККА. Также R-субъединица участвует в инактивации цитохромоксидазы, ингибирует фосфатазы, образует комплексы с mTOR киназой и рибосомальной S6 киназой RSK1, регулирует транспорт факторов транскрипции (PAZT1) и репликации (RFC40) в ядро, причем некоторые из этих процессов являются цАМФ-зависимыми.

Известно, что в состав R-субъединицы входят два цАМФ-связывающих домена (А-домен и В-домен), каждый из которых может существовать в двух конечных конформациях: цАМФ-связанной В-форме и в Н-форме, реализующейся в присутствии ПККА. Конформационный переход R-субъединицы определяется конформационными переходами этих доменов. цАМФ-связывающие домены (CNBD) широко распространены в природе. Они входят в состав белков EPAC, ионных каналов (HCN, CNG, HERG), многих транскрипционных факторов и, возможно, других белков. Кроме того, известны домены, схожие с CNBD по строению и, вероятно, по функционированию.

Создание модели цАМФ-индуцированных конформационных переходов CNBD R-субъединицы дает возможность: 1) тестировать *in silico* потенциальные агонисты и антагонисты ПККА I α ; 2) предположить механизм участия R-субъединицы в контроле функционирования не родственных ПККА белков; 3) понять в первом приближении конформационные изменения других CNBD и родственных им доменов; 4) получить новые данные о путях конформационных переходов белков, в частности о формировании промежуточных нестабильных состояний.

Моделирование перехода А-домена R-субъединицы из Н- в В-конформацию проводилось методом молекулярной динамики с использованием пакета программ NAMD 2.8. Использовалось водное окружение с периодическими граничными условиями и силовое поле CHARMM27. Пространственная структура А-домена R-субъединицы (а.о. 118–242) в Н-конформации была взята из PDB под номером 3PVB. цАМФ в связывающий сайт помещался методом докинга. Получившийся лиганд-белковый комплекс являлся

исходной структурой для последующих расчетов. Нами была разработана следующая методика, позволяющая воспроизводимо получать переход А-домена из Н- в В-конформацию. На первом этапе в течение 10 нс система моделировалась без использования термостата и баростата, кинетическая температура при этом составляла 350 К. На втором этапе продолжительностью 5-10 нс моделирование проводилось методом ускоренной молекулярной динамики, предложенным Hamelberg D. et al., при постоянной температуре 350 К, поддерживаемой динамикой Ланжевена. На третьем этапе температура системы снижалась с 350 до 310 К в течение 20 – 40 нс.

В результате была построена модель конформационного перехода А-домена, представляющая собой последовательность разрывов и образований взаимодействий между группами аминокислотных остатков. Важно, что большинство этих взаимодействий носят преимущественно ван-дер-ваальсов характер, а следовательно, их трудно выявить путем внедрения в белок точечных мутаций.

Сравнительно небольшое суммарное время моделирования и малый размер А-домена делают разработанную модель удобной для тестирования потенциальных агонистов и антагонистов ПКА I α in silico.

Все расчеты проводились на кластере Т-платформы СПбГУ и на кластере СПб Филиала МСЦ РАН (<http://scc.ioffe.ru/>)

Работа поддержана грантом 2010 г. для студентов, аспирантов вузов и академических институтов, расположенных на территории Санкт-Петербурга и грантами СПбГУ (проекты 11.37.141.2011 и 1.0.130.2010) и ФЦНП НК-541 (3).

РОГОЖИН В.В.

Якутская сельскохозяйственная академия, Якутск, Россия

ПЕРОКСИДАЗА КАК ГЕНЕРАТОР ВОДЫ В ЗЕРНОВКАХ ПШЕНИЦЫ

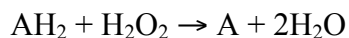
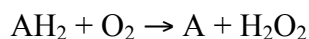
Семена растений, находящихся в состоянии вынужденного покоя, способны сохранять длительное время жизнеспособность. При этом влажность зерновок должна быть более 5%, что позволяет поддерживать нормальное дыхание клеток и сохранять высокую активность окислительно-восстановительных ферментов, в частности,

пероксидазы (ПО). Фермент входит в состав антиоксидантной системы (АОС) живых организмов. Высокая активность фермента и широкая субстратная специфичность, свидетельствует о ее разнообразной функциональной деятельности в клетках растений. Пероксидаза способна катализировать реакции оксидазного, пероксидазного и оксигеназного окисления. Субстратами пероксидазы могут быть антиоксиданты, в частности, дигидрокверцетин, кверцетин и аскорбиновая кислота. Последняя способна окисляться как в оксидазных, так и пероксидазных реакциях, катализируемых пероксидазой. Регулировать протекание этих реакций могут стероидные гликозиды, которые хотя и не являются субстратами фермента, но оказывают влияние на скорость окисления медленно окисляемых субстратов, превращая их в быстро окисляемые. Поэтому было изучено содержание СГ и АК в зародыше и эндосперме зерновок ячменя и пшеницы сорта Якутянка 224. Показано, что в эндосперме зерновок ячменя со всхожестью 76% СГ и АК содержится больше на 30 и 37% соответственно, чем в зародыше. Тогда как в эндосперме зерновок пшеницы с лабораторной всхожестью 28%, но высокой жизнеспособностью (86%) стероидов содержится на 20, а АК на 30% меньше, чем в зародыше. Эти изменения служат подтверждением того, что содержание и состав функционально активных соединений эндосперма может оказывать влияния на интенсивность метаболических процессов в зародыше. Понижение концентрации СГ и АК в эндосперме приводит к замедлению процессов деления и роста клеток зародыша.

Подтверждением участия АК в регулировании покоя зерновок является выполненное нами исследование эндогенного содержания АК в зерновках пшеницы до и после замачивания их в воде. Показано, что содержание АК в непроросших зерновках пшеницы на протяжении всего срока прорастания сохраняется на достаточно высоком уровне и в 1,5-1,8 раз выше, чем в сухих зерновках. Отмечается явная тенденция к понижению содержания АК в проросших зерновках и в проростках пшеницы по сравнению с уровнем этих антиоксидантов в непроросших зерновках. На четвертые сутки прорастания в надземной части и корнях проростков пшеницы уровень АК понижается в 4 раза. Эти изменения в содержании АК могут служить подтверждением участия эндогенных антиоксидантов в формировании механизмов покоя зерновок пшеницы. Еще одним доказательством участия АО в формировании механизмов покоя у зерновок пшеницы могут служить данные о пребывании зерновок в условиях повышенной

влажности. Так, пребывание зерновок пшеницы в течение 1-4-х суток в воде или растворах этанола и строфантина G приводит к резкому понижению их всхожести до 9-22%. При этом в зернах отмечается повышение содержания АО в 1,7-2,2 раза, с одновременным понижением пероксидазной активности на 28-36%. Предварительное УФ-облучение зерновок пшеницы провоцирует в них протекание свободно-радикальных процессов, поэтому в ответ на действующий фактор в зерновках содержание АО может возрасти в 2-3 раза, особенно это проявляется после 15 мин УФ облучения. Полученные данные свидетельствуют о том, что пероксидаза способна выполнять роль инициатора процессов прорастания зерновок, поскольку для углубления покоя зерновок требуется понижение пероксидазной активности, что, по-видимому, достигается за счет увеличения содержания АО. Эти данные наглядно показывают взаимосвязь между пероксидазной активностью и содержанием АО при реализации механизмов формирования покоя зерновок.

Таким образом, нами установлено, что пероксидаза может участвовать в поддержании жизнеспособности зерновок злаковых культур, находящихся в состоянии вынужденного покоя и испытывающих в этот период недостаток экзогенной воды. Фермент способен катализировать реакции последовательного восстановления кислорода до воды и за счет этого восполняя потребности зародыша в воде.



Однако для реализации этой функции в каталитическом процессе расходуется пластический материал клеток растений. Поэтому в реакциях восстановления кислорода могут использоваться различные органические соединения, реализуя возможности широкой субстратной специфичности пероксидазы. Кроме того, пероксидаза может участвовать в иницировании дыхания в начальный период прорастания зерновок, когда энергетические возможности зерновок резко понижены, что подтверждается наличием корреляции активности фермента со всхожестью зерновок.

РОГОЖИН Ю.В., РОГОЖИН В.В.

Якутская государственная сельскохозяйственная академия, Якутск, Россия

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОНО-, ДИ- И ТРИКОМПОНЕНТНЫЕ РАСТВОРЫ ДЛЯ КОНСЕРВАЦИИ ЗЕЛЕННОЙ МАССЫ

Развитие животноводства в Республике Саха (Якутия) неразрывно связано с ростом производства кормов, улучшением их качества производства и хранения. Для решения этих проблем разработана республиканская программа развития животноводства, согласно которой должны быть решены задачи по снижению потерь при заготовке и хранении кормов, повышению содержания в них биологически активных веществ, которые наиболее подвержены быстрому разрушению при длительном и неудовлетворительном хранении.

В настоящее время потери питательных веществ в процессе уборки, консервировании и длительном хранении кормовых растений могут достигать 30-80%. Поэтому получаемые корма не всегда имеют достаточно высокое качество. Для снижения потери кормов, значительного повышения их качества и эффективности использования разрабатываются различные методы консервирования.

Для консервации зеленой массы нами были использованы моно-, ди- и трикомпонентные растворы, в состав которых входили этанол, ацетальдегид и уксусная кислота. Эти соединения относятся к основным метаболитам клеток и при поступлении в организм животных в остаточных количествах вместе с кормом способны быстро утилизироваться, являясь дополнительными пищевыми субстратами и стабилизаторами уровня обмена гомеостаза организма животных. Уксусная кислота в живых организмах может образовываться в результате реакций последовательного превращения этанола и ацетальдегида, которые катализируются при участии алкоголь- и альдегиддегидрогеназ.

Малая токсичность и высокая летучесть, используемых для консервации зеленой массы использованных нами органических соединений, позволяет использовать их в относительно больших количествах без опасения вызвать интоксикацию.

Ацетальдегид является эффективным консервантом живых тканей и применяется в медицине при трансплантации органов, для консервации костной ткани. При необходимости полного удаления ацетальдегида из консервированной зеленой массы можно добиться путем выдерживания ее при 23°C на воздухе в течение 0,5-1,0 часа.

Консервацию зеленой массы проводили в целлофановых мешках, куда с помощью пульверизатора подавали вещества. В случае использования сложных смесей, смешивание реагентов проводилось непосредственно перед началом консервации. Консервирующие растворы вводили в количестве 5 л на 1000 кг зеленой массы.

Индивидуальное использование ацетальдегида, уксусной кислоты и этанола позволило проявить их консервирующее действие на зеленую массу. При этом в течение всего срока хранения температура среды была на 6-11°C ниже контроля.

Двухкомпонентные смеси консервантов так же обладали консервирующим действием, обеспечивая высокую сохранность белков и глюкозы в зеленой массе. Однако средняя температура среды понижалась всего на 4-8°C.

Трехкомпонентные смеси, хотя и обладали выраженным консервирующим эффектом, но средняя температура среды при этом понижалась всего на 1,5-2,0°C.

Изучая качественные показатели зеленой массы в процессе консервирования, было выявлено, что выраженным консервирующим действием обладает ацетальдегид, использование которого позволяет сохранить первоначальную окраску зеленой массы, тогда как остальные консерванты, хотя и подавляли развитие плесени и сохранности основных питательных соединений, но при их использовании зеленая масса приобретала бурую окраску. Растворы ацетальдегида и смеси ацетальдегида с уксусной кислотой и этанолом могут обеспечить длительную сохранность обработанной зеленой массы, на срок более одного года. Оптимальный состав консервирующей смеси, мас. %: ацетальдегид 25,0-35,0; уксусная кислота 25,0-35,0; этанол 25,0-35,0. Использование данной смеси обеспечивает длительную сохранность структуры консервированной зеленой массы и pH среды консервирования. Однако только добавление уксусной кислоты несколько снижает pH консервированной зеленой массы.

Таким образом, использование органических соединений (ацетальдегида, уксусной кислоты и этанола) для консервирования зеленой массы повышенной влажности позволяет лучше сохранить в ней основные питательные вещества, предотвратить развитие плесени и гниения, подавляя жизнедеятельность микроорганизмов и предотвращая согревание консервированной массы. Кроме того, предлагаемые соединения могут быть использованы как дополнительные питательные вещества для животных.

РОГОЖИНА Т.В.

Якутская сельскохозяйственная академия, Якутск, Россия

ГЛИЦЕРИН КАК ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЙ КОНСЕРВАНТ БИОГЕННЫХ ТКАНЕЙ

Республика Саха (Якутия) относится к регионам с богатыми природными ресурсами. Особенно широкие возможности открываются в области освоения возобновимых, но исчерпаемых природных ресурсов, к которым относятся уникальные животные и растения республики. Использование этих природных ресурсов позволило бы развивать интегрированные сектора экономики, внедряя последние достижения науки. Для освоения природных ресурсов республики необходимо обратить пристальное внимание не только на создание и развитие производственной базы, но и на освоение современных приемов и методов переработки сырья, с возможностью создания безотходных высокотехнологичных комплексов, ориентированных на производство высокотехнологичной, конкурентоспособной продукции.

Высокую ценность имеют влажные и сухие панты (неокостеневшие рога) северного оленя, которые являются природным сырьем для получения продукции в высокотехнологичном производстве. После срезки панты должны как можно быстрее подвергнуты технической переработке, с целью извлечения из них максимального количества биологически активных веществ. В случае, если это невозможно сразу сделать, то панты обычно консервируют, используя для этого различные способы, которые включают термическую обработку пантов при температуре 70-95°C, использование химических консервантов, хранение при низкой температуре и др. В связи с непродолжительным сроком хранения пантов (при температуре выше +5°C в течение 3-5 дней), они должны быть подвергнуты технологической переработке. Для этого панты сушат при температуре 60-70°C. Более высокая температура сушки способствует разрушению биологически активных веществ, понижая фармацевтическую ценность сырья. В результате сушки масса пантов может понижаться на 20-60%.

Поэтому цель наших исследований – получение высокоэффективного, простого в употреблении, экономичного в эксплуатации консерванта пантов оленя, который являлся бы метаболитом клеток животных тканей и соответственно не обладал токсичностью, но в

высоких концентрациях полностью подавлял процессы гниения, увеличивая за счет этого сроки хранения свежесрезанных пантов, с сохранением повышенной биологической активности.

Для решения поставленной задачи в качестве консерванта нами предлагается использовать водные растворы глицерина, различной концентрации.

Глицерин активно поглощает влагу из воздуха (до 40 г на 100 г раствора). Растворы глицерина имеют низкие температуры замерзания, в частности, при -20°C растворы с концентрацией выше 50% не замерзают. Обладая низкой температурой кипения (290°C), глицерин практически не испаряется в окружающую среду и поэтому может быть многократно использован с минимальными потерями массы вещества во время длительного использования. Благодаря наличию таких физических свойств глицерин можно долго хранить в негерметично закрывающихся емкостях.

Контрольные образцы пантов в отсутствие консерванта способны сохраняться при комнатной температуре только в течение 2-3 дней, тогда как наличие даже малых концентраций глицерина (20-40%) уже проявляет его консервирующее действие на биогенные ткани. Причем срок консервации пантов оленя зависел от их влажности. Наибольшее консервирующее действие малых доз глицерина наблюдалось для пантов третьего и четвертого сортов, влажность которых составляла ~42-54%.

При концентрации глицерина 50% и более отмечен выраженный консервирующий эффект, позволивший увеличить сроки хранения пантов оленя от 3-х до 11-ти месяцев. При этом максимальный срок хранения пантов оленя первого сорта в 70% растворе глицерина составил 5,9-7,3 месяцев, а пантов второго, третьего и четвертого сортов соответственно – 7,3-9,2, 8,2-10,4 и 9,2-11,6 месяцев.

Практически близкие значения в сроках консервации пантов первого сорта мы получили при использовании глицерина для хранения различного вида мясной продукции (оленина, говядина, конина, жеребятина). Эти виды мясной продукции преобладают на продовольственном рынке республики Саха (Якутия). Близость полученных результатов обусловлено тем, что влажность этих видов мяса незначительно отличалась от влажности свежесрезанных пантов первого сорта.

Таким образом, разработан метод консервации влажных пантов северного оленя с использованием растворов глицерина различных концентраций. При этом установлено, что

выраженным консервирующим эффектом обладают растворы глицерина с концентрацией выше 40%. Предложенный метод может быть широко использован в оленеводстве для длительного хранения пантов и мяса оленей, в особенности в северных улусах, где слабо развита транспортная сеть.

РОГОЖИНА Т.В., РОГОЖИН В.В.

Якутская сельскохозяйственная академия, Якутск, Россия

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЕРОКСИДАЗЫ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Пероксидаза катализирует реакции индивидуального и совместного окисления различных неорганических и органических соединений. Широкая субстратная специфичность пероксидазы, по-видимому, обусловлена возможностью реализации ферментом нескольких различных каналов электронного транспорта с субстратов, контактирующих с поверхностью белковой глобулы, на железо гема. Причем субстраты пероксидазы можно поделить на две группы: доноры электронов и доноры атома водорода.

Трифтазин, аминазин и тиопроперазин относятся к нейролептическим препаратам. Основной особенностью препаратов этой группы является их седативное, успокаивающее действие при аффективных расстройствах и состояниях возбуждения. Трифтазин по седативному эффекту более активен, чем аминазин, является одним из наиболее активных нейролептических средств.

Методами стационарной кинетики нами изучены реакции пероксидазного окисления трифтазина, аминазина и тиопроперазина в присутствии пероксидазы хрена. Показано, что фенотиазины являются медленно окисляемыми субстратами пероксидазы. В интервале рН 4,5-7,5 определены величины k_{cat} и K_m . Изучено совместное окисление фенотиозинов и *o*-дианизидина.

Тиопроперазин при рН 4,5-5,5, связываясь с фермент-субстратным комплексом ингибировал пероксидазу по антиконкурентному типу. При рН > 5,5 происходило последовательное окисление субстратов с преимущественным превращением

тиопроперазина. Трифтазин в исследованном диапазоне рН 4,5-7,5 не оказывал влияния на окисление *o*-дианизидина. Однако в этом диапазоне рН окисление *o*-дианизидина и аминазина протекает последовательно. Причем вначале преимущественно окисляется аминазин, а затем начинает окисляться *o*-дианизидин. Последовательность реакций, по-видимому, задается доступностью функциональных групп аминазина к каналам электронного транспорта активных центров окисленных форм пероксидазы. Реакции пероксидазного окисления трифтазина и тиопроперазина характеризуются низкими значениями каталитических констант 0,3-124 и 0,12-9,8 с⁻¹ соответственно, что позволяет отнести их к группе медленно окисляемых субстратов пероксидазы, таких как NADH и ферроцианид калия. Низкие константы скорости окисления фенотиозинов в первую очередь обусловлены тем, что их окисление пероксидом водорода, протекает по одноэлектронному механизму, аналогично окислению неорганических субстратов пероксидазы. Поэтому при совместном окислении *o*-дианизидина и различных фенотиозинов, фермент реализует различные пути переноса электрона с окисляемого субстрата, выбор которых определяется доступностью функциональных групп субстрата каналам переноса электронов на поверхности белковой глобулы. Среди изученных фенотиозинов расположение функциональных групп аминазина, обеспечивает его преимущественное пероксидазное окисление по сравнению с *o*-дианизидином. При этом вначале полностью окисляется аминазин, а уж затем протекает реакция пероксидазного окисления *o*-дианизидина. В кислых рН тиопроперазин и *o*-дианизидин могут одновременно связываться в активном центре пероксидазы. Причем связывание тиопроперазина улучшает последующее связывание *o*-дианизидина, но замедляет скорость его пероксидазного окисления, что проявляется в антиконкурентном типе ингибирования. При этом тиопроперазин связывается только с фермент-субстратным комплексом, и не связывается со свободным ферментом. С возрастанием рН происходит депротонирование одной из функциональных групп активного центра фермента и это способствует переключению механизма переноса электронов с донора водорода *o*-дианизидина, на преимущественное окисление донора электронов - тиопроперазин. Противоположный эффект возникает при совместном окислении *o*-дианизидина и трифтазина. Последний возможно и связывается в активном центре фермента, однако его окисление не происходит, поскольку реализуется механизм окисления донора водорода - *o*-дианизидина.

Значение выявленных особенностей пероксидазного окисления фенотиазинов позволяет высказать предположения о возможных сроках нахождения фенотиазинов в организме человека, а также дать предположительную оценку эффективности их действия. Среди изученных фенотиазинов выраженное седативное действие трифтазина можно объяснить за счет того, что поскольку он в присутствии быстро окисляемого субстрата не окисляется пероксидазой, то он должен дольше сохранять свое функциональное действие. Быстрее всех в организме может окисляться аминазин и его действие должно быть за счет этого не продолжительным.

РОДИОНОВ Ю.В.

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

ВЛИЯНИЕ НОВОКАИНА НА СОКРАТИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ТРАХЕИ И БРОНХОВ КРЫСЫ И МОРСКОЙ СВИНКИ

В настоящее время хорошо изучены противовоспалительные свойства кортикостероидов, но не механизмы их дилатационного эффекта. В данной работе рассматривается эффект преднизолон на бронхи здоровых крыс и морских свинок, отличающиеся различной иннервацией. опыты проводили на изолированных препаратах бронхов, которые помещали в термостатируемую камеру ($T=37\pm 0,5^{\circ}$ C) с проточным физиологическим раствором. В опытах применяли новокаин в концентрации 1 мкг/мл, который перфузировали через камеру вместо физиологического раствора, и преднизолон в дозе 0,1, 1, 100 и 1000 мкг, который апплицировали в камеру. Концентрация новокаина подбиралась таким образом, чтобы заблокировать рецепторы, не оказывая существенного влияния на медиаторное звено и проведение нервных импульсов по нервам, которое определялось по изменению сократительной активности гладкой мышцы дыхательных путей. При стимуляции преганглионарных нервов частота стимулов составляла 8 стим/с, длительность – 0,5 мсек, амплитуда 20 В, продолжительность стимуляции – 10 с. При стимуляции мышцы частота стимулов составляла 30 стим/с, длительность – 2 мсек, амплитуда 20 В, продолжительность стимуляции – 10 с. Время между стимуляциями

составляло 2,5 мин. При стимуляции преганглионарных нервов различные дозы преднизолона линейно увеличивали сократительные ответы гладкой мышцы бронхов крыс с $79,7 \pm 3,4\%$ (0,1 мкг) до $100,7 \pm 3,3\%$ (1000 мкг) в ряду 0,1–1–100–1000 мкг преднизолона, и достоверно не изменяли ответы бронхов морских свинок. При стимуляции мышцы бронхов крысы сокращение под действием различных доз преднизолона увеличивалось с $86,7 \pm 1,8\%$ (0,1 мкг) до $103,4 \pm 1,4\%$ (1000 мкг), а бронхов морской свинки – с $96,8 \pm 3,7\%$ (0,1 мкг) до $109,6 \pm 3,7\%$ (1000 мкг). Местный анестетик новокаин в концентрации 1 мкг/мл при стимуляции преганглионарных нервов снижал амплитуду сокращения на препаратах бронхов крысы до $86,5 \pm 4,2\%$, а морской свинки – до $89,6 \pm 2,3\%$. При совместном действии новокаина и преднизолона на бронхи крыс при стимуляции нерва 0,1 мкг глюкокортикоида вызвали снижение ответа до $81,0 \pm 5,2\%$, 1 мкг и 1000 мкг достоверно не изменяли величины сокращения, а 1000 мкг – увеличивали до $108,9 \pm 3,6\%$. На бронхах морских свинок 0,1 мкг и 1 мкг преднизолона на фоне новокаина достоверно не изменяли величины сокращения, 100 мкг - снижали до $83,2 \pm 4,6\%$, а 1000 мкг – до $81,6 \pm 3,7\%$. Заключение, что действие преднизолона на бронхи крысы и морской свинки отличается, и это может быть связано с разным количеством С-волокон, через которые в основном и действует преднизолон. На бронхах крысы блокада рецепторов новокаином приводила к уменьшению дилатационного эффекта преднизолона, а на бронхах морской свинки полностью снимала этот эффект.

РОМАНОВА И. В., ПЕТРОВСКАЯ Л.Е., ШИНГАРОВА Л.Н., ДОЛГИХ Д.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия

ПОЛУЧЕНИЕ И АНАЛИЗ КОМБИНАТОРНОЙ БИБЛИОТЕКИ ВАРИАНТОВ ДОМЕНА ФИБРОНЕКТИНА

Фактор некроза опухолей-альфа человека (ФНО) представляет собой гомотример с молекулярной массой около 51 кДа, относится к группе цитокинов и является эндогенным медиатором воспалительной реакции организма. Высокие концентрации ФНО обнаруживаются при инфицировании организма патогенными вирусами, бактериями и при

паразитарных инвазиях. Кроме того, доказано участие ФНО в патогенезе септического шока, ревматоидного артрита, болезни Бехтерева и реакции отторжения трансплантатов.

Для лечения сложных патологических состояний необходимо разработать новые генно-инженерные препараты ингибиторов ФНО, блокирующие биологическую активность этого цитокина. 10 домен фибронектина III типа (домен фибронектина, Fn3) является структурным аналогом переменного домена тяжелой цепи иммуноглобулинов. Изменение последовательностей аминокислот в трех петлевых участках Fn3, соответствующих CDR в молекулах антител, придают таким мутантным белкам способность связывать разные антигены.

Нами была получена библиотека кодирующих последовательностей домена фибронектина, в которых последовательности, соответствующие участкам петель BC, DE и FG были рандомизированы. Синтез переменных участков гена Fn3 проводился с использованием тримерных синтетических блоков, что позволило избежать появления стоп-кодонов. При помощи метода бесклеточного CIS-дисплея был проведен скрининг библиотеки для поиска вариантов, связывающих ФНО. Белки, обнаружившие наибольшую связывающую способность, были экспрессированы в клетках *E. coli* и охарактеризованы физико-химическими и иммунологическими методами. Показано, что сконструированные нами белки специфически взаимодействуют с ФНО в ELISA и Вестерн-блоте.

В результате проделанной работы сконструирована комбинаторная библиотека вариантов домена фибронектина, которая в дальнейшем может быть использована для получения рекомбинантных белков, связывающих различные лиганды..

Благодарности. Работа проводится при финансовой поддержке гранта НШ-5597.2012.4, программы РАН «Молекулярная и клеточная биология» и федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 - 2013 г.

РОМАНОВА М.А., МУРЛАЕВА Е.В., ДОЛОТКАЗИНА А.В.,

АТЫКЯН Н.А., РЕВИН В.В.

ФГБОУВПО Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарёва,

Саранск, Россия

ИЗУЧЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ДРОЖЖЕЙ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА СРЕДЕ С ПОВЫШЕННЫМ ОСМОТИЧЕСКИМ ДАВЛЕНИЕМ

В условиях современного спиртового производства актуально внедрение интенсивной технологии высококонцентрированного сбраживания, сущность которой состоит в том, что зерновое сусло с концентрацией сухих веществ 22-35 % сбраживается дрожжами, обладающими высокой осмофильностью. Использование этого способа позволяет увеличить мощность действующих заводов на 25-50%, а также существенно экономить топливно-энергетические ресурсы. Кроме того, сбраживание концентрированных сред способствует снижению выхода послеспиртовой барды - одного из вторичных продуктов спиртового брожения.

Высококонцентрированное сусло относится к труднображиваемым средам из-за повышенного осмотического давления, отрицательно влияющего на жизнедеятельность дрожжей, и высокого уровня алкоголя. Для ассимиляции питательных веществ среды внутриклеточное давление в дрожжевой клетке должно быть выше, чем осмотическое давление среды. От разности осмотического давления в клетке и в сусле зависит скорость роста дрожжей, плотность дрожжевой популяции, бродительная активность, продуктивность и жизнеспособность дрожжей. Эти факторы физиологического состояния дрожжевой культуры оказывают существенное влияние на стабильное протекание процесса брожения, скорость сбраживания сырья и выход целевого продукта.

Целью работы был анализ и сравнение жизнеспособности дрожжевых клеток при культивировании на среде с повышенным осмотическим давлением. Объектами исследования выступали сухие дрожжи Ethanol Red, Safdistil C-70 (*Франция*). В качестве среды использовали фильтрат зернового сусла с концентрацией растворимых веществ 15, 20, 33%. Изучение состояния дрожжей проводили на анализаторе жизнеспособности клеток Vi-CELL XR (*Beckman Coulter, США*). Культивирование и определение жизнеспособности дрожжей проводили каждые 24 часа в течение 72 часов.

В ходе эксперимента установлено, что жизнеспособность расы Ethanol Red выше, чем у расы Safdistil C-70. Так, жизнеспособность расы Ethanol Red увеличивалась с 87 до 98% на 72 час культивирования на фильтрате с концентрацией растворимых веществ 15 и 20%. Жизнеспособность расы Safdistil C-70 при равных условиях увеличилась в интервале от 72 до 87%. Определение жизнеспособности при культивировании на фильтрате суслу с концентрацией растворимых веществ 33% дало снижение показателя. Жизнеспособность расы Ethanol Red на 24 час составила 67% к исходным 87%, к 72 часу показатель составил 78%. Жизнеспособность расы Safdistil C-70 на 24 час составила 48% к исходным 72%, к 72 часу показатель составил 65%.

РУКАВЦОВА Е.Б., ПУЧКО Е.Н., РУДЕНКО Н.В., БУРЬЯНОВ Я.И.

Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Пушино, Россия

ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОГЕННОСТИ ПОВЕРХНОСТНОГО АНТИГЕНА ВИРУСА ГЕПАТИТА В, СИНТЕЗИРУЕМОГО БЕЗМАРКЕРНЫМИ ТРАНСГЕННЫМИ РАСТЕНИЯМИ

Растения являются удобной, безопасной и экономически выгодной альтернативой для продукции различных белков, вакцин и антител по сравнению с системами экспрессии на основе микроорганизмов, культур животных клеток или трансгенных животных. За последние десятилетия в растениях синтезировано множество ценных белков — белки человеческой сыворотки, регуляторы роста, антитела, вакцины, промышленные ферменты, биополимеры и реагенты для молекулярной биологии. Растительные клетки имеют энзиматические системы посттрансляционной модификации, необходимые для сборки синтезируемых мономерных белков вакцины в иммуногенные мультимерные формы. В растениях можно осуществить полноценный синтез целевых антигенов, способных вызывать активный иммунный ответ. Интенсивно разрабатывается концепция «съедобных вакцин» на основе трансгенных растений, чьи плоды, листья и семена годятся в пищу. При

этом отпадает потребность в дорогостоящей очистке антигенов, которая необходима для создания вакцин с парентеральным способом введения.

Целью данной работы явилось получение биобезопасных трансгенных растений нового поколения без селективных генов устойчивости к антибиотикам и гербицидам. Настоящее поколение трансгенных растений содержит в своем геноме гены устойчивости к антибиотикам и гербицидам, которые представляют потенциальную опасность из-за возможности их неконтролируемого переноса другим растениям или микроорганизмам. Разработаны различные подходы получения трансгенных растений без селективных маркеров. Однако в большинстве случаев эти методы являются достаточно трудоемкими и требуется значительное увеличение времени для отбора таких растений.

Для трансформации растений нами создана плазмида рВМ-Аg, содержащая ген поверхностного антигена вируса гепатита В (*HBsAg*) под контролем двойного промотора 35S РНК вируса мозаики цветной капусты CaMV 35SS без селективного гена устойчивости к канамицину *nptII*. С помощью разработанных методов агробактериальной инфильтрации различных эксплантов растений картофеля, томата и табака достигнуто повышение эффективности трансформации растений с 2 до 10-20%. Для отбора безмаркерных растений проведен скрининг трансформантов с помощью прямой количественной оценки синтеза продуктов целевых генов с использованием иммуноферментного анализа. При этом сокращается время отбора трансгенных растений и одновременно появляется возможность прямой детекции синтеза продукта целевого гена.

На лабораторных мышах проведены испытания иммуногенности клубней картофеля, синтезирующих поверхностный антиген вируса гепатита В. Показано значительное повышение уровня антител к *HBsAg* в сыворотке крови иммунизированных животных (до 140-185 мМЕ/мл), сохраняющееся в течение более года после начала иммунизации. До настоящего времени не существовало данных о мониторинге иммунитета к вирусу гепатита В такой продолжительности при использовании трансгенных растений в качестве съедобной вакцины. Полученные данные подтверждают перспективность использования безмаркерных растений в качестве безопасной субстанции для производства вакцины против гепатита В.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского Фонда фундаментальных исследований (грант № 11-08-00413).

РУКАВЦОВА Е.Б.¹, ЛАЗАРЕВА Н.В.², БУРЬЯНОВ Я.И.¹

¹Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института
биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова

Российской академии наук, Пущино, Россия

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

ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ С ГЕНОМ СТИЛЬБЕНСИНТАЗЫ ВИНОГРАДА

Целью наших исследований являлось получение трансгенных растений с геном стильбенсинтазы винограда – безопасных продуцентов резвератрола. Известно, что резвератрол является антиоксидантом и обладает противоопухолевым, антибактериальным и противовирусным действием, а также благотворно влияет на сердечно-сосудистую и нервную системы человека и обладает гепатопротекторными свойствами. Кроме того, синтез резвератрола в клетках растений может придавать им устойчивость к ряду фитопатогенов. Для клонирования выбран ген стильбенсинтазы *vinst1* винограда *Vitis vinifera* (GenBank AB046375.1). Ген стильбенсинтазы встроен в вектор для трансформации растений рSS под контроль конститутивного промотора 35S РНК вируса мозаики цветной капусты CaMV 35SS. Полученными рекомбинантными плазмидами трансформирован штамм агробактерий *Agrobacterium tumefaciens* CBE21 (pTiBo542). Эти агробактерии использовали для трансформации эксплантов растений и инфильтрации семян. Показано наличие гена *vinst1* в ДНК трансгенных растений табака. Проводится встраивание гена *vinst1* под контролем промотора CaMV 35SS в вектор рВМ для создания безмаркерных растений – продуцентов резвератрола. Отбор растений планируется проводить с помощью тестирования антимикробной активности, а также с помощью иммуноферментного анализа и вестерн-блот анализа.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского Фонда фундаментальных исследований (грант № 11-08-00413).

РУПОШЕВ А.Р.

*Учебно-методический центр сельскохозяйственного консультирования и
переподготовки кадров АПК, Москва, Россия*

АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ БИОЛОГИЧЕСКОГО СОРТОВЕДЕНИЯ РАСТЕНИЙ

Биологический сорт является одним из средств производства, определяющий количество и качество получаемой продукции и растительного сырья. Традиционное сортоведение растений является дисциплиной, занимающейся изучением сортов в таксономическом плане (помология, ампелография). Однако, как всякая отрасль знаний, сортоведение проходит свой исторический путь развития, на протяжении которого накапливаются новые и уплотняются имеющиеся знания. В науке существует понятие жизни сорта, в процессе которой он зарождается и погибает. Дальнейшее развитие понятия "жизнь сорта" и "сортоведения" получило в последние годы (Рупошев, Рупошева, 2000; Рупошев, 2012). Каждый сорт имеет свой жизненный цикл, который представляет упорядоченную систему последовательно протекающих явлений, и подразделяется на несколько возрастных этапов: создания, признания, освоения, использования и морального старения. Более правильно для сортоведения использовать названием "биологическое сортоведение", так как существует "товароведческое сортоведение". По нашему определению биологическое сортоведение - это комплекс мероприятий, связанных с жизнедеятельностью сорта от момента его зарождения до физической гибели, точнее до его исторической гибели, и охватывает 2 периода в жизненном цикле сорта: научно-технический (распространяется на селекционное и историческое сортоведение) и производственный.

Научно обоснованная система сортоведения включает в себя селекционное и производственное сортоведение. При этом первое охватывает весь селекционный процесс и признание селекционного достижения как объекта правовой охраны, а второе распространяется на всю технологическую цепочку производства растительной продукции. Сортоведение отдельных культур причисляется к частному сортоведению и основывается на положениях общего сортоведения растений. К селекционному сортоведению относится селекция, сортоиспытание, сортография (помология), первичное семеноводство, поддерживающая и восстанавливающая селекция, сохранение

генетической плазмы сорта и т.п. В настоящее время эти отрасли стоят обособленно друг от друга, что создает трудности в работе с сортами, как с селекционными достижениями. До сих пор остаются не проработанными в научном плане организационно-технологические аспекты биологического сортоведения.

Производственное сортоведение является отраслью науки и производственной деятельностью. В жизненном цикле сорта оно следует за селекционным сортоведением и включает в себя комплекс мероприятий по размножению, распространению, использованию и сохранению сорта в производстве. Сохранение сортов в производстве имеет дело с сортовой типичностью, сортовой чистотой, сортовым контролем, сортообновлением. Не соблюдение системы сортоведения в производстве приводит к снижению хозяйственной ценности возделываемых сортов. Цель и задача производственного сортоведения заключается в эффективном применении сортов для получения растительного сырья и их сохранения при использовании в производстве (семеноводство, сортовая метеорология и агротехника, сортосмена и т.п.).

Различия в продолжительности жизни сортов обусловлены их хозяйственными достоинствами и генетической стабильностью. При эксплуатации сортов отмечается снижение качества растительного сырья при сохранении чистосортности материала. Чем старше сорт, тем ниже качество продукции, которое происходит за счет накопления соматических мутаций и длительно живущих модификаций (Рупошев, 1987), и тем тщательнее должен соблюдаться комплекс мероприятий по сохранению сортов в производстве. Несоблюдение его приводит к понижению хозяйственной ценности возделываемых сортов.

Разрыв технологической цепи между селекционным и производственным сортоведением создает определенные трудности при работе с сортами. Осознание необходимости и возможности управления сортоведением как сложной системой, объединяющей науку и производство, приведёт к становлению биологического сортоведения как раздела науки отрасли производства, и придаст сорту надлежащее места в производственном процессе. Биологическое сортоведение- это система, охватывающая большой объем явлений и процессов, и чем на более длительный период жизнедеятельности сорта оно распространяется, тем больше связей и фактов необходимо учитывать при этом. Становление биологического сортоведения должно проявиться в

придании сорту надлежащего места в производственном процессе и переходу к возделыванию, переработке и использованию растительной продукции и сырья на сортоведческих принципах.

РЫБНИКОВА Е.И., КОВАЛЕВ Н.Н.

*Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр,
Владивосток, Россия*

БАКТЕРИОСТАТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭКСТРАКТА ИЗ КУКУМАРИИ ЯПОНСКОЙ

В работе приводится анализ экспериментальных исследований бактериостатического действия фарша мускульных тканей кукумарии японской и их спиртового экстракта при использовании в качестве пищевых добавок в производстве мясных фаршевых изделий.

Современная система торговли, при которой продукты питания, в том числе скоропортящиеся, транспортируются на большие расстояния, вынуждает производителей искать различные способы сохранения высоких потребительских свойств продуктов, а так же увеличения сроков их хранения. Среди них наиболее эффективным и легкоприменимым является поиск пищевых добавок, сохраняющих качественные и санитарные показатели продукта на протяжении установленного производителем срока хранения. В настоящее время достаточно широкое распространение получили добавки из гидробионтов (в том числе БАД), а так же использование вышеупомянутых добавок в составе мясных продуктов. Существует множество способов, позволяющих продлить сроки хранения вареных колбас и сосисок. В большинстве своем – это внесение консервантов, на основе органических кислот. К недостаткам вышеупомянутых добавок можно отнести отрицательное влияние на качество готового продукта (накопление потенциально опасных компонентов, кислый привкус, изменение вкуса самого продукта и др.), при этом, не значительно увеличивая сроки хранения.

Целью данной работы являлось исследование влияния спиртового экстракта фарша из мышечной ткани кукумари японской на микрофлору и сроки хранения сосисок в проницаемой оболочке «Амилюкс».

Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что контрольный образец (без каких либо консервирующих добавок) выдержал 7 суток хранения при температуре 0-6°C, когда общее микробное число (МАФАНМ) совпадает с допустимым требованиям нормативной документации. Добавление спиртового экстракта кукумари, в количестве 1 мл на 100 г фарша, явилось причиной приостановления роста общего количества бактерий, что отмечается в течение 12 суток хранения. В тоже время внесение в рецептуру фарша гомогената тканей кукумари, в количестве 1.8 г на 100 г фарша, способствовало продлению срока хранения готового изделия до 10 суток.

Проведено исследование биологической активности экстракта кукумари, в отношении чистых культур сапрофитных гнилостных бактерий, выделенных из сосисок, в среде Патерсона – Кука, содержащей 0,1% глюкозу, в течение 14 суток при температуре +6° С. ост бактерий определяли спектрофотометрически на приборе T70 UV/VIS Spectrometer PG Instruments Ltd (Англия) при длине волны 600 нм.

Исследование роста и размножения проводили только для гнилостных бактерий, разлагающих белковые субстраты, с выраженной протеолитической активностью. Всего выявлено 4 штамма сапрофитной гнилостной микрофлоры.

Результаты проведенных исследований показали, что спиртовой экстракт кукумари ингибировал рост гнилостных бактерий в 75% случаев во все сроки наблюдения.

Таким образом, проведенные исследования показали перспективность использования некоторых морских гидробионтов и спиртовых экстрактов из них в биотехнологии пищевых продуктов, и, их использования в качестве сырья для получения пищевых добавок бактериостатического действия.

РЯБОВА Н.А., МАРЧЕНКОВ В.В., МАРЧЕНКОВА С.Ю., КОТОВА Н.В.,
СЕЛИВАНОВА О.М., СЕМИСОТНОВ Г.В.

Институт белка Российской академии наук, Пущино, Россия

САМООРГАНИЗАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО ШАПЕРОНА GroEL/ES *IN VITRO*

Белки клеток *Escherichia coli* GroEL и GroES являются яркими представителями клеточных шаперонов, участвующих в обеспечении правильного сворачивания и сборки большого разнообразия белков, как синтезированных *de novo*, так и денатурированных вследствие клеточных стрессов. Вместе с тем, GroEL и GroES сами по себе являются сложными олигомерными белками, состоящими из 14 и 7 субъединиц соответственно. В этой связи, ответ на вопрос - как самоорганизуются сами шапероны? - приобретает особое значение.

В работе представлены результаты равновесных и кинетических исследований процессов денатурации и ренатурации GroEL и GroES рядом физико-химических методов, чувствительных к формированию различных уровней структурной организации белков (вторичной, третичной и четвертичной структурам). Показано, что приобретение ко-шапероном GroES нативной олигомерной структуры из полностью развернутого состояния происходит спонтанно и быстро (в секундном временном интервале). В противоположность, в отсутствие лигандов GroEL быстро сворачивается в глобулярную мономерную форму, а для сборки шаперона в нативную олигомерную структуру необходимо присутствие его лигандов (Mg-АДФ или Mg-АТФ) и повышенной ионной силы раствора (~0.2 М). Дополнительное присутствие ко-шаперона GroES существенно повышает скорость и эффективность сборки GroEL, особенно при его низких (менее 0.2 мг/мл) концентрациях.

Было установлено также, что сборка полной 14-субъединичной GroEL-частицы происходит через формирование метастабильного промежуточного олигомерного состояния, представляющего собой однокольцевую 7-субъединичную структуру. Это промежуточное состояние стабилизируется связыванием с ко-шапероном GroES или взаимодействием с другой такой же структурой с образованием полного тетрадекамера. Обсуждаются возможные механизмы межсубъединичных взаимодействий, приводящих к

формированию олигомерной структуры GroEL, и предлагается модель самоорганизации шаперона GroEL/ES *in vitro*.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 09-04-00768-а, гранта МКБ Президиума РАН и госконтракта «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» № 02.740.11.0295.

РЯЗАНЦЕВА И.Н., АНДРЕЕВА И.Н., ОГОРОДНИКОВА Т.И.

Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, Казань, Россия

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ПИГМЕНТЫ – ПЕРСПЕКТИВНЫЕ КРАСИТЕЛИ ПОЛИОЛЕФИНОВ

В последние десятилетия полимерные материалы широко применяются для изготовления товаров различного назначения. В основном для окрашивания полиолефинов в массу применяют органические соединения двух классов – пигменты и растворимые красители. В процессе изготовления изделий для окрашивания полимеров используют концентраты и суперконцентраты пигментов. Современные требования, предъявляемые к органическим пигментам, очень высоки и определяются основными критериями как особо тонкое распределение пигмента в материале-носителе, температурный диапазон переработки окрашиваемой композиции, высокая светостойкость композиции и др. Для органических пигментов предъявляются строгие экологические и полимер красящие требования.

Потенциал микроорганизмов как источник практически важных пигментов весьма велик. Биоразнообразие проявляется как в широкой цветовой гамме, так и в различной химической природе пигментов. Микробные пигменты, как принято считать, будучи природными соединениями оказывают меньшую нагрузку на окружающую среду.

В институте в течение нескольких лет разрабатывается приоритетная технология крашения полимеров бактериальными пигментными препаратами. Способ выделения из биомассы является принципиальным этапом для применения пигмента в технологии крашения полимеров.

Предложены методы выделения из биомассы двух микробных пигментов – красного и желтого, наиболее дорогостоящих пигментов из класса органических красителей. Продуцентом красного пигментного препарата продигиозина является *Serratia marcescens*, продуцентом желтого пигментного препарата сарцинаксантина – *Micrococcus luteus*. Процесс бактериального биосинтеза и экстракция пигментного препарата из биомассы включают значительно меньше технологических стадий и время ферментации составляет не более 52-56 часов. Бактериальные пигменты как соединения вторичного метаболизма синтезируются из интермедиатов и максимальная их концентрация достигается в период стационарной фазы роста и в дальнейшем они не метаболизируют.

Технология крашения полиэтилена, а также испытания окрашенных композиций (концентратов) согласно ТУ бактериальными пигментами красным и желтым проводились совместно с ОАО «Казаньоргсинтез» в ЦЛЮ объединения.

Разработан метод выделения из бактериальной биомассы пигментного препарата продигиозина ионным детергентом (ДДС-додецилсульфат натрия). Отработана концентрация ДДС для солубилизации биомассы и последующей экстракции пигмента этанолом.

На втором этапе разработки применены новые подходы крашения полиэтилена микробными пигментами методом вальцевания. В процессе вальцевания пигментные препараты (красный и желтый) применяли в виде концентрированной суспензии, что упрощает введение пигмента в окрашиваемый полимерный концентрат и способствует минимальному содержанию агломератов в полиэтиленовом полотне.

Количество продигиозина, необходимое для введения в полимер, на три порядка ниже (мг % мас), чем при крашении органическими красителями. Мировой рынок желтых пигментов реализует красители по высоким ценам из-за дороговизны сырья. Существенным преимуществом желтого пигментного препарата сарцинаксантина является его низкое содержание в концентрате до 0,1 % мас, по сравнению с Микроленом 3G желтым, концентрация которого составляет 4-10 % мас, в композициях – 0,2-0,6 % мас.

Таким образом, технология крашения полиолефинов бактериальными пигментами обеспечивает: 1. расширение сырьевой базы пигментов для полимеров отечественной разработки; 2. исключение затрат на многостадийный синтез молекулы пигмента; 3. более экономичный расход пигмента в крашении полиолефинов; 4. минимальное влияние на

технологические свойства полимера благодаря низкому содержанию пигмента в окрашенной композиции.

Технологическая разработка крашения полиолефинов бактериальными пигментными препаратами - продигиозином и сарцинаксантином защищена тремя патентами.

РОЗЕНФЕЛЬД М.А., ЛЕОНОВА В.Б., БЫЧКОВА А.В., КОВАРСКИЙ А.Л.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

ВЛИЯНИЕ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ НА СТРУКТУРНО- ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ФИБРИНОГЕНА

Свободные аминокислоты и аминокислотные остатки в белках способны подвергаться окислительной модификации под действием активных форм кислорода (АФК). АФК присутствуют в качестве примесей в атмосфере, образуются в результате метаболических процессов, а также формируются за счет радиации. Озон является одним из наиболее токсичных компонентов атмосферы, реагирующим непосредственно с целым рядом аминокислотных остатков в белках. Было показано, что окислительная модификация фибриногена, являющегося ключевым белком системы свертывания крови, под действием озона сопровождается изменениями в структуре и свойствах белка. Окислительная модификация фибриногена резко ускоряет процесс агрегации молекул белка в растворе; однако, механизмы самосборки кластеров из окисленных и неокисленных молекул белка являются полностью идентичными. В обоих случаях образуются гибкоцепные одноцепочечные полимеры, в которых мономерные молекулы взаимодействуют по типу «конец к концу»; при достижении критической длины такие полимеры сворачиваются в клубок и обладают тенденцией к агрегации. Методом ИК-спектроскопии было показано, что свободнорадикальное окисление аминокислотных остатков в полипептидных цепях фибриногена под действием озона сопровождается формированием карбонильных, гидроксильных и эфирных групп. Фибрин, полученный из окисленного фибриногена, характеризуется большим отношением среднemasсовой массы к

среднемассовой длине по сравнению с нативным фибрином. Данные, полученные методами упругого и динамического светорассеяния в сочетании с вискозиметрией и электрофорезом восстановленных образцов, демонстрируют значительное ускорение ферментативной реакции ковалентного сшивания молекул фибриногена под действием фибринстабилизирующего фактора (FXIIIa). Также было изучено свободнорадикальное окисление конечных продуктов плазминного гидролиза фибриногена – фрагментов *D* и *E*. Сравнение ИК-спектров, полученных для окислено-модифицированных фрагментов *D* и *E*, обнаружило более значительную трансформацию функциональных групп в случае *D* фрагмента. Методом ЭПР-спектроскопии исследованы времена вращательной корреляции спиновых меток, связанных с окисленными и неокисленными *D* и *E* фрагментами. Показано, что спиновые метки на окисленных белках характеризуются большей подвижностью. Более того, *D* фрагмент оказался наиболее чувствительным к свободнорадикальной модификации. По нашему мнению влияние озона и других АФК на аминокислотные остатки фибриногена и, в первую очередь, на циклические аминокислотные остатки как наиболее чувствительные к окислению затрагивает конформационное состояние *D* области фибриногена, вызывая в нем локальные перестройки, что, в свою очередь, обуславливает способность молекул фибриногена к самосборке и другим вышеуказанным эффектам. Согласно нашей рабочей гипотезе, трехмерная структура и химический состав белков свертывания крови предоставляет наиболее доступные и чувствительные области полипептидных цепей в качестве перехватчиков свободных радикалов при свободнорадикальной атаке. Этот механизм защищает ключевые центры, ответственные за основные функции белков.

САЖИНА Н.Н., МИСИН В.М.

Институт биохимической физики им. Н.М. Эммануэля РАН, Москва, Россия

КОНТРОЛЬ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ АЛКОГОЛЬНЫХ НАПИТКОВ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

С давних времен известно благотворное воздействие на здоровье человека сухих виноградных вин, коньяков и других качественных алкогольных напитков, конечно при

умеренном их потреблении. Это связано, в основном, с наличием в них природных антиоксидантов (АО), главными из которых являются полифенольные соединения. Полифенольные соединения винограда, в частности биофлавоноиды, играют ключевую роль в проявлении «Французского парадокса», заключающегося в том, что среди населения, регулярно потребляющего красные сухие виноградные вина, выявлена более низкая подверженность сердечно-сосудистым и онкологическим заболеваниям. Поэтому содержание полифенольных соединений в алкогольных напитках и их антиоксидантная активность являются важными показателями качества этих напитков.

В настоящей работе проведено исследование антиоксидантной активности более 100 образцов разных алкогольных напитков двумя оперативными электрохимическими методами: амперометрическим и вольтамперометрическим, и сделан анализ полученных результатов. Объектами исследования были сухие, полусухие, десертные, крепленые красные и белые вина, коньяки, ликеры, настойки, полученные от производителей на специализированной выставке в Москве в 2009 г.

Амперометрический метод, реализованный в приборе «Цвет Яуза-01-АА», позволяет определить суммарное содержание АО фенольного типа в исследуемых образцах. Сущность метода заключается в измерении электрического тока, возникающего при окислении исследуемого вещества на поверхности рабочего электрода при определенной величине потенциала (0 – 1,3 В). При этом происходит окисление природных фенольных антиоксидантов (R–ОН). Электрохимическое окисление, протекающее по схеме $R-OH \rightarrow R-O^{\cdot} + e^{-} + H^{+}$, может быть использовано как модельное при измерении активности поглощения свободных радикалов. Активность фенольных АО, степенью которой служит площадь под кривой тока окисления, определяется по калибровочной зависимости окисляемости галловой кислоты (ГК) от ее концентрации, т.е. в единицах содержания ГК. Погрешность измерения составила 10%, а время измерения одного образца -10-15 мин. Вольтамперометрический метод дает возможность измерить активность исследуемых образцов по отношению к кислороду и его радикалам. В качестве модельной реакции, лежащей в основе методики, используется процесс электровосстановления кислорода ЭВ O_2 на поверхности ртутно-пленочного электрода, а в качестве критерия АО активности исследуемых веществ принимается кинетический

критерий, отражающий количество кислорода и его радикалов, прореагировавших с АО за единицу времени.

Результаты проведенных измерений показали, что наиболее высокие значения суммарного содержания фенольных АО имеют сухие и полусухие красные вина (от 200 до 430 мг/л ГК), что примерно в 2-6 раза больше, чем сухие и полусухие белые вина. Красные полусладкие вина также доминируют по содержанию полифенолов в сравнении с белыми полусладкими винами и шампанским. Из крепленых вин лидируют «красные» портвейны и кагор. У коньяков, настоек и ликеров уровень содержания фенольных соединений оказался значительно ниже (20 – 80 мг/л ГК). На этом фоне резко отстают некоторые марки коньяков, настоек и ликеров, имеющих содержание полифенолов на уровне 4 – 6 мг/л ГК. Такие же незначительные показания регистрируются и для 40%-ного этанола. Относительно низкие значения показателей содержания фенольных АО в образцах этих напитков могут свидетельствовать о том, что они, возможно, являются фальсифицированными. Что касается суммарной активности АО алкогольных напитков к кислороду и его радикалам, то разные образцы демонстрируют различные механизмы влияния АО на процесс ЭВ O_2 и вид тока восстановления. Для всех красных и белых вин, включая портвейн и кагор, механизм действия полифенолов, содержащихся в них, происходит по типу классических фенольных соединений, а величина смещения потенциалов максимумов токов ЭВ O_2 увеличивается с ростом их содержания. Значения кинетического критерия повышаются с ростом суммарного содержания фенольных АО. Коэффициент корреляции между сопоставляемыми методами для 40 образцов сухих и полусухих красных вин составил 82%, а для 24 образцов белых вин – 91%. Что касается крепких спиртных напитков, то они демонстрируют другой характер тока ЭВ O_2 и механизм взаимодействия с кислородом и его радикалами. Какой-либо корреляции между содержанием фенольных АО и значениями кинетического критерия для них не наблюдалось. Вид кривой тока ЭВ O_2 для образцов, имеющих аномально низкие значения содержания фенольных АО, соответствовал кривой тока для 40%-го этанола. Это еще раз дает основание подозревать их фальсификацию.

Таким образом, электрохимические методы, использованные в настоящей работе, могут широко применяться для контроля качества вин и других алкогольных напитков.

САЗЫКИН И.С., САЗЫКИНА М.А.

НИИ биологии Южного федерального университета, Ростов-на-Дону, Россия

**КОМЕТАБОЛИЗМ СМОЛО-АСФАЛЬТЕНОВОЙ ФРАКЦИИ НЕФТИ
НЕКОТОРЫМИ ШТАММАМИ НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ В
ПРИСУТСТВИИ ГЕКСАДЕКАНА**

Задачей данной работы являлась количественная оценка кометаболизма тяжелых фракций нефти (для которых неизвестны ферментативные механизмы биodeградации) в присутствии и при отсутствии углеводов нефти, для которых хорошо изучены ферментные системы утилизации.

В качестве такого модельного углеводорода был взят гексадекан, так как он способен служить субстратом для роста большинства известных нефтеокисляющих микроорганизмов и метаболические пути его микробиологической утилизации хорошо изучены.

Тяжелые фракции нефти в данном исследовании были представлены смоло-асфальтеновой фракцией, выделенной при помощи осаждения пентаном из сырой нефти Октябрьского месторождения Ростовской области.

Нами была исследована утилизация смоло-асфальтеновой фракции в присутствии и при отсутствии гексадекана для 7 штаммов нефтеокисляющих микроорганизмов: *Achromobacter xylosoxidans* (штаммы 05, 07 и ВКПМ В-10344), *Acinetobacter calcoaceticus* (штаммы 06 и ВКПМ В-10353), *Bacillus subtilis* (штамм ВКПМ В-1895) и *Deinococcus radiodurans* ВКМ В-1422).

Определение степени биodeградации гексадекана и смоло-асфальтеновой фракции нефти проводили спектрофотометрическим и флюориметрическим методами. Количество нефтяных компонентов определялось по интенсивности оптических характеристик их элюатов после разделения фракций при помощи тонкослойной хроматографии.

В ходе проведенных исследований обнаружено, что присутствие гексадекана может как стимулировать, так и замедлять утилизацию смоло-асфальтеновой фракции исследованными штаммами нефтеокисляющих микроорганизмов.

В связи с двойственным отношением к присутствию гексадекана в среде культивирования исследованные штаммы рационально разделить на две группы: штаммы,

утилизирующие максимально доступное количество субстратов, и штаммы, переключающие свой метаболизм на потребление наиболее легко утилизируемого субстрата.

К первой группе мы можем отнести три из семи исследованных штаммов. Это в первую очередь два штамма *Acinetobacter calcoaceticus* (штаммы 06 и ВКПМ В-10353), а также штамм 05 *Achromobacter xylosoxidans*. Присутствие гексадекана в среде культивирования стимулирует биodeградацию смоло-асфальтеновой фракции штаммом 06 на 80,2%, а штаммом ВКПМ В-10353 на 29,9 %. Сильнее всего эффект кометаболизма выражен у 05 штамма *A. xylosoxidans*, который в присутствии гексадекана утилизирует в 3,4 раза большее количество смоло-асфальтеновой фракции, однако это происходит на фоне достаточно слабой общей биodeградации соединений нефти.

У второй группы микроорганизмов наблюдается выраженное уменьшение потребления смоло-асфальтеновой фракции в присутствии более легко метаболизируемого гексадекана. Так, у *A. xylosoxidans* ВКПМ В-10344 утилизация смоло-асфальтеновой фракции падает на 62,4 %, у *A. xylosoxidans* 07 - на 35,8%, у *B. subtilis* ВКПМ В-1895 на 42,2 % и *D. radiodurans* ВКМ В-1422 потребляет на 74,4 % (то есть почти в 4 раза) меньше смоло-асфальтеновой фракции.

Общая стратегия «поведения» живых организмов – в первую очередь, использовать легко доступный ресурс, к тому же имеющийся в бóльших количествах. Как же, исходя из этого постулата, объяснить повышение утилизации смоло-асфальтеновой фракции несколькими из исследованных штаммов нефтеокисляющих микроорганизмов? С точки зрения гипотезы свободнорадикального окисления соединений нефти нефтьдеградирующими микроорганизмами, предложенной нашей исследовательской группой, ситуация представляется вполне логичной: при утилизации гексадекана данными штаммами образуются активные формы кислорода (АФК), которые усиливают биodeградацию смоло-асфальтеновой фракции.

САЗЫКИН И.С., САЗЫКИНА М.А.

НИИ биологии Южного федерального университета, Ростов-на-Дону, Россия

ОКИСЛЕНИЕ СМОЛО-АСФАЛЬТЕНОВОЙ ФРАКЦИИ НЕФТИ И ГЕКСАДЕКАНА ПЕРОКСИДАЗОЙ ХРЕНА

Для субстратной специфичности многих пероксидаз характерно наличие субстратов, содержащих ароматические циклы. К таким пероксидазам относятся таксономически весьма разобщенные ферменты, представленные, например, пероксидазой хрена. В дополнение к пероксидазной, пероксидаза проявляет и оксигеназную активность.

Наличие у большого количества различных пероксидаз субстратов, несущих ароматические циклы, позволило нам с большой долей вероятности предположить, что субстратами пероксидаз будут являться смолы и асфальтены, содержащиеся в нефти.

Необходимо также отметить, что в результате окисления органических субстратов, некоторые пероксидазы образуют органические радикалы, которые сами способны участвовать в окислительных реакциях. В сумме эти свойства дают “инструмент” для биodeградации соединений нефти.

В качестве модельной пероксидазы была взята пероксидаза хрена в силу ее хорошей изученности и более легкой коммерческой доступности, по сравнению с другими пероксидазами. Тяжелые фракции нефти в данном исследовании были представлены смоло-асфальтеновой фракцией, выделенной при помощи осаждения пентаном из сырой нефти Октябрьского месторождения Ростовской области.

15 мл минеральной среды Ворошиловой-Диановой с добавлением 20 мкл гексадекана и/или 200 мкг смоло-асфальтеновой фракции нефти инкубировали в 50-мл конических колбах в шейкере-инкубаторе Biosan ES-20 в течение 7 суток при температуре 30°C и скорости вращения платформы 220 об/мин.

Нами была исследована утилизация смоло-асфальтеновой фракции (САФ) в присутствии четырех различных концентраций пероксида водорода (100 нМ, 1 мкМ, 10 мкМ и 100 мкМ). Во время инкубации в колбы ежедневно, через равные промежутки времени, вносили пероксидазу хрена в количестве 0,1 ед. активности для концентраций 100 нМ, 1 мкМ и 10 мкМ, и в количестве 1 ед. активности для концентрации 100 мкМ. Контролем служили колбы со средой Ворошиловой-Диановой с добавлением

аналогичного количества гексадекана и/или смоло-асфальтеновой фракции, в которые пероксид водорода и пероксидазу не вносили.

Определение степени биодegradации гексадекана и смоло-асфальтеновой фракции нефти проводили спектрофотометрическим и флюориметрическим методами. Количество компонентов нефти определялось по интенсивности оптических характеристик их элюатов после разделения фракций при помощи тонкослойной хроматографии.

Установлено, что деградация смоло-асфальтеновой фракции составила от 17,6 % до 32,9 %, причем оптимальное соотношение составило 10 мкМ пероксида водорода на 1 ед. активности пероксидазы. Необходимо отметить, что окислению пероксидазой были подвержены не только смолы и асфальтены, что было постулировано на основании данных литературы, но и представитель весьма инертных в химическом отношении алканов – гексадекан (до 4,5 %). Является ли окисление гексадекана результатом его непосредственного взаимодействия с пероксидазой хрена в качестве субстрата или процессов, связанных с образованием органических радикалов при окислении САФ – тема дальнейших исследований.

Таким образом, на основании данного исследования, можно сделать вывод об эффективности пероксидазы в качестве неспецифического механизма биодegradации соединений нефти с участием АФК.

САЗЫКИНА М.А., НОВИКОВА Е.М., САЗЫКИН И.С.

НИИ биологии Южного федерального университета, Ростов-на-Дону, Россия

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НОВОГО ВИДА БИОЛЮМИНЕСЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Актуальность проблемы поиска новых, высокоэффективных методов биотестирования окружающей среды опосредована возрастающими масштабами антропогенного загрязнения. При этом одним из трендов современной экологической токсикологии является использование для мониторинга токсичности среды видов, приспособленных к конкретным условиям обитания.

Vibrioaquamarinus sp. nov. VNB-15BKПМ В-11245 - новый вид биолюминесцирующих бактерий рода *Vibrio*, был выделен из воды Черного моря в районе п. Абрау-Дюрсо, Россия.

Была изучена чувствительность биолюминесценции данного штамма к действию следующих приоритетных токсикантов: ZnSO₄, CuSO₄, K₂Cr₂O₇, додецилсульфат натрия, фенол.

Для оценки чувствительности использовали характеристику EC₅₀ (effective concentration), под которой в данном случае понимается эффективный объем образца, вызывающий тушение свечения биосенсора на 50 % по сравнению с контролем.

Величина EC₅₀ составила:

- для ZnSO₄·7H₂O - 0,3 мг/л;
- для CuSO₄·5H₂O - 0,4 мг/л;
- для бихромата калия – 35 мг/л;
- для фенола – 225 мг/л;
- для додецилсульфата натрия - 10 мг/л.

Сравнение чувствительности *Vibrioaquamarinus* sp. nov. VNB-15BKПМ В-11245 к токсическим веществам с чувствительностью штамма *Ph. phosphoreum* (Cohn) Ford, который рекомендован для биотестирования воды на территории Украины; генноинженерного штамма на основе *E. coli* K12 TG1 *E. coli* («Эколюм»); а также с чувствительностью генноинженерного lux-штамма *E. coli* C600 (pPBA-5), показало, что природный штамм, исходя из значений величины EC₅₀, более чувствителен, чем данные контрольные тест-культуры.

Высокая чувствительность нового вида морских биолюминесцирующих бактерий позволяет говорить, что данный аборигенный штамм перспективен для создания на его основе тест-системы для оценки токсичности компонентов экосистем, в частности, Азово-Черноморского бассейна. Практическое ее использование даст возможность максимально быстрого получения объективной информации о состоянии экосистем.

Данные, полученные при помощи данного теста, могут быть использованы для идентификации вида и источника загрязнения, прогноза влияния антропогенного загрязнения среды на экосистемы, что будет способствовать повышению эффективности природоохранных мероприятий на акватории Азово-Черноморского бассейна.

САЗЫКИНА М.А.¹, ЧУГУНОВА Е.А.², САЗЫКИН И.С.¹,

ГИБАДУЛЛИНА Э.М.², БУРИЛОВ А.Р.²

¹*НИИ биологии Южного федерального университета, Ростов-на-Дону, Россия*

²*Учреждение Российской академии наук Институт органической и физической химии им. А.Е.*

Арбузова Казанского научного центра РАН, Казань, Россия

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРИ ПОМОЩИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ LUX-БИОСЕНСОРОВ

Сложность задач, стоящих перед современной фармакологией, приводит к необходимости проверки множества вариантов теоретически перспективного соединения. Необходимы экспресс-методы для выявления фармакологически ценных свойств (антиоксидантная, антимуtagenная, антимикробная активность и т.п.), для определения нужного диапазона концентраций с целью проведения дальнейших испытаний на животных и оценки риска побочных эффектов.

В нашей работе при помощи бактериальных lux-биосенсоров была изучена способность супрессировать генотоксические эффекты УФ-излучения с длиной волны 300-400 нм соединений, синтезированных на основе реакций 4,6-дихлоро-5-нитробензофуороксана с ароматическими аминами и ароматическими диаминами. С точки зрения медицинской и комбинаторной химии бензофуороксаны весьма привлекательны. Это эффективные биологически активные соединения, которые легко подвергаются функционализации, позволяют создавать библиотеки, из которых исследователь может извлечь информацию для создания препарата с необходимым селективным эффектом.

Было показано, что соединения на основе 4,6-дихлоро-5-нитробензофуороксана и ароматических аминов и диаминов защищают бактериальные клетки от деструктивных эффектов ультрафиолета с длиной волны 300-400 нм. Исходное вещество – 4,6-дихлоро-5-нитробензофуороксан, не обладает защитным эффектом, а замещение атома хлора на азотосодержащие фрагменты увеличивает протекторный потенциал.

Сопоставление результатов, полученных для различных бензофуороксанов, классического природного антиоксиданта α -токоферола (витамина Е) и синтетического антиоксиданта тролокса показало, что количественно бензофуороксаны проявляют аналогичный протекторный эффект, а соединение на основе 4,6-дихлоро-5-

нитробензофуроксана и этилендианилина обладает более высоким защитным потенциалом.

Таким образом, в результате проведенных исследований выявлено, что бензофуроксаны являются веществами, перспективными для создания высокоэффективных УФ-протекторных препаратов. А одним из перспективных методов тестирования в лекарственной токсикологии, который позволит при минимуме затрат получить информацию о механизмах биологической активности вновь синтезированных веществ, может стать биолюминесцентный анализ на основе бактериальных lux-биосенсоров, включающих детекторы повреждения ДНК, белков, мембранных структур, уровня свободнорадикальных процессов в клетке и неспецифической токсичности.

Использование целой серии специфических индуцируемых lux-биосенсоров даст возможность более детально оценить механизм действия новых лекарственных препаратов на клетку и определить молекулярную мишень в клетке, которая повреждается при его воздействии. Применение данной методологии на основе lux-биосенсоров обеспечит достаточно представительный интегральный отклик, моделирующий реакцию живого организма на воздействие новых лекарственных препаратов и позволит свести к минимуму использование животных в испытаниях лекарственных средств.

САЛОВА А.В., ЛЕОНТЬЕВА Е.А., МОЖЕНОК Т.П., КОРНИЛОВА Е.С.,
КРОЛЕНКО С.А., БЕЛЯЕВА Т.Н.

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ПРИМЕНЕНИЯ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

В настоящее время фундаментальные и прикладные исследования в области биологии и медицины все шире используют достижения современных нанотехнологий. Полупроводниковые флуоресцентные нанокристаллы – квантовые точки (КТ), первые технологии синтеза которых были предложены российскими учеными, широко применяются в различных исследованиях. КТ обладают рядом уникальных оптических свойств: ярким сигналом, обусловленным высоким квантовым выходом; узким и

симметричным спектром флуоресценции, максимум которого зависит от размера и состава КТ; широкой полосой возбуждения (от УФ до ближней инфракрасной области спектра); исключительной флоростабильностью. Эти свойства позволяют использовать одновременно КТ с разными максимумами флуоресценции и один источник возбуждения, что обеспечивает преимущества КТ для многоцветной флуоресцентной визуализации. Наиболее популярными в биологических исследованиях являются КТ, имеющие полупроводниковые CdSe-ядро и ZnS-оболочку, поскольку они флуоресцируют в видимой области спектра. Следует отметить, что в медицинских исследованиях часто используют флуоресцирующие в ближней инфракрасной области спектра CdTe/CdSe КТ, обеспечивающие неинвазивное оптическое выявление мишеней в глубине тканей.

КТ могут быть использованы для маркировки клеток в культуре и в целом организме, для визуализации сигнальных молекул, для исследования внутриклеточных процессов или в качестве маркеров, подтверждающих адресную доставку различных биологически активных веществ. Фотоустойчивость КТ позволяет проводить долговременные наблюдения, что может быть удобным для исследования движения различных молекул. КТ могут внести огромный вклад в биомедицинские исследования, особенно в качестве удобного инструмента для выявления опухолевых клеток, ранней диагностики и мониторинга опухолевых заболеваний. Во многих экспериментах для этой цели к КТ пришивают определенные лиганды для узнавания рецепторов, гиперэкспрессирующихся в опухолевых клетках. Необходимо понимать, что такое присоединение может вносить изменения в процессы, в которых участвуют лиганды, хотя бы потому, что размеры лиганд-КТ комплексов превосходят размеры лиганда.

Как известно, развитие многочисленных опухолей эпителиального происхождения, в частности, опухолей желудочно-кишечного тракта, коррелирует с гиперэкспрессией рецептора эпидермального фактора роста (ЭФР). В наших экспериментах мы провели сравнительное исследование проникновения в клетки ЭФР и ЭФР-КТ комплексов. Мы показали, что использование КТ в качестве метки ЭФР вызывает изменения в динамике эндоцитоза рецептора ЭФР: ЭФР-рецепторные комплексы обычно деградируют через 2–4 ч после поступления в клетку, а КТ выявляются в клетке через 24–48 ч. Однако основные стадии эндоцитоза ЭФР-КТ комплексов: взаимодействия с рецепторами, интернализация, слияние эндосом, их транспортировка по микротрубочкам и формирование

мультивезикулярных тел – не отличаются от этапов эндоцитоза, стимулированного ЭФР. Эти данные позволяют утверждать, что КТ могут быть успешно использованы в изучении процессов жизнедеятельности клеток при решении фундаментальных вопросов в биологии и медицине.

САЛОВАРОВА В.П., ЮРИНОВА Г.В., ПРИСТАВКА А.А., БЕРСЕНЕВА О.А.

Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

ИССЛЕДОВАНИЕ НАНОРАЗМЕРНЫХ СТРУКТУР, УЧАСТВУЮЩИХ В ФОРМИРОВАНИИ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

Биологические системы характеризуются высокой степенью специфичности взаимодействия, прежде всего на молекулярном уровне. Важной особенностью взаимодействия между биологическими системами является их регулируемость: под влиянием строго определенных факторов сила взаимодействия может усиливаться или ослабляться, что позволяет достаточно гибко регулировать протекание тех или иных процессов. Исследование молекулярных механизмов, определяющих специфичность взаимодействия, позволит не только лучше понять эволюционные и биохимические аспекты функционирования различных биологических систем, но и существенно расширит возможности моделирования наноконструкций, которые могут найти практическое применение в различных отраслях: медицине, сельском хозяйстве, обрабатывающей промышленности, экологии и т.д. На кафедре физико-химической биологии Иркутского государственного университета ведутся работы, непосредственно связанные с изучением различных типов взаимодействия в биологических системах.

Экологическая система, компонентами которой являются организм человека и микроорганизмы его населяющие, характеризуется единством и способностью к саморегуляции. Постоянство данной системы зависит от двух равноправных ее сочленов, находящихся в кооперативных взаимодействиях, обеспечивающих стабильность кишечной экосистемы, приживление аутохтонной (полезной) и элиминацию аллохтонной

(патогенной) микрофлоры. Однако молекулярные механизмы таких взаимодействий до настоящего времени окончательно не выяснены.

Основным способом повышения численности полезной микрофлоры (бифидобактерии, лактобактерии), в кишечнике человека является пероральное введение жизнеспособных клеток этих микроорганизмов, содержащихся в составе кисломолочных продуктов. Однако этот путь не всегда дает стабильное улучшение кишечной микрофлоры, поскольку экзогенные бифидобактерии не успевают закрепиться в кишечнике в условиях жесткой конкуренции за питательные субстраты и быстро вымываются после прекращения приема пробиотиков. Большое значение для коррекции микрофлоры кишечника имеют пищевые волокна, которые способствуют пролиферации и адсорбции бифидо- и лактобактерий в кишечнике. Растительные полисахариды - целлюлоза, пектины, гемицеллюлоза, - являются естественными энтеросорбентами и влияют на состав микробиоценоза.

Проведенные сотрудниками кафедры исследования показали более высокие показатели роста бифидобактерий в присутствии растворимого арабиногалактана. Нерастворимые полисахариды, поступая в толстую кишку, подвергаются воздействию специфических ферментов микроорганизмов, главными из которых являются целлюлазы. Существуют множественные формы целлюлаз, отличающиеся способностью сорбироваться на целлюлозе, что обусловлено наличием (или отсутствием) помимо каталитического домена целлюлозосвязывающего домена, который отвечает за прикрепление фермента к субстрату. Сотрудниками кафедры были достигнуты определенные успехи в области выделения ферментов, разлагающих растительные полимеры и условий энзиматической конверсии.

В ходе исследований была установлена положительная корреляция между степенью адсорбции фермента и его активностью по отношению к нативной целлюлозе. Чередование актов сорбции-десорбции определяет скорость протекания деструкции субстрата, причем, скорость лимитирующей стадией является десорбция фермента. Эксперименты, проведенные на изолированных сорбционных доменах, свидетельствуют о высоком значении константы адсорбции, причем даже при отсутствии каталитического центра, сорбционный домен способен разрушать кристаллическую структуру целлюлозы. Процесс ферментативного гидролиза гликозидных связей в молекуле целлюлозы изучен

достаточно хорошо, однако молекулярные механизмы, обуславливающие специфичность и прочность взаимодействия фермента с субстратом могут быть выяснены с привлечением нанотехнологических средств и методов. В составе биодобавок сейчас преобладает искусственно получаемая микрокристаллическая целлюлоза. Изучение механизмов образования комплекса белок-целлюлоза может быть использовано для разработки наноструктур. При этом необходима направленная ферментативная деструкция целлюлозы до фрагментов с заданной молекулярной массой. Полученные наночастицы обладают высокой стабильностью и могут найти применение в медицине, химическом синтезе и ряде других отраслях.

Таким образом, понимание механизмов специфических взаимодействий на субмолекулярном уровне имеет не только фундаментальное, но и прикладное значение, т.к. может найти применение при моделировании динамических наноструктур (молекулярных манипуляторов, ассемблеров), при создании средств ранней диагностики, например, иммунологической реактивности организма к индигенным микроорганизмам.

САМКОВ А.А., ВОЛЧЕНКО Н.Н., ХУДОКОРМОВ А.А.,
КАРАСЕВ С.Г., ОТРОШКО Д.Н., АФАНАСЬЕВА Ю.В.,
САМКОВА С.М., БАТИНА Е.В., КАРАСЕВА Э.В.

Кубанский государственный университет, Краснодар, Россия

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ КОМПЛЕКС В СТРУКТУРЕ БИЗНЕС-ИНКУБАТОРА КУБАНСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА

Получение биотехнологической продукции, наряду со свойствами продуцента и технологией его дальнейшего применения неразрывно связано с аппаратным обеспечением культивирования. Воспроизводимое качество микробной биомассы, являющейся основой многих биопрепаратов, особенно важно на этапе испытаний и апробации новых разработок. Качалочные колбы, а также разнообразные настольные биореакторы обеспечивают глубинное культивирование в небольших объемах, достаточных для начальных этапов исследований свойств апробируемых биопрепаратов. Однако, при выходе на пилотный уровень, наряду с необходимостью увеличения объемов

получаемой биомассы возникает острая необходимость стандартизации количественных и качественных характеристик как процесса наработки биологического агента, так и получаемого продукта.

Классическая компоновка биореактора с принудительной аэрацией и перемешиванием является наиболее универсальной и распространенной, обеспечивая возможность культивирования широкого круга различных продуцентов. При этом, реализация современных возможностей вычислительной техники в обвязке биореактора, создание дружественного интерфейса управления и сбора данных расширяет возможность использования такой автоматизированной системы многими научными коллективами.

Модульное биотехнологическое оборудование серии ОКА 01-100Т, размещенное в микробиологической лаборатории бизнес-инкубатора Кубанского государственного университета, позволило значительно увеличить масштаб экспериментов по полевым испытаниям разрабатываемых регионально адаптированных нефтеокисляющих биопрепаратов и, как следствие, ускорить внедрение текущих разработок. Расширенные возможности настройки параметров культивирования, а также стерилизации оборудования, среды, воздуха, возможность архивации параметров при общей емкости ферментационного модуля 100 л (коэффициент заполнения до 0,8) максимально приблизили условия наработки бактериальной биомассы к промышленным, что весьма важно для разработки проектов технических условий. Паростерилизуемые фильтры очистки отработанного воздуха, аппаратная реализация убивки невостребованной биомассы непосредственно в емкости культивирования, наряду с оборудованным соответствующим образом ферментационным залом, обеспечивают биологическую безопасность лаборатории.

Приращение научного инструментария ВУЗа модульным биотехнологическим оборудованием способствует популяризации идеи использования биотехнологий в инновационной деятельности университета. Объединение группы разработчиков биопрепаратов с другими научными группами на базе университетского бизнес-инкубатора, центра коллективного пользования в рамках программы стратегического развития ВУЗа несомненно будет способствовать дальнейшему развитию, дивергенции и внедрению новых биотехнологий на территории одного из наиболее динамично развивающихся регионов России – Краснодарского края.

САМОЙЛОВ И.Б., КУЗНЕЦОВ А.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

НОВАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ПЕРЕРАБОТКИ БИОМАСС И АНТРОПОГЕННЫХ УГЛЕВОДОРОДСОЖЕРЖАЩИХ ОТХОДОВ В БИОТОПЛИВО И ХИМИКАТЫ

В работе приводится описание новой экологически чистой технологии переработки биомасс и антропогенных отходов, включая ТБО, в жидкое топливо, горючий газ и химикаты, основанная на быстром низкотемпературном (до 450 гр. С) пиролизе, запускаемом заданной серией тепловых импульсов от нагреваемых электроимпульсами хромовых стержней, расположенных в объеме пиролизной камеры таким образом, чтобы обеспечить беспрепятственный и быстрый выход первичных продуктов пиролиза на охлаждаемую поверхность с температурой в пределах $50 \leftrightarrow 100^0$ С до начала в них вторичных реакций. Длительность электроимпульсов по порядку величины составляет 0,1 с.

Технология может применяться при дисперсности массы порядка 10 см^{-1} и более, т.е. при размерах частиц в смеси 10 см и более. При этом быстрый пиролиз мелкодисперсной части смеси с частицами порядка мм и менее, дает основной вклад в производство бионефти (жидкие топливные продукты и химикаты), а пиролиз содержащихся в смеси крупных частиц, порядка см и более, дает основной вклад в образование биогаза, который используется в газовых электрогенераторах для электронагрева хромовых стержней.

Данная технология пригодна для использования в автономном мобильном варианте, что позволяет перемещать ее непосредственно в зону производства биомассы или захоронения ТБО, существенно снижая тем самым общие расходы, связанные с производством биотоплива и утилизации органосодержащих отходов.

Описанная технология может использоваться также в целях конверсии нефти и нефтепродуктов и для химической переработки твердых горючих ископаемых.

На основе этой технологии создана опытная установка, в которой переработке подвергались древесные опилки, лигнин, пеллеты, полиэтилен и другие

углеродсодержащие материалы. В качестве продуктов были получены топливная жидкость (бионефть) и горючий газ, а также древесный уголь.

Опыты показали, что общее число импульсов необходимое для полной переработки смеси зависит от дисперсности и свойств исходной смеси и в случае древесных опилок и пеллет достигает 100-110 импульсов, что, по общему времени импульсного нагрева смеси, составляет 30-40 с. Однако общее время переработки, примерно, на порядок больше, т.к. оно включает время, необходимое для охлаждения стержней до температуры 200- 250⁰С после каждого электроимпульса.

Экстрополяционные оценки показывают, что затраты электроэнергии для переработки 1 т. древесных опилок при данной технологии достигают, примерно, 200 кВт-часов.

Известные обзоры современных технологий получения жидкого топлива из биомассы быстрым пиролизом и анализ состояния и перспектив их развития показывают, что эти технологии, несмотря на их обилие и многообразие, еще не достигли коммерческого уровня. Авторы надеются, что предложенная здесь технология позволит продвинуться в этом направлении и тем самым приблизиться к решению задачи получения альтернативных возобновляемых источников жидкого топлива и химикатов, т.е. сделать определенный шаг в развитие биоэнергетики и в уменьшении эмиссии парниковых газов, а также снизить остроту проблемы экологически чистой утилизации промышленных и бытовых отходов.

САНДАНОВ А.А.¹, ЦЫРЕНОВ В.Ж.¹, ОСТРОВСКИЙ Д.Н.²

¹ *Восточно-Сибирский Государственный Университет Технологий и Управления,*

Улан-Удэ, Россия

² *Институт биохимии РАН им. А.Н. Баха, Москва, Россия*

О РОЛИ АДЕНИЛАТКИНАЗЫ В SALVAGE СИНТЕЗЕ NAD КОРИНЕФОРМНЫМИ БАКТЕРИЯМИ

Низкомолекулярные компоненты нуклеиновых кислот - нуклеозиды, нуклеозидфосфаты, а также нуклеотидные коферменты NAD, FAD стали целевыми

продуктами биотехнологии. Эти коферменты играют важную роль: NAD и NADP участвуют более чем в 300 ферментативных окислительно-восстановительных реакциях в качестве коферментов. Препараты NAD и FAD являются лекарствами. Однако, главное применение NAD и FAD - это реактивы для клинических биохимических анализов.

Накопление NAD в условиях сверхсинтеза не достигало 100% выхода от количества внесенных предшественников. Это позволило предположить, что при сверхсинтезе NAD действуют регуляторные механизмы, одним из которых возможно, является ретроингибирование.

Для исследований по ретроингибирующему действию NAD, NADP, NADH на синтез NAD использовалась культура, выращенная в течение 24 часов: NAD синтезирующая активность биомассы этого возраста была наиболее высокой.

Внесение в культуральную среду экзогенных NAD, NADP и NADH показало, что эти соединения ингибировали сверхсинтез NAD. Ингибирующий эффект NAD проявляется при концентрации его 4 мг/мл. NADP оказывал более сильный эффект.

Известно, что ферменты salvage синтеза NAD находятся под контролем АТФ. Поэтому представлялось интересным выяснить, направлено ли обнаруженное нами ретроингибирующее действие NAD и NADP на образование АТФ, являющегося промежуточным метаболитом синтеза NAD.

В отсутствие пиридинового предшественника и в присутствии АМФ наблюдался сверхсинтез АТФ. Изучая влияние NAD и NADP на образование АТФ из АМФ было обнаружено, что уровень накопления АТФ из АМФ снижался при внесении в среду NAD (3 мкмоль/мл) и NADP (2 мкмоль/мл). NAD ингибировал синтез АТФ на 56%, NADP - 17%. Поскольку в качестве предшественника использовался АМФ, мы заключили, что одной из точек приложения ингибирующего действия NAD и NADP на сверхсинтез NAD является синтез АТФ из АМФ.

Для подтверждения этих результатов исследована активность фосфорилирования АМФ бесклеточными экстрактами в качестве источника фосфорилирующих ферментов с использованием радиоактивного $[C^{14}]$ - АМФ.

Активность аденилаткиназы ингибировалась на 50 % под действием NAD и NADP при концентрации эффекторов 3 и 3,5 мМ соответственно

Для дальнейшего изучения ингибирующего действия NAD и NADP ферментный препарат был подвергнут дополнительной очистке. Чтобы полностью отделить аденилаткиназу от нуклеозиддифосфаткиназы, мы применили обработку ферментного препарата кальций-фосфатным гелем.

Изучение кинетики аденилаткиназной реакции показало, что K_m для АТФ составляет $4,7 \cdot 10^{-4}$ М, для АМФ - $5,5 \cdot 10^{-4}$ М. Для АМФ константа Михаэлиса увеличивалась с $5,5 \cdot 10^{-4}$ М до $2,5 \cdot 10^{-3}$ М под действием NAD, а под действием NADP - до $1,7 \cdot 10^{-3}$ М. Для АТФ константа Михаэлиса ($4,7 \cdot 10^{-4}$ М) под действием NAD изменялась незначительно ($5,3 \cdot 10^{-4}$ М), а в присутствии NADP увеличивалась до $1,5 \cdot 10^{-3}$ М. NAD проявлял по отношению к АМФ конкурентное ингибирование, а по отношению к АТФ - смешанный конкурентно-неконкурентный тип ингибирования. NADP по отношению к обоим субстратам оказывал ингибирующий эффект конкурентно - неконкурентного типа

Выводы

1. Установлено, что ингибирующее действие NAD и NADP направлено на аденилаткиназу, фермент в аденилатной ветви salvage синтеза НАД.

2. Показано, что аденилаткиназа, выделенная и очищенная в 170 раз из *S. amoniagenes* ATCC 6872, ингибируется не только NAD и NADP, но и промежуточными метаболитами salvage синтеза NAD (АТФ, МННК, деНАД). Не ингибировали активность аденилаткиназы никотинамид, никотиновая кислота, аденозин, ФМН, ФРПФ и пирофосфат.

3. Показано, что кроме НАД, НАДФ и промежуточных метаболитов сэл-видж синтеза НАД, ингибирующим действием обладал ряд нуклеотидов, таких как АТФ, ГТФ, ФАД, ЦТФ, УТФ.

САФОНОВА М.А., КУЗНЕЦОВ О.Ю.

*Ивановская государственная медицинская академия Минздравсоцразвития России,
Иваново, Россия*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОМПЛЕКСА АУТОШТАММОВ БИФИДОБАКТЕРИЙ И ЛАКТОБАЦИЛЛ В КОРРЕКЦИИ ДИСБАКТЕРИОЗОВ

Одной из наиболее значимых микробиологических ниш тела человека является кишечник. Именно там возможно обнаружить самые разнообразные условия для жизнедеятельности различных микроорганизмов, а в результате неблагоприятных воздействий и патологических состояний здесь могут быстро происходить качественные и количественные изменения «нормальной» микрофлоры кишечника по сравнению с другими экологическими нишами тела человека. В данном случае стойкое нарушение квазистатического состояния микрофлоры кишечника определяется понятием дисбактериоз.

При устойчивых микробиологических нарушениях флоры кишечника коррекцию микробного пейзажа начинают с использования препаратов-пробиотиков – фармакопейных препаратов, пищевых добавок или продуктов функционального питания. Эти препараты и продукты питания на основе живых микроорганизмов являются достаточно эффективными лечебно-профилактическими средствами. Однако клинико–экспериментальные работы по бактериотерапии дисбактериозов показали, что наиболее лучший эффект достигается при индивидуальном подборе донорских штаммов, либо при использовании аутофлоры. Все это служит основанием для дальнейшей разработки концепции создания пробиотиков и продуктов функционального питания на основе аутоштаммов и аутоассоциаций симбиотических микроорганизмов.

Создание общедоступных технологий выделения и изоляции аутоштаммов бифидобактерий и лактобацилл крайне важно для устранения микробиологических нарушений кишечника.

Фундаментальный характер разработок в данном направлении может быстро перейти в практическую плоскость использования препаратов аутопробиотиков, содержащих комплекс бифидобактерий и лактобацилл для лечения и коррекции дисбактериозов кишечника, а также поддержания гомеостаза организма конкретного

индивидуума в повседневной жизни.

САХАРЧУК Т.Н.¹, ПОЛИКСЕНОВА В.Д.¹, ПРАДУН О.М.¹,
КАРПИНЧИК Е.В.², ТАРАСЕВИЧ В.А.²

¹*Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь*

²*ГНУ «Институт химии новых материалов НАН Беларуси», Минск, Республика Беларусь*

ГУАНИДИНСОДЕРЖАЩИЕ ПРЕПАРАТЫ:

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЛЯ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

Приоритетное направление развития сельского хозяйства – производство экологически чистых продуктов питания при существенном уменьшении пестицидной нагрузки путем активации собственных защитных сил растительного организма.

Перспективным является решение задачи одновременного повышения уровня продуктивности и неспецифической устойчивости растений к неблагоприятным факторам окружающей среды. Однако не всегда с помощью селекционных методов удается направить развитие новых форм по нужному пути. Это обуславливает потребность в химических средствах, повышающих адаптационную устойчивость растений. Неудивительно, что одним из актуальных направлений в области химии биологически активных веществ является создание синтетических регуляторов роста защитно-стимулирующего действия.

К началу наших исследований сотрудниками ГНУ «Институт химии новых материалов» НАН РБ были синтезированы препараты на основе гуанидинов. В литературе описано, что данные соединения, обладая биоцидным действием на фитопатогены, тем не менее отвечают требованиям экологической безопасности, поскольку метаболизируются в организме живых существ до безопасных соединений (Воинцева И.И., Гембицкий П.А., 2009). На наш взгляд, эти свойства соединений на основе гуанидинов могут стать предпосылкой для включения их в систему агротехники возделывания сельскохозяйственных культур, в частности овощных, с целью получения так называемых «органических овощей» – экологически чистых продуктов питания.

Однако сведения об эффективности их применения в целях защиты растений для многих овощных культур, в том числе и для культуры томата, отсутствуют, нет данных и об их воздействии на сами растения. В связи с этим, целью настоящего исследования явилось комплексное изучение влияния полигексаметиленгуанидиновых соединений и их композиций как на развитие растений (на первоначальном этапе и в полевых условиях), так и на основные патогены томата при прямом и опосредованном контакте.

Объектом исследования являлся ранний сорт томата белорусской селекции Пралеска и водные растворы препаратов для обработки семян на основе полигексаметиленгуанидинов (ПГМГ): ПГМГХлорид (10 %) и его композиции ПГМГХлорид+КК (10 % + карбамидный комплекс), ПГМГХ+КС (10 % + коллоидное серебро), ПГМГХ+ИК (5 % + йод-крахмальный комплекс) а также ПГМГФосфат (10 %). При проведении работ использованы общепринятые методики лабораторных и полевых исследований.

Нами показано, что в условиях *in vitro* все препараты биоцидны и полностью подавляют прорастание спор и вегетативный рост возбудителей фузариоза, ботритиоза и альтернариоза. Вместе с тем установлено, что обработка семян томата гуанидинсодержащими препаратами повышает их посевные качества, ускоряет рост и развитие сеянцев. Наиболее эффективными являются 0,01 % р-ры ПГМГФ, ПГМГХ и его композиция с карбамидным комплексом, а также 0,1 % р-р ПГМГХ в композиции с КС и ИК. Отмечено стимулирующее влияние исследуемых препаратов на прорастание семян и появление всходов: энергия прорастания выше на 5-17 %, а всхожесть на 10 % по сравнению с контролем. Также, по сравнению с контролем при предпосевной обработке томата гуанидинсодержащими препаратами первый и второй настоящие листья длиннее в 1,2-1,6 раз, сеянцы выше в 1,1-1,2 раза, а количество сеянцев, вступающих в фазу образования настоящих листьев, больше на 10-25 %.

Эффект предпосевной обработки семян томата проявляется в течение всего онтогенеза растений: отмечено стимулирующее влияние на ростовые процессы, морфогенез и репродуктивную способность томатов. Кроме того, в структуре урожая снижается доля больных фитофторозом плодов на 10-14 %. В результате искусственного заражения отделенных листьев патогеном *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary отмечено подавление его роста в тканях листа, снижение интенсивности спорообразования данного

патогена на 70-87%. Таким образом, можно предположить, что обработка семян ПГМГ повышает неспецифическую устойчивость растений к биотическим (грибные инфекции) стрессам.

Полученные результаты имеют перспективу внедрения в промышленное, фермерское и приусадебное овощеводство республики.

СВЕТЛАКОВА Т.Н., БОРОННИКОВА С.В., БОБОШИНА И.В.

Пермский государственный национальный исследовательский университет

Пермь, Россия

**ДЕТЕКЦИИ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ЗАМЕН (SNP) В ГЕНАХ БИОСИНТЕЗА
ЛИГНИНА *POPULUS TREMULA* L. КАК МОДЕЛЬНАЯ СИСТЕМА
МОЛЕКУЛЯРНОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ДЛЯ ОТБОРА ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ
ПЛАНТАЦИОННОГО ВЫРАЩИВАНИЯ ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ**

В рамках комплексной программы развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года выделено приоритетное направление "Лесная биотехнология". Целью реализации этого направления является создание современной системы управления лесонасаждениями с привлечением методов ДНК-маркирования, новых биотехнологических форм деревьев с заданными признаками, развитие плантационного лесовыращивания. Молекулярное маркирование деревьев направлено на решение широкого круга задач лесного хозяйства и промышленности, таких как совершенствование принципов и подходов лесосеменного районирования; генетическая паспортизация и сертификация семян; мониторинг фитосанитарного состояния питомников и лесонасаждений; контроль законности происхождения древесины. Значительная часть расходов в процессе переработки древесины приходится на отделение древесной целлюлозы от лигнина. Использование древесины, содержащей меньше лигнина и больше целлюлозы, существенно повышает конкурентоспособность лесоперерабатывающей промышленности (Комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020, 2012).

Биосинтез лигнина хорошо изучен на молекулярном уровне (Boerjan et al, 2003) и особенно интересен для изучения у древесных видов растений, древесина которых используется в целлюлозно-бумажной промышленности. Данные о структуре лигнина могут быть использованы для улучшения качества бумаги, а нарушение процессов образования лигнина может привести к снижению содержания целлюлозы (Hu et al., 1999). После идентификации у различных древесных видов растений генов, вовлеченных в процессы биосинтеза лигнина, становится возможным наблюдать корреляции между изменениями структуры лигнина и количественными признаками (QTL) древесины.

Полностью секвенирован геном *Populus trichocarpa* (Tuskan et al., 2006), поэтому этот вид принято считать модельным древесным видом растений. Нами проведен молекулярно-генетический анализ другого вида этого же рода - *P. tremula* (тополь дрожащий, или осина) с использованием ISSR-метода анализа полиморфизма ДНК (Inter Simple Sequence Repeats, или межмикросателлитный анализ, Zietkiewicz et al., 1994). Выявлены уникальные фрагменты, отмечены четкие мономорфные и полиморфные фрагменты ДНК, присутствующие в электрофоретических спектрах как всех популяций, так и у отдельных выборок. Этот тип маркеров перспективен для идентификации места происхождения древесины с целью контроля законности ее происхождения при предварительном анализе аллелей выявленных локусов и их частот в популяциях, а также паспортизации природных популяций.

В лаборатории «Молекулярной биологии и генетики» ЕНИ Пермского государственного национального исследовательского университета проведено секвенирование нуклеотидных последовательностей пяти генов биосинтеза лигнина *P. tremula*, а также анализ в них однонуклеотидных замен (SNP) и их частот. Выявлено 29 полиморфных позиций, из которых только 4 вели к замене кодируемой аминокислоты. При сравнении со средними показателями изменчивости для видов рода *Populus* обнаруживается высокий консерватизм изучаемых генов, при довольно высокой степени изменчивости в некодируемых участках ДНК. Эти и полученные аналогичным образом в других генах полиморфные позиции могут использоваться для молекулярного маркирования хозяйственно-ценных количественных признаков, таких как содержания лигнина, скорость роста, устойчивость к болезням.

Таким образом, на примере листовного древесного вида растений *P. tremula* разработана модельная система молекулярной идентификации для отбора растений, перспективных для плантационного выращивания, которая включает в себя молекулярного маркирования генома, секвенирование последовательностей ДНК, детекцию однонуклеотидных замен на первых этапах в генах биосинтеза лигнина, а в дальнейшем и в других генах, вовлеченных в формирование хозяйственно-ценных признаков.

Биотехнология в настоящее время может уверенно решать широкий круг проблем, начиная от идентификации растений и контроля законности происхождения древесины, заканчивая созданием новых биотехнологических форм деревьев с заданными хозяйственно-ценными признаками.

СВЕНСКАЯ Ю.И., СЕВЕРЮХИНА А.Н., БОКОВА Д.А.

Саратовский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского,

Саратов, Россия

НЕТКАНЫЙ КОМПОЗИТНЫЙ МАТЕРИАЛ ИЗ НАНОВОЛОКОН ХИТОЗАНА И МИКРОКАПСУЛ КАРБОНАТА КАЛЬЦИЯ ДЛЯ КОНТРОЛИРУЕМОЙ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

В последнее время появилось большое число раневых ожоговых покрытий, отличающихся как материалом основы, так и входящими в их состав лекарственными веществами. Добавлением различных лекарственных средств можно придать материалу различные свойства, например, антибактериальное действие или способность ферментативной очистки раны от гнойно-некротических тканей. Наиболее серьезным препятствием для данной модификации свойств раневых покрытий является цитотоксичность целого ряда препаратов, применяемых в терапии ожоговых, раневых поверхностей и раковых опухолей, в частности, фотодинамических красителей. При введении в организм таких лекарственных средств происходит их связывание с белками крови, в результате чего они распространяются по всей кровеносной системе. Для

снижения токсических эффектов необходимо обеспечивать контролируемую адресную доставку лекарственных средств к пораженной области.

В рамках данной работы был разработан композитный нетканый материал из биodeградируемых нановолокон хитозана, полученных методом электроформования, с включениями структур «ядро-оболочка» на основе микрочастиц карбоната кальция. Структуры «ядро-оболочка» являются одним из вариантов микроконтейнеров, позволяющих локализовать инкапсулируемое действующее вещество. Микрочастицы карбоната кальция, использованные в качестве ядер при формировании структур, были изготовлены методом кристаллизации из растворов солей карбоната натрия и хлорида кальция с добавлением красителя «Фотосенс» (НИОПИК). Далее методом последовательной адсорбции противоположнозаряженных полиэлектролитов на микрочастицах формировались оболочки.

Полученный нановолокнистый материал характеризуется наличием структур ядро-оболочка, встроенных в волокнистую сетку со средним диаметром волокон 500 нм. Предполагается дальнейшая модификация материала различными физическими и химическими методами.

СЕМАШКО Т.В.¹, МИХАЙЛОВА Р.В.¹, ДЕМЕШКО О.Д.¹,

УРЕЦКИЙ В.Г.², АЛЕХНО В.В.², МИХАЛЕНКО Е.В.²

¹*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

²*ОАО «МИНСКИЙ НИИ РАДИОМАТЕРИАЛОВ», Минск, Беларусь*

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БИОСЕНСОРОВ «ГЛЮКОСЕН», ИЗГОТОВЛЕННЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ *PENICILLIUM FUNICULOSUM* И РАЗЛИЧНЫХ БУФЕРНЫХ СИСТЕМ

Глюкозооксидаза (КФ 1.1.3.4) - фермент класса оксидоредуктаз, катализирующий окисление глюкозы до глюконолактона и пероксида водорода. Высокая специфичность фермента к глюкозе позволяет устанавливать содержание данного вещества в присутствии различных сахаров и редуцирующих веществ неуглеводной природы в крови и других физиологических жидкостях. Именно поэтому глюкозооксидаза получила широкое

распространение в биосенсорных технологиях для экспресс-анализа глюкозы и аналитического контроля биотехнологических процессов.

Ранее ОАО «МИНСКИЙ НИИ РАДИОМАТЕРИАЛОВ» разработал амперометрический биосенсор «Глюкосен» для определения глюкозы в крови с помощью портативного анализатора «Глюкометр ГМ-2». В лаборатории ферментов Института микробиологии НАН Беларуси получен высокоактивный продуцент глюкозооксидазы *Penicillium funiculosum* 46.1, выделен и очищен фермент, изучены его свойства. В результате совместных исследований показана возможность использования ферментного препарата в производстве биосенсоров «Глюкосен».

Цель настоящей работы – изучение влияния буферных систем на эксплуатационные характеристики датчиков «Глюкосен», изготовленных с использованием глюкозооксидазы *P. funiculosum*.

Препарат фермента (активность ~ 400 ед/мл) был получен методом ультрафильтрационного концентрирования из культуральной жидкости *P. funiculosum*. С целью выбора буфера для проявления максимальной активности глюкозооксидазы *P. funiculosum* проверены следующие системы (0,01 М): фосфатная (рН 5,0-9,0), цитратная (рН 3,0-5,0), и универсальная (рН 3,0-9,0).

Установлено, что для глюкозооксидазы *P. funiculosum* самое низкое сродство фермента к глюкозе обнаруживается в буферных системах с рН 9,0. Оптимальные значения константы Михаэлиса (K_m) наблюдались в интервале рН 5,0-8,0. Наиболее эффективно фермент связывался с субстратом в цитратном рН 5,0 ($k_{cat}/K_m = 20904 \text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$) и в фосфатном рН 5,0 и 7,0 ($k_{cat}/K_m: 21019 \text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$ и $21825 \text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$ соответственно) буферах.

Для дальнейших исследований с использованием глюкозооксидазы *P. funiculosum* и буферных систем (фосфатной, рН 7,0; цитратной рН 5,0; фосфатной, рН 5,0) было изготовлено 3 партии биосенсоров, обозначенные как № 1, № 2 и № 3 соответственно. Для испытаний датчики были положены на хранение в течение 12 месяцев в условиях + 4–+ 10°C и + 4–+ 30°C. Анализ электрохимических показаний биосенсоров проводился каждые 2 месяца.

Показано, что все изготовленные датчики характеризовались высоким уровнем токов (18-26,8 мкА) (согласно техническим характеристикам биосенсоров сила их тока должна быть выше 13 мкА). Данный показатель не менялся во время всего срока проверки

(12 месяцев) независимо от условий хранения датчиков и использованных для их изготовления буферных систем.

Далее в Минском городском эндокринологическом диспансере на стандартных контрольных растворах глюкозы проведена калибровка биосенсоров с целью определения чувствительности и силы начального тока, а также рассчитаны коды для программирования «Глюкометр ГМ-2».

Установлено, что датчики партии № 2 по чувствительности ферментных электродов (ΔI) и фоновым начальным токам имели параметры, выходящие за пределы допустимых диапазонов, что не позволяло построить калибровочные кривые. Завышенными показателями ΔI характеризовались 50 % датчиков партии № 3. Лучше всего отвечали необходимым техническим условиям биосенсоры партии № 1 (фосфатный буфер, pH 7,0). На всем диапазоне концентраций глюкозы показатели изменения силы токов этих датчиков минимально отклонялись от среднего значения. С целью анализа достоверности полученных результатов биосенсоры этой партии по полученным кодам были протестированы на образцах крови пациентов городского эндокринологического диспансера. Все исследуемые датчики характеризовались высокой воспроизводимостью результатов, коэффициент корреляции анализируемых данных составил $\geq 0,94$.

Таким образом, в результате выполненных исследований установлено, что в производстве биосенсоров «Глюкосен» на основе глюкозооксидазы *P. funiculosum* для экспресс-анализа глюкозы портативным анализатором «Глюкометр-2» необходимо использовать фосфатный буфер pH 7,0.

СЕМЕНОВА Е.Ф., ШПИЧКА А.И., МОИСЕЕВА И.Я.

Пензенский государственный университет, Пенза, Россия

К ОБОСНОВАНИЮ РАЗРАБОТКИ БИОТЕХНОЛОГИИ ЭРЕМОТЕЦЕВОГО ЭФИРНОГО МАСЛА

Одним из приоритетных направлений научно-технического развития является расширение мирового ассортимента выпускаемых промышленностью натуральных эфирных масел, насчитывающих в настоящее время 180 наименований и широко

применяемых в фармацевтическом, парфюмерно-косметическом, кондитерском, мыловаренном и ликероводочном и других производствах. Выявление перспективных продуцентов является актуальной задачей в современной биотехнологии ароматических продуктов, в том числе и с запахом розы. Однако, биотехнологии получения эфирных масел в культуре изолированных клеток и тканей не являются конкурентоспособными по сравнению с биотехнологиями на основе микробного синтеза. В проведенных ранее исследованиях было начато изучение новых природных источников душистых веществ. Оценка проводилась по уровню накопления и составу эфирного масла, скорости роста культуры и другим свойствам, важным для биотехнологического производства. Кроме этого, особое внимание в настоящее время уделяется исследованию механизмов синтеза ароматообразующих соединений, выяснению путей метаболизма, влияющих на этот процесс.

Осуществленный направленный поиск перспективных объектов для биотехнологии ароматических продуктов в пределах родов *Ceratocystis* и *Eremothecium* дал возможность охарактеризовать различия между видами и штаммами по уровню биосинтетической активности и составу эфирного масла. Компонентный состав эфирного масла *Ceratocystis paradoxa* и *C. pilifera* представлен лактонами, терпеновыми и ароматическими спиртами, альдегидами и кетонами. Основными компонентами эфирного масла *E. ashbyi* являются гераниол, β -фенилэтанол, а также идентифицированы нерол, цитронеллол, нераль и гераниаль. Гераниол, β -фенилэтанол и другие компоненты эфирного масла оказывают противовоспалительное и антисептическое действия. По составу эфирное масло, синтезируемое *E. ashbyi*, приближается к эфирному маслу свежих цветков розы и обладает приятным запахом. Синтез эфирного масла достигает 180 мг/л культуральной жидкости в течение первых двух суток роста на ферментационной среде, что может быть сопоставлено с содержанием эфирного масла в 500-600 г цветков розы. Компонентный состав эфирного масла *E.gossypii* сходен, но соотношение монотерпеновых спиртов более приближено к их содержанию в болгарском розовом масле. Этот натуральный продукт, цена которого на мировом рынке достигает 80 \$ за 1 грамм, чрезвычайно востребован. Ведь более 50% мировых парфюмерных брендов изготавливается на основе розового масла. Оно также используется в медицине и фармацевтике. Розовое масло обладает умеренным антибактериальным (бактериостатическим) действием, при этом β -

фенилэтанол ингибирует синтез макромолекул, но не токсичен в равной степени для всех микроорганизмов и штаммов. Показана его эффективность против широкого спектра бактерий, грибов, вирусов, повышение на их фоне чувствительности возбудителей к антибактериальным средствам. Масло применяют в качестве корриганта фармацевтических препаратов с целью улучшения их вкуса и запаха. Розовое масло регулирует работу надпочечников, оказывает жаропонижающее, противовоспалительное, противоотечное, желчегонное, гепатопротекторное действие, применяется в лечении стоматита, пародонтоза, кожных и других заболеваний. Эфирное масло оказывает также стимулирующее или успокаивающее действие на центральную нервную систему, проявляет иммуномодулирующий эффект, регулирует окислительные процессы в организме. Выход розового масла составляет в среднем 0,025%, так что для получения 1 кг масла приходится собрать вручную и переработать около 4 тонн лепестков. После перегонки масла остается розовая вода. В ней доля масла составляет около 0,2%. Основным поставщиком розовой воды на мировой рынок является Иран. Однако масло в Иране не производят. В мире производят розовое масло высшего качества (объем которого в настоящее время около 600 кг/год) всего 4 страны: Саудовская Аравия (Таиф), Болгария (Казанлык), Турция (Стамбул) и Узбекистан (Ташкент). До 1992 года производство розового масла методом гидродистилляции в республиках СССР (Украина, Молдавия и др.) составляло около 4 т/год. Сейчас оно резко сократилось из-за экономического кризиса в странах СНГ. Например, в 2005 г. в Крыму было выработано 600 кг эфирного масла (экстракта) розы, что в 2 раза меньше по сравнению с максимально достигнутыми эфиромасличной отраслью этого региона показателями.

Таким образом, сравнительный анализ культур микроорганизмов различной таксономической принадлежности показал, что количество синтезируемых летучих душистых веществ розового направления запаха достаточно велико и эти биообъекты обладают самой большой скоростью роста, что дает им преимущество в связи с увеличением выхода целевого продукта на единицу полезного объема оборудования. Это позволяет считать разработку биотехнологии эрмотецевого эфирного масла перспективной.

СЕРБА Е.М., РИМАРЕВА Л.В., РАЧКОВ К.В.

ГНУ ВНИИ пищевой биотехнологии Россельхозакадемии, Москва, Россия

ИНТЕНСИФИКАЦИЯ ПРОЦЕССОВ ПРОРАСТАНИЯ СЕМЯН С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОТХОДОВ ФЕРМЕНТНОГО ПРОИЗВОДСТВА

В основе всех проявлений жизнедеятельности растительного организма лежит обмен веществ, процессы которого катализируются ферментами. Часть гидролитических ферментов начинает образовываться в процессе созревания семян. По мере синтеза происходит связывание гидролаз специфическими ингибиторами, и до момента прорастания эти ферменты находятся в латентной форме. Показано, что амилазы семян злаковых культур инактивируются в результате связывания их с запасными белками, при этом возрастает термостабильность ферментов. В настоящее время имеются сведения о некоторых ингибиторах растительных ферментов, выделенных из семян пшеницы, ржи, сои, фасоли, кукурузы и др. Они представляют собой белки альбумино-глобулиновой природы. По достижении зрелости зерна активность ферментов существенно снижается, а количество ингибиторов увеличивается. При прорастании зерна активность ферментов возрастает в несколько раз.

Проведенные ранее исследования показали возможность активации процессов прорастания семян при использовании различных биоактиваторов: ферментов, микроэлементов, ростовых стимуляторов, таких как гиббереллиновая кислота и пр.

Во ВНИИ пищевой биотехнологии разработана технология получения комплексных ферментных препаратов (ФП) протеаз для пищевой промышленности на основе глубинного культивирования активных штаммов *Aspergillus oryzae*. Однако установлено, что продуцент комплекса гидролаз *Aspergillus oryzae* РОМ 156 синтезирует как экзо-ферменты, так и клеточно-связанные ферменты. Таким образом, биомасса гриба – отход ферментного производства является дополнительным источником ферментов, а также белковых веществ и др., что позволяет рассматривать ее как перспективный источник биологически активных веществ.

Цель данной работы заключалась в изучении влияния различных источников биологически активных веществ (БАВ) на процессы прорастания семян для определения возможности использования отхода ферментного производства.

Несмотря на то, что в продаже все чаще встречаются семена, не требующие обработки перед посевом, забывать о ней не следует. Семена при обработке приобретают способность раньше и дружнее всходить, в них усиливаются процессы обмена веществ. Молодые растения из обработанных семян лучше растут и развиваются, более устойчивы к неблагоприятным внешним факторам, дают более ранние урожаи.

Существуют различные способы предпосевной обработки семян, но самый распространенный, это — замачивание в воде. В последние годы с целью ускорения сроков созревания овощей применяют предпосевное замачивание семян в растворах микроэлементов или стимуляторов роста.

В работе были использованы различные биологически активные добавки (БАД) - источники ферментов и БАВ — для активации прорастания семян: культуральная жидкость гриба *A. oryzae* РОМ-156 (№1); гидролизат дрожжевой биомассы *Saccharomyces cerevisiae* (№2); полученный при обработке экзогенными ферментами протеолитического и гемицеллюлазного действия из расчета 20ед. ПС и 10ед.β-ГКС на грамм биомассы; гидролизат биомассы *A. oryzae* (№3), полученный при обработке экзогенными ферментами протеолитического и гемицеллюлазного действия из расчета 20ед. ПС и 10ед.β-ГКС на грамм биомассы; автолизат биомассы *A. Oryzae* (№4), полученный под воздействием внутриклеточных ферментов микромицета.

Семена огурцов замачивали в водных 10%-ных растворах БАВ и в воде в течение 1 часа при 30° С и выкладывали на чашки Петри для проращивания.

Наилучший результат, достигнут при воздействии микромицета. Семена, замоченные в воде, тоже показали хороший результат. Однако на шестые сутки, когда уже появились первые листочки, более заметное активирующее влияние оказали препараты из *A. oryzae* №1,3,4. По-видимому, ферменты мицелиального гриба оказывали стимулирующее действие на обменные процессы семян огурцов в результате активации их латентных ферментов, как было отмечено и в случае проращивания зерна в производстве солода.

Таким образом, выявлено стимулирующее действие БАД, приготовленных на основе микромицета *A. oryzae* РОМ-156, на процессы прорастания семян. Полученные результаты указывают на принципиальную возможность использования различных

источников ферментов, в том числе, отхода ферментного производства-биомассы гриба *Aspergillus oryzae* в сельском хозяйстве, как ускорителей роста.

СЕРЕБРЯКОВА Л.А., ТЕКУТЬЕВА Л.А., НЕКРАСОВ А.Е.

Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОТРЕБИТЕЛЬСКИХ СВОЙСТВ АГРОТЕКСТИЛЬНЫХ НЕТКАНЫХ МАТЕРИАЛОВ ИЗ ВТОРИЧНОГО СЫРЬЯ

Перспективы развития текстильного, швейного, строительного и других отраслей промышленности обусловлены появлением новых экономичных технологий современных нетканых материалов.

Рост производства нетканых материалов происходит за счет прогрессивной технологии, обеспечивающей возможность комплексной механизации и автоматизации производственных процессов, сокращения трудовых и материальных затрат, широкого использования низкосортного сырья и снижения себестоимости по сравнению с производством тканей. Нетканые материалы бытового назначения нашли свое применение в производстве одежды, обуви, мебели, а технического назначения используют для производства упаковки, фильтрующих, прокладочных, дренажных, армирующих полотен, геотекстиля и агротекстиля и других.

В условиях дефицита и природных сырьевых ресурсов является актуальными исследования, направленные на возможность полной переработки отходов потребления и производства швейных, трикотажных, рыбодобывающих предприятий (вышедшие из эксплуатации канаты, сетная часть орудия лова и отходы при их производстве), что способствует созданию безотходных технологий, энергосбережению и экономии ресурсов, снижению затрат и одновременно позволяет решить экологическую проблему утилизации отходов

В работе проводятся исследования по изучению возможности применения полиамидных иглопробивных нетканых материалов из вторичного сырья (группа 2.2 ТУ 63-473-32-90), в качестве укрывного материала для защиты растений от заморозков, промерзания почвы и повышения урожайности сельскохозяйственных угодий.

Для установления влияния структуры на основные эксплуатационные свойства нетканых материалов и выбора наиболее рациональной толщины и использования в сельском хозяйстве в качестве укрывных были выработаны и исследованы четыре варианта полиамидных экспериментальных материалов различной толщины (5,5; 4,5; 4,0; 3,1 мм).

В соответствии с действующим стандартом основными требованиями, предъявляемыми к укрывным нетканым материалам, являются эксплуатационные, гигиенические и показатели безопасности.

В связи с этим в работе проведены исследования прочностных свойств (разрывной нагрузки, удлинения при разрыве, прочности при раздирании, устойчивости нетканых материалов к расслоению), гигиенических (гигроскопичности, водопоглощения, влагоотдачи, капиллярности), свойств проницаемости (воздухопроницаемости, светопроницаемости), а также показателей безопасности, в частности безвредности для растений и почвы.

Для испытания перечисленных потребительских свойств полиамидных иглопробивных нетканых материалов были использованы стандартные и разработанные методики.

На основании проведенных исследований выявлено, что все образцы нетканых материалов являются безвредными для растений и почвы. При анализе потребительских свойств установлено, что с увеличением толщины иглопробивных нетканых материалов из вторичного сырья разрывная нагрузка увеличивается в продольном и поперечном направлениях соответственно в 2,3 и 2,1 раза, а удлинение при разрыве – уменьшается в 1,5 и 1,1 раза. Наибольшие показатели прочности при раздирании в продольном и поперечном направлениях имеют нетканые материалы варианта 1 с толщиной 5,5 мм, равные 218,3 Н и 249,8 Н соответственно. Наименьшим показателем прочности к раздиранию характеризуется нетканые материалы варианта 4, толщина которого 3,0 мм и прочность при раздирании в продольном и поперечном направлениях составляет 101,1 Н и 135,5 Н соответственно.

Установлено, что с увеличением толщины нетканых материалов наблюдается снижение гигроскопичности в 1,2 раза и водопоглощения в 1,5 раза. Воздухопроницаемость иглопробивных нетканых материалов также снижается с

увеличением толщины материала в 1,2 раза в результате увеличения объемной плотности материала.

Таким образом, сравнительный анализ показал, что иглопробивные нетканые материалы 2 и 3 вариантов, толщиной 4,5 и 4,0 мм и поверхностной плотностью 395,0 и 334,7 г/м² являются менее затратными по количеству используемого сырья и наиболее полно отвечают требованиям в отношении эксплуатационных свойств. На основании проведенных исследований выявлена возможность использования полиамидных иглопробивных нетканых материалов в качестве агротекстильных.

СЕРКОВ И.В.¹, БЕЗУГЛОВ В.В.²

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт физиологически активных веществ Российской академии наук, Москва, Россия

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт

биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова

Российской академии наук (ИБХ РАН), Москва, Россия

ГИБРИДНЫЕ ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ, СОДЕРЖАЩИЕ ДОНОРЫ ОКСИДА АЗОТА

Гибридные полифункциональные лекарственные препараты, построенные из фрагментов нескольких биоактивных молекул, содержат в своей структуре несколько фармакофоров, действие которых дополняет друг друга. Чрезмерно селективные монофункциональные лекарственные препараты, нацеленные на одну фармакологическую мишень, оказывают помимо положительного эффекта, побочное действие, иногда с отдалёнными последствиями при длительном приёме такого лекарства. Осознание этой проблемы вызвало к жизни альтернативный подход к конструированию лекарственных препаратов, основанный на использовании соединений, способных взаимодействовать с различными мишенями. Полифункциональность молекул можно увеличить за счет объединения в одной структуре нескольких многофункциональных соединений. Одним из направлений в создании таких гибридных соединений является введение в молекулу природного соединения или известного лекарственного препарата фрагмента,

являющегося генератором оксида азота (NO) – внутри- и межклеточного мессенджера со многими важными биохимическими и физиологическими свойствами. Нами разработаны принципы и методы создания гибридных препаратов, содержащих в качестве NO-донорного фрагмента остаток органического нитрата. Такая группировка выбрана по следующим основаниям. Во-первых, у органических нитратов отсутствует спонтанная генерация NO, что позволяет направленно доставлять такие соединения в клетки-мишени без потери NO-генерирующей активности. Во-вторых, выделение NO из нитратов спиртов – это тиолзависимый процесс, требующий участия специфических белков, что может обеспечить генерацию NO в нужное время и в нужном месте. В-третьих, при генерации NO из органических нитратов высвобождается гидроксильная группа, восстанавливая структуру исходного фармакологически активного вещества. Образующееся природное или известное лекарственное соединение подвергается метаболизму по стандартным путям, и в организме не происходит накопление «неприродных» фрагментов с неизученными свойствами. И, наконец, в-четвертых, превращение в нитроэфиры меняет фармакокинетику и лигандные свойства исходного соединения. Например, оно становится более липофильным и может легче проникать через мембраны клеток или гематоэнцефалический барьер. Для введения нитратной группы в молекулу фармакологически активного вещества нами было использовано два подхода. Первый подход основан на прямом нитровании гидроксильных групп с образованием так называемых «безлинкерных» гибридных соединений. В случае отсутствия в молекуле гидроксильной группы или необходимости ее сохранения в конечном гибридном соединении, а также при лабильности исходного соединения в условиях нитрования, NO-донорный фрагмент присоединяли с помощью дополнительной группировки. Этот подход приводит к линкерным гибридным соединениям, когда два фармакофора соединены с помощью третьего дополнительного компонента. С использованием указанных подходов нами синтезировано обширное семейство гибридных NO-донорных соединений на основе производных полиеновых жирных кислот, эндоканнабиноидов, аминокислот (серина и треонина), нестероидных противовоспалительных препаратов, гидроксикислот, антибиотиков (цефалоспорина G) и других биологически активных соединений. В качестве NO-донорного фрагмента были использованы нитрогруппа, неполные нитраты полиолов и нитраты разнообразных аминоспиртов.

Введение в молекулы биоактивных липидов и других низкомолекулярных биорегуляторов фрагментов, генерирующих оксид азота (NO), в ряде случаев существенно изменяет спектр фармакологической активности исходного вещества. Подобная модификация оказалась наиболее перспективной в ряду природных простаноидов (простагландинов, простамидов, глицериновых эфиров простагландинов). Она позволяет сохранить практически неизменной структуру исходного простаноида при одновременном усилении фармакологически значимых эффектов, что приводит к существенному снижению возможных побочных эффектов, обычно сопровождающих применение природных простагландинов. Таким образом, создание гибридных полифункциональных соединений на основе доноров оксида азота и природных биорегуляторов или апробированных фармакологических агентов является перспективным направлением биофармацевтики.

Работа частично поддержана грантом РФФИ (проект 12-04-00608).

СЕРЧЕНЯ Т.С.¹, ЛАВСКАЯ А.С.², НЕЧЕСОВА Т.А.³, СВИРИДОВ О.В.¹

¹ *Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

² *Международный государственный экологический университет им. А.Д. Сахарова, Минск, Беларусь*

³ *РНПЦ «Кардиология», Минск, Беларусь*

АНАЛИТИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОКОЛИЧЕСТВ АЛЬБУМИНА В МОЧЕ ЧЕЛОВЕКА

В настоящее время артериальная гипертензия, ишемическая болезнь сердца и сахарный диабет являются наиболее распространенными хроническими невоспалительными заболеваниями. Важным аспектом в снижении риска развития сердечно-сосудистых осложнений и продлении жизни пациентов с артериальной гипертензией и ишемической болезнью сердца, а также в обеспечении высокого качества жизни пациентов с сахарным диабетом является своевременная эффективная диагностика и мониторинг этих заболеваний. Данным условиям отвечает тест количественного определения альбумина в моче человека. Под микроальбуминурией в настоящее время

понимают уровень экскреции альбумина с мочой в диапазоне 30–300 мг/сут или 20–200 мкг/мин, который превышает значения физиологической нормы, но не определяется обычными рутинными методами. Многочисленные клинические и эпидемиологические исследования убедительно доказывают, что микроальбуминурия является важнейшим ранним признаком поражения почек, отражает начальные стадии патологии сосудов и является самостоятельным неблагоприятным предиктором сердечно-сосудистой заболеваемости и смертности.

Целью данной работы было получение основных компонентов и разработка тест-системы для иммуноферментного определения микроколичеств альбумина в моче человека.

В результате работы получены основные реагенты и созданы конструкции диагностической тест-системы. Специфические антитела к альбумину человека, выделенные из сыворотки крови иммунизированных животных, характеризовались высоким титром и отсутствием перекрестных реакций с основными белками человека и альбумином животных. Твердофазный реагент, или иммунособент, для различных конструкций представлял собой 96-луночный микропланшет с иммобилизованным альбумином или специфическим антителом к альбумину. Для сохранения иммунохимических свойств антигена и антитела были разработаны методики их стабилизации на твердой фазе с помощью растворов специальных составов. Критериями эффективности твердофазной иммобилизации и выбора условий стабилизации антигена и антител служили такие параметры как аналитическая чувствительность, диапазон определяемых концентраций и коэффициент вариации. Калибровочные пробы с известными концентрациями альбумина человека были приготовлены на основе среды разработанного состава, обеспечивающего идентичность протекания иммунохимических реакций в калибровочных пробах и анализируемых образцах и стабильность антигена в процессе хранения. С использованием полученных реагентов были исследованы конструкции прямого и непрямого конкурентного иммуноферментного анализа. В конструкции непрямого конкурентного иммуноанализа в лунках микропланшета при инкубации происходит конкурентное распределение конъюгата специфических антител с пероксидазой из корней хрена между альбумином, находящимся на твердой фазе, и альбумином, присутствующим в растворе в составе калибровочных проб и анализируемых

образцов. В основе второй конструкции лежит принцип прямого конкурентного взаимодействия альбумина и его меченого ферментом аналога с антителами, иммобилизованными на твердой фазе. В обеих конструкциях анализируемые образцы не требуют предварительного разведения. Анализ проходит в одну стадию, характеризуется малой трудоемкостью и быстротой. Технические характеристики и аналитические параметры тест-систем соответствуют современным международным требованиям. Диапазон определяемых концентраций является широким и составляет 0,5–300 мг/л, коэффициент вариации не превышает 10 %, открытие находится в пределах 85–115 %. Установлено, что разработанные тест-системы позволяют достоверно дифференцировать здоровых людей и пациентов с микроальбуминурией. Данные иммуноаналитические системы могут эффективно использоваться в биомедицинских исследованиях и служить основой создания набора реагентов для иммуоферментного определения альбумина в моче человека.

СИДОРЧУК Ю.В., ЗАГОРСКАЯ А.А., УВАРОВА Е.А., ДЕЙНЕКО Е.В.

*Институт цитологии и генетики Сибирского Отделения Российской Академии Наук,
Новосибирск, Россия*

ВНЕЯДЕРНЫЕ ГЕНОМЫ РАСТЕНИЙ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ СИСТЕМЫ ЭКСПРЕССИИ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ

В последнее десятилетие значительно возрос интерес к генетически модифицированным растениям как продуцентам рекомбинантных белков хозяйственного и медицинского назначения. Для наработки рекомбинантных белков в растениях применяют несколько подходов. В первую очередь, перенос целевых генов в ядерный геном растений. Существенным недостатком этого подхода является низкий уровень выхода рекомбинантного белка. Тем не менее, на современном рынке фармацевтически ценных белков, получаемых на основе генетически модифицированных растений, он является доминирующим. Около 80% фирм-производителей используют для этих целей трансгенные растения с модифицированным ядерным геномом.

Другим подходом в получении рекомбинантных белков может служить перенос целевых генов во внеядерные геномы растений: митохондрии и хлоропласты. Принципиальная возможность генетической трансформации митохондрий в культуре клеток впервые была продемонстрирована на примере одноклеточной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*. Необходимо отметить, что системы генетической трансформации митохондрий к настоящему времени отсутствуют, и в связи с этим экспрессия белков различного функционального назначения в митохондриях пока остается недостижимой целью.

Наиболее привлекательной системой экспрессии для наработки рекомбинантных белков хозяйственного и медицинского назначения являются хлоропласты растений. В данном случае мишенью для переноса целевых генов является геном пластид (хлоропластов) называемый пластом. Мощным толчком к развитию этой технологии послужил тот факт, что она позволяет накапливать в растениях более 40% рекомбинантного от общего растворимого белка. Несмотря на высокий уровень выхода рекомбинантного белка у транспластомных растений, привлекательность этой системы экспрессии в значительной степени нивелируется целым рядом трудностей, преодоление которых имеет решающее значение для биотехнологии пластид. К таким трудностям следует отнести очень низкий выход растений-трансформантов, длительный период отбора, возникновение спонтанных мутаций.

В лаборатории биоинженерии растений проводятся исследования по трансформации генома пластид на примере модельных объектов табака и моркови. Решающее значение для успешной интеграции трансгена в геном хлоропластов, происходящей по принципу гомологичной рекомбинации, имеет структура последовательностей, фланкирующих целевые гены. В связи с этим в лаборатории проводятся работы по оптимизации последовательностей интеграционных фланков, обеспечивающих встройку в области инвертированного повтора, что дает возможность встроенному фрагменту ДНК дублироваться в процессе репликации и тем самым увеличивать дозу гена. Помимо этого в лаборатории проводится оптимизация состава регуляторных и кодирующих элементов, входящих в кассеты интеграции, позволяющая не только повысить эффективность трансляции, но и обеспечить в дальнейшем удаление используемых для отбора доминантных селективных маркеров и репортерных генов.

Основным методом доставки плазмидной ДНК в хлоропласты является биобаллистика. Несмотря на то, что общие принципы работы этого метода хорошо известны, в каждом конкретном случае необходим подбор его индивидуальных параметров. С использованием метода транзientной экспрессии нами отработаны параметры биобаллистики для эффективной доставки ДНК в клетки мезенхимы листа и каллусных культур у растений табака и моркови. Определены условия отбора растений-трансформантов на селективных средах, позволяющие сократить время культивирования и тем самым понизить вероятность возникновения спонтанных мутаций, обуславливающих устойчивость к антибиотикам.

СИЗЕНЁВА Е.С., ЩЕННИКОВА А.В., СКРЯБИН К.Г., ШУЛЬГА О.А.

Центр «Биоинженерия» РАН, Москва, Россия

ГОМЕОЗИСНЫЕ MADS-БЕЛКИ - ГОМОЛОГИ AGAMOUS, ИЗ РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА *ASTERACEAE*, ИХ РОЛЬ В МОРФОГЕНЕЗЕ РАСТЕНИЙ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ

Факторы транскрипции MADS-семейства играют ключевую роль в онтогенезе растений. Считается, что эволюция именно предшественников *MADS*-генов и механизмов контроля их экспрессии привела к возникновению цветка. Многочисленные экспериментальные данные ведущих лабораторий мира показывают, что функции гомологичных MADS-белков высоко консервативны, а конститутивная или эктопическая экспрессия *MADS*-генов в растениях (как в гомологичных, так и в гетерологичных системах) приводит к изменению времени зацветания и различным морфологическим превращениям как цветка, так и вегетативной системы. Это делает перспективным использование *MADS*-генов в биотехнологии декоративных и сельскохозяйственных растений. Наша работа посвящена функциональному исследованию MADS-белков Астровых: CDM37 из *Chrysanthemum morifolium* и HAM59 из *Helianthus annuus*. Структурный анализ последовательностей кДНК соответствующих генов показал, что они гомологичны *MADS*-гену *AGAMOUS* (*AG*), продукт которого определяет идентичность

репродуктивных органов цветка и регулирует завершение развития цветковой меристемы у *Arabidopsis thaliana*.

Для функционального анализа CDM37 и HAM59 с помощью агробактериальной трансформации листовых дисков нами были получены два вида трансгенных растений табака *Nicotiana tabacum*. Первые – 35S::*CDM37* – с конститутивной экспрессией полноразмерной кДНК *CDM37* под контролем промотора 35S *CaMV* и терминатора *NOS*, вторые – *FBP1*::*HAM59* – с эктопической экспрессией полноразмерной кДНК *HAM59* под контролем тканеспецифичного промотора гена петунии *FBP1* (обеспечивает транскрипцию гена в лепестках и тычинках) и терминатора *NOS*.

Посредством ПЦР было отобрано 29 трансгенных линий 35S::*CDM37*, при этом 15 из них демонстрировали характерный фенотип. В сравнении с контролем цветков было в 1,2-1,4 раза больше, стеблевых листьев – на 4-5 меньше, высота – в среднем на 25 см ниже, цветение – в среднем на неделю раньше, стеблевые листья – ассиметричны и слегка скручены. Органы околоцветника приобретали признаки репродуктивных. На верхних долях лепестков возникали структуры, подобные пыльникам. Основание каждого чашелистика превратилось в функционирующий нектарник, а верхнюю часть местами заменили ткани, подобные столбику и рыльцу. В поздних цветках линии 37-21 венчики преобразовались в пять тычинко-лепестков. ОТ-ПЦР подтвердила наличие мРНК гена *CDM37* во всех тканях первичных трансформантов. Поколение T1 имело тот же фенотип. Одно из десяти растений T2 выглядело нетрансгенным. ОТ-ПЦР выявила в нем отсутствие мРНК гена *CDM37*, хотя наличие кассеты экспрессии этого гена было подтверждено с помощью ПЦР анализа. Следовательно, трансгенный фенотип является результатом именно эктопической экспрессии *CDM37*.

Посредством ПЦР было отобрано 74 трансгенные линии *FBP1*::*HAM59*. Семь из них имели морфологические изменения, касающиеся количества органов цветка и формы венчика, в одном случае наблюдали тычинку с признаками лепестка. В дальнейшее исследование взяли четыре линии, несколько поколений которых прошли отбор на селективной среде и ПЦР анализ. Фенотипическое исследование выявило факты изменения места закладки лепестков, их количества, размеров и цвета. Наблюдалось формирование дополнительных отдельно стоящих лепестков в местах закладки тычинок. Пыльцы образовывалось мало, в результате чего цветки не могли самостоятельно

опыляться. Иногда менялось количество плодолистиков (вместо двух формировалось от трех до шести), а в завязи наблюдалось полное или частичное перерождение семязачек в структуры, подобные плодолистикам.

Полученные данные подтверждают принадлежность CDM37 и HAM59 к группе AG и свидетельствуют о том, что CDM37 и HAM59 запускают гены, отвечающие за формирование и развитие тычинок, плодолистиков и семязачатков. Известно, что конститутивная экспрессия *AG* и его гомологов в растениях приводит к раннему цветению и морфологическим изменениям в чашелистиках и лепестках. Отсутствие же экспрессии *AG* и его гомологов приводит к замене тычинок на лепестки, а пестика – на новый цветок с такой же моделью развития. Поэтому с точки зрения выведения новых декоративных («махровые» цветки), а также сельскохозяйственных (с измененным временем цветения) сортов белки группы AG, в том числе CDM37 и HAM59, несомненно, перспективны. Кроме того, нами обнаружено, что эктопической активности белка CDM37 достаточно для инициации программы развития функциональных нектарников в области закладки чашелистиков табака. Данное свойство CDM37 делает перспективным использование этого белка в биотехнологии медоносных культур растений.

СИМОНЕНКО Е.А., ШАЛИМОВА О.А.

ФГБОУ ВПО «Орловский государственный аграрный университет», Орел, Россия

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ПЛОДОВЫХ НАПОЛНИТЕЛЕЙ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ БЫСТРОПРИГОТАВЛИВАЕМЫХ ПРОДУКТОВ

В настоящее время перспективной переработкой плодово-ягодного сырья с целью максимального сохранения его биологической ценности является вакуумная сублимационная сушка.

Фракционирование при пониженных температурах минимизирует потери биологической ценности и позволяет получать пищевые ингредиенты, содержание отдельных компонентов в которых превышает содержание в исходном продукте.

Были проведены исследования и оптимизация процесса получения биологически активных продуктов: физико-химические, функционально-технологические и биохимические исследования получаемых фракций; разработаны технические условия на новую продукцию.

Цель работы - обеспечение высокоэффективной, ресурсосберегающей переработки плодово-ягодного сырья; разработка технологии получения биологически активных пищевых продуктов.

Объектами исследования являлись плоды тыква, яблоки и продукты их переработки.

Концентрат, получаемый в результате выпаривания, обладает высокой влажностью (40 – 60) % и не пригоден к длительному хранению. Влажность выжимок мякоти также высокая. С целью уменьшения влажности до уровня, обеспечивающего длительное хранение в обычных условиях при комнатной температуре, концентрат и выжимки сушатся при атмосферном давлении и температуре до 50 °С с получением сухих сока и выжимок.

Полученные данные концентрированного сока тыквы образцов №1- при 50°С и №2 – при 60°С на микро- и макроэлементы очень высокие, что позволяет покрывать суточную потребность человека в микро- и макроэлементах.

Таблица 1

**Содержание макро- и микроэлементов в плоде и концентрированном тыквы,
мг/100г**

Показатель	Содержание в плоде	Содержание в образце №1 - 50°С	Содержание в образце №2 - 60°С	Суточная потребность человека, мг/100г
Кальций (Ca)	25,0	149,5	147,6	800-1000
Железо (Fe)	0,4	9,36	3,09	15
Магний (Mg)	14,0	84,7	72,8	300-500
Марганец (Mn)	0,04	0,56	0,276	2
Натрий (Na)	4,0	17,2	14,9	4000-6000
Фосфор (P)	25,0	395,2	336,7	1000-1500
Цинк (Zn)	0,24	5,5	5,2	10-15
Калий (K)	204	409,5	321,9	1500-3500
Медь (Cu)	0,18	0,334	0,185	2-3

Глубокая переработка плодов, позволяет максимум сохранить нутриенты и при этом экономить энергетические ресурсы.

СИМОНОВИЧ Е.И., ШИМАНСКАЯ Е.И.

НИИ биологии Южного федерального университета, Ростов-на-Дону, Россия

ПРИМЕНЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ АКТИВИЗАТОРОВ ПОЧВЕННОГО ПЛОДОРОДИЯ, КАК ОДИН ИЗ СПОСОБОВ ЭКОЛОГИЗАЦИИ ЗЕМЛЕДЕЛИЯ НА ЧЕРНОЗЕМАХ ОБЫКНОВЕННЫХ В УСЛОВИЯХ РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Повышение и поддержание почвенного плодородия – одна из самых важных и сложных задач практической и теоретической деятельности человека. Урожайность сельскохозяйственных культур и интенсивность микробиологических процессов, протекающих в почве, находятся в прямой зависимости, поэтому большое значение приобретают способы активизации микробиологических процессов в ней. Одним из таких способов является внесение биологических активизаторов почвенного плодородия. В настоящее время их применение получает все более широкое распространение в сельском хозяйстве. С 1998-2011 гг. на территории Ростовской области проводятся исследования по разработке и внедрению в производство ряда биологических активизаторов почвенного плодородия, разрабатываются рекомендации по их использованию под сельскохозяйственные культуры.

Биологические активизаторы почвенного плодородия - вещества биологического происхождения, усиливающие процессы стимуляции активности природных компонентов почвенного ценоза.

Основными препаратами, применяемыми в опытах в качестве активизаторов почвенного плодородия являлись биоудобрение «Весна» (БУ), концентрат микроорганизмов «Белогор» (КМ) и Ризоторфин КМ, выпускаемые ООО «Научно-техническим центром биологических технологий в сельском хозяйстве» (НТЦ БИО) г. Шебекино Белгородской области.

В результате многолетних исследований установлено, что внесение биологических активизаторов почвенного плодородия в пахотный горизонт чернозема обыкновенного

способствует улучшению условий питания растений (увеличению количества нитратов и подвижного фосфора и калия) и повышению продуктивности сельскохозяйственных культур.

В результате применения системного подхода для анализа механизмов повышения почвенного плодородия чернозема обыкновенного установлены закономерности действия биологических активизаторов на стимуляцию взаимодействий в системе почва – сельскохозяйственная культура – фитофаги – инсектициды – почвенная микрофлора – почвенное животное население на биоценоотическом уровне в зависимости от почвенно-климатических условий. Использование биологических активизаторов почвенного плодородия под сельскохозяйственными культурами на богаре и в закрытом грунте, цветочными культурами и многолетними травами влияет на состав и структуру населения микроартропод, активизирует микробиологические процессы в почве агроценозов. Внесение биологических активизаторов почвенного плодородия в пахотный горизонт чернозема обыкновенного ведет к стимуляции метабиотических связей большинства групп почвенной микрофлоры и микроартропод, к трансформации структурно-функциональной организации комплексов почвенных беспозвоночных в зависимости от почвенно-климатических условий.

Биологические активизаторы почвенного плодородия не оказывают влияния на биологическую эффективность инсектицидов, одновременно повышая урожайность растений. Использование биологических активизаторов почвенного плодородия в качестве косубстратов периферийного метаболизма фенилпиразольных инсектицидов активизирует микрофлору природных агроценозов и способствует снижению токсичности фипронила в течение 3-12 месяцев с момента внесения их в почву, что является одним из способов решения проблемы экологизации системы защиты растений.

За период исследований был получен чистый доход на сумму 8699025 руб. от применения биологических активизаторов почвенного плодородия на площади 288 га. Один затраченный рубль в год применения активизаторов окупался в 6-10 раз. При этом была сохранена почвенная фауна и в целом среда от загрязнения инсектицидами.

В результате проведенных исследований обоснован эколого-биосферный способ ведения сельского хозяйства, при котором сохранение и повышение плодородия почв и урожайности сельскохозяйственных культур достигается путем создания устойчивых

агробиоценозов, не нарушающих биохимические потоки в агроландшафтах и использующий естественные процессы в биосфере.

Таким образом, с применением биологических активизаторов почвенного плодородия решена задача по экологизации земледелия на черноземах обыкновенных в условиях Ростовской области и обоснован способ получения экологически чистой продукции на фоне повышения урожайности сельскохозяйственных культур.

СИНЕВА О.Н.¹, ФИЛИППОВА С.Н.², СУРГУЧЕВА Н.А.²,
ЕРМАКОВА Е.В.³, КИСЕЛЕВ М.А.³, ГАЛАТЕНКО О.А.¹, ТЕРЕХОВА Л.П.¹,
ЗАБЕЛИН А.В.⁴, ГАЛЬЧЕНКО В.Ф.²

¹ ФГБУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков
им. Г.Ф. Гаузе РАМН, Москва, Россия

² Учреждение Российской академии наук Институт микробиологии
им. С.Н. Виноградского РАН, Москва, Россия

³ Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия

⁴ Курчатовский центр синхротронного излучения и нанотехнологий,
Российский научный центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ АКТИНОБАКТЕРИЙ

Изучение выживаемости актинобактерий в условиях низких температур необходимо для совершенствования режимов их хранения. Адаптация микроорганизмов к условиям окружающей среды во многом зависит от состава и строения клеточной мембраны. Методом дифракции нейтронов показано, что структура и состав липидной фракции клеточных мембран актиномицетов *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 27438 и штамма 34-06, отнесенного к роду *Nonomuraea*, отличаются. Преобладающими компонентами фосфолипидной фракции культуры *Streptomyces hygroscopicus* являются фосфатидилглицерин, фосфатидилинозит и фосфатидилсерин, а в составе фракции фосфолипидов штамма *Nonomuraea sp.* 34-06 - фосфатидилэтаноламин и фосфатидилглицерин. Фосфолипиды штамма *Streptomyces hygroscopicus* образовывали

мультиламеллярные слои достаточно плотной упаковки, в то время как липиды фосфолипидных фракций *Nonomuraea* sp. 34-06 формировали ламеллярную и инвертированную гексагональную фазы. Была установлена нестабильность структуры липидной фракции при хранении образца при пониженной температуре (+4⁰С), а также ее сильное изменение в результате гидратации у штамма 34-06 *Nonomuraea*, в то время как у культуры рода *Streptomyces* таких изменений не наблюдалось. Возможно, фосфатидилэтаноламин, являясь преобладающим компонентом фосфолипидной фракции штамма 34-06, окисляясь, приводит к ее нестабильности. Исходя из полученных данных, можно было предположить, что штамм *Nonomuraea* sp. 34-06 окажется менее устойчивым к хранению в кельвинаторе при температуре -70⁰С.

Поэтому было проведено изучение выживаемости штаммов актинобактерий при температуре -70⁰С в течение одного года. На хранение закладывались споровые суспензии культур *Nonomuraea* sp. 34-06 и *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 27438 в 10% растворе глицерина. Анализ выживаемости культур проводили на основании сравнения числа КОЕ до закладки споровой суспензии на хранение и через определенные интервалы (1, 2 недели, 1,2,3,5, 12 месяцев) в процессе хранения. Исследование не выявило различий в жизнеспособности спор штамма *Nonomuraea* sp. 34-06 по сравнению со штаммом *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 27438 при их хранении в течение 1 года, при этом не было отмечено уменьшения количества КОЕ у каждого из исследованных штаммов. Полученные результаты, вероятно, можно объяснить тем, что раствор глицерина является хорошим криопротектором для хранения данных актинобактерий в условиях низких температур.

СИРОТКИН А.С.

*Казанский национальный исследовательский технологический университет,
Казань, Россия*

СОВРЕМЕННЫЕ ЭКОБИОТЕХНОЛОГИИ ОЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД

Многообразие биохимических функций микроорганизмов привело к формированию «доктрины катаболической безотказности микробов», так как любое органическое

соединение, имеющееся в природе, используется какими-либо микроорганизмами. Однако было бы ошибочным считать, что микроорганизмы биоценозов очистных сооружений сточных вод (активного ила и биопленки) способны разрушить любое синтетическое органическое вещество, особенно если это вещество токсично и вследствие этого губительно влияет на организмы активного ила или, напротив, является биологически ригидным, поступает эпизодически и в малых концентрациях (О.В. Турковская, 2000).

Учитывая вышеизложенное, актуальным является создание оптимальных с технико-экономической точки зрения условий культивирования микроорганизмов, участвующих в процессе очистки сточных вод. При этом некоторые исследователи обоснованно полагают, что методы интенсификации процесса биологической очистки сточных вод инженерными средствами близки к исчерпанию и приоритет получает использование резервов самих микроорганизмов и создание условий для их реализации.

С учетом вышесказанного к перспективным приемам интенсификации процесса биологической очистки сточных вод в настоящее время следует отнести следующие:

- *создание и внедрение биосорбционных систем очистки сточных вод в аэротенках.*

В указанных системах микробные клетки закрепляются (сорбируются, иммобилизуются) на поверхности блочных или порошкообразных загрузок, помещаемых в аэротенки;

- *микробная агрегация* с получением и использованием гранулированных форм микробных агрегатов (так называемых анаэробных и аэробных микробных гранул). Получение микробных гранул связано с протеканием процесса самоиммобилизации в биологической системе смешанного микробного сообщества;

- *высокоэффективная биофильтрация с биорегенерацией сорбента.* В биофильтрах развивается еще одна из агрегированных микробных форм - биопленка, содержащая разнообразные микроорганизмы, в результате деятельности которых происходит глубокое удаление всей гаммы примесей сточных вод. Интерес также представляет и то, что в биофильтрах могут одновременно протекать процессы, требующие для этого совершенно различных условий (такие как, например, нитрификация, денитрификация, анаэробное окисления аммония и др.); в результате сточная вода подвергается комплексной очистке от примесей;

- *биоаугментация в смешанных культурах* (биоценозах активного ила и биопленки).

Её основная идея состоит в том, чтобы использовать бактерии со специфическими

структурообразующими или метаболическими свойствами (например, флокулообразующие бактерии, нитрификанты, деструкторы хлорированных углеводов) с целью придания автохтонным биологическим сообществам, функционирующим в системе очистки сточных вод, свойств, которые способствуют ускорению адаптации и выработки устойчивости системы по отношению к изменяющимся внешним условиям;

- *башенная биология*, предполагающая высокую эффективность использования кислорода, облегченный монтаж, обслуживание и ремонт, отсутствие шума и образование запахов, снижение потребления электроэнергии, а также значительную экономию производственной площади;

- *перспективные системы аэрации сточных вод*. Судя по разнообразию существующих диспергирующих устройств для воздуха, вероятно, это самый освоенный и распространенный прием интенсификации процесса биологической очистки.

Вышеуказанные инновационные водоохранные биотехнологии в разной мере реализованы для защиты природных водоемов от техногенного воздействия объектов промышленности и городского хозяйства.

СИПАЙЛОВА О.Ю., ЛЕБЕДЕВ С.В., НЕСТЕРОВ Д.В.

*Институт биоэлементологии ФГБОУ «Оренбургский государственный университет»,
Оренбург, Россия*

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ СЕЛЕЗЕНКИ КРЫС НА ФОНЕ ВВЕДЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ ЖЕЛЕЗА

В эксперименте на двухмесячных самцах крыс линии «Wistar» изучено влияние интраперитонеального введения раствора высокодисперсного нанопорошка железа (Fe_3O_4 с ядром Fe^{+3}) с размерами гранул $80 \pm 15 \text{ нм}$, в дозе 20,8 мг/кг в течение 3-х (I опытная) и 10 суток (II опытная) на морфофункциональное состояние селезенки животных. Животным контрольной группы интраперитонеально вводили стабилизирующий физиологический раствор.

Для приготовления суспензии нанопорошка железа, навеску порошка растворяли в стабилизирующем физиологическом растворе, с последующей сонификацией на ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-2Т, чтобы разрушить конгломераты наночастиц, которые образуются при хранении нанопорошка.

Выведение животных из эксперимента проводилось под эфирным наркозом на 3 и 10 сутки. Для морфологического исследования извлекали селезенку, с последующей фиксацией в 10% растворе нейтрального формалина Парафиновые гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином, на волокнистые структуры - пикрофуксином по Ван Гизон. Применялись гистохимические реакции для выявления железа с получением берлинской лазури по Перслу в модификации по Лизону и Бантингу и реакции с альциановым синим, который связывается только с неорганическим железом.

В ходе исследований установлено, что морфологические реакции тканевых элементов селезенки в значительной степени определялись длительностью поступления экзогенного железа в организм животных. У крыс I опытной группы основные морфофункциональные изменения развивались в красной пульпе. В сравнении с контрольной группой животных, кавернозные венозные синусы расширялись, становились полнокровные, в просвете наблюдалось содержание большого количества железосодержащего пигмента. Отмечено повышение пролиферативной активности эндотелиальных клеток. Высокой активностью характеризовались макрофаги. Функциональной их особенностью являлось образование сидерофагов и сидеробластов с накоплением в цитоплазме гранул железа, которые распределялись равномерно по всей цитоплазме клеток. В ретикулярной ткани между синусами повышалось содержание свободных гранул железосодержащего пигмента, значительно в большем количестве, чем в селезенке крыс контрольной группы. Оживлялась пролиферация клеток лимфоидного ряда с преобладанием лимфоцитов и лимфобластов; отмечалось накопление соединительнотканых клеток – фибробластов

При введении раствора нанопорошка крысам в течение 10 дней (II опытная группа) по всей красной пульпе происходило усиленное накопление железа, которое располагалось в виде мелких гранул с формированием крупных конгломератов, давая яркую окраску на железо. Наблюдалась реакция белой пульпы селезенки в виде увеличения клеточного пролиферата в фолликулах. Сами фолликулы увеличивались в

размерах, в них практически отсутствовал железосодержащий пигмент. Четко определялись мантийная и маргинальная зоны фолликулов с большим количеством клеток. Наблюдалось формирование вторичных центров размножения. Особенностью клеточного пролиферата фолликулов являлось накопление плазмобластов и плазматических клеток в формирующихся реактивных центрах, мантийной и маргинальной зонах.

Таким образом, избыточное поступление в организм трехвалентного железа в виде наночастиц вызывало неоднозначные морфофункциональные процессы в селезенке лабораторных животных, которые проявились в виде нарушений кровообращения, пролиферативных и иммунологических реакций. При этом выраженность данных изменений, в значительной степени, определялась длительностью поступления металла в организм.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Министерства образования и науки Российской Федерации на проведение научно-исследовательских работ (Шифр заявки № 4.2979.2011 г.).

СКЛАДНЕВ Д.А.

*Учреждение Российской Академии Наук Институт Микробиологии
им. С.Н.Виноградского РАН, Москва, Россия*

ПОЛЯРНЫЕ ЛИПИДЫ МЕМБРАН, БИОЛОГИЧЕСКАЯ ЭВОЛЮЦИЯ И ВОЗНИКНОВЕНИЕ АНИБИОТИКОВ

"Nothing in biology makes sense except in the light of evolution."

Th. Dobzhansky (1973)

В качестве отправной точки для рассмотрения вопросов биологической эволюции на Земле удобно выбрать момент, когда первый свободноживущий прокариотический организм совершил первое клеточное деление. Для обозначения этого момента предлагается использовать слово, составленное из греческих корней — диплапархе (δίπλα и ἀρχή) самое первое удвоение. Способность свободно существовать на поверхности ещё стерильной, неорганической планеты, требовала от клеток первого земного вида

прокариотов (Пионеров) тех же функций, которые реализуются современными прокариотами: трансляция, транскрипция, репликация и репарация ДНК, полное обеспечение энергетических потребностей биосинтеза всех функциональных соединений и компонентов клеток, удаление цитотоксичных продуктов метаболизма. Можно предположить, что цитоплазматические мембраны клеток Пионеров, как самых первых свободноживущих организмов, отличались скудным составом полярных липидов, поскольку для формирования функциональной замкнутой липидной бислоевой мембраны с выраженной кривизной и анизотропией внешней и внутренней сторон достаточно всего двух(-трёх) типов молекул полярных липидов. Просто устроенные мембраны могли легко пропускать внутрь клеток Пионеров низкомолекулярные ростовые и энергетические субстраты и не препятствовали выделению отработанных продуктов.

Все современные данные показывают, что эволюционно более сложные клетки и организмы имеют всё более и более разнообразный состав полярных липидов цитоплазматических мембран. Возникает вопрос, как шло усложнение химического состава мембран в ходе эволюции?

Мы предполагаем, что мутации по генам биосинтеза полярных липидов (приводящие к синтезу молекул новых типов — с новыми группировками внутри липида, с изменёнными полярными группировками, с новыми размерами и геометрией молекул и т.п.) не должны были быть «забракованы отбором», поскольку полярные молекулы практически любого вида способны включаться в бислою мембраны без ущерба для его геометрии, то есть для общей жизнеспособности клетки. Соответственно, можно предположить, что темп усложнения химического разнообразия полярных липидов оказался принципиально выше, чем темп усложнения компонентов иных ветвей сбалансированного метаболизма. Именно несдерживаемый рост разнообразия липидного состава цитоплазматических мембран обеспечивал увеличение разнообразия трансмембранных и мембран-ассоциированных белков, что предопределяло возможность отбора наиболее конкурентоспособных форм Пионеров. Очевидно, что эволюционное преимущество получали те и только те клетки, которые обладали высокой жизнеспособностью и которые начинали эффективнее использовать ростовые и энергетические субстраты.

По мере колонизации Земли Пионерами, клетки могли накапливать казалось бы вредные мутации, приводившие к биосинтезу токсичных аналогов нормальных биомолекул. Понятно, что выживали только мутанты, выработавшие адекватные механизмы изоляции токсинов от основного объёма цитоплазмы. Именно тогда могли появиться механизмы, широчайшим образом распространённые в современной биоте: выведение токсичных аналогов в виде их полимеров или внутриклеточная инкапсуляция. Таким образом, одновременно формировались надёжные механизмы защиты от цитотоксичных продуктов собственного биосинтеза, а также экзогенных токсичных соединений, например, солей металлов. Соответственно, клетки, секретирующие цитотоксичные продукты даже в крайне низких концентрациях, подавляли развитие иных микроорганизмов и получали конкурентное преимущество в доступе к внешним ростовым субстратам по сравнению с остальными культурами. Эволюционно такие генетические признаки, несомненно, должны были закрепляться в новых видах/таксонах.

Среди обычных компонентов метаболизма в качестве неправильных и вредных продуктов могли оказаться, прежде всего, D-аминокислоты. Полимеризация именно «аминокислоты-содержащих» соединений, относимых ныне к классу пептидных антибиотиков, широко распространена у представителей всех трёх доменов Archaea, Bacteria, Eukarya. Вероятно, с этим связана и повышенная устойчивость рибосом многих представителей Archaea к биоцидным пептидам.

СКОБЛИКОВ Н.Э.¹, ЗИМИН А.А.²

¹*Северо-Кавказский научно-исследовательский институт животноводства,*

Краснодар, Россия

²*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.Скрябина, Пущино, Россия*

ПЛАЗМИДНЫЙ ПРОФИЛЬ ИЗОЛЯТОВ *E. COLI* КИШЕЧНОГО МИКРОБИОЦЕНОЗА СВИНЕЙ В ОНТОГЕНЕЗЕ

Целью исследования было изучение плазмидного профиля штаммов *E. coli*, изолируемых периодически в микробиоценозе одного и того же животного (свиньи) в течение индивидуального развития.

У двух животных (поросята породы СМ-1) отбирались образцы содержимого толстой кишки в различном возрасте: в возрасте 10 дней, 33 дня, 61 день, 155 дней.

Из фекалий животных после разведения осуществляли первичный посев на плотную питательную среду Эндо с последующим инкубированием, после которого отбирали изолированные колонии, подозрительные на *E.coli*, учитывая их морфологические особенности и количество колоний данных изолятов.

В отношении каждого из идентифицированных изолятов *E. coli* определяли спектр его антибиотикорезистентности диско-диффузионным методом к набору из 30 антимикробных химиотерапевтических препаратов. Оценку чувствительности к антибактериальным препаратам давали по системе *SIR* согласно критериям *CLSI*.

Плазмидный профиль выделенных изолятов *E.coli* исследовали, используя щелочной метод выделения плазмидной ДНК. Исследование раствора, содержащего плазмидную ДНК, проводили с помощью электрофореза (60 мин при напряженности электрического поля 5 В/см) в 0,8 % агарозном геле, приготовленном на *TBE*-буфере. По окончании электрофореза гели с разделенной ДНК окрашивали в водном растворе бромистого этидия и фотографировали получившиеся фрагменты в проходящем жёстком ультрафиолетовом свете.

Для проверки обусловленности антибиотикорезистентности исследуемых штаммов *E.coli* наличием у них соответствующих R-плазмид проводили опыт по трансформации компетентных клеток, полученных с применением хлористого кальция.

В результате посевов биоматериала, отбираемого от двух животных за четыре возрастных периода, было выделено 12 культур, подозрительных на *E.coli*: 1a1, 1a+, 1a2, 1b1, 1b+, 2a1, 2b3, 3a1, 3b1, 3b2, 4a1, 4a2. От одного животного выделялось не более трёх штаммов *E.coli*.

По результатам исследования чувствительности к спектру антимикробных химиотерапевтических препаратов было установлено, что все выделенные изоляты отличались по устойчивости к антибиотикам друг от друга.

Наиболее значимыми отличиями в антибиотикограммах выделенных штаммов были следующие: резистентность штамма 2b3 к фторхинолонам (левофлоксацину, норфлоксацину, офлоксацину, цiproфлоксацину) при чувствительности к ним остальных изолятов; резистентность штаммов 3a1 и 3b1 к пенициллинам (амоксциллину и

ампициллину); резистентность штамма 4a1 к хлорамфениколу; резистентность штаммов 4a1 и 4b1 к кларитромицину (при умеренной резистентности к нему остальных штаммов); умеренная резистентность штаммов 1a1 и 1a+ к цефуроксиму.

Таким образом, выяснилось, что ни один штамм *E. coli* не обнаруживался повторно у одного у того же животного во все периоды отбора материала (10 дней, 33 дня, 61 день, 155 дней).

По результатам исследования плазмидного профиля выделенных изолятов *E.coli* установлено, что некоторые штаммы характеризовались наличием различных плазмид. Так, штаммы 1a1 и 1a+ имели в своём составе две плазмиды с м.м. 5000 и 3000 п.о. соответственно. Штаммы 1a2 и 4b1 имели в составе по одной плазмиде с м.м. около 2500 п.о.; штамм 2b3 имел в составе две плазмиды с м.м. около 6000 и 1300 п.о.; штамм 3b2 имел в составе одну плазмиду с м.м. около 2300 п.о.

Нами сделано предположение о том, что различия в антибиотикорезистентности среди исследуемых штаммов обусловлена наличием у них соответствующих R-плазмид; в частности – что резистентность к хинолоновым антибиотикам у изолята *E.coli* 2b3, вероятно, обусловлена наличием у него плазмид с м.м. 6000 и 1300 п.о. соответственно. Это предположение было подтверждено положительным результатом опыта трансформации компетентных клеток плазмидами изолята *E.coli* 2b3.

Работа была поддержана грантом РФФИ № 11-04-96575-р_юг_ц.

СЛИВКИН А.И.¹, ЛАПЕНКО В.Л.¹, ПОПОВ В.Н.¹, КОРНИЕНКО С.В.², БЕЛЕНОВА А.С.¹

¹ Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

² КУЗ ВО Воронежский областной клинический противотуберкулезный диспансер им. Н.С. Похвисневой, Воронеж, Россия

РАЗРАБОТКА ПОЛИМЕРНЫХ КОМПЛЕКСОВ ГИДРАЗИДА ИЗОНИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ, ОБЛАДАЮЩИХ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫМ ДЕЙСТВИЕМ

Из литературных источников известно, что бактериальные и вирусные антигены, конъюгированные с полиэлектролитами-матрицами вызывают в организме формирование

высокой специфической протекторной иммунной защиты против соответствующих патогенных антител.

В научных публикациях сообщается о целесообразности использования для модификации противотуберкулезных препаратов полимерных матриц, способствующих завершению процессов фагоцитоза, что открывает возможность использования клеточных механизмов естественной резистентности организма в борьбе с туберкулезной инфекцией.

В настоящем исследовании для иммобилизации гидразида изоникотиновой кислоты (ГИНК) использована матрица, включающая водорастворимый катионоактивный аналог хитозана N-хлоргидроксипропилхитозан (ХХТЗ) с высокой степенью диссоциации йоногенных групп, со средней молекулярной массой 5-10 тыс., комплексированная с ионами кобальта (ХХТЗ-Co). Комплексы модифицированных полиионов синтезировали по известной методике Рашидовой С.Ш.(1980). Содержание металлов в полимерметаллокомплексах определяли комплексометрически. Кристаллогидраты $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ марки ч.д.а. использовали после перекристаллизации.

Связывание лекарственного вещества с ХТЗ-Co проводили в водном растворе при перемешивании в течение 90 минут в инертной сфере (25 °С); соотношение полимер:ГИНК, как 1:1, объемный модуль-20. Целевой продукт (ХТЗ-Co-ГИНК) осаждали этанолом. Непрореагированный ГИНК выделяли и определяли количественной экстракцией с контролем исчерпывающего его излучения УФ-спектроскопией по полосе поглощения 262 нм в экстракте. По длинам электронных спектров центральный ион имеет октаэдрическое окружение. Геометрия связывания Co^{2+} в комплексе квадратно-планарная. Содержание ГИНК в полимерном комплексе определяли по данным элементного анализа на азот и УФ-спектроскопией. Изониазида в целевом продукте 8,2%. Туберкулостатическая активность *invitro* (H37Rv) для ХТЗ-Co-ГИНК в пересчете на ГИНК составляла 0,08 мкг/мл.

Изучены иммуномодулирующие свойства полииона с Co^{2+} , а также ХТЗ-Co с ГИНК. В экспериментах использовали мышей линии СВА трехмесячного возраста массой 18-20 г. Животных иммунизировали однократно внутрибрюшинно эритроцитами барана (ЭБ). На пятые сутки после антигенного стимула в селезенке определяли количество антителообразующих клеток (АОК) прямым методом локального гемолиза в агарозе по

Ерне. Исследуемые соединения вводили однократно внутривенно вместе с ЭБ в дозе 25,0 мг/кг.

Новый полимерный металлокомплекс обладает выраженной иммуностимулирующей активностью. Включение иммунокоррекции в химиотерапию туберкулеза повышает эффективность традиционного лечения.

СМИРНОВ А.А., ПУТЛЯЕВ Е.В., ЛАЗАРЕВА Е.А.

*Московский государственный университет им.М. В. Ломоносова,
Биологический факультет, кафедра вирусологии, Москва, Россия*

НОВЫЙ ВИРУСНЫЙ ВЕКТОР ДЛЯ ПРОДУКЦИИ БЕЛКОВ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ В РАСТЕНИИ

Лекарственные средства на основе различных белков все шире используются в современной медицине. Так, для лечения многих заболеваний применяют физиологически активные белки человека: цитокины, гормоны, ферменты и т.д. Кроме того, основным компонентом многих вакцин являются иммуногенные белки патогенов человека. Таким образом, современная биотехнологическая промышленность нуждается в эффективном и низком по себестоимости методе производства различных белков.

По сравнению с другими подходами, накопление белков медицинского назначения в растениях имеет ряд существенных преимуществ:

- 1) Растения не требуют сложного оборудования для культивирования, и обеспечения стерильности, что значительно снижает затраты на производство.
- 2) Растения не имеют общих с человеком патогенов, что обеспечивает высокую биобезопасность производства и конечного продукта.
- 3) Растения могут обеспечить высокий уровень накопления целевого белка

Вирусоподобные частицы (ВПЧ), образованные белками оболочки (БО) различных растительных вирусов, широко используются в современной биотехнологии. Так, одним из перспективных подходов для производства вакцин является создание ВПЧ, декорированных пептидами - антигенными детерминантами различных патогенов. Подобные вакцинные препараты отличает высокая иммуногенность и биобезопасность.

Целью данной работы было создание нового вирусного вектора для продукции белков медицинского назначения в растении.

Ранее в нашей лаборатории был описан новый штамм вируса мозаики альтернантеры (AltMV-MU (GenBank FJ822136.1)), БО которого, способен образовывать ВПЧ в отсутствие РНК.

В данной работе создан новый вирусный вектор (AltMV- вектор) на основе кДНК копии геномной РНК AltMV-MU, лишенный генов транспортных белков. Ген целевого белка находится под контролем мощного субгеномного промотора гена БО. Для трансформации растений полученным вектором использовался метод агроинфильтрации в присутствии рекомбинантной агробактерии, несущей ген p19 - репрессор РНК интерференции вируса кустистой карликовости томатов.

AltMV- вектор обеспечивает чрезвычайно высокий уровень экспрессии БО AltMV-MU в зараженных листьях *Nicotiana benthamiana*, достаточный для эффективного образования ВПЧ. Таким образом, разработанная экспрессионная система может быть использована для получения ВПЧ.

AltMV-вектор также обеспечивает эффективное накопление рецептор связывающего домена гемагглютинаина вируса гриппа (HA-RBD) штамма H1N1 A/California/07/2009 в листьях *Nicotiana benthamiana*. HA-RBD содержит все основные антигенные детерминанты гемагглютинаина, являющегося компонентом современных противогриппозных вакцин.

Таким образом, в данной работе разработан новый вирусный вектор, обеспечивающий эффективное накопление белков медицинского назначения в растении.

СМИРНОВ А.К.

Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН,

пос. Борок Ярославской обл., Россия

ИЗБИРАЕМЫЕ И ЛЕТАЛЬНЫЕ ТЕМПЕРАТУРЫ МОЛОДИ ОКУНЯ (*PERCA FLUVIATILIS* L.) В ТЕЧЕНИЕ ПЕРВОГО МЕСЯЦА ЖИЗНИ

Рыбы, как и большинство других пойкилотермных организмов, способны к самопроизвольному выбору оптимальных температурных условий для существования. Это

явление имеет место и в природе, и в лабораторных условиях. При наличии в среде температурного градиента гидробионты, спустя некоторое время, сосредотачиваются в зоне с определенными значениями температур. Такие температуры называются «избираемыми» или «предпочитаемыми».

Ранее были исследованы возрастные и сезонные изменения избираемых и летальных температур у отдельных видов рыб (Лапкин и др., 1981; Jobling, 1981; McCauley, Read, 1973 и др.). В то же время, данных о температурных предпочтениях ранней молодежи очень мало.

Цель настоящей работы заключалась в установлении значений избираемой и верхней летальной температуры у молодежи окуня в течение первого месяца с момента вылупления.

Экспериментальный материал получен путем инкубации икры, взятой из канала п. Борок (Рыбинское водохранилище) после естественного нереста окуня в мае 2010 г. На начало эксперимента возраст личинок окуня, считая с момента массового выклева, составлял 7 суток. Средняя длина составляла 5.0 ± 0.2 мм. Было исследовано 70 личинок окуня.

Эксперименты проведены в горизонтальной термоградиентной установке. Температурный градиент составлял 15.0°C , от 15.0°C в холодном конце лотка до 30.0°C в теплом. Жесткость градиента составляла $0.05^{\circ}\text{C см}^{-1}$. В начале эксперимента рыб помещали в отсек установки с температурой, равной температуре их акклимации. Наблюдения за рыбами производились ежедневно пять раз в сутки. При этом записывался номер отсека, в котором располагались особи, их количество и температура воды в отсеке. Личинок в градиенте кормили живым зоопланктоном два раза в сутки.

Исследования летальных температур проводились при скорости нагрева воды $\approx 17^{\circ}\text{C ч}^{-1}$. Отмечались время и температура, при которой личинки переставали реагировать на прикосновение стеклянной палочки.

Непосредственно после посадки личинок окуня в термоградиентную установку было отмечено их интенсивное движение в сторону повышения температуры. В течение первых суток они были отмечены в отсеках с температурами от 17.4 до 28.8°C , при этом средняя избираемая температура составила 22.6°C . Далее наблюдался постепенный рост значений избираемых температур и начиная с 25-х и по 35-е сутки после выклева наступил

период стабилизации данных значений на уровне от 25.5 до 26.3°C ($p < 0.05$). Интересно отметить, что ранее проведенные исследования показывают, что конечная избираемая температура у сеголеток окуня достигает своего максимума в течение первого года жизни и составляет $\approx 26.5^\circ\text{C}$ (Лапкин и др., 1981). Следовательно, такие температурные предпочтения появляются у молоди очень рано и сохраняются в течение первых лет жизни, начиная изменяться в сторону снижения лишь с началом полового созревания.

Анализ полученных в эксперименте данных показывает, что начиная с первых недель жизни личинок окуня значение верхних летальных температур очень высокое (32.0-33.7°C в течение эксперимента) и приближается к максимальному для данного вида. Так верхняя летальная температура сеголеток окуня определенная методом критического термического максимума при скорости нагрева $17^\circ\text{C}/\text{ч}$ составила 32.7°C (Смирнов, Голованов, 2005).

Подытожив отмеченные выше результаты можно сказать, что личинки окуня уже на первой неделе своей жизни делают попытки перейти в зоны с температурами воды близкими к оптимальным для вида значениям. Такая поведенческая реакция позволяет им оптимизировать свой уровень метаболизма и достичь максимальной скорости роста. В естественной среде наиболее прогреваемые участки водоемов это мелководные прибрежья. Не случайно именно на них сосредотачивается молодь большинства видов рыб, так как повышенный температурный фон привлекает сюда и различные кормовые организмы, ускоряя их циклы развития. Кроме того сильное зарастание мелководий предоставляет большое количество укрытий для молоди. Наряду с этим, появляющаяся очень рано высокая температурная устойчивость у личинок окуня предотвращает их гибель в случае чрезмерного прогрева мелководий.

СМИРНОВА Т.А.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

ЗАВИСИМОСТЬ АМПЛИТУДНЫХ ОТНОШЕНИЙ СПЕКТРАЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ ГЛАСНЫХ ОТ ЧАСТОТЫ ОСНОВНОГО ТОНА

Согласно классическим представлениям, основным признаком, характеризующим гласные разговорной речи, служат частотные значения их формант. Однако известно, что

формантный подход не может быть распространен, например, на звуки с высокой частотой основного тона. Значительно меньше уделено внимания роли амплитудных характеристик гласных. Исследования последних лет подчеркивают важность амплитудных отношений между формантами для распознавания гласных (Ito, 2001; Jacewicz, 2005; Kiefte et al., 2010). Полученные нами ранее данные позволяют подтвердить роль относительной амплитуды (в психофизиологических экспериментах с использованием естественных гласных [a], [o], [y], произнесенных детьми (3-5-летнего возраста) и взрослыми – при разных частотах основного тона (240-400 Гц)). В данном исследовании оценивалась восприятие синтезированных стимулов с частотой основного тона 382 Гц. В данном диапазоне естественные гласные [o] и [y] могут быть лишены формантной структуры.

На основании ранее полученных данных и с учетом характеристик естественной речи был осуществлен синтез серии тестовых стимулов с последовательным изменением амплитуды первой и второй гармоник. Во всех стимулах эти гармоники являлись спектральными максимумами, исходно были равны по амплитуде. В одной части серии последовательно снижалась амплитуда первой гармоники, в другой – второй, в пределах сохранения естественного звучания (шаг в 2 дБ). Остальные параметры стимулов (частота основного тона, амплитуды третьей и четвертой гармоник, длительность стимула) сохранялись постоянными. Синтез и модификация стимулов осуществлялись с помощью компьютерной программы Adobe Audition. В тестовой серии стимулы предъявлялись в случайном порядке с помощью компьютерной программы Praat, каждый стимул в серии повторялся три раза. Аудиторами выступили 10 студентов Санкт-Петербургского государственного университета, носителей русского языка, не имеющих нарушений слухового восприятия.

В эксперименте по идентификации тестовых стимулов (трехальтернативный вынужденный выбор) выявлено, что изменение относительной амплитуды спектральных компонентов приводит к изменению их фонетической идентификации (ряд [a]-[o]-[y]). Между однозначными фонетическими интерпретациями существует несколько промежуточных. Проведенный индивидуальный анализ показал наличие областей уверенной идентификации для каждого аудитора. Суммарный анализ выборки показал варьирование переходных областей, однако области уверенной идентификации (и их зависимость от амплитуды гармонических составляющих) выявляются. Показано

соответствие этих областей диапазонам, характерным для естественных гласных [а], [о], [у] при сопоставлении.

Для уточнения перцептивных границ в настоящее время проводятся эксперименты с предъявлением серии последовательно изменяющихся стимулов и выбором испытуемым граничных сигналов.

СМОЛЕНСКИЙ И.В.

*Санкт-Петербургский Государственный Университет, Институт физиологии
им. И.П.Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия*

НЕЙРОГОРМОНАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ ФОРМИРОВАНИЯ ПОСТСТРЕССОРНЫХ РАССТРОЙСТВ У ПРЕНАТАЛЬНО СТРЕССИРОВАННЫХ САМЦОВ КРЫС

Тревожно-депрессивные расстройства, сопровождающиеся нарушением функционирования гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы (ГГАС), к числу которых относится посттравматическое стрессовое расстройство (ПТСР), входят в число самых распространенных заболеваний в современном обществе. Поэтому одной из актуальных задач физиологии и медицины является изучение факторов, увеличивающих предрасположенность к данным заболеваниям. В предыдущих экспериментах нашей лаборатории было показано, что у самцов крыс, матери которых подверглись стрессу во время беременности, в модели ПТСР депрессивные и тревожные компоненты поведенческого расстройства сохраняются дольше, чем у контрольных. В данной работе изучались гормональные изменения, сопровождающие формирование постстрессорного расстройства – функционирование ГГАС и содержание вазопрессина в паравентрикулярном ядре (ПВЯ) гипоталамуса.

В экспериментах использовались половозрелые самцы крыс 2 групп, одни были рождены интактными самками, другие - самками, подвергшимися ежедневной 60-минутной иммобилизации в цилиндрических пеналах 20x7 см. ПТСР моделировалось в модели «стресс-рестресс», для чего крысы последовательно подвергались 2-часовой иммобилизации в пеналах, 20-минутному вынужденному плаванию в воде $t=25^{\circ}\text{C}$ и после 15-минутного перерыва эфирному стрессу до потери сознания, а через 7 дней

подвергались 30-минутной иммобилизации в качестве рестресса для напоминания о пережитом стрессе. Для изучения функции ГГАС у всех крыс измеряли базальный уровень кортикостерона (основной глюкокортикоидный гормон крыс), во время рестресса определяли стрессорный уровень кортикостерона через 30 и 60 мин от его начала, при этом перед рестрессом крысам ввели гидрокортизон для проведения нагрузочного теста на быструю отрицательную обратную связь, характерную для ПТСР. Концентрацию кортикостерона в плазме определяли методом радиоиммунного анализа. Для определения содержания вазопрессина в ПВЯ гипоталамуса приготавливались фронтальные срезы мозга толщиной 5-6 мкм по стандартной методике. В иммуногистохимических исследованиях использовались первичные поликлональные антитела кролика, вторичные биотинилированные антитела, авидин-биотин-пероксидазный комплекс и диаминобензидин для визуализации. Приготовленные препараты фотографировали с помощью светового микроскопа и обрабатывали изображение в программе Video Test Master Morphology. На каждом срезе обводились все клетки обоих ядер, и высчитывалась их оптическая плотность, пропорциональная количеству вазопрессина в клетке. Опытные группы (через 10 и 30 дней после рестресса) сравнивались каждая со своим контролем, чтобы препараты были приготовлены в один день. Все количественные данные сравнивались с помощью критерия Манн-Уитни, различия считались достоверными при $p < 0.05$.

У пренатально стрессированных (ПС) самцов крыс, не подвергавшихся стрессу, базальный уровень концентрации кортикостерона более, чем в 2 раза превышает таковой у контрольных ($p < 0.01$). Базальный уровень концентрации кортикостерона у контрольных крыс в ходе формирования постстрессорного расстройства не изменяется, у ПС через 10 дней снижается более, чем в 2 раза ($p < 0.005$) и остается таким же через 30 дней, хотя клиническая картина ПТСР у человека может как сопровождаться снижением уровня кортизола, так и нет. В нагрузочном тесте, используемом в клинике для диагностики ПТСР, в ПС крыс, так же как у контрольных, включается быстрая обратная связь, что проявляется в снижении концентрации кортикостерона в плазме крови через 60 минут после начала рестресса.

У контрольной группы через 10 дней после рестресса как в крупно- (кПВЯ) так и в мелкоклеточной части (мПВЯ) паравентрикулярного ядра гипоталамуса количество

сильноиммунопозитивных клеток снижается в 1,5-2 раза. Через 30 дней в кПВЯ и в мПВЯ (в меньшей степени), наоборот, в 1,5 раза падает доля слабоокрашенных клеток, и появляются сильноокрашенные клетки. У ПС крыс, в отличие от контрольных, снижение содержания вазопрессина наблюдалось как через 10, так и через 30 дней после рестресса. Через 10 дней доля слабоокрашенных клеток в как в кПВЯ, так и в мПВЯ возрастает в 4 раза. Через 30 дней в обеих частях ПВЯ встречаются только слабоокрашенные нейроны, хотя в соответствующих контрольных группах присутствуют средне- и сильнопозитивные клетки.

Проведенные исследования показывают сильное влияние пренатального стресса на гормональные изменения, сопровождающие постстрессорное расстройство. Особенно актуальными являются данные о различиях в динамике работы вазопрессинергической системы, т.к. по современным представлениям именно вазопрессин является ключевым фактором постстрессорных патологий.

СМЕРТИНА Е.С., ФЕДЯНИНА Л.Н., ЛЯХ В.А.

Дальневосточный федеральный университет,

Школа экономики и менеджмента / Школа биомедицины, Владивосток, Россия

ВЛИЯНИЕ ПОБОЧНЫХ ПРОДУКТОВ ПЕРЕРАБОТКИ БУРЫХ ВОДОРОСЛЕЙ НА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ХЛЕБОПЕКАРНЫХ ДРОЖЖЕЙ

В работе приводится анализ влияния водно-этанольного экстракта бурой водоросли *Fucus evanescens* на биотехнологические свойства хлебопекарных дрожжей.

В лаборатории химии ферментов ТИБОХ ДВО РАН разработан способ комплексной переработки бурых водорослей *Fucus evanescens*. Основные продукты данной технологии – биоактивные полисахариды: фукоидан и альгиновая кислота, на основе которых созданы БАД к пище – Фуколам-С, Фуколам, Фуколам Янтарный. Многочисленные медико-биологические исследования подтвердили положительное действие на организм человека сотворенных БАД к пище.

Существующий способ комплексной переработки бурых морских водорослей предполагает на первом этапе их обработку большим количеством этанола, в результате

чего образуется побочный продукт – водно-этанольный экстракт, который в настоящее время не применяется в технологии продуктов питания. Однако, химический состав водно-этанольного экстракта, доказанные положительные многоаспектные медико-биологические свойства, показывают целесообразность его применения в качестве функционального ингредиента для создания продуктов лечебно-профилактической направленности и в последующем, основы для создания БАД к пище.

В состав водно-этанольного экстракта *Fucus evanescens* входят йод, микроэлементы (медь, цинк, железо, селен и др.), набор аминокислот (в первую очередь тирозин и фенилаланин), полиненасыщенные жирные кислоты, а также белки и олигосахариды, манит и полифенольные соединения. Это - созданный природой комплекс веществ, необходимых для нормального функционирования щитовидной железы и усвоения йода в организме человека. Ценность водно-этанольного экстракта также определяется тем, что свободные аминокислоты легко усваиваются, а фенольные соединения проявляют антиоксидантные свойства. Была показана также противоопухолевая активность экстракта на модели раковых клеток кишечника человека.

Научными сотрудниками ТИБОХ ДВО РАН было определено, что водно-этанольный экстракт по токсикологическому воздействию на организм относится к малоопасным веществам, не оказывает общетоксического, кожно-раздражающего и сенсibiliзирующего действия на организм человека.

Определение показателей безопасности водно-этанольного экстракта по СанПиН 2.3.2.1078-01 в лаборатории «Океан» Дальневосточного федерального университета, также показало пригодность его использования для пищевых целей. Среди токсичных элементов был обнаружен только мышьяк в следовом количестве, радионуклиды, по содержанию ниже нормативных показателей в десятки раз. В целом показатели безопасности соответствовали таковым в действующих нормативных документах.

Анализ проводили двумя методами: определение подъемной силы дрожжей и методом прямого счета числа дрожжевых клеток в одном грамме теста.

При внесении экстракта в концентрациях 2,5 и 5 % время, затраченное на подъем теста, сократилось на 8 и 5 мин соответственно, по сравнению с контрольным образцом, который не содержал экстракта. Это можно объяснить тем, что микронутриенты,

содержащиеся в исследуемом экстракте являются стимуляторами роста дрожжевых клеток, следовательно, тесто поднимается быстрее, чем контрольный образец теста.

После 20 мин брожения количество дрожжевых клеток в образцах с концентрациями 2,5 и 5 % по сравнению с контролем, увеличилось на 38 и 53 %, соответственно. После 3-х ч брожения у тех же образцов количество дрожжевых клеток увеличилось на 33 и 56 % соответственно, по сравнению с контролем.

Образцы с более высоким содержанием экстракта (7,5 и 10%) оказывают отрицательное влияние на хлебопекарные свойства пшеничной муки и биотехнологические свойства дрожжей, по причине повышенного содержания спирта в данных образцах.

Таким образом, исходя из результатов проведенных исследований, можно сделать вывод, что микронутриенты и полисахариды, входящие в состав водно-этанольного экстракта *Fucus evanescens*, положительно влияют на биотехнологические свойства хлебопекарных дрожжей, так как они являются стимулятором их роста.

СОВГИР Н.В., ГОЛЕНЧЕНКО С.Г., ПОТАПОВИЧ М.И., ПРОКУЛЕВИЧ В.А.

Белорусский государственный университет, биологический факультет, Минск, Беларусь

ЭКСПРЕССИЯ ГИБРИДНЫХ АНТИМИКРОБНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI*

Повсеместное использование антибиотиков в медицине и ветеринарии привело к появлению полирезистентных штаммов патогенных бактерий. В связи с чем, актуальной является разработка новых антибактериальных агентов, природа и механизмы действия которых принципиально отличны от таковых у широко распространенных антибиотиков. Огромным потенциалом в этом отношении обладают антимикробные пептиды (АМП). Белок из кожных секретов прудовой лягушки (*Rana esculenta*) – эскулентин-1b (Esc1b) семейства эскулентин-1 обладает, по данным разных исследований, одним из наиболее широких спектров антибактериальной активности. Целью данной работы является исследование экспрессии полифункциональных рекомбинантных белков, несущих в своём составе последовательность Esc1b, в клетках *E. coli*.

Известно, что экспрессия АМП и, в частности, Esc1b в клетках *E. coli* связана с рядом трудностей: во-первых, они могут деградироваться клеточными протеазами, а во-вторых, токсичны для клеток, в которых экспрессируются. Для решения данных проблем нами была предпринята попытка осуществить экспрессию Esc1b в составе гибридных последовательностей. В качестве партнёров Esc1b были выбраны бычий интерферон α (INF α) и пептидазный домен лизирующего фермента бактериофага К (LyzK). С одной стороны данные последовательности должны были приводить к образованию телец включения (индивидуальные INF α и LyzK хорошо экспрессируются в клетках *E. coli* и формируют тельца включения), что защищает белок от протеаз и значительно уменьшает его токсичность. С другой стороны, заметно расширяют функциональность гибридного продукта для дальнейшего использования в ветеринарии (INF α обладает противовирусным и иммуностимулирующим действием, а LyzK известен своей выдающейся антистафилококковой активностью).

Путём замены редких кодонов, все последовательности были оптимизированы для экспрессии в клетках *E. coli* и синтезированы с помощью ПЦР. Полученные продукты были клонированы в составе экспрессионного вектора pET24b(+) в клетках *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL. Индукцию экспрессии клонированных генов проводили в среде ZYM-5052 при 28 °С всю ночь (80 об/мин). Учет результатов проводили электрофоретически в ДСН-ПААГ. В качестве отрицательного контроля использовали клетки *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL, содержащие плазмиду pET24b(+) без вставки. Положительными контролями выступали аналогичные клетки, несущие плазмиду pET24b(+) со встроенными по сайтам рестрикции *Nde* I и *Eco* RI последовательностями INF α или LyzK. Анализ физико-химических характеристик исследуемых белков (значение изоэлектрической точки (IP), средняя гидрофобность (GRAVY), индекс нестабильности(II), заряд белка при pH = 7, алифатический индекс (AI)) проводили в программном пакете EditSeq 5.03 DNASTAR и при помощи сервиса ExPASy ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>).

Из четырёх полученных нами гибридных последовательностей: N-INF α -Esc1b-C, N-Esc1b-INF α -C, N-LyzK-Esc1b-C и N-Esc1b-LyzK-C, только последняя экспрессировалась на детектируемом уровне. В поисках объяснения данного феномена мы сравнили некоторые физико-химические характеристики родительских последовательностей и исследуемых

гибридов. Стоит отметить, что зеркальные гибриды (N-INFa-Esc1b-C / N-Esc1b-INFa-C, и N-LyzK-Esc1b-C / N-Esc1b-LyzK-C) практически не отличались друг от друга. Наименее термодинамически стабильным оказался INFa (который отлично экспрессируется) $\Pi = 75,72$, а наиболее стабильным – не экспрессирующийся эскулентин ($\Pi = -7,76$); гибриды INFa хотя и обладали большей стабильностью, в целом характеризовались как нестабильные ($\Pi > 40$), а гибриды LyzK165, как стабильные ($\Pi < 40$). Очевидно, термодинамическая стабильность не вносит заметного вклада в стабильность Esc1b и его гибридов в клетках *E. coli*. Esc1b характеризуется как слегка гидрофобный (GRAVY=0,28), а LyzK, INFa и все гибриды – как гидрофильные (GRAVY от -0,3 до -0,6). Все последовательности имели высокое, но близкое значение PI (8,8-9,5), а вот по заряду гибриды ($Z=10,9$ для гибридов INFa и 8,5 для гибридов LyzK) значительно отличались от родительских белков ($Z=4,8, 6,0$ и 3,5 для Esc1b, INFa и LyzK, соответственно). Возможно, высокий не скомпенсированный заряд и протяжённые алифатические участки (AI=95) гибридов INFa, не позволяют им достаточно быстро спрятать токсичную последовательность внутри глобулы. Гибриды LyzK несут меньший заряд и меньше алифатических участков (AI=76), но при этом экспрессия наблюдается только для N-Esc1b-LyzK-C. Можно предположить, что принципиальность нахождения токсичной последовательности Esc1b на N-конце гибрида объясняется тем, что именно с N-конца начинается сворачивание белка, и образующая его гидрофобная последовательность с большей вероятностью окажется внутри глобулы, чем та же последовательность, находящаяся на C-конце.

СОВКОВА И.В.

ФГБУ «НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздравсоцразвития России, Москва, Россия

НОВАЯ ГРУППА ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ ЛЕГИОНЕЛЛ

Легионеллез (болезнь легионеров) — инфекционная патология, вызванная внедрением в организм человека микроорганизмов рода *Legionella*. По современным данным, около 90 % легионеллезом связано с видом *L. pneumophila*. Данная бактерия является грамм – отрицательным микроорганизмом, требовательным к условиям

выращивания, но, в то же время, широко распространенным в природе. Основной средой обитания легионелл являются водные резервуары, как природные, так и созданные человеком.

С инфицированным аэрозолем легионеллы попадают в легкие, где и происходит их контакт с клетками – мишенями. Бактерии активно размножаются в макрофагах, моноцитах крови и эпителиальных клетках, что приводит к накоплению возбудителя в высокой концентрации и развитию острого воспалительного процесса, характерного для классической болезни легионеров. Легионеллы являются «вакуолярными» патогенами, то есть размножаются внутри фагоцитирующих клеток. Вслед за проникновением в клетку в составе фагосомы, легионеллы индуцируют нарушения процессов фагоцитоза.

К группе новых факторов патогенности легионелл относятся глюкозилтрансферазы – бактериальные ферменты, присоединяющие остаток глюкозы к эукариотическому белку-мишени. Нами были обнаружены и получены в чистом виде 3 глюкозилтрансферазы, способные принимать участие в патогенезе болезни легионеров. Основываясь на уровне гомологии, продукты обнаруженных генов были сгруппированы в три семейства, названных Lgt1, Lgt2 и Lgt3. Гены, кодирующие белки Lgt1 и Lgt3 обнаруживались в секвенированных геномах у всех четырех представителей *L. pneumophila* (штаммы Philadelphia-1, Lens, Paris и Corby), тогда как ген *lgt2* был найден лишь у единственного штамма с известным геномом – Philadelphia-1.

В проведенных нами исследованиях с очищенными веществами было показано, что Lgt1, Lgt2 и Lgt3 глюкозилировали один и тот же субстрат – эукариотический фактор элонгации 1A (eEF1A), один из важнейших компонентов системы синтеза белка клетки. Установлено, что модификация у eEF1A подвергается остаток аминокислоты серин в положении 53, что приводит к остановке белкового синтеза и гибели эукариотической клетки – мишени.

Обнаруженные нами новые глюкозилтрансферазы представляют собой важные и интересные белковые вещества. Дальнейшее изучение полученных ферментов может стать основой для расшифровки молекулярных механизмов взаимодействия хозяин – микроорганизм, и, как следствие, создание новых методов диагностики, терапии и профилактики легионеллеза, а также других инфекционных заболеваний.

СОКОЛЕНКО Г.Г.

*Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I,
Воронеж, Россия*

ПОЛУЧЕНИЕ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ СИНБИОТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ БИОТРАНСФОРМАЦИЕЙ ОКАРЫ

Разработан способ получения кормовой добавки твердофазным культивированием пробиотика *Bacillus cereus* IP 5832 на окаре. Кормовая добавка имеет высокую питательную ценность, экономична в производстве и стабильна при хранении.

В настоящее время в животноводстве и ветеринарии широко применяют пробиотики. Все чаще в таком качестве стали использоваться спорообразующие бактерии из рода *Bacillus*, которые имеют высокий и разнообразный спектр биологической активности. Включение споровых пробиотиков в корма способствует повышению эффективности использования корма и продуктивности животных.

Представители рода *Bacillus* синтезируют целый ряд ферментов, разлагающих крахмал, пектины, целлюлозу, жиры, белки, которые регулируют и стимулируют процессы пищеварения. Способность споровых пробиотиков к синтезу комплекса ферментов обуславливают возможность их культивирования на растительных субстратах. Получение пробиотических препаратов аэробных бацилл твердофазным культивированием на растительных субстратах, обладающих пребиотическими свойствами, позволяет упростить технологию получения синбиотических добавок и снизить затраты на их производство.

Кормовую добавку получали твердофазным культивированием пробиотика *Bacillus cereus* IP583, для которого показана антагонистическая активность в отношении ряда возбудителей кишечных инфекций, а также стимулирующий эффект по отношению к бифидобактериям. На основе этого штамма получен ряд пробиотических препаратов, которые применяют для человека и животных. Субстратом служила окара - нерастворимый осадок неэкстрагированной части соевых бобов в результате отжима соевого молока. Она богата питательными веществами, витаминами, содержит ряд веществ, обладающих пребиотическим действием (соевые пептиды, олигосахариды). Процесс прорастания аэробных бацилл сопровождается интенсивной продукцией

активных экзометаболитов, которые обладают бактериостатическим и бактерицидным действием и являются стимуляторами иммунобиологической активности организма. В связи с этим биоконверсия окары пробиотическим микроорганизмом позволяет получить синбиотическую кормовую добавку, обладающую пробиотическим и пребиотическим свойствами.

Окару получали методом горячей водной экстракции дисперсии измельченных семян сои, определен ее химический состав: 26,7% белка, 16,2 % жира, 2,2 % сахаров, 11,2 % клетчатки. Учитывая высокое содержание питательных веществ в окаре, при использовании ее в качестве субстрата для твердофазного культивирования, в нее не вносили дополнительных компонентов. Окару инокулировали суточной культурой *Vac. cereus* IP5832.. Установлены оптимальные условия культивирования: температура 37 °С, рН среды - 6,6, время культивирования - 24 часа. Для иммобилизации спор и стабилизации продукта трансформированную окару высушивали методом конвективной сушки при температуре 60-65 °С. После высушивания кормовая добавка имела вид светло-коричневых гранул размером 1-3 мм, с влажностью 11%. Установлено, что полученная кормовая добавка содержит 29,4 % белка, 21, 5% жира, 1, 97% сахаров, 0,8% кальция и 0,99% фосфора.. В результате биотрансформации содержание клетчатки снизилось, по сравнению с контролем более чем в 2 раза (с 6,2 % до 12,5 %), сахаров - с 2,45 % до 1,75 %. При этом продукт обогатился жиром, его содержание увеличилось на 1,0 % (19,2 % в кормовой добавке и 18,2 % - в контроле). Результаты исследований свидетельствуют о высокой питательной ценности полученной кормовой добавки.

Методом посевов серийных разведений определен титр спор. В 1 г полученной добавки содержится $5,0 \times 10^8$ спор пробиотика *Vac. cereus* IP5832. Установлено, что хранение при комнатной температуре не вызывает снижения концентрации спор, через 3, 6 и 12 месяцев хранения она оставалась стабильной $4,95-5,0 \times 10^8$ КОЕ /г.

Разработан способ получения кормовой добавки методом твердофазной ферментации на окаре. Полученный препарат содержит споры пробиотика в достаточно высоком титре, пребиотические и питательные вещества сои, а также физиологически активные метаболиты пробиотика. Это позволяет отнести его к синбиотикам и рекомендовать в качестве кормовой добавки для животных и птицы. Полученный продукт

имеет высокую питательную ценность, экономичен в производстве и стабилен при хранении.

СОКОЛОВ А.Ю., БАРАНОВ Б.А.

Российский экономический университет имени Г.В. Плеханова, Москва, Россия

РАЗРАБОТКА МЕТОДОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НОВЫХ СЫРЬЕВЫХ ИСТОЧНИКОВ В ПИЩЕВОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

Вовлечение в технологию пищевых продуктов вторичных сырьевых ресурсов животного происхождения, представляет интерес, так как в настоящее время слабо разработана методология технологических процессов их использования.

Известно, что возможна переработка в пищевые ингредиенты и продукты коллагенсодержащего сырья различных видов. В частности, к высокоресурсным относят свиную шкуру колбасного производства. Однако отсутствуют способы использования в пищевых производствах «нативных» шкур или их отходов, поскольку они характеризуются низкими функционально-технологическими свойствами, неоднородностью гистологической структуры, значительными прочностными характеристиками. В то же время формируется научное направление проведения их модификации различными соединениями, как неорганическими, так и органическими. В рамках этой проблемы осуществлялась настоящая работа с целью обоснования методологии переработки вторичных сырьевых ресурсов, в т.ч. коллагенсодержащих, на базе изучения отдельных показателей их пищевой ценности и других.

В частности, для модификации свойств коллагенсодержащего сырья, свиных шкур, была использована щелочно-солевая модификация (ЩСМ), включая стадии щелочно-солевой обработки, солевой промывки, нейтрализации и дополнительной солевой промывки, удаления избытка влаги и т.д. Характеристика процессов и параметры проведения отражены в патенте РФ 2227507.

Известно, что обработка шкур и их отходов в растворах электролитов (гидроксидах одно- и двухвалентных металлов) способствует разрыхлению, удалению кератиновых включений, обезжириванию, дезодорации, сокращает длительность тепловой обработки,

что необходимо и для производства пищевых ингредиентов (О.Э. Кошелева, Н.С. Грыженкова). Это было подтверждено и в настоящем исследовании.

Анализ результатов исследований показал, что коллагенсодержащее сырье содержит существенные количества белка (27,5 %), главным образом коллагена, жира (10,0 %). Это открывает перспективу использования в пищевых целях.

В данной публикации отражены результаты этапа исследований, связанного с изучением показателей качества жира, как исходного сырья, так и полуфабриката из шкур после ЩСМ. Общее содержание жира после модификации сырья составляло 6,5 %. Результаты определения фракционного состава липидов полуфабрикатов после ЩСМ выявили, что преобладали триглицериды – 63,4 %, являющиеся для организма поставщиком пластического материала, свободные жирные кислоты (18,4 %) – структурообразующий компонент в питании; также отмечены эфиры стероидов и воски (в сумме 4,0 %) и другие фракции.

Изучение чисел омыления липидов в исходном сырье показало его значение около 109,0 мг КОН/г жира. Для полуфабрикатов на разных этапах ЩСМ установлено, что непосредственно после щелочно-солевой обработки не удавалось определить данный показатель, вследствие значительной полярности исследуемых образцов, при сильно щелочном pH (>12). На последующих этапах ЩСМ: солевой промывки, нейтрализации и дополнительной промывки, число омыления уменьшалось. После солевой промывки число омыления составило 69,4 мг КОН/г жира, что обусловлено расщеплением триглицеридов и других фракций. Затем, в процессе нейтрализации и дополнительной промывки, продукты гидролиза триглицеридов, видимо, частично удаляются и в жире остаются неразрушенные фракции, что вызывает небольшое возрастание числа омыления (76,3 мг КОН/г).

Таким образом, анализ представленных данных показывает, что в связи с понижением числа омыления, уменьшается и количество соединений, образованных вследствие щелочного гидролиза жира, определенный эффект «насыщения» жирных кислот не влияет отрицательно на качество липидов, поскольку он не может приводить при последующих обработках, к возрастанию количества перекисных соединений.

В дальнейшем, принимая в расчет результаты комплексных исследований, как пищевой ценности, так и безопасности, предполагается оптимизировать и реализовать методологию переработки коллагенсодержащего сырья, которая может включать, в

зависимости от технологических возможностей, как модификацию неорганическими, органическими соединениями, так и биокатализ.

СОКОЛОВ Л.В.

*Федеральное государственное бюджетное Учреждение науки Зоологический институт
Российской Академии Наук, Санкт-Петербург, Россия*

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИИ ПТИЦ С ПОМОЩЬЮ СОВРЕМЕННОЙ ТЕЛЕМЕТРИИ

Метод телеметрии стал разрабатываться еще в начале 60-х годов XX века, после того как были созданы первые радиопередатчики для животных. Первоначально это были достаточно громоздкие ультракоротковолновые (УКВ) устройства, которые крепились только на крупных птиц. Для их применения требовались специальные источники питания, антенны и приемники. В настоящее время применяются как миниатюрные передатчики весом менее 0.5 грамма для изучения локальных перемещений птиц в течение нескольких месяцев, так и небольшие спутниковые передатчики весом от 5 до 20 грамм, позволяющие исследователям следить за сверхдальними миграциями на протяжении нескольких лет.

После внедрения в качестве нового метода слежения за птицами, радиотелеметрия стала в первую очередь применяться для изучения их локальных перемещений, для определения размеров индивидуальных участков (home range) и выяснения мест обитания. Затем с появлением спутниковых передатчиков стали активно изучать маршруты, скорость и высоту миграций птиц. Позже с помощью телеметрии начали исследовать социальное поведение, внутривидовые и межвидовые отношения птиц, а также стали использовать ее для оценки смертности и численности разных видов (White, Garrott 1990, Beekman et al. 1995, Seegar et al. 1996, Guan, Higuchi 2000, Kenward 2001, Fuller et al. 2005, Olival, Higuchi 2006, Meyburg, Fuller 2007, Whitworth et al. 2007, Hart, Nyrenbach 2009, Соколов 2011). Более того, радиопередатчики, прикрепленные к птицам, в частности к пингвинам и другим морским птицам, можно использовать для сбора разного рода гидрологической и аэродинамической информации, такой, например, как температура и прозрачность воды на

разных глубинах, температура и скорость воздушных потоков и т.д. (Bögel, Burchard 1992, Wilson 1994).

Анализ перемещений и распределения животных, в том числе птиц, в пространстве уже сам по себе стал сложной наукой. Так, например, при изучении локальных перемещений птиц, размеров их индивидуальных участков или биотопического распределения с помощью телеметрии работу можно свести к простому соединению точек регистрации объекта в форме минимального выпуклого многоугольника, который бы покрывал всю территорию, используемую меченой особью. Однако можно применять более сложные вероятностные модели, позволяющих найти различия в характере использования особью территории, что уже потребует применения более сложных географических информационных систем (ГИС). Знание ГИС в настоящее время является обязательным для тех, кто работает с пространственными данными, описывающими перемещения животных. ГИС предоставляет возможность проводить сложное картографирование с целью визуального или статистического анализа пространственных зависимостей между положением меченых птиц и распространением местообитаний, а также другими переменными. Высококачественные спутниковые снимки поверхности Земли, которые делают доступными для пользователя такие компьютерные программы как Google Earth (<http://www.earth.google.com>), позволяют также добавлять к снимкам пользовательские данные, вроде координат пунктов, снятых с помощью GPS-приемника, или отобразить перемещения птиц относительно их среды обитания. Существующая в настоящее время специальная программа Arcview GIS (Whitworth et al. 2007), наряду с другими, предлагает широкий спектр опций, которые позволяют пользователю выводить местонахождение меченой особи на карту, быстро рассчитывать расстояния и скорость передвижения, а также проводить анализ самих перемещений, а также решать целый ряд других задач средствами пространственного анализа.

В настоящее время метод телеметрии находит все более и более широкое распространение среди биологов, правда, к сожалению, преимущественно западных. Ограниченное применение этого высокотехнологического метода среди отечественных исследователей в первую очередь объясняется его относительной дороговизной. Однако не следует забывать, что любые технические изобретения со временем дешевеют и становятся более доступными. Надо четко понимать, что без использования современных

методов телеметрии отечественные специалисты рискуют оказаться на обочине мировой науки во многих областях знания о биологии животных. Это не значит, что с помощью телеметрии можно решить все задачи. Телеметрия это только один из современных методов биологии. Важно грамотно его применять и четко представлять, что вы хотите с его помощью изучить. Если нет финансовых возможностей использовать в своих исследованиях дорогие спутниковые передатчики, можно сосредоточить внимание на микропередатчиках локального действия, которые не так дороги, но дают не менее потрясающие результаты при изучении биологии птиц и других животных. Возможности современной телеметрии весьма широки.

Данное исследование выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ (10-04-00721-а Л.В.С.).

СОКОЛОВА А.В., ЗЕНИН В.В., КАМИНСКАЯ Е.В., МИХАЙЛОВ В.М.

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

СТРУКТУРА НЕЙРОМЫШЕЧНЫХ СОЕДИНЕНИЙ МУТАНТНЫХ МЫШЕЙ MDX ПОСЛЕ ОБЩЕЙ И МЕСТНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ СИНГЕННЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ДИКОГО ТИПА

Мыши mdx - экспериментальная модель неизлечимого моногенного заболевания миодистрофии Дюшенна у человека. Мутация в структурном гене дистрофина приводит к гибели поперечнополосатых мышечных волокон (ППМВ), что ведет к гибели больных. Отсутствие синтеза дистрофина также сопровождается нарушением структуры нейромышечных соединений (НМС), что выражается в распаде больших кластеров ацетилхолиновых рецепторов (АХР), имеющих форму ветвей, на более мелкие в форме островков.

Целью работы было исследование влияния местной внутримышечной трансплантации стволовых клеток костного мозга (СККМ) и общей внутривенной трансплантации клеток костного мозга (ККМ) после предварительного облучения на структуру НМС мышей mdx. Для внутримышечной трансплантации использовали сингенные Lin(-) СККМ, полученные путем истощения костного мозга мышей C57BL/6 от

дифференцированных клеток магнитным способом на системе Dynal (Norway) смесью антител Caltag (США). Полученные Lin(-) СККМ инъецировали в 8-9 точек M. quadriceps femoris мышей mdx в дозе $(0,5-1,0) \cdot 10^6$ клеток на мышцу. При общей трансплантации мышей mdx облучали лучами Рентгена в дозе 5 и 3 Гр и трансплантировали по $(15-20) \cdot 10^6$ ККМ. Область НМС на продольных и поперечных срезах M. quadriceps femoris, а также в диафрагме определяли при помощи тетраметилродамин- α -бунгаротоксина (Biotium, USA), который специфически связывается с АХР.

После местной внутримышечной трансплантации Lin(-) СККМ происходило усиление синтеза дистрофина до 2 % ППМВ. При этом на ранних сроках после трансплантации наблюдалось увеличение площади отдельных кластеров АХР, составляющих НМС, с одновременным уменьшением их количества, что приближало структуру НМС к нормальной. На более длительных сроках наблюдения сохранялось увеличение площади отдельных кластеров АХР, однако также увеличивалось их количество, что привело к увеличению общей площади НМС до $666,0 \pm 46,1$ мкм², достоверно превосходящей величину площади синапсов, характерную для НМС дикого типа – $403,8 \pm 77,1$ мкм². При этом АХР не формировали кластеры в виде ветвей.

Трансплантация ККМ после облучения в летальной дозе 5 Гр не сопровождалась усилением синтеза дистрофина выше 2 % при наблюдении до 6 мес после трансплантации. Трансплантация ККМ после облучения в полублетальной дозе 3 Гр сопровождалась усилением синтеза дистрофина через 6 мес до 27 %. Такой значительный рост дистрофин-экспрессирующих ППМВ соответствует минимальной доле 20 % дистрофин-экспрессирующих ППМВ, при которой наблюдается восстановление функции мышц больного организма. Соответственно результатом проведенного эксперимента стало частичное излечение мышей mdx от миодистрофии. При этом также происходило уменьшение гибели ППМВ до $0,7 \pm 0,1$ % и повышение доли ППМВ без центральных ядер до $22,0 \pm 1,9$ %. Полученные данные указывают на прогрессивное усиление дифференцировки скелетных мышц после общей трансплантации ККМ. При этом в составе НМС накапливаются кластеры АХР в виде ветвей, доля которых доходит до $42,6 \pm 5,7$ %, и уменьшается доля кластеров АХР в виде островков с $75,8 \pm 3,1$ % до $53,7 \pm 6,0$ %, что указывает на более значительное улучшение структуры НМС, чем в случае местной клеточной терапии. Улучшение структуры НМС сопровождается полным

восстановлением электрогенеза мышечных волокон диафрагмы (Кравцова и др., 2011, ДАН, 441(2): 1-3).

Таким образом, замена мутантного костного мозга у мышей mdx на костный мозг дикого типа приводит к усилению синтеза дистрофина и более выраженному восстановлению структуры НМС ППМВ, чем в случае местной клеточной терапии. В мазках костного мозга через 6 мес после трансплантации обнаружено 3 % клеток донорского происхождения, что указывает на возникновение у реципиентов костного мозга мышей mdx смешанного химеризма. Полученные результаты указывают на то, что после проникновения в саркоплазму ядер трансплантированных клеток при не миелоаблативной трансплантации ККМ дикого типа у мутантных мышей mdx происходит частичное восстановление синтеза дистрофина и структуры НМС. Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Программы Молекулярно-Клеточная Биология РАН, гранта РФФИ 10-04-00970а и научно-исследовательского гранта Санкт-Петербургского Университета № 1.131.118.2011.

СОКОЛОВА В.А., ЧЕРНУХИН В.А., ГОНЧАР Д.А., КИЛЁВА Е.В.,
ГОЛИКОВА Л.Н., ДЕДКОВ В.С., МИХНЕНКОВА Н.А., ДЕГТЯРЁВ С.Х.
НПО «СибЭнзим», Новосибирск, Россия

**НОВАЯ МЕТИЛЗАВИСИМАЯ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ДНК ЭНДОНУКЛЕАЗА
MteI РАСЩЕПЛЯЕТ НУКЛЕОТИДНУЮ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
5'-G(5mC)G(5mC)NG(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)GN(5mC)G(5mC)G-5'**

Метилзависимыми сайт-специфическими ДНК-эндонуклеазами (МСС ДНК-эндонуклеазами) называют ферменты, которые узнают и расщепляют определенные метилированные последовательности ДНК и не гидролизуют немодифицированную ДНК. По своим свойствам эти ферменты похожи на хорошо изученные эндонуклеазы рестрикции и также как рестриктазы, они не требуют кофакторов помимо ионов Mg^{2+} .

На сегодня открыто более десяти МСС ДНК-эндонуклеаз, которые узнают и расщепляют короткие сайты узнавания, содержащие 5-метилцитозин. Наиболее известной из 5-метилцитозин-зависимых сайт-специфических ДНК-эндонуклеаз является Glal,

которая имеет сайт узнавания 5'-Pu(5mC)GPy-3'/3'-PyG(5mC)Pu-5' [1]. Сразу несколько ферментов (BlsI, BisI, PkrI и GluI) узнают и расщепляют метилированную последовательность 5'-GCNGC-3', при этом первые два из них гидролизуют эту последовательность различным образом при наличии в ней хотя бы двух 5-метилцитозинов [2,3], тогда как для PkrI и GluI требуется 3 и 4 метилированных основания, соответственно [4,5].

Новая эндонуклеаза MteI - первая из ряда 5-метилцитозин-зависимых сайт-специфических ДНК-эндонуклеаз, имеющая протяженный девятинуклеотидный сайт узнавания. Активность MteI зависит от числа 5-метилцитозинов и их положения в узнаваемой последовательности. MteI расщепляет сайт 5'-G(5mC)G(5mC)[^]NG(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)GN[^](5mC)G(5mC)G-5' как указано стрелками, и этот сайт является минимальным. Активность фермента существенно возрастает при замене в сайте узнавания 5'-GC-3' динуклеотидов на 5'-G(5mC)-3' динуклеотиды и появлении дополнительных 5'-G(5mC)-3' динуклеотидов на 5'-концах нонануклеотида в обеих цепях ДНК. Благодаря своей способности расщеплять только протяженные метилированные последовательности ДНК фермент MteI может найти практическое применение в молекулярно-биологических и эпигенетических работах.

Литература

1. Чернухин В.А., Наякшина Т.Н. и др. // Биотехнология. – 2006. – №4. – С.31–35.
2. Чмуж Е.В., Каширина Ю.Г. и др. // Биотехнология. – 2005. - №3. – С.22-26.
3. Чернухин В.А., Томилова Ю.Э. и др. // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. – 2007. – Т.3. – №1. – С.28-33.
4. Чернухин В.А., Чмуж Е.В. и др. // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. – 2007. – Т.3. – №2. – С.13-17.
5. Чернухин В.А., Наякшина Т.Н. и др. // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. - 2011. - Т.7. - №3. - С.35-41.

СОКОЛОВА О.В., РОГОЖИН В.В.

Якутская сельскохозяйственная академия, Якутск, Россия

РОЛЬ КОМПОНЕНТОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В ПРОРАСТАНИИ ЗЕРНОВОК ПШЕНИЦЫ

Семена культурных растений, имея пониженную влажность (5-10%), в отсутствие воды, находятся в состоянии вынужденного покоя. Оптимальными условиями для прорастания зерновок является достаточная их насыщенность водой (45-50%), обеспеченность атмосферным кислородом, необходимого для дыхания зерновок и благоприятной температуры среды, которая может колебаться, но в среднем должна быть равна 18-24°C. Во влажных семенах наблюдается активное потребление кислорода, который может вызывать окислительное повреждение тканей. В развитии окислительного стресса играют роль активные формы кислорода, накопление которых в клетках приводит к нарушению протекания процессов транскрипции и репликации, изменяет состав липидов мембран. Поэтому исследования начальных этапов прорастания зерновок послужат основой для определения пригодности посевного зерна и позволят разработать критерии прогноза урожайности зерновых культур.

Динамика набухания зерновок в лабораторных условиях, при их полном погружении в воду, описывается гиперболической зависимостью, на которой можно выделить три стадии: ускоренного, быстрого и медленного поступления воды в зерновку пшеницы. При этом наиболее активно при 23°C происходит набухание зародыша зерновки. На стадии ускоренного поглощения воды, наблюдается активное поступление воды в зародыш семени, продолжающееся в течение 2-6 часов. Затем отмечается снижение поглотительной способности зерновки (стадия быстрого набухания), в этот период вода преимущественно поступает в эндосперм. Длительность этой стадии 6-16 часов. Оканчивается набухание стадией насыщения - 16-22 часа. Более длительное пребывание зерновок в воде может повлиять на дальнейшее их прорастание, обусловленное недостатком кислорода и подавлением дыхательной активности митохондрий. Пребывание зерновок пшеницы в течение 1-4-х суток в воде приводит к резкому понижению их всхожести до 9-22%. При этом в зернах отмечается повышение содержания антиоксидантов (АО) в 1,7-2,2 раза, с одновременным понижением пероксидазной

активности на 28-36%. Предварительное УФ-облучение семян пшеницы провоцирует в них протекание свободно-радикальных процессов, поэтому в ответ на действующий фактор в зернах содержание АО может возрастать в 2-3 раза, особенно это проявляется после 15 мин УФ-облучения. Полученные данные свидетельствуют о том, что пероксидаза способна выполнять роль инициатора процессов прорастания семян, поскольку для углубления покоя семян требуется понижение пероксидазной активности, что, по-видимому, достигается за счет увеличения содержания АО. Эти данные наглядно показывают взаимосвязь между пероксидазной активностью и содержанием АО при реализации механизмов формирования покоя семян. Поэтому нами была изучена активность пероксидазы на ранних этапах прорастания зерновок. При прорастании зерновок с появлением корней и побегов резко возрастает активность пероксидазы в надземной части в 1,8-2,0, в корнях в 12-14, а в зерне в 4-5 раз. Это свидетельствует о том, что пероксидаза участвует не только в поддержании жизнеспособности покоящихся зерновок, но и крайне необходима при их прорастании. В покоящихся зерновках пероксидаза катализирует реакции окислительного и пероксидазного окисления различных соединений. При этом продуктом реакции является вода, которая крайне требуется зерновкам, находящимся в состоянии вынужденного покоя. В этих условиях пероксидаза и другие оксидазы способны выполнять роль «водяной помпы», обеспечивая за счет этого зародыш зерновок водой.

Таким образом, нахождение зерновок в состоянии покоя является важным приспособительным механизмом сохранения вида. Данный признак достался семенам культурных растений от их дикорастущих предков, у которых способность семян находиться в состоянии органического покоя обеспечивает растениям возможность переносить неблагоприятные условия среды и позволяет создавать запас семян в почве. При этом жизнеспособность зерновок поддерживается за счет активности компонентов антиоксидантной системы. Ведущим звеном этой системы является пероксидаза, активность которой резко возрастает в процессе прорастания зерновок, тогда как в условиях искусственного гипобиоза, вызванного длительным затоплением зерновок в воде, у них так же отмечается увеличение содержания антиоксидантов, сопровождающееся понижением активности пероксидазы. Между пероксидазой и антиоксидантами наблюдается взаимосвязь, которая обусловлена тем, что пероксидаза способна

осуществлять контроль за уровнем перекиси, восстанавливая ее до воды, окисляя низкомолекулярные антиоксиданты. При этом высокие концентрации антиоксидантов подавляют активность фермента. Выявленные особенности в прорастании зерновок пшеницы позволят в дальнейшем разобраться в механизмах прорастания и предложить методы и способы повышения продуктивности зерновых культур.

СОЛОВЬЕВА А.И., ВЫСОЦКАЯ О.Н.

Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН, Москва, Россия

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ RAPD, ISSR И REMAP МЕТОДОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА РАСТЕНИЙ ЗЕМЛЯНИКИ, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ *IN VITRO*

Земляника лесная (*Fragaria vesca* L.) – многолетнее растение, относящееся к семейству розоцветных, размножающееся семенами. Сорты этой культуры в последнее время очень популярны и широко используются в садоводстве. Длительное поддержание сортов земляники представляется трудной задачей, поскольку при многолетнем размножении семенами невозможно обеспечить полную идентичность исходных растений и потомства. Возможным решением данной проблемы является использование размножения *in vitro*. Однако результатом длительного культивирования органов и тканей растений на средах, содержащих гормоноподобные вещества, часто становится появление соматональных вариантов. Для их выявления применяют целый ряд методик, в том числе различные ДНК-маркеры, обладающие неодинаковой эффективностью при работе с разными объектами.

Целью данной работы было изучение возможности использования – RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA), ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) и REMAP (Retrotransposon Microsatellite Amplified Polymorphism) методов для тестирования генетического однообразия растений земляники (*F. vesca*, cv. Reine des Valles), культивируемых *in vitro* в течение 25 лет.

Предварительно, с целью выявления наиболее информативных вариантов, с рядом праймеров и их комбинаций проводили ПЦР-анализ ДНК, выделенной из листьев десяти

растений земляники, относящихся к различным популяциям Москвы и Московской области. Он показал, что наибольшее число полиморфных локусов позволяют выявить REMAP и ISSR методы (58,8 и 50,0% полиморфных фрагментов, соответственно). RAPD метод показал 46,7% полиморфных фрагментов. В результате проведенной работы были выбраны 2 RAPD- и 4 ISSR-праймера, а также, в рамках REMAP метода, 4 комбинации ISSR- и LTR- праймеров. Далее их использовали для оценки идентичности растений мериклона земляники (потомство одной меристемы) сорта *Reine des Valles*, который был введен в культуру *in vitro* в 1987 году. Всего в результате исследования было получено и проанализировано 98 ДНК-фрагментов. Данный анализ показал, полную идентичность растений по всем рассмотренным ДНК-маркерам. Таким образом, RAPD, REMAP и ISSR анализы хорошо зарекомендовали себя в качестве методов оценки генетической однородности растений земляники, культивируемых *in vitro*.

СОЛОВЬЕВА В.В., РИЗВАНОВ А.А.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

**ЭНДОГЕННЫЙ УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ
СОСУДИСТОГО ЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА
В КУЛЬТУРЕ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ
ЗАЧАТКОВ ТРЕТЬИХ МОЛЯРОВ ЧЕЛОВЕКА**

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) играют важную роль в самообновлении и регенерации органов и тканей, они способны к дифференцировке в различные клеточные типы, в т.ч. остеобласты, хондробласты, адипоциты, а также в цементобласты, мышечные и нервные клетки. Известно, что МСК секретируют множество трофических и протекторных факторов. Это является основанием для их внедрения в клиническую практику для лечения различных заболеваний человека.

Одним из перспективных источников стволовых клеток являются зачатки и пульпа третьих моляров (зубов мудрости) человека. Стволовые клетки, выделенные из зачатков третьих моляров человека hTGSC (англ. Human Tooth Germ Stem Cells), по своим морфологическим и фенотипическим свойствам аналогичны мезенхимным стволовым

клеткам человека, поскольку обладают фибробласто-подобной морфологией, экспрессируют поверхностные антигены (маркёры дифференцировки) CD29, CD73, CD90, CD105 и CD166, характерные для МСК, и способны к дифференцировке в остеогенно, хондрогенно, адипогенно и нейрогенно направлениях [Yalvac M.E., Ramazanoglu M. et al. // Pharmacogenomics J. - 2010. - V. 10. - P.105-113].

По данным литературы одним из наиболее перспективных для клинического применения факторов роста является сосудистый эндотелиальный фактор роста человека VEGF (англ. Vascular Endothelial Growth Factor), обладающий нейропротекторными, нейротрофическими и про-ангиогенными свойствами. Фактор поддерживает выживание нейронов, защищает нервную ткань от кислородного голодания при гипоксии, стимулирует пролиферацию нейробластов и рост аксонов, а также поддерживает выживание нейронов *in vitro* и *in vivo*.

Цель работы — определение эндогенного уровня экспрессии VEGF в культуре клеток hTGSC. В качестве контрольной клеточной линии с низким эндогенным уровнем экспрессии VEGF использовали иммортализованную линию первичных человеческих эмбриональных клеток почки HEK293T (англ. Human Embryonic Kidney 293 cells).

Клетки культивировали в 24-луночных культуральных планшетах в инкубаторе при 37 °C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Сбор культуральной среды из лунок с клетками HEK293T и hTGSC проводили на 1, 3 и 5 дни. Концентрацию VEGF в культуральной среде определяли с помощью набора VEGF-ИФА-БЕСТ А-8784 (Вектор, Россия) по методике, рекомендуемой производителем. Метод определения основан на твердофазном «сэндвич» варианте иммуноферментного анализа с применением моно- и поликлональных антител к VEGF человека. Для построения стандартной кривой использовали калибровочные образцы с известной концентрацией VEGF, входящие в состав набора. Стандартная кривая свидетельствует о чувствительности и линейности детекции измеряемых концентраций VEGF в диапазоне 10–2000 пг/мл. Оптическую плотность растворов измеряли на многофункциональном микропланшетного ридере в двухволновом режиме: основной фильтр — 450 нм, референс-фильтр — 655 нм. Исходя из прямой пропорциональности между величиной оптической плотности и концентрацией VEGF в стандартных образцах, вычисляли концентрацию VEGF в исследуемых образцах.

В ходе эксперимента было установлено, что клетки hTGSC обладают высокой эндогенной экспрессией гена *vegf* и активно секретируют белок VEGF в культуральную среду: 1 день — 367 пг/мл, 3 день — 2247 пг/мл, 5 день — 2675 пг/мл. Клетки HEK293T обладали низким эндогенным уровнем экспрессии VEGF на 1, 3 и 5 день инкубации — 11, 58 и 78 пг/мл, соответственно.

Таким образом, показано, что мезенхимные стволовые клетки, выделенные из зачатков третьих моляров человека, способны секретировать высокие уровни сосудистого эндотелиального фактора роста VEGF при культивировании *in vitro*, что указывает на перспективность их применения для терапии различных дегенеративных заболеваний человека.

СОЛОДОВНИКОВ В.В.

Оренбургская государственная медицинская академия, Оренбург, Россия

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МИОКАРДА КРЫС В УСЛОВИЯХ ЭМОЦИОНАЛЬНО-БОЛЕВОГО СТРЕССА

Объектом явились 30 лабораторных беспородных крыс-самцов (10 - контроль) массой 180 – 200 г. Моделирование эмоционально-болевого стресса проводили у 20 крыс. В специальной камере животных подвергали воздействию тока силой 4 мА, избежать которое животные могли только путем ухода на платформу, расположенную в центре камеры. Это приводило к выработке условного рефлекса избегания, проявлявшегося в постоянном нахождении крыс на платформе. Последующее неупорядоченное нанесение коротких ударов тока (6 мА в течение 2 сек) через пол платформы сопровождалось формированием стрессорной реакции у животных, обусловленной как наличием конфликта между выработанным условным рефлексом избегания и безусловным болевым раздражителем, так и постоянным напряженным ожиданием электроболевого раздражения.

При моделировании длительного эмоционально-болевого стресса (10 суток) светооптический и ультраструктурный анализ сократительных и проводящих кардиомиоцитов в своей совокупности показал изменения, характерные для пластической

сердечной недостаточности (выраженный отек саркоплазмы, маргинация и конденсация хроматиновых структур, набухание митохондрий и локальное разрушение их крист, фрагментация миофибрилл по Z-линиям, формирование лептофибрилл, появление в клетках миелоноподобных элементов и крупных аутофагосом). Вокруг скоплений проводящих кардиомиоцитов (синоатриальный и атриовентрикулярный узлы) усиливался отек фиброэластической ткани. При этом в данных клетках отмечены признаки ультраструктурных повреждений мембранных компартментов. Иммуноцитохимические исследования показали, что апоптоз в кардиомиоцитах у интактных крыс встречается редко, однако, в условиях длительного эмоционально-болевого стресса формируется апоптотическая доминанта у кардиомиоцитов и немышечных клеток миокарда, о чем свидетельствует возрастание числа bcl-2 позитивных клеток. Вместе с тем, определяются не только функционально сохранные и гипертрофированные клетки, но и элементы с признаками внутриклеточной регенерации. Таким образом, длительноестрессирование животных приводит к неблагоприятному ремоделированию миокарда, недостаточности метаболических и пластических процессов, усугубляющим фактором которого может быть апоптоз. Данное заключение согласуется современными исследованиями, указывающими на то, что дефинитивные кардиомиоциты млекопитающих, избегающие вступление в деструктивную стадию апоптоза, реализуют генетическую программу программированной клеточной гибели путем длительногострессирования животных.

СОЛОМОНОВА Е.А.¹, ОСТРОУМОВ С.А.²

¹ *Научная консалтинговая фирма «Волга», Москва, Россия*

² *МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

**ВЫЯВЛЕНИЕ ДИАПАЗОНА УСТОЙЧИВОСТИ МАКРОФИТОВ К
ЗАГРЯЗНЯЮЩИМ ВЕЩЕСТВАМ КАК ЭЛЕМЕНТ ЭКОБИОТЕХНОЛОГИЙ С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФИТОРЕМЕДИАЦИИ**

Известно, что высшие водные растения (ВВР) рекомендованы для применения на гидрофитных площадках (биоплато) для очистки и доочистки сточных вод.

Наши предыдущие исследования выявили токсичность поверхностно-активных вещества (ПАВ) –на примере анионных ПАВ (АПАВ) - для высших растений.

Это делает необходимым получение данных о возможной фитотоксичности наиболее часто применяемых ПАВ-содержащих препаратов на рекомендованные для использования на биоплато виды макрофитов. При выявлении фитотоксичности необходимо определение диапазона устойчивости ВВР к ПАВ и установление допустимой нагрузки смесевых препаратов на макрофиты. В этих целях нами был разработан метод выявления допустимых нагрузок загрязняющих веществ на биосистемы с ВВР. Метод был апробирован на индивидуальных АПАВ, на примере додецилсульфата натрия.

В период с января по февраль 2012 г. нами была проведена серия опытов по определению эффектов воздействия концентрированной смеси анионных и неионогенных ПАВ LIQUID CRYSTAL CONCENTRATE (LCC) на водный макрофит *Elodea canadensis*.

Опыты проводили в условиях однократных и рекуррентных (неоднократных) добавок.

Для исследования был выбран препарат LCC, поскольку он широко применяется в России (продается и используется на территории РФ) в качестве основы при производстве косметических моющих средств (шампуней, жидкого мыла, пены для ванн). Основным действующим компонентом этого концентрата является АПАВ лауретсульфат натрия, концентрация которого в препарате составляет до 50%.

В результате опытов показана фитотоксичность LCC на *E. canadensis*. Установлен диапазон устойчивости *E. canadensis* к использованным дозам препарата.

Так, диапазон устойчивости *E. canadensis* к смесевому препарату LCC составил от 0,00 до 20,00 мкл/мл LCC в водной среде в течение семи дней инкубации.

Опыты с однократными и рекуррентными добавками выявили следующее. Негативный эффект от воздействия 60 мкл/мл концентрата (в условиях рекуррентных добавок 3 раза по 20 мкл/мл с интервалом в 7 суток) был меньше (наблюдали снижение тургора у 20-25% растений), чем после внесения разовой добавки концентрацией 50 мкл/мл. В последнем случае (разовая добавка 50 мкл/мл) где наблюдали снижение тургора у 45-50% растений через 7 суток от начала инкубации.

Все концентрации LCC, использованные в опытах (рекуррентные добавки: 20,00; 50,00 мкл/мл; однократные добавки: 100,00 и 150,00 мкл/мл) превысили значение

допустимой нагрузки по LCC на *E. canadensis*. Таким образом, максимальные значения допустимой нагрузки по LCC на *E. canadensis* лежат в диапазоне концентраций ниже 20,00 мкл/мл LCC.

В последующих сериях опытов нами запланировано выявить количественные значения допустимой нагрузки по LCC на *E. canadensis* с учетом полученных данных.

Выявленные количественные показатели устойчивости макрофитов к АПАВ и LCC вносят вклад в информацию для более обоснованного применения ВВР в целях восстановления водных объектов и кондиционирования воды. Разработанный метод позволяет определять длительность эксплуатации фитосистемы, выживаемость ВВР и сроки замены фитомассы, а также определять возможность устойчивости фитосистем к максимальным нагрузкам загрязняющих веществ.

Таким образом, полученные результаты могут быть использованы при разработке, планировании, внедрении и использовании биотехнологий очистки и доочистки водных объектов.

СОЛОХИНА И.Ю.

Орловский государственный аграрный университет, Орел, Россия

СКРИНИНГ ГЕНОТИПОВ ОВСА ПОСЕВНОГО НА СОДЕРЖАНИЕ АВЕНАЦИНА

Растения синтезируют широкий спектр веществ вторичного происхождения. Подавляющее большинство известных в настоящее время вторичных соединений было выделено из высших растений и микроорганизмов. О существовании биологически активных веществ растительного происхождения, способных оказывать влияние на биологические объекты, человек знал еще с древности. Попытки использовать эти активные вещества для борьбы с вредными организмами, повреждающими сельскохозяйственные растения и хранящуюся продукцию, также предпринимались очень давно. Но только во второй половине 20 века, благодаря стремительному развитию химии природных соединений и биохимии, мир так называемых «вторичных соединений» значительно расширился.

Многие вторичные соединения принимают участие в экологических взаимосвязях между микроорганизмами, растениями и животными и играют важную роль в выработанных в процессе эволюции защитных механизмах растений, направленных на предотвращение их повреждений вредными организмами. Наиболее известные вторичные метаболиты - антибиотики, фитоалексины и фитоантисипины, растительные токсины, регуляторы роста и поведения, контролирующие внутривидовые и межвидовые связи в биоценозах. Вторичные метаболиты используются в качестве аллелохимических агентов - веществ, способствующих взаимодействию между видами, и могут обладать активностью аттрактантов, репеллентов, антибиотиков и защитных веществ.

Так малоизученными являются вторичные метаболиты овса посевного – сапонины. Среди них выделяют класс тритерпеновых гликозидов, к которым относится авенацин. Авенацин – растительный антибиотик, содержащийся в максимальных количествах в корнях овса посевного. Он борется с корневыми гнилями пшеницы и ячменя. Поэтому актуальность исследования заключается в выделении авенацина из овса и создание на его основе средства защиты растений.

Целью данной работы являлся скрининг сортов овса посевного на содержание максимального количества авенацина. Объектами исследования являлись сорта овса из коллекции ВИРа им. Н.И. Вавилова: устойчивые к обыкновенной злаковой тле «СІ 1580» (США), «Vorrus» (Германия), «122141/1» (Монголия), «122141/2» (Монголия), «PI 186270» (США); сорта неустойчивые к обыкновенной злаковой тле: «Тюменский голозерный» (Тюменская область), «Гунтер» (Кировская область), «Левша» (Кемеровская область), «Кречет» (Кировская область), «Пушкинский голозерный» (Ленинградская область).

Порошок из корешков овса экстрагировали 50% этиловым спиртом, центрифугировали в течение 10 минут при 14000 об/мин. Навеску из корешков овса с этиловым спиртом сушили в вакуумной сушке. Полученный сухой экстракт авенацина хранили при температуре -20°C. В результате проведенного скрининга 10 генотипов овса установлено, что сорта устойчивые к обыкновенной злаковой тле: «СІ 1580» (США), «Vorrus» (Германия), «122141/1» (Монголия), «122141/2» (Монголия), «PI 186270» (США) содержат большее количество авенацина по сравнению с неустойчивыми. А сорт «122141/2» (Монголия) содержит наибольшее количество авенацина – 0,57 мг/мл. Таким

образом, авенацин может быть использован в качестве перспективного источника для получения экологически безопасного средства защиты растений от патогенов.

СОРОКИНА А.Ю., ДУБИНИНА Г.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского Российской академии наук, Москва, Россия

РАЗНООБРАЗИЕ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ЛИТОТРОФНЫХ ЖЕЛЕЗОБАКТЕРИЙ И ИХ РАСПРОСТРАНЕНИЕ В ЖЕЛЕЗИСТЫХ ИСТОЧНИКАХ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗИСА

Из-за трудности выделения и культивирования группа нейтрофильных литотрофных железобактерий слабо изучена в физиологическом и таксономическом плане. За последние 20 лет были описаны, но остаются до сих пор невалидированными три вида, относящиеся к классам *Alpha-* и *Betaproteobacteria*, и один вид описан в качестве единственного представителя нового класса *Zetaproteobacteria*.

Исследования проводили на 8 железистых источниках различного генезиса, расположенных в Республике Карелия, Новгородской области, Краснодарском и Ставропольском краях. Содержание Fe(II) в воде источников варьировало от 3 до 126 мг/л, рН 6.2–8.0, минерализация составляла 0.5–20 мг/л. Все источники низкотемпературные (5–15°C), за исключением одного умеренно термального (40°C).

Бактериальные сообщества свежееосажденных железистых осадков на выходе источников характеризовались своеобразным составом. Представители органотрофных железобактерий – типичных обитателей пресных водоемов (*Leptothrix*, *Sphaerotilus* и др.) в большинстве источников отсутствовали, встречаясь лишь в единичных случаях в качестве минорных компонентов, главным образом, в заболоченных участках водостоков. Литоавтотрофные железобактерии рода *Gallionella* обнаружены только в одном источнике с высоким содержанием Fe(II). Доминирующим компонентом всех минеральных железистых источников были одноклеточные литотрофные железобактерии. Их численность не превышала 10 кл/мл в воде на выходе источников, но резко возрастала до 10⁷ кл/мл в осадках на разливах и далее по ходу стоков глубинных вод.

Чистые культуры одноклеточных железобактерий были выделены путем предельных десятикратных разведений из образцов свежесажженных железистых осадков.

Все изоляты, согласно результатам филогенетического анализа, оказались представителями различных классов филума *Proteobacteria*. Четыре штамма имели сходство последовательностей гена 16S рРНК в пределах 89–98.5%, отличаясь от ближайших таксонов на видовом или родовом уровне (штаммы Sp-1, Obr-1, DNZ-1, Hf1). Два штамма, Ac-1 и Mac-2, имели 99.8–99.9% сходства с представителями известных таксонов *Acidovorax facilis* и *Cupriavidus metallidurans* и отнесены к этим видам, соответственно.

Все изоляты, помимо окисления Fe(II) в микроаэробных условиях, способны к окислению Fe(II) в анаэробных условиях за счет использования NO_3^- и N_2O в качестве акцептора электронов.

Штаммы Sp-1 и Hf1 использовали различные источники Fe(II) в качестве донора электронов (FeSO_4 , FeS, Fe_2CO_3) лишь при росте в присутствии усвояемого органического вещества (ацетат), т.е. по типу метаболизма были охарактеризованы как миксотрофы. Ключевые ферменты циклов Кальвина (РУБИСКО) или вЦТК (изоцитратлиазы) – не обнаружены.

Основываясь на полученных данных полифазного анализа (фенотипических, хемотаксономических свойств, результатов молекулярно-генетических анализов), штамм Hf1, выделенный из солончатого источника № 8 (Новгородская обл.) описан в качестве нового вида *Hoeflea siderophila* sp. nov. рода *Hoeflea* в пределах класса *Alphaproteobacteria*. Штамм Sp-1, выделенный из термального источника «Марка» (Краснодарский край), описан в качестве единственного представителя нового рода *Ferrivibrio denitrificans* gen. nov., sp. nov. в пределах класса *Alphaproteobacteria*.

СОРОКИНА Е.В., АХМАТОВА Н.К., АХМАТОВ Э.А., ХОМЕНКОВ В.Г.

*Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение НИИ Вакцин и сывороток
им. И.И.Мечникова РАМН, Москва, Россия*

ВЛИЯНИЕ ИММУНОТЕРАПИИ ПРЕПАРАТОМ ИММУНОВАК-ВП-4 НА ДИНАМИКУ ЭКСПРЕССИИ TLRs У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ КРАПИВНИЦЕЙ И ПЕРСИСТИРУЮЩЕЙ ГЕРПЕСВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

В последнее время все больше исследований посвящено взаимосвязи торпидно протекающей хронической крапивницы с активацией персистирующих герпесвирусных инфекций. Многие вирусы, обладающие способностью длительно сохраняться в организме, могут вызывать хроническую форму инфекции, что приводит к изменению иммунологической реактивности организма. Toll-подобные рецепторы являются важным компонентом врожденной иммунной системы. Нарушение проводимости сигналов через TLRs приводит к развитию целого ряда патологических процессов в организме.

Цель исследования: изучить динамику экспрессии TLRs у больных хронической крапивницей в результате иммунотерапии препаратами Иммуновак-ВП-4 и Кагоцел.

Материалы и методы: Обследовано 52 больных ХК с сопутствующей рецидивирующей ВПГ1,2 инфекцией и реактивацией хронической ВЭБ- и ВГЧ-6-инфекции. Оценку экспрессии TLRs на МЛПК осуществляли методом проточной цитометрии с применением моноклональных антител против соответствующих антигенов.

Результаты: У больных наблюдались исходно высокие значения экспрессии TLR3 ($37,8 \pm 3,2\%$) на фоне повышенных почти в 4 раза TLR2 ($19,6 \pm 3,3\%$). Уровни экспрессии TLR4,9 были высокие, составляя $17,3 \pm 3,8\%$ и $28,1 \pm 3,4\%$ и превышая нормальные значения в группе здоровых лиц ($4,2 \pm 0,3\%$ и $11,2 \pm 1,3\%$ соответственно). Изучение динамики экспрессии TLRs в результате терапии Иммуновак продемонстрировало повышение в ходе лечения экспрессии TLR2 до $25,1 \pm 7,6\%$, TLR9 в 2 раза по сравнению с исходными значениями (до $57,1 \pm 9,7\%$). Установлено, что TLR3 распознает двухцепочечную РНК и молекулярные структуры вирусов. Иммунотерапия Иммуновак способствовала повышению экспрессии TLR3 до $59,9 \pm 9,8\%$. В группе, получавшей Кагоцел, экспрессия TLR3 повысилась до $42,1 \pm 3,2\%$, экспрессия TLR2,4 практически не изменилась, а уровень TLR9 повысился до $33 \pm 3,8\%$. В группе, получавшей базисную терапию, произошло

снижение уровня экспрессии TLR2,4,3 до $16,8 \pm 6,5\%$, $8,1 \pm 3,1\%$, $26,7 \pm 7,8\%$, но не до нормальных значений, экспрессия TLR9 не изменилась. Таким образом, включение Иммуновак-ВП-4 в терапию больных ХК, протекающей на фоне хронических персистирующих вирусных инфекций, способствует активации рецепторов врожденного иммунитета.

СОРОКИНА Е.В., АХМАТОВА Н.К., АХМАТОВ Э.А.

Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение НИИ Вакцин и сывороток им.

И.И.Мечникова РАМН, Москва, Россия

**ДИНАМИКА ЭКСПРЕССИИ TLRs У БОЛЬНЫХ
ХРОНИЧЕСКОЙ КРАПИВНИЦЕЙ С СОПУТСТВУЮЩЕЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ
ИНФЕКЦИЕЙ В ХОДЕ ПРОВЕДЕНИЯ ИММУНОТЕРАПИИ ПРЕПАРАТАМИ
ИММУНОВАК-ВП-4 И КАГОЦЕЛ**

В патогенезе хронической крапивницы роль триггеров играют различные инфекционные агенты. Дефекты в механизмах распознавания различных микробных PAMPs в результате изменения экспрессии TLRs может привести к нарушению иммунного ответа, и как следствие — нарушению элиминации патогена. Цель исследования: изучить динамику экспрессии TLRs у больных хронической крапивницей с сопутствующей бактериальной и вирусной патологией в результате иммунотерапии препаратами Иммуновак-ВП-4 и Кагоцел.

Материалы и методы: Обследовано 40 больных ХК с бактериальной и бактериально-вирусной инфекцией. Уровни экспрессии сывороточных TLRs определяли в начале исследования и через сутки после окончания терапии.

Результаты: Терапия Иммуновак способствовала незначительному снижению экспрессии TLR2 с $30,7 \pm 3,6\%$ до $16,5 \pm 8\%$. Исходно этот показатель у больных превышал нормальные значения в 6 раз. Экспрессия TLR3 повышалась почти в 2 раза по сравнению с исходными значениями до $66,3 \pm 11,5\%$, TLR9 в 2 раза до $60,7 \pm 10,3\%$, что может свидетельствовать о включении внутриклеточных рецепторных механизмов, способствующих более эффективному распознаванию нуклеиновых кислот бактерий, ДНК

и РНК вирусов. В группе, получавшей Кагоцел, экспрессия TLR2,4 незначительно снизилась до $24,7 \pm 11,3$ и $12,7 \pm 7,1\%$ соответственно, уровни экспрессии TLR3,9 повысились до $41,8 \pm 7,4$ и $36,8 \pm 6,7\%$ соответственно. Терапия Иммуновак у больных с бактериально-вирусной инфекцией способствовала снижению экспрессии TLR2 до $9,4 \pm 2,7\%$. Иммуновак способствовал повышению экспрессии TLR4 до $22,3 \pm 4,6\%$. Наиболее выраженная динамика наблюдалась в уровнях экспрессии TLR3: исходно очень низкие значения повысились до $32,5 \pm 9,8\%$, экспрессия TLR9 увеличилась в 2 раза до $33,4 \pm 9,4\%$. В группе, получавшей Кагоцел, экспрессия TLR2 не изменилась, TLR4 выросла до $19,4 \pm 7,7\%$, а TLR3,9 повысилась до $27,4 \pm 6,3$ и $22,6 \pm 5,8\%$. Показано, что Иммуновак у больных ХК при наличии хронических бактериальных и смешанных вирусно-бактериальных инфекций способствует активации рецепторов врожденного иммунитета, своевременной санации очагов фокальной инфекции, снижению активности вирусной инфекции и как следствие - профилактике рецидивов ХСК и инфекционного процесса.

СОРОКИНА Е.В., МАЖУЛЬ М.М., ЮДИНА Т.П., ДАНИЛОВ В.С.

Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова,

биологический факультет, Москва, Россия

ОЦЕНКА ИСТИНОЙ ТОКСИЧНОСТИ ИОНОВ СЕРЕБРА С ПОМОЩЬЮ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО МЕТОДА НА РЕКОМБИНАНТНОМ ШТАММЕ *ESCHERICHIA COLI*

Одним из самых прогрессивных методов определения биологической активности различных веществ на бактерии является метод с использованием морских люминесцентных бактерий. Этот экспрессный (до 30 минут) биолюминесцентный метод широко распространен для определения токсичности всех химических веществ и их смесей позволяет следить за процессом в режиме online. Тушение люминесценции пропорционально токсическому действию исследуемого агента. Любое изменение в метаболизме клетки приводит к быстрому изменению интенсивности свечения бактерий, поскольку фермент люцифераза, обеспечивающий биолюминесценцию, прямо или опосредовано реагирует на воздействие на клетку. Одна из разновидностей такого теста -

это использование рекомбинантного штамма *Escherichia coli*, для которого, не требуется обязательной добавки NaCl, что особенно мешает при определении токсичности ионов серебра. Индекс токсичности определяется по формуле $T=(I_0-I_T)/I_0 \times 100$, где I_0 и I_T - интенсивность биолюминесценции в отсутствие и присутствие токсиканта.

Предметом нашего исследования является выявление токсического действия ионов серебра и сравнение величин токсичности в остром и хроническом опытах на рекомбинантном штамме *E. coli*. Сопоставление индексов токсичности серебра, полученных в краткосрочном и долгосрочном экспериментах позволит судить об истинной токсичности данного металла.

Эксперименты проводили, определяя токсичность в краткосрочном 30-минутном опыте, так и в долгосрочном 24-часовом варианте. По изменению биолюминесценции, а также росту клеток в присутствии серебра судили об их токсичности в исследуемом диапазоне концентраций. Величина EC_{50} (концентрация вещества вызывающая 50% ингибирование интенсивности свечения бактерий) составляла 0,27 мг/л для острой токсичности. Показано, что значение индекса токсичности зависит от количества клеток в пробе и от количества среды лиофилизации или культивирования. Не отмытые от среды клетки при одном и том же титре (в данном случае 2×10^8 кл/мл) на порядок менее чувствительны к ионам серебра ($EC_{50}=0,27$ мг/л), чем отмытые ($EC_{50}=0,025$ мг/л). Уменьшение концентрации клеток путем разбавления не отмытых клеток водой на порядок до 2×10^7 кл/мл также приводит к эффекту, аналогичному отмыванию клеток от среды. Объяснением этого феномена является способность ионов серебра связываться с компонентами среды в нетоксичный комплекс, вследствие чего не отмытые клетки *E. coli*, становятся менее чувствительны к ионам серебра вследствие падения его эффективной концентрации. При разбавлении или отмывании клеток концентрация среды падает, что и приводит к увеличению чувствительности метода.

Для выяснения вопроса об истинной токсичности и специфичности действия серебра на бактерии были проведены эксперименты по выращиванию бактерий, до 24 часов, в присутствие ионов серебра (так называемый хронический опыт). Величина хронической токсичности серебра составила $EC_{50}=0,014$ мг/л, что на порядок меньше, чем в остром опыте, при одинаковой концентрации 10^8 кл/мл на не отмытых от среды клетках. Параллельно на тех же клетках было изучено влияние серебра на рост бактерий в

диапазоне концентраций от 0,015 мг/л до 0,120 мг/л. Рост клеток был чувствителен к концентрации ионов серебра. При наименьшей концентрации серебра в опыте 0,015 мг/л он к 24 часу составляет 93,7%, а наибольшей (0,120 мг/л) – 56,2% по отношению к контролю.

Сопоставляя данные по ингибированию роста бактерий и индексу токсичности ионов серебра можно сделать вывод, что оба эти параметра взаимосвязаны, то есть, чем больше ингибирование роста бактерий, тем выше индекс токсичности. Следовательно, серебро способно нарушать на молекулярном уровне как метаболические, так и репродуктивные процессы, протекающие в клетке. В хроническом опыте, серебро оказалось более токсичным, чем в остром опыте и это позволяет нам оценить истинную токсичность данного металла.

СТАРОСТИНА И.Г., ПОЛИКАРПОВА А.В., СОЛОВЬЕВА В.В., РИЗВАНОВ А.А.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

ПРИМЕНЕНИЕ ТРАНС-СПЛАЙСИНГА В ТЕРАПИИ ДИСФЕРЛИНОПАТИИ

Дисферлинопатии представляют собой гетерогенную группу аутосомно-рецессивных заболеваний мышц человека, которые являются результатом дефектов или недостатков белка дисферлина. Дисферлин — трансмембранный белок, состоящий из 2080 аминокислот (237кДа), в котором есть большой заряженный гидрофильный район и один мембран-связывающий район на С-конце, обеспечивающий возможность его ассоциации с саркоплазматическим ретикулумом. Мутации в гене *Dysf* вызывают конечностно-поясную мышечную дистрофию типа 2В (англ. LGMD 2В, limb-girdle muscular dystrophy 2В).

Ген дисферлина имеет большой размер и состоит из 55 экзонов, которые охватывают 233140 п.н. геномной ДНК. Вследствие большого размера гена *Dysf* проводить генную терапию дисферлинопатии путем создания генетической конструкции, кодирующей полный ген, достаточно сложно. Даже использование кДНК (открытой рамки считывания) гена (6243 п.н.) ограничивает возможность выбора векторов для генной терапии. Например адено-ассоциированные векторы, считающиеся наиболее безопасными и одними из перспективных вирусных векторов для генной терапии, могут нести не более

5 т.п.н. трансгенной информации. Существуют другие альтернативные методы генной коррекции заболевания, такие как транс-сплайсинг.

РНК-репарация, или репрограммирование, — новый подход для генной терапии человека. В отличие от обычной генной терапии, в которой экзогенные кДНК вводятся в клетки, подходы РНК-репарации, основанные на сплайсосомо-опосредованном транс-сплайсинге РНК (англ. SMaRT, spliceosome-mediated RNA trans-splicing), транс-сплайсинге рибозимов и тРНК-сплайсинге эндонуклеаз, позволяют проводить коррекцию эндогенных видов РНК. SMaRT создает гибридную мРНК путем реакции транс-сплайсинга между эндогенной мишенью пре-мРНК и молекулой претранс-сплайсируемой РНК (англ. РТМ, pretrans-splicing RNA molecule). Данный подход РНК-транс-сплайсинга затрагивает РНК на уровне пре-мРНК. Процесс транс-сплайсинга содержит три различных компонента: сплайсосому, пре-мРНК транскрипты-мишени и пре-мРНК транс-сплайсируемые молекулы (ПТМ). Сплайсосома и пре-мРНК-мишень естественным путем синтезируются клетками, в то время как ПТМ — искусственно синтезируемые РНК-молекулы, способные специфически связываться с выбранной пре-мРНК в ядре клетки. Сплайсосомо-опосредованный транс-сплайсинг пре-мРНК может одновременно проходить при репарации, замене и удалении последовательностей РНК из дефектной пре-мРНК-мишени путем замены экзона.

Средствами доставки ПТМ в клетки могут являться генетические вектора на основе аденовирусов и адено-ассоциированных вирусов. Рекомбинантные молекулы ДНК получают путем рестрикции и последующей лигации ПТМ и выбранного генетического вектора. Созданный рекомбинантный вектор можно использовать для генетической модификации клеток *in vitro* и *in vivo*.

Целью данного исследования является создание генетической конструкции ПТМ и вектора на основе адено-ассоциированного вируса с последующей коррекцией мутации в гене *dysf*. Нами разработана генетическая конструкция ПТМ для гена дисферлина, состоящая из следующих компонентов: домен связывания с интроном 25, участок-спейсер, консервативный участок связывания сплайсосомы, полипиримидиновый тракт, 3' сайт сплайсинга CAG, экзон 26 дикого типа, 5' сайт сплайсинга, консервативная последовательность DISE, домен связывания с интроном 26. На 5' и 3' концах синтезированы сайты attB1 и attB2 для Gateway-субклонирования.

Таким образом разработана конструкция ПТМ для гена дисферлина (коррекция мутации в экзоне 26) для генной терапии с применением технологии РНК транссплайсинга.

СТЕКЛОВ М.Ю.^{1,2}, ТАРАРОВ В.И.¹, РОМАНОВ Г.А.², МИХАЙЛОВ С.Н.¹

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

²*Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН, Москва, Россия*

СИНТЕЗ АЗИДОПРОИЗВОДНЫХ ЦИТОКИНИНА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ФОТОАФИННОЙ МОДИФИКАЦИИ

Цитокинины принято относить к «классическим» фитогормонам. Эндогенные цитокинины стимулируют деление клеток, фотоморфогенез, развитие хлоропластов, биосинтез пигментов, регулируют темп роста корней и общую архитектуру растения и противодействуют старению листьев и апикальному доминированию. В настоящее время термин «цитокинины» объединяет большую группу соединений, включающую как природные гормоны, так и синтетические биорегуляторы. Синтез новых цитокининов интересен благодаря потенциальной возможности их применения в биотехнологиях, сельском хозяйстве, медицине и даже косметике.

Азидопроизводные аденина и близких по структуре соединений, в том числе цитокининов, были успешно использованы во многих экспериментах по фотоаффинному мечению. Фотолиз азидогруппы генерирует высокорекреационные нитрены, которые могут образовывать ковалентные «мостики» с белками при наличии О-Н, N-Н или С-Н связей в ближайшем окружении. Это свойство азидопроизводных широко используется, в частности, для изучения структуры лиганд-связывающих сайтов сенсорных белков. Кроме того, современные тенденции "клик-химии" позволяют применять азидосодержащие соединения для модификации нуклеиновых кислот, материаловедения и поиска новых лекарственных препаратов.

В настоящей работе были синтезированы: 8-азидо- N^6 -бензиладенин, 2-азидо- N^6 -бензиладенин и 2-азидо- N^6 -изопентениладенин. В случае 8-азидо- N^6 -бензиладенина был предложен относительно простой метод синтеза на основе N^6 -бензиладенина (6-

бензиламинопурина). Синтез проходит в две стадии. Первая – это бромирование 6-бензиламинопурина Br_2 в уксусной кислоте в присутствии AcONa , что позволяет получить 8-бром- N^6 -бензиладенин с выходом 59%. Положение бромирования было подтверждено с помощью прямой трансформации бромида реакцией с NaN_3 в ДМСО с получением 8-азидо- N^6 -бензиладенина с выходом 70% и сравнением свойств полученного соединения с эталонным 2-азидо- N^6 -бензиладенином.

Синтезированные азидопроизводные существенно отличались по спектральным характеристикам от исходных N^6 -бензиладенина или N^6 -изопентениладенина, но при этом проявляли типичную гормональную активность в стандартных цитокининовых биотестах, которая в ряде случаев заметно превышала активность немодифицированного N^6 -бензиладенина.

Работа поддержана грантами РФФИ 11-04-00614 и 11-04-01958.

СТЕПАНОВ А.Е.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный университет тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

БИОФАРМАЦЕВТИКА В ДИАГНОСТИКЕ И ТЕРАПИИ РЕДКИХ («ОРФАННЫХ») ЗАБОЛЕВАНИЙ

Работа по решению медицинских и социальных проблем людей, страдающих так называемыми особо редкими или «орфанными» заболеваниями ведётся в Российской Федерации на государственном уровне с 2010 года. Ориентировочно, на сегодняшний день, в стране около 13 тысяч таких больных. Принципы для создания системы медицинской помощи этой категории пациентов заложены в отдельную статью закона «Об основах охраны здоровья граждан РФ», вступившего в действие с января 2012 г. Законодательное закрепление определений «редкие заболевания» и «орфанные препараты» важный этап на путях решения обозначенных проблем путём обеспечения равного доступа граждан страны к инновационным медицинским технологиям и высокоэффективным диагностическим и лекарственным препаратам. В статье 44 закона к

определению «редкие» отнесены те заболевания, «которые имеют распространённость не более 10 случаев на 100 000 населения», составлен перечень редких заболеваний. В настоящее время многие сотни редких заболеваний поддаются достоверной диагностике различными методами биохимии, цитогенетики, иммунологии, молекулярной генетики и др. Для целей терапии редких заболеваний в настоящее время на фармацевтическом рынке также уже имеются сотни препаратов со статусом «orphan drug». По объемам применения «орфанных препаратов» на первом месте находится онкогематология, далее следуют генетические заболевания (мукополисахаридоз, акромегалия, болезни Гоше и Фабри и др.), наследственные болезни центральной нервной системы; также имеются редкие заболевания аутоиммунного, инфекционного и токсического характера. Исследования и разработки, направленные на производство новых орфанных препаратов, являются важной задачей биофармацевтики и способствуют появлению эффективных методов диагностики и лечения редких заболеваний. Медицинская и социальная реабилитация пациентов с редкими заболеваниями требует объединённых скоординированных усилий органов государственной и исполнительной власти, общественных и благотворительных организаций, врачей, экспертов, исследователей, представителей фармацевтической отрасли.

СТИГАЙЛО И.Н., ЕГОРОВА З.Е.

Белорусский государственный технологический университет, Минск, Беларусь

ПОДБОР КОМПЛЕКСНОЙ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ МАЦЕРАЦИИ ОВОЩНОГО СЫРЬЯ В ПРОИЗВОДСТВЕ СОКОВ ПРЯМОГО ОТЖИМА

В работе представлены результаты исследований по подбору комплексной ферментативной системы с целью повышения эффективности процесса получения морковного сока прямого отжима.

Несмотря на наличие большого количества промышленно производимых ферментов, на сегодняшний день отсутствуют ферментные комплексы направленного действия, позволяющие проводить эффективную деструкцию овощного сырья с целью

извлечения сока. Более активные исследования и их практическое применение отмечаются в винодельческой и пивоваренной отраслях. Достаточное количество сообщений посвящено использованию ферментов при производстве яблочного сока, как наиболее распространенного, получаемого из местного сырья. Овощные соки остаются практически вне внимания биотехнологов. Имеются немногочисленные сообщения об использовании ферментов при производстве свекольного и морковного сока.

Однако, в последние годы все большее предпочтение, особенно на Европейском рынке, отдается натуральным сокам, в частности сокам прямого отжима, из овощного сырья. Получение таких соков требует специального подбора ферментов с целью увеличения сокоотдачи сырья и сохранения при этом максимального количества биологически-активных веществ, содержащихся в нем.

Это свидетельствует о необходимости исследования мацерирующего действия ферментов на овощное сырье с целью подбора или создания ферментных композиций, которые позволят увеличить выход сока и обеспечат переход в него биологически-активных компонентов корнеплодов.

В связи с этим целью исследования явилось изучение действия ряда ферментных комплексов на морковную мезгу при производстве морковного сока прямого отжима.

На сегодняшний день отсутствуют специализированные ферментативные препараты для обработки морковной мезги. В связи с этим были использованы коммерческие ферментные препараты, присутствующие в настоящее время на рынке Беларуси. Это препараты, рекомендованные фирмой ERBSLOH Geisenheim для биокатализа овощного сырья, а также ферментные комплексы фирмы Novozymes. Продуцентами ферментов являлись в основном штаммы *Aspergillus niger*.

Были исследованы следующие ферменты и ферментные композиции: пектиназа, (препараты «Vegazim P» и «Vegazim P-CS», Erbsleoh), пектиназа+ полигалакторуназа

(«Vegazim M», Erbsleoh), целлюлаза+гемицеллюлаза («Vegazim HC», Erbsleoh), полигалакторуназа+пектинлиаза («PectinexBE Color», Novozymes), пектиназа+целлюлаза+гемицеллюлаза+арабаназа («Pectinex BEXXL», Novozymes).

Для получения морковного сока прямого отжима корнеплоды моркови мыли, очищали от кожуры, пропаривали и измельчали. Ферменты предварительно разводили водой в соотношении 1:10 и вносили в измельченную морковную мезгу в концентрациях,

рекомендованных производителем. Ферментализ проводили при температуре 50-55°C в течение 60 мин. Отжим сока производили в лабораторных условиях с использованием комбайна фирмы Bosh.

При использовании всех ферментов было отмечено увеличение выхода сока на 27,5%- 36,4% по сравнению с контролем. Их композиция существенного влияния не оказывала. Однако, использование пектиназных комплексов, содержащих в своем составе как „классическую" пектиназную фракцию (полигалактуроназу), так и „новую» (арабаназу),- оказалось более эффективным, чем применение целлюлазного комплекса. Наибольший выход сока (72,3%) был отмечен в случае использования пектин-целлюлазного комплекса (пектиназа + целлюлаза + гемицеллюлаза+ арабаназа).

Было установлено, что увеличение выхода сока сопровождалось уменьшением содержания бета-каротина в нем. При использовании пектин-целлюлазного комплекса был отмечен наибольший выход сока и наименьшее содержание в нем бета-каротина. В случае использования пектинового комплекса (пектиназа+полигалактуроназа) содержание бета-каротина было наибольшим при достаточно высоком выходе сока. Следует отметить, что в процессе получения морковного сока для всех вариантов было отмечено уменьшение содержания бета-каротина почти в 2 раза по сравнению с исходным сырьем. В корнеплодах моркови этот показатель составлял (7,07-8,5) мг/100г, в морковном соке- (3,78-4,96) мг/100г.

СТРЕЛКОВА И.Ю., БЕЗЛЕПКИН В.Г.

ФГУП Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

РАЗРАБОТКА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И МОНИТОРИНГА ОНКОПАТОЛОГИИ

В курсе лучевой терапии по случаю рака легких (РЛ) воздействию радиации (2-3 Гр за сеанс) подвергается ограниченная область грудной клетки. Суммарная доза, в зависимости от стадии заболевания, может достигать 66 Гр. Радиационное воздействие является сильнейшим цитотоксическим фактором по отношению к активно делящимся опухолевым клеткам, что определяет выбор такого типа лечения. В результате

фракционированного облучения опухоли радиационному воздействию подвергаются и близлежащие ткани, а также клетки крови. Согласно клиническим протоколам каждому пациенту в зависимости от стадии заболевания назначается оптимизированный профиль радиотерапии (РТ). Однако, при высокой степени стандартизации протоколов, сложности диагностики и тяжести патологии, в определенной мере, стираются индивидуальные биологические различия между пациентами. Это может быть причиной побочных эффектов РТ. Поиск дополнительных молекулярно-генетических параметров оценки состояния организма пациента в курсе лечения, в дополнение к стандартным, утвержденным Минздравом, представляется полезным для усовершенствования клинической практики лечения больных с тяжелой онкопатологией.

В работе проводилась оценка индивидуальной реакции пациентов, страдающих РЛ, на РТ в процессе лечения. В качестве показателя определялась величина соотношения копийности митохондриального гена, кодирующего первую субъединицу NADH-дегидрогеназы, и ядерного гена β -актина. Ген β -актина выступает в качестве внутреннего стандарта, относительно которого возможна оценка изменения количества митохондриальных фрагментов, предположительно элиминированных в кровотоке в большом количестве при радиационном поражении клеток опухоли. Для исследования использовали общую ДНК из плазмы крови пациентов до начала лечения и после окончания курса радиотерапии. Выделение ДНК из 500 мкл плазмы проводилось методом фенольно-хлороформной экстракции с некоторыми модификациями. Полученная ДНК использовалась в качестве матрицы для полимеразной цепной реакции с использованием SybrGreen I в качестве флуоресцентного красителя.

Соотношение копийности NADH/ β -актин генов определяли методом Real-Time PCR. Сравнивались результаты, полученные до лечения и после одного курса РТ для каждого пациента, а также со значениями, по данному параметру для группы здоровых доноров. Фактический материал свидетельствует о широком спектре реакций организма пациентов на РТ. Концентрация ДНК в плазме крови, а также качественная характеристика (NADH/ β -актин), вероятно, определяется соотношением процессов пролиферации и клеточной гибели при РТ, как в опухоли, так в нормальной ткани легких, а также в крови. Являясь сильнейшим цитотоксическим агентом, ионизирующая радиация оказывает воздействие в первую очередь на клетки опухоли, но в зоне поражения с большой долей

вероятности оказываются и здоровые ткани, а также клетки крови. Доминирование того или иного процесса отражается в большей или меньшей гибели клеток, ДНК которых попадает в кровоток. В зависимости от соотношения молекулярно-генетических показателей можно достаточно быстро получить информацию о преобладании того или иного процесса в развитии онкопатологии и об эффективности проводимой терапии. Анализ ДНК плазмы каждого отдельного пациента дает возможность оценить индивидуальную реакцию организма на проводимое лечение.

Работа выполнялась при финансовой поддержке Программы Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине».

СУВОРОВА Е.Е.

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

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ БОРА, ЖЕЛЕЗА И МЕДИ В ПИТАНИИ РОЗ И УСТОЙЧИВОСТИ К ФИТОПАТОГЕНАМ В УСЛОВИЯХ ЗАЩИЩЕННОГО ГРУНТА

При культивировании роз в защищенном грунте повышение их устойчивости к заболеваниям является актуальной проблемой, требующей разностороннего рассмотрения процессов метаболизма, нормальное протекание которых зависит от сбалансированности обеспечения растений макро- и микроэлементами.

Целью работы было определить физиолого-биохимическое значение В, Fe, Cu, Zn в формировании устойчивости роз к инфекциям при выращивании в защищенном грунте.

Объектами исследования были черенки роз сорта Lovely Red. Вегетационный опыт был проведен на базе Ульяновского совхоза декоративного садоводства. В качестве субстрата для выращивания использовали тепличный грунт торф-агроперлит в соотношении 1:3. Торф был нейтрализован доломитовой мукой (рН=5,3) и обогащен минеральным удобрением «Кемира-супер», где содержание основных минеральных элементов было: N_{общ.} – 11%, K_{общ.} – 24%, P_{общ.} – 24%. Фолиарная обработка растений в опыте осуществлялась 5 раз через две недели растворами борной кислоты в концентрации (1,2 г/л, 3,1 г/л, 6,1 г/л – соответственно, две, пять и 10 доз бора в сравнении со смесью

Хогланда), Cu (0,1 г/л), и Fe (0,1 г/л). В контрольном варианте обработку в эти сроки проводили дистиллированной водой. За основу для расчёта концентраций растворов использовалась смесь Кнопа для обработки солью железа и смесь Хогланда – для всех других обработок.

Одним из биохимических показателей, который отвечает за устойчивость растений к инфекциям по литературным данным, является сумма органических кислот. Было показано, что при увеличении концентрации борной кислоты, вносимой на листья при фолиарной обработке, данный показатель возрастает в 2-3 раза по сравнению с контрольным вариантом. Такая тенденция согласуется с теорией иммунитета растений Комеса, в которой повышение кислотности клеточного сока свидетельствует об укреплении пассивного иммунитета растения.

Показателем устойчивости растений считается также отношение белкового азота ($N_{\text{бел}}$) к общему ($N_{\text{общ}}$) его содержанию. В нашем исследовании показано, что $N_{\text{общ}}$ в корнях растений на варианте с обработкой высокой концентрацией борной кислоты, на 50 % выше, чем на других вариантах. При этом содержание моносахаров в корнях уменьшается на фоне увеличения вносимых доз бора. Известно, что бор влияет на углеводный обмен и, как следствие, на азотный метаболизм в растении, который требует энергетических затрат, а углеводы – основные субстраты, при «сжигании» которых в процессе дыхания происходит образование необходимой метаболической энергии.

Железо, как кофактор, входит во многие ферменты, прямым образом влияющие на его устойчивость, – супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза, а также в важнейшие ферменты электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) фотосинтеза и дыхания – цитохромы. Содержание железа в корнях растений на вариантах без обработок этим элементом в 2-10 раз выше, чем его содержание в листьях и стеблях. Одним из видов адаптивной реакции растений на дефицит этого элемента является восстановление Fe(III) до Fe(II) под действием секретируемых растением фенольных соединений, которые образуют комплексные соединения с металлом и способствуют его транспорту в растение. Так как в корневой системе происходят многие важнейшие биохимические процессы, в которых железо необходимо (в цитохромах ЭТЦ), наибольшее количество его концентрируется в корнях. Такое же распределение количества микроэлементов отмечено и для Cu и Zn,

также входящих в ферменты ЭТЦ - в корнях растений их в 2-10 раз выше, чем в стеблях и листьях на вариантах, где обработка этими микроэлементами не проводилась.

При фолиарной обработке растений В накопление этого элемента происходит в листовой пластине, но в стеблях и корнях его содержание на соответствующих вариантах также увеличивается по сравнению с контролем.

Содержание цинка в корнях на варианте с обработкой высокой концентрацией борной кислоты (В10) в 5 раз выше, чем на контрольном варианте. Известно, что при высоком содержании В идет активный метаболизм фенольных соединений, в котором участвует фермент полифенолоксидаза, для функционирования которой, кроме В, необходим Zn, что влечет за собой «подтягивание» корнем растения цинка из грунта.

Таким образом, показано, что фолиарная обработка роз растворами микроэлементов В, Fe, Cu, повышает содержание биохимических компонентов в их составе, которые характеризуют устойчивость растений к инфекции за счёт их влияния на протекание ряда важнейших физиолого-биохимических процессов, отвечающих за иммунитет растений.

СУДОРГИНА П.В., САУЛЬСКАЯ Н.Б.

*Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, лаборатория физиологии ВНД,
Санкт-Петербург, Россия*

НИТРЕРГИЧЕСКАЯ СИСТЕМА ПРИЛЕЖАЩЕГО ЯДРА (N. ACCUMBENS) УЧАСТВУЕТ В ПЕРЕДАЧЕ ВЛИЯНИЙ СТРАХА НА ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЕ ПОВЕДЕНИЕ

Нестабильный межклеточный мессенджер окись азота (NO) участвует в регуляции ряда физиологических функций как в ЦНС, так и на периферии. В ЦНС в непатологических случаях NO вырабатывается NO-продуцирующими нейронами, содержащими нейронную изоформу NO-синтазы, фермент, катализирующий образование NO и сопродукта его синтеза цитруллина. В прилежащем ядре NO-продуцирующие интернейроны составляют 1% популяции, но вырабатываемый ими NO оказывает существенное влияние на нейротрансмиссию, стимулируя выброс нейромедиаторов и контролируя возбудимость нейронов ядра. Результат такого влияния, предположительно,

отражается на проведении внешних сигналов через прилежащее ядро, а также на запуске контролируемых этой структурой программ поведения.

Одной из функций медиального отдела прилежащего ядра (мПЯ) является регуляция исследовательской активности в новом пространственном окружении. Участие нитрергической системы мПЯ в регуляции данной формы поведения ранее не изучалось. Цель настоящей работы заключалась в исследовании изменений уровня внеклеточного цитруллина (сопродукта синтеза NO) в мПЯ, вызываемых исследовательским поведением, и в изучении зависимости этих изменений от степени новизны пространственного окружения и локальной активности нейронной NO-синтазы. Еще одной целью работы было исследование того, как ранее пережитый страх сказывается на активности нитрергической системы мПЯ в ходе исследовательского поведения и на самом исследовательском поведении.

Работа выполнена на крысах-самцах линии Спрег-Доули методом прижизненного внутримозгового микродиализа, позволяющего осуществлять *in vivo* мониторинг нейрохимических изменений в межклеточном пространстве мозга. Животным под наркозом имплантировали диализные канюли в мПЯ. Микродиализные эксперименты начинали на второй день после имплантации. К входу канюли подключали перфузионный насос, осуществляющий постоянную перфузию прилежащего ядра искусственной спинномозговой жидкостью. Оттекающий диализат собирали на выходе канюли каждые 5 минут и анализировали на содержание со-продукта синтеза NO цитруллина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией. После сбора фоновых порций диализата животных помещали в новую камеру на 10 мин, где регистрировали двигательную активность, количество стоек, перемещений между секциями камеры и груминг, и параллельно собирали оттекающий диализат.

Первое помещение животного в новую обстановку, провоцирующее высокий уровень исследовательской активности, сопровождалось подъемом уровня внеклеточного цитруллина в мПЯ, наблюдаемым во время и после поведенческого тестирования. При повторном помещении животного в новую обстановку, сопровождавшемся меньшим уровнем двигательной активности, наблюдалась тенденция к увеличению уровня внеклеточного цитруллина в этой структуре. При помещении животных в хорошо знакомую обстановку, практически не вызывавшую исследовательского поведения,

подъем уровня внеклеточного цитруллина мПЯ не наблюдался. Подъем уровня цитруллина, вызываемый первым предъявлением новой камеры, полностью предотвращался введениями в мПЯ методом диализной инфузии ингибитора нейронной изоформы NO-синтазы 7-нитроиндазола (0.5мМ).

Предъявление новой камеры крысам, у которых за сутки до этого вырабатывали условнорефлекторную реакцию страха (сочетание неизбежного электрокожного раздражения лап и тона), во-первых, вызывало исследовательское поведение меньшей интенсивности и длительности, чем исследовательское поведение контрольных животных, ранее не подвергавшихся действию болевого раздражения, во-вторых, сопровождалось меньшим подъемом уровня внеклеточного цитруллина в мПЯ по сравнению с этим показателем во время исследовательского поведения контрольных животных.

Полученные данные впервые свидетельствуют об активации нитрергической системы прилежащего ядра в ходе исследовательского поведения в новой обстановке. Кроме того, они свидетельствуют, что пережитый ранее страх оказывает тормозящее влияние на исследовательскую активность, возможно посредством торможения нитрергической системы мПЯ. Эти новые данные позволяют предполагать, что нитрергическая система мПЯ может быть вовлечена в передачу влияния ранее пережитого страха на исследовательское поведение.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект N10-04-00397а).

СУЛЬТИМОВА Н.Б., ЛЕВИН П.П.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

СРАВНЕНИЕ КИНЕТИКИ ОБРАЗОВАНИЯ И ГИБЕЛИ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ ПРОДУКТОВ ПРИ ФОТОЛИЗЕ НАБУМЕТОНА И НАПРОКСЕНА В МИЦЕЛЛЯРНЫХ И БЕЛКОВЫХ ВОДНЫХ СРЕДАХ

Набуметон и напроксен – это нестероидные противовоспалительные препараты, обладающих обезболивающим, жаропонижающим и противовоспалительным эффектами.

В настоящее время активно ведется поиск новых препаратов, которые сочетают высокую эффективность с улучшенной переносимостью. Широкий диапазон применения нестероидных лекарственных препаратов заставил обратить внимание на появление побочных эффектов. Наиболее часто встречаются эффекты, связанные с пищеварительным трактом и почками, реже проявляется фотосенсибилизирующий побочный эффект. Фототоксичность набуметона и напроксена связана с наличием нафталинового хромофора в молекулах. Следовательно, необходимость подобрать соответствующие условия для изолирования нежелательных эффектов является важной задачей. Так, фотогемолитические исследования показали, что применение комплекса включения напроксена с β -циклодекстрином снижает его фототоксическое действие. Кроме того, известно, что нейтральный набуметон может образовать комплекс с сывороточным альбумином.

Цель настоящей работы заключается в сравнении кинетических характеристик промежуточных продуктов (триплетных состояний, катион-радикалов и гидратированных электронов), образующихся при фотолизе набуметона (Nab) и напроксена (Nap) в водных растворах додецилсульфата натрия (SDS), β -циклодекстрина (β -CD) и сывороточного альбумина (бычьего) методом наносекундного лазерного фотолиза.

Установлено, что соответствующие триплетные состояния ^3Nab и ^3Nap образуются по одноквантовому механизму, а катион-радикалы ($\text{Nab}^{\bullet+}$ и $\text{Nap}^{\bullet+}$) и гидратированные электроны (e_{aq}) – по двухквантовому. В мицелле молекулы SDS стабилизируют образующиеся катион-радикал $\text{Nab}^{\bullet+}$ и гидратированный электрон e_{aq} , которые вследствие электростатического отталкивания выходят из мицеллы в водный объем, где медленно рекомбинируют. В случае напроксена наблюдается быстрое декарбоксилирование катион-радикала $\text{Nap}^{\bullet+}$. Продукты декарбоксилирования рекомбинируют с гидратированным электроном e_{aq} в мицеллярной фазе с константами скорости близкими к частоте встреч двух частиц в мицеллах, которая составляет примерно $4 \times 10^7 \text{ c}^{-1}$. В водном растворе β -CD образующийся продукт декарбоксилирования катион-радикала напроксена успевает быстро прореагировать с полостью циклодекстрина, поэтому гидратированный электрон e_{aq} выходит из мицеллы и медленно рекомбинирует в водном объеме. Образование катион-радикалов $\text{Nab}^{\bullet+}$ и $\text{Nap}^{\bullet+}$ в присутствии бычьего сывороточного альбумина не наблюдалось. Можно предположить, что катион-радикалы взаимодействуют с аминокислотным

остатком, например с гистидином. В докладе обсуждаются возможные механизмы фотопревращений набуметона и напроксена в различных водных средах.

СУЛЬТИМОВА Н.Б.¹, ЛОБАНОВ А.В.², ЛЕВИН П.П.¹, РАЗИНА В.С.²,
КОМИССАРОВ Г.Г.², МУЗАФАРОВ А.М.³

¹*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия*

²*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук, Москва, Россия*

³*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова Российской академии наук, Москва, Россия*

ИССЛЕДОВАНИЕ ТРИПЛЕТНЫХ СОСТОЯНИЙ ФТАЛОЦИАНИНОВ НА ПОВЕРХНОСТИ НАНОКРЕМНЕЗЕМА И ГИДРОФИЛЬНЫХ ПОЛИМЕРОВ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ МЕТОДОМ ЛАЗЕРНОГО ФОТОЛИЗА

В последние десятилетия уделяется особое внимание изучению фотохимических свойств фталоцианинов в наносистемах, активно используемых в фотодинамической терапии рака. Использование наноструктурированных фталоцианинов расширило область их потенциального применения в современных технологиях, в частности при производстве искусственных светособирающих антенн, молекулярных проводов и т.д. Особый интерес вызывают быстрые фотохимические и фотофизические процессы, протекающие в наноструктурированных агрегатах с участием их электронно-возбужденных состояний. Важным фактором является сохранение фотоактивности при наноструктурировании. Исследования наноструктурированных фталоцианинов сфокусированы главным образом на разработке метода получения агрегата необходимой структуры, а не на изучении их фотохимических особенностей, которые можно активно использовать не только в фотодинамической терапии рака, но и во флуоресцентной диагностике состояния сосудистой стенки и в качестве вещества-аттрактанта при остеогенезе. Известно, что сочетание фталоцианина с носителем способствует лучшему накоплению его в опухоли.

В настоящей работе методом наносекундного лазерного фотолиза изучены кинетические характеристики промежуточных продуктов, образующиеся при фотолизе фталоцианинов цинка (ZnPc), алюминия (AlPc) и магния (MgPc) на поверхности наночастиц кремнезема (диаметр частиц 60 нм) и на поверхности гидрофильных полимеров поливинил-N-пирролидона (ПВП), полиэтиленгликоля (ПЭГ) в водных растворах.

Спектры электронного поглощения фталоцианинов цинка и алюминия на поверхности наночастиц кремнезема (диаметр 60 нм) в водных растворах указывают на образование H-агрегатов по типу «сэндвич» (полоса поглощения с максимумом при 640 нм) и двух типов J-агрегатов по типу «голова к хвосту» (полосы поглощения с максимумами 740 и 770 нм). Методом наносекундного лазерного фотолиза (длина волны возбуждения 337 нм) в обескислороженных растворах AlPc на поверхности нанокремнезема зарегистрировано образование триплетных электронно-возбужденных состояний J-агрегатов (T_J), характеризующихся широким спектром поглощения в области 400-800 нм и временем жизни 360 мкс. Выход T_J заметно ниже выхода триплетного состояния мономера в растворах. Наличие фотоактивности этих J-агрегатов в совокупности с длинноволновым поглощением в области прозрачности тканей делает эти комплексы потенциальными препаратами для фотодинамической терапии. При фотолизе ZnPc в аналогичных условиях образование каких-либо интермедиатов не обнаружено вследствие триплет-триплетной аннигиляции.

Из спектров поглощения водных растворов ZnPc, AlPc и MgPc в комплексах с ПВП и ПЭГ видно, что образуются преимущественно нефотоактивные H-агрегаты с полосой поглощения с максимумом при 620 нм. Образование J-агрегатов на полимерных носителях не наблюдалось. При фотолизе полимерных комплексов фталоцианинов образование каких-либо интермедиатов не происходило, что позволяет рассматривать данные структуры в качестве перспективных диагностирующих агентов, не обладающих фототоксичностью.

Работа выполнена при финансировании грантом Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук МК-227.2011.3, грантом РФФИ № 12-03-01081-а, программой Президиума РАН № 28, проектом МНТЦ № 3910 и Ведущей научной школой (грант № 6605.2012.3).

СУПОТНИЦКИЙ М.В.

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения»

Минздравсоцразвития России, Москва, Россия

ВИЧ/СПИД-ПАНДЕМИЯ КАК ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ ПРОБЛЕМА ЭВОЛЮЦИОННОЙ БИОЛОГИИ

Принципиальное отличие ВИЧ/СПИД-пандемии от пандемических процессов, в борьбе с которыми были достигнуты успехи в XX столетии, заключается в том, что она вызвана вирусом из семейства ретровирусов. Узкий медицинский подход к понимаю природы пандемии упускает из вида то обстоятельство, что ретровирусы представляют собой древние инструменты эволюции. Вызываемые ретровирусами эпидемии (эпизоотии) составляют основу механизма прерывистой эволюции видов, когда в их эволюции чередуются длительные периоды стабильности, во время которых основные черты вида сохраняются неизменными; и короткие периоды быстрых изменений (в геологических масштабах времени), в ходе которых вид делится на новые виды, либо «отпочковывает» их от себя, либо исчезает. Этот механизм реализуется эндогенизацией ретровирусов в геноме выжившего вида и наращиванием его генома посредством образованием новых копий ретроэлементов; усложнением генома путем образования новых экзонов из интронов и/или увеличения количества генов, подвергающихся альтернативному сплайсингу. Эволюционное прошлое иммунной системы человека свидетельствует об участии в ее создании ретровирусов. Благодаря клеткам иммунной системы происходит размножение и накопление экзогенных ретровирусов в популяциях инфицированного вида до какой-то критической массы, которая позволяет некоторым из них эндогенизироваться в зародышевой линии отдельных особей, и в дальнейшем передаваться вертикально, меняя его эволюционную траекторию.

Для инфекционного процесса, лимитируемого клеточной и гуморальной иммунной системой (натуральная оспа, грипп, корь, чума и др. контролируемые вакцинацией инфекционные болезни), характерны следующие периоды: инкубационный, продромальный, нарастания симптомов, разгара болезни, угасания клинических проявлений болезни, выздоровления (реконвалесценции) с формированием стерильного иммунитета. Их можно отнести к *циклическим инфекционным процессами*. Как правило,

они представляют собой *монопроцессы*, т. е. вызываются одним микроорганизмом. Эпидемии, вызываемые микроорганизмами, использующими такую стратегию паразитизма, также являются циклическими. Какой бы масштаб циклические эпидемии не принимали бы (например, чума «черная смерть» в 1346-1351 гг. уничтожила до четверти населения Европы), они прекращаются сами из-за формирования иммунной прослойки среди населения, угасания активности природных очагов или в результате противоэпидемических мероприятий, направленных на разрыв эпидемической цепи.

Ответы иммунной системы человека на ВИЧ эффективны, но прямо противоположны по содержанию тем, что бывают при циклических инфекционных процессах. Вызываемый ВИЧ инфекционный процесс не блокируется Т- и В-клеточной составляющей иммунной системы. Поэтому он не носит циклический характер, не предполагает периода угасания клинических проявлений болезни и выздоровления больного. Передача вируса между людьми происходит растянутым во времени, но всегда реализуемым путем — половым, без которого вид не может размножаться. Такая пандемия не имеет механизмов самоограничения и будет растянута во времени на период существования инфицированного вида.

Инфекционный процесс, вызванный ВИЧ, является многокомпонентным. По мере развития ВИЧ-инфекции фагоцитирующие клетки, утратившие контроль со стороны Т- и В-клеток, начинают играть в инфекционном процессе ту же роль «мусорщиков», которую они играли у первых многоклеточных животных, что проявляется множеством вялых инфекционных процессов, называемых СПИД-ассоциируемыми. Взаимодействие вызывающих их возбудителей между собой, с ВИЧ и с клетками иммунной системы, носит специфический характер, прослеживаемый на надклеточном, клеточном и генетическом уровнях. Чтобы понятийно отделить такие процессы от инфекционных процессов, контролируемых Т- и В-клеточной составляющей иммунной системы, целесообразно ввести термин *«многокомпонентный нециклический инфекционный процесс»*.

ВИЧ/СПИД-пандемия среди вида *Homo sapiens* — частное проявление эволюции таксона приматов. Результаты расшифровки генома человека показали, что ретровирусные пандемии сопровождали человека на протяжении всей его эволюции. Поэтому проблема ВИЧ/СПИД-пандемии не является только медицинской проблемой. Она еще представляет собой фундаментальную проблему эволюционной биологии. Нам необходимо признать

поражение ранее используемой стратегии борьбы с этой пандемией, основанной на принципах, разработанных для противодействия принципиально иным, циклическим пандемиям, и разработать стратегию борьбы с нециклическими многокомпонентными эпидемическими процессами — это уникальная и не имеющая аналогов в истории медицины задача. Какой будет новая стратегия, пока можно только обсуждать. Но опасно продолжать недооценивать и замалчивать проблему ВИЧ/СПИДа, к «миру без ВИЧ» возврата уже не будет.

СУПОТНИЦКИЙ М.В., БОНДАРЕВ В.П.

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения»

Минздравсоцразвития России, Москва, Россия

БЕЗОПАСНОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ВАКЦИН СТАВИТ НОВЫЕ ЗАДАЧИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ

В России создана вся правовая база, необходимая для проведения вакцинации населения и налажен государственный контроль качества, эффективности и безопасности вакцин. Клинические расстройства, возникающие вследствие профилактических прививок, не свойственны обычному течению вакцинального процесса, иначе бы такая вакцина не прошла даже доклинических исследований. Однако медицинские работники продолжают сталкиваться с поствакцинальными осложнениями у отдельных, внешне здоровых детей и взрослых. Их количество в России медленно растет, и попытки связать их ошибочными действиями врачей прививочных кабинетов, далеко не всегда объясняют истинные причины таких осложнений. Проведенный мониторинг публикаций о причинах поствакцинальных осложнений позволяет нам утверждать, что часть осложнений зависит от особенностей иммунной системы вакцинируемого пациента, заложенных на генетическом уровне, а не от качества самих вакцин. В отдельных группах населения накапливаются мутантные аллели, носители которых реагируют на введение вакцин патологическим образом. Например, уже опубликованы доказательства того, что, по крайней мере, часть осложнений на введение вакцины БЦЖ связаны с наличием у детей таких аллелей. В зависимости от типа наследования (рецессивного и доминантного) и

этнической группы, меняются клиника осложнения и шансы на возможность эффективной терапии. У представителей французского этноса мутация в рецепторе гамма-интерферона (IFN- γ R1) приводит к диссеминации бацилл Кальмета-Герена и летальному лептоменингиту; у японцев — к тяжелым формам остеомиелита, трудно поддающимся лечению. Развитие atopического синдрома при вакцинации BCG ассоциируется с врожденной недостаточностью функции фагоцитов, диссеминация BCG ассоциируется с аутосомально-рецессивной недостаточностью интерлейкина 12 (IL-12).

Изменился и характер эпидемических и пандемических процессов. ВИЧ-инфицированность населения привела к тому, что сегодня врач имеет дело уже не с удобными для проведения массовых вакцинаций эпидемическими монопроцессами, а с многокомпонентными процессами, со множеством неизвестных составляющих. В связи с тем, что в России не проводится обязательное тестирование населения на ВИЧ-инфекцию, и прививаемому пациенту не всегда известно о его ВИЧ-статусе, то существует риск развития посвакцинальных осложнений, связанных как с диссеминацией живого компонента вакцины, так и провоцирования развития СПИДа антигенной стимуляцией инактивированным компонентом вакцины. Затруднить формирование иммунной прослойки в детских коллективах может низкая эффективность вакцинации у детей, внутриутробно экспонированных к антиретровирусным препаратам.

При разработке вакцин и проведении массовых вакцинаций также необходимо учитывать возможность появления осложнений, связанных с феноменами антигенного импринтинга и феномена антителозависимого усиления инфекции. Суть *феномена антигенного импринтинга* состоит в том, что при повторном контакте иммунной системы с вирусом или вакциной, иммунная система может не воспринимать различия между вариантом эпитопа, с которым уже познакомилась ранее, и его новым вариантом. И тогда активизируются В-клетки памяти, «запомнившие» предыдущий антиген. Выработка антител происходит в отношении этого антигена, хотя реально иммунная система с ним не контактирует. Образующиеся антитела не способны нейтрализовать вирус, выработка же специфических антител к нему тормозится из-за подавления «наивных» В-клеток активизировавшимися В-клетками памяти. Этот феномен наблюдается при ВИЧ-инфекции, при гриппе, лихорадке Денге, лептоспирозе, малярии и энтеровирусной инфекции.

Суть феномена антителозависимого усиления инфекции состоит в том, что вирусспецифические антитела связывают вирус и посредством взаимодействия с рецепторами, расположенными на поверхности фагоцитирующих клеток усиливают его проникновение в эти клетки, а в отдельных случаях даже стимулируют его репликацию. Наблюдается при лихорадках Эбола, Марбург, Денге, гепатите С, кори, желтой лихорадке, энцефалите Западного Нила и отдельных энтеровирусов.

Вакцинация, проведенная без учета обоих феноменов, способна утяжелить эпидемический процесс или вызвать развитие эпидемии близкородственного вируса в тех районах, где одновременно циркулируют этот вирус, и тот, против которого вакцинация проводилась.

Серьезную проблему для развития технологий конструирования современных вакцин и разработки безопасных стратегий вакцинации создают устаревшие знания по иммунологии и эпидемиологии. В тоже время наличие таких проблем не дискредитирует вакцинацию как способ профилактики инфекционных болезней, а ставит новые задачи для исследовательской работы.

СУРМА С.В.¹, СТЕФАНОВ В.Е.², ЩЕГОЛЕВ Б.Ф.¹

¹*ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия*

²*СПбГУ, Биолого-почвенный факультет, Санкт-Петербург, Россия*

МАГНИТОВАКУУМНАЯ БИОЛОГИЯ

Магнитовакуумная биология как раздел магнитобиологии, связанный со сверхслабыми магнитными полями, индукция которых меньше индукции магнитного поля Земли, является новым научным направлением, ориентированным на исследование структурно-функциональных изменений в биологических объектах в условиях изменения магнитных характеристик окружающей среды. Актуальность таких исследований обусловлена требованиями космической биологии, постоянного изменения магнитного поля Земли и задачами практической медицины.

Магнитобиологические эффекты, наблюдаемые при помещении биологических объектов в условия сверхслабых магнитных полей, значительно отличаются от эффектов

действия сильных полей. В зависимости от сложности биологического объекта и времени его нахождения в сверхслабых магнитных полях наблюдаются изменения скоростей течения биохимических реакций и структуры отдельных компонентов, приводящие либо к временному повышению резистентности объекта к внешним экстремальным факторам, либо даже к его гибели. Между этими крайними состояниями располагается целый ряд промежуточных состояний, которые можно использовать для целенаправленного воздействия на требуемые элементы, например, клетки. В качестве внешних экстремальных факторов воздействия экспериментально были опробованы: температурный, радиационный и гипоксический. Однако этот ряд экстремальных факторов может быть значительно расширен.

Сверхслабые магнитные поля, обладая высокой проникающей способностью, относятся к внешним факторам прямого действия, т.е. они оказывают непосредственное воздействие на все элементы биологического объекта одновременно, следствием чего является их быстрое действие и возможность сочетания с другими внешними факторами, например, медикаментозными. Многочисленные эксперименты на биологических объектах различной степени сложности показали эффективность воздействия сверхслабых магнитных полей практически на всех иерархических уровнях, начиная от субклеточного, и заканчивая уровнем целостного организма.

Так, при выдерживании личинок разных линий дрозофилы в ослабленном геомагнитном поле ОГМП (1.6 мкТл) в течение 1 и 12 часов была показана важная роль гена LIMK1 у мутанта *agn^{ts3}* в адаптации личинок дрозофилы к воздействию ОГМП. Отмечено, что воздействие ОГМП на *agn^{ts3}* приводит к резкому изменению локомоторного поведения: возрастает двигательная активность, полностью восстанавливается изначально дефектная способность к пространственному ориентированию. Обнаружено, что нарушения синтеза кинуреновой кислоты на кинурениновом пути метаболизма триптофана у линий *cd* и *v* приводят к ненормальной реакции на кратковременное воздействие ОГМП.

На клеточном уровне было изучено влияние ОГМП (0.2 мкТл) на культуры клеток HeLa и VH-10 (1,3 часа). Оказалось что P-53 и опосредуемые им сигнальные пути активно вовлечены в адаптацию клетки. Во всех клетках наблюдалась реорганизация митохондриальной сети, которая в норме упорядочена и располагается преимущественно

вокруг ядра. Уже через час после помещения клеток в ОГМП митохондриальная сеть распадалась, образуя как одиночные скопления, так и крупные нерегулярные конгломераты в цитоплазме клетки. Количество клеток с такой реорганизованной сетью росло с увеличением времени экспозиции.

При исследовании эффектов воздействия ОГМП (0,3 мкТл) на пролиферацию и дифференцировку скелетных мышечных клеток в культуре были зарегистрированы нарушения в процессах прикрепления и пролиферации, а затем и дифференцировки миоцитов, а также незначительная гибель клеток в более поздние сроки. Полученные результаты важны для прогнозирования осложнений при регенерации скелетных мышц в условиях ОГМП (космические полеты).

Изучение воздействия ОГМП (2 мкТл) на развитие колоний микромицетов *Neurospora crassa* показало задержку спороношения (4-6 суток) по сравнению с контролем, а также определенные морфологические изменения клеток грибов за счет увеличения их средней длины и уменьшению поперечного сечения, что связано с нарушением функционирования элементов цитоскелета.

Таким образом, магнитовакуумная биология может рассматриваться, с одной стороны, как основа для исследований о влиянии магнитных полей на зарождение и эволюцию жизни на Земле, а с другой – как основа для практической неинвазивной медицины, более быстродействующей и менее затратной, чем классическая.

СУХОВ И.Б., ЧИСТЯКОВА О.В., ШИПИЛОВ В.Н., БОНДАРЕВА В.М., ШПАКОВ А.О.

ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова

Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

ИНСУЛИН И СЕРОТОНИН ПРИ ИНТРАНАЗАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ УСТРАНЯЮТ ДЕФИЦИТ ДОЛГОВРЕМЕННОЙ ПАМЯТИ У КРЫС С НЕОНАТАЛЬНЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

Нарушения в инсулиновой сигнальной системе мозга, возникающие при сахарном диабете (СД) 2-го типа, приводят к нейродегенеративным заболеваниям, следствием чего является когнитивный дефицит. Механизмы развития когнитивного дефицита при СД 2-го

типа и влияние на него гормональной терапии остаются мало изученными. Цель работы состояла в изучении влияния интраназально введенных инсулина и серотонина на формирование и сохранение пространственной памяти у крыс с неонатальным СД 2-го типа, для чего использовали водный тест Морриса, позволяющий быстро провести обучение животных, оценить формирование и консолидацию у них пространственной памяти. Интраназальное введение инсулина (ежедневно, 0.48 IU на крысу) или серотонина (ежедневно, 20 мкг на крысу) начинали за неделю до обучения и продолжали в процессе тестирования. Для проверки формирования пространственной памяти тестирование повторяли на протяжении пяти дней (первая серия) и через месяц оценивали консолидацию пространственной памяти (вторая серия). Диабетические животные в первой серии затрачивали на поиск платформы в два раза больше времени, чем контрольные крысы. Во второй серии латентный период и динамика снижения его продолжительности у диабетических крыс были в 3–4 раза ниже, чем в контроле, что указывает на ухудшение показателей пространственной памяти у крыс с СД 2-го типа. Интраназальное введение инсулина диабетическим крысам в три раза сокращало латентный период. Это указывает на то, что интраназальный инсулин в значительной степени улучшает показатели долговременной памяти у диабетических крыс и приближает их к таковым у здоровых животных. Интраназальное введение серотонина также позитивно влияло на продолжительность и динамику латентного периода у диабетических крыс. Так на первый день второй серии продолжительность латентного периода у диабетических крыс, обработанных интраназальным серотонином, снижалась в четыре раза в сравнении с диабетическими животными, не подвергнутыми такой обработке. Таким образом, интраназальные инсулин и серотонин восстанавливают функции инсулиновой и серотонинергической систем мозга в условиях экспериментального СД 2-го типа, что приводит к улучшению способности к обучению и пространственной памяти у диабетических животных. Полученные нами данные указывают на перспективность интраназального способа введения инсулина и серотонина для терапии осложнений ЦНС, вызываемых СД 2-го типа.

Работа поддержана РФФИ (проект № 12-04-00434).

ОСОБЕННОСТИ ПРОВОДИМОСТИ СЕРДЦА ПРИ РЕАЛИЗАЦИИ НЫРЯТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ У ЧЕЛОВЕКА

Исследования генотипических адаптаций к полуводному образу жизни ныряющих млекопитающих выявили комплекс сердечно-сосудистых реакций, обеспечивающих при нырянии переход организма на более экономный уровень потребления кислорода. Изучение нырательной реакции у человека показало, что в процессе эволюции сформирована единая стратегия толерантности к дефициту кислорода у ныряющих млекопитающих и человека (Галанцев и др., 1990–2000, Баранова и др., 1993-2007). При погружении в воду развивается рефлекторная брадикардия, замедляется кровоток, сужаются сосуды на периферии, происходит селективное перераспределение крови к наиболее уязвимым к недостатку кислорода органам – мозгу и сердцу. В отличие от животных, у человека эффект кислородосбережения в значительной степени обусловлен реактивностью вегетативной нервной системы. Показано, что возможно четыре типа изменений хронотропной функции сердца при нырянии. Рефлекторная брадикардия может развиваться сразу при погружении, при этом она хорошо выражена – высокореактивный тип. У представителей реактивного типа замедление ЧСС происходит постепенно, латентный период брадикардии составляет 9 с. У 15% испытуемых рефлекторная брадикардия не развивается – ареактивный тип. У 5% - наблюдается повышение ЧСС при погружении – парадоксальный тип.

На основе феномена нырательной реакции разработана оздоровительная адаптационная технология холодо-гипокси-гиперкапнического воздействия - ХГВ (Патенты РФ № 2286128 от 2006г., № 2281745 от 2006 г.), которая дает возможность активировать механизмы защиты организма от гипоксии, оптимизировать мозговой кровоток и вегетативный баланс организма. Однако можно предположить, что усиление парасимпатических влияний на синусовый узел при ХГВ может вызвать чрезмерное замедление проведения возбуждения во время систолы и привести к остановке сердца. В связи с этим цель нашего исследования заключалась в том, чтобы определить, как

изменяется проводимость сердца при различном характере развития рефлекторной брадикардии во время реализации нырательной реакции у человека.

Обследовано 30 человек (18-26 лет), без патологий сердечно-сосудистой системы. Нырательная реакция вызывалась способом ХГВ. Модель разработана в лаборатории системных адаптаций каф. Общей физиологии СПбГУ (Патент РФ № 2161476 от 2001). В исходном состоянии, при ХГВ и во время восстановления регистрировалась ЭЭГ (стандартные и грудные отведения). Определялся тип нырательной реакции испытуемых. Анализировалась длительность P-Q, Q-T и T-P-интервалов.

Исследования показали: при ХГВ у высокореактивного типа происходит статистически значимое замедление сердечного ритма. Длительность кардиоинтервала (КИ) в исходном состоянии - $954 \pm 96,5$ мс, при ХГВ КИ - $1237 \pm 132,1$ мс, при восстановлении $1025 \pm 97,6$ мс ($p < 0,01$). P-Q интервал существенно не изменялся: в исходном состоянии - $162 \pm 14,6$ мс, при ХГВ - $166 \pm 24,6$ мс, при восстановлении $164 \pm 15,6$ мс. Интервал Q-T при ХГВ также существенно не менялся: в исходном состоянии - $361 \pm 15,5$ мс, при ХГВ - $370 \pm 21,5$ мс, при восстановлении - $368 \pm 12,6$ мс. При этом статистически значимо увеличивался T-P интервал ($p < 0,01$): в исходном состоянии - $431 \pm 91,9$ мс, при ХГВ - $701 \pm 113,9$ мс, при восстановлении - $492 \pm 107,6$ мс. У испытуемых реактивного типа КИ статистически значимо увеличивался ($p < 0,01$): в исходном состоянии - $1069 \pm 65,7$, при ХГВ - $1283 \pm 181,5$ мс, при восстановлении $1143 \pm 98,4$ мс. Увеличение P-Q интервала статистически не достоверно: в исходном состоянии - $164 \pm 10,8$ мс, при ХГВ - $180 \pm 16,7$ мс, при восстановлении $186 \pm 10,5$ мс. Интервал Q-T при ХГВ увеличивался, но при этом не выходил за пределы нормы. В исходном состоянии - $382 \pm 11,2$ мс, при ХГВ - $392 \pm 7,2$ мс, при восстановлении - $376 \pm 11,0$ мс. При этом статистически значимо увеличивался T-P интервал ($p < 0,01$): в исходном состоянии - $522 \pm 79,0$ мс, при ХГВ - $710 \pm 168,7$ мс, при восстановлении - $581 \pm 104,6$ мс. У парадоксального типа наблюдалось уменьшение длительности КИ при ХГВ относительно исходного состояния (на 10-12%), но интервалы, характеризующие систолу, существенно не изменялись. У ареактивного типа увеличение КИ наблюдалось по завершении ХГВ. При этом удлинение интервалов, характеризующих электрическую систолу, не выходило за пределы нормы.

Таким образом, полученные нами результаты показали, что замедление сердечного ритма при ХГВ происходит за счет длительности диастолы, длительность электрической

систола предсердий и желудочков при этом замедляется незначительно и остается в пределах нормы.

ТАРАСКЕВИЧ М.Р., КУДРЯШОВ В.К., РЕДИКУЛЬЦЕВ Ю.В.,
ГОЛИЧЕНКОВ В.С., ЗИНОВЬЕВ М.А., БЕЗРУЧКО В.В., СИЗОВ А.Н.,
УГРАИЦКИЙ А.А., ШЕВЕЛЕВ Д.А., ШИРШИКОВ Н.В., ЧЕРЕМУХИН В.В.
*ФГБУН Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН,
Пушино, Россия*

**ЭНЕРГОЭФФЕКТИВНОЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОРУДОВАНИЕ
НА ОСНОВЕ БИОРЕАКТОРОВ СО СТЕКАЮЩИМИ ПЛЕНКАМИ
ДЛЯ ЖИДКОФАЗНЫХ И СОВМЕЩЕННЫХ ПРОЦЕССОВ
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ**

В работе проводится анализ современного состояния разработки, производства биотехнологического оборудования и роли такого оборудования для становления в России биоэкономики. Большинство созданных в СССР предприятий биотехнологической отрасли в новых экономических условиях оказались неконкурентоспособны, в первую очередь, из-за больших затрат энергоресурсов, высокой себестоимости продукции и экологических факторов. Для создания новых эффективных биотехнологий и биотехнологических производств пищевых, фармацевтических, химических продуктов требуется современное биотехнологическое оборудование. Создание только научных основ новых биотехнологических процессов без проверки технологии на пилотном уровне, как правило, недостаточно для принятия бизнесом решения об инвестициях в промышленную реализацию проектов и поэтому научный результат «кладется на полку», либо продается за рубеж. Но продукт, производимый на старой технологической базе, чаще всего является дженериком, и сделать его на рынке, где присутствуют фирмы Китая, Индии конкурентоспособным, практически невозможно.

Поэтому инновационный конкурентоспособный продукт может базироваться только на инновационной технологической базе. К сожалению, РФ в настоящее время не сохранились, за исключением Пушкинской площадки, научно-технические и

производственные возможности для разработки и производства биотехнологического оборудования. Осознание необходимости разработки отечественных инфраструктурных аппаратных и программных средств для реализации новых биотехнологических процессов, в первую очередь, лабораторного и пилотного уровней является необходимым условием создания в России новой конкурентоспособной биотехнологии и биоэкономики в целом. Строить развитие биоэкономики накупаемых по импорту научно-технических и технологических решениях биотехнологических производств, на поставках импортного базового биотехнологического оборудования значит обрекать отрасль на роль догоняющего и всегда отстающего от передовых технологических решений, которая по определению не может быть конкурентоспособной. В ИБП РАН разработаны новые поколения биотехнологического оборудования с расширенными функциональными возможностями. Комплекты имеют в своем составе средства стерилизации оборудования и питательных сред (парогенератор, стерилизатор растворов, стерилизатор газов, автоклав), причем операции стерилизации выполняются в автоматических режимах, имеется возможность менять параметры процессов в интерактивном режиме. Биореакторные модули также осуществляют процессы в автоматическом режиме, как периодического, так и непрерывного (отъемно-доливного) типа. Используемые в настоящее время традиционные схемы построения биореакторов не позволяют избегать ингибирующих механических воздействий на культуры и проводить эффективные процессы при использовании нерастворимых в воде субстратов, так как не решены вопросы обеспечения массо- и теплообмена. В ИБП РАН ведутся разработки базового биотехнологического оборудования, в которых используются новые методы активизации массообмена. Исследования показали, что стекающие пленки – наиболее эффективной способ обеспечения массообмена при минимальных механических ингибирующих воздействиях на культуры клеток, при этом не используется механическое перемешивание. Для увеличения площади стекающих пленок и соответственно площади контакта газ-жидкость в биореакторной емкости можно использовать носитель или твердый субстрат. Так реализуется жидкофазное и совмещенное (жидкофазное – твердофазное) культивирование микроорганизмов, культивирование микроорганизмов в пленке на носителе, в качестве продуцентов могут использоваться мицелиальные формы грибов, бактерии, дрожжевые культуры. При создании новых и модернизации действующих

биотехнологических производств предлагается использовать технические и технологические решения, повышающие энергоэффективность биотехнологических процессов и производств биотехнологических продуктов, в первую очередь, за счет построения энергосберегающих систем аэрации биотехнологических процессов с рекуперацией и кондиционированием тепловой энергии воздушных потоков. Повышение энергоэффективности биотехнологических производств обеспечит им новое, конкурентоспособное качество, так как доля энергозатрат на подготовку азирующего воздуха и его кондиционирование является существенной в общих энергозатратах и в лабораторных, и в пилотных, и в промышленных системах. Энергоэффективность биотехнологического оборудования и процессов в значительной степени зависит от инфраструктуры производственных помещений и поэтому представляет собой сложную в общем случае междисциплинарную задачу оптимального управления производственным объектом, включающим подсистему с живым объектом. Разработка автоматизированных систем управления объектами, включающими технические средства и сложно организованные живые объекты, потребовало привлечения современных средств проектирования (SCADA-системы) с адаптацией, учитывающей особенности объекта.

ТАРЛАЧКОВ С.В.¹, ДЬЯЧЕНКО О.В.¹, МАРИНИЧ Д.В.²,

РУДЕНКО Н.В.¹, ШЕВЧУК Т.В.¹, БУРЬЯНОВ Я.И.¹

¹*Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино, Россия*

²*Республиканский научно-практический центр гематологии и трансфузиологии Минздрава Республики Беларусь, Минск, Беларусь*

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ РАКА

Метилирование ДНК играет важную роль в регуляции различных процессов у эукариот, в том числе в регуляции генетической экспрессии, клеточной дифференцировке и морфогенезе, эпигенетическом контроле геномного импринтинга и инактивации мобильных генетических элементов. Нарушение нормальной картины метилирования

ДНК сопровождает канцерогенез и различные эпигенетические заболевания человека. В настоящее время в химиотерапии онкологических заболеваний широко применяется деметилирование генов-супрессоров опухолей с использованием 5-азацитидина. В то же время практически не реализован альтернативный путь — направленное метилирование онкогенов. Предлагаемый нами подход позволит реализовать этот новый путь в терапии онкологических заболеваний.

С этой целью получена генетическая конструкция, содержащая ген бактериальной ДНК-метилтрансферазы M.HhaI, слитый с геном зеленого флуоресцентного белка (GFP), и модифицированная добавлением последовательностей сигнала ядерной локализации и сигнала транспорта через клеточную мембрану (TAT-NLS-M.HhaI-GFP). Кодируемый этой конструкцией белок был выделен из клеток *E. coli*. Показано полное сохранение ДНК-метилтрансферазной активности белка и подтверждена его способность проникать в цитоплазму культивируемых клеток человека *in vitro*.

В настоящий момент ведутся работы по подбору наиболее эффективного сигнала ядерной локализации. Используемая нами ДНК-метилтрансфераза M.HhaI будет осуществлять метилирование цитозина в CpG-динуклеотидах в последовательностях GCGC клеточного генома. Для направленного выключения онкогенов в дальнейшем планируется модифицировать данную конструкцию с сигналом ядерной локализации доменом, специфически связывающимся промотором целевого онкогена. На основе полученного белка возможно создание препарата предназначенного для направленного метилирования генома эукариот.

ТАРТАКОВСКАЯ Д.И.

ФГБУ «НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздравсоцразвития России, Москва, Россия

ДРОЖЖЕВАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ТОКСИНА LGT1 *L. PNEUMOPHILA* И МЕХАНИЗМОВ ТРАНСЛЯЦИИ ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ КЛЕТКИ

Legionella pneumophila – патогенная грамотрицательная бактерия, способная размножаться в фагоцитах, вызывая острую пневмонию. Микроорганизм адаптирует внутреннюю среду эукариотической клетки для своей жизнедеятельности путем синтеза

многочисленных бактериальных токсических белков – эффекторов. Среди наиболее хорошо изученных эффекторов легионелл является глюкозилтрансфераза Lgt1. Этот фермент модифицирует эукариотический фактор элонгации 1A (eEF1A), что приводит в остановке белкового синтеза и гибели эукариотической клетки. К настоящему времени точный механизм остановки белкового синтеза при модификации субстрата глюкозилтрансферазой Lgt1 неясен.

Для решения этой проблемы необходима надежная и удобная генетическая система. Одной из них является дрожжевая модель, которая успешно используется в мире для изучения молекулярных механизмов действия факторов вирулентности, продуцируемых патогенными микроорганизмами. Мишенями эффекторных белков часто становятся различные эукариотические клеточные процессы и вещества, которые достаточно консервативны у дрожжей и клеток млекопитающих. Например, фактор элонгации 1A у млекопитающих более чем на 80% идентичен аминокислотной последовательности дрожжевых аналогов – факторов элонгации Tef1 и Tef2. Эти данные позволили нам использовать дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* как перспективную живую модель для изучения последствий действия глюкозилтрансферазы легионелл на клетки эукариот.

Глюкозилтрансфераза Lgt1 модифицирует eEF1A по аминокислотному остатку серин в положении 53 (S⁵³). Необходимым и достаточным субстратом для данного фермента служит последовательность из 10 аминокислотных остатков (G⁵⁰KGSFKYAWV⁵⁹), причем Lgt1 глюкозилирует данный декапептид с большей эффективностью, нежели полноразмерный белок eEF1A. Эти данные указывают на то, что фрагмент фактора элонгации, эволюционно выбранный ферментом Lgt1 в качестве субстрата, может нести особо важные функции в процессах жизнедеятельности эукариотической клетки. В связи с этим мы провели специальные исследования, направленные на изучение роли обнаруженного декапептида в метаболизме *S. cerevisiae*.

Для этого нами были сконструированы штаммы дрожжей, содержащие только мутантные копии фактора элонгации Tef1. При изучении этих штаммов, содержащих точечные мутации в районе декапептида, было обнаружено, что замена ароматических остатков F⁵⁴, Y⁵⁶ и W⁵⁸ на аланин приводила к получению нежизнеспособных клеток дрожжей. В свою очередь, замена аминокислотных остатков G⁵⁰, K⁵⁵ или V⁵⁹ не приводила к заметному изменению фенотипа *S. cerevisiae*. Интересно, что в предыдущих

экспериментах мы показали, что идентичные ароматические остатки необходимы для субстратной активности фактора элонгации в глюкозилтрансферазной реакции. Таким образом, полученные данные служили экспериментальным подтверждением критически-важной роли, которую играет изучаемый фрагмент eEF1A в метаболизме эукариотической клетки.

Замены в факторе элонгации 1A аминокислотного остатка серин-53, который является мишенью для Lgt1, на аланин, цистеин, или лизин не влияли на фенотип генетически-сконструированных дрожжей. Тем не менее, замена серина-53 на глутаминовую кислоту приводила к нефункциональному Tef1 и гибели клеток *S. cerevisiae*. Из литературных данных известно, что замена остатка серина на отрицательно заряженный остаток глутаминовой кислоты представляет собой так называемое «псевдофосфорилирование», поскольку функционально имитирует присоединение фосфатной группы к белку-мишени. Таким образом, наши данные позволяют предположить, что модификация остатка серина-53 eEF1A протеинкиназами эукариотической клетки может служить новым регуляторным механизмом и приводить к остановке синтеза белка.

Проведенная серия экспериментов позволила разработать эффективную модель с использованием *S. cerevisiae* для изучения молекулярных механизмов интоксикации токсическим белком легионелл. Анализ полученных нами данных показывает, что мало изученная область, узнаваемая Lgt1, играет ключевую роль в функциональной активности фактора элонгации 1A.

ТАТАРКИН И.В., ДЕМИН Д. В., СЕВОСТЬЯНОВ С.М.

Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пуцино, Россия

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ И СПОСОБОВ УТИЛИЗАЦИИ ОСАДКОВ СТОЧНЫХ ВОД, АДАПТИРОВАННЫХ К РЕАЛЬНЫМ УСЛОВИЯМ МОСКОВСКОЙ И АСТРАХАНСКОЙ ОБЛАСТЕЙ

Основными источниками загрязнения почв ТМ являются металлургическая промышленность, транспорт и коммунальные отходы. Одним из таких источников являются осадки сточных вод (ОСВ) городских очистных сооружений.

Большие объемы ОСВ городской канализации - проблема многих городов. Они часто загрязнены ТМ и содержат патогенные микроорганизмы. Их утилизация наиболее оправданным способом - в качестве органического удобрения - может привести к загрязнению почв, поверхностных и грунтовых вод, растительной продукции. Утилизация другими способами сопряжена с рядом экономических и технологических трудностей, а складирование ОСВ на территориях очистных сооружений создает серьезную угрозу для окружающей среды.

В связи с этим особенно остро стоит проблема поиск новых методов обработки ОСВ, позволяющих снизить токсичность и подвижность ТМ при применении ОСВ в качестве органического удобрения.

Известно, что попадая в почву, ТМ вступают во взаимодействие, с органическим веществом почвы образуя сложные комплексные соединения - хелаты. При этом тяжелые металлы становятся менее доступными для поглощения растениями. Простые органические соединения, например некоторые аминокислоты, присутствующие в почвах в естественном состоянии, являются активными хелатообразующими агентами для микроэлементов. Кроме того попадая в организм человека и животных металлы в токсичных концентрациях связываются, инактивируются и выводятся различными агентами белковой природы. Исходя из данных предпосылок, в Институте фундаментальных проблем биологии РАН была разработана технология переработки осадков городских очистных сооружений в органическое удобрение, путем их обезвреживания и обеззараживания специальными реагентами на аминокислотной основе с их последующим компостированием.

При обработке ОСВ реагентами происходит уничтожение патогенной микрофлоры, ионы ТМ связываются в устойчивые и не токсичные аминокислотные комплексы, необратимо ингибируются токсины, продукты взаимодействий химически стабильны. Компосты, получаемые по данной технологии могут быть использованы в качестве почвоулучшающей добавки и органического удобрения. Оценка токсичности ОСВ (с очистных сооружений г. Астрахани и г. Серпухова) загрязненных ТМ, предварительно обработанных аминокислотными реагентами и компостов на их основе, на проростках салатной горчицы и кресс-салата показала, что после обработки реагентами, количество проросших семян в вариантах контроля и компостах, различается незначительно - в

пределах 10%. Это свидетельствует об отсутствии ингибирующего действия данных субстратов. В вариантах с ОСВ количество проростков меньше на 30%, чем в контроле и остальных вариантах, что соответствует средней степени фитотоксичности необработанных осадков. Таким образом, компосты не оказывают фитотоксического эффекта, в отличие от ОСВ.

У проростков, в вариантах с компостом, кроме того, отсутствовал явный токсичный эффект в виде отставания в росте от растений контроля, а также хлороза и некроза листьев. Это свидетельствует о том, что в процессе компостирования, под воздействием микроорганизмов, разрушения комплексов тяжелых металлов и высвобождения их ионных форм в концентрациях, способных оказать токсическое действие, не произошло.

ТАТИКОЛОВ А.С.¹, АКИМКИН Т.М.¹, ПРОНКИН П.Г.¹, ПАНОВА И.Г.²,
ШВЕДОВА Л.А.¹, ИЩЕНКО А.А.³, ЯРМОЛЮК С.М.⁴

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

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

³Институт органической химии НАН Украины, Киев, Украина

⁴Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, Украина

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЦИАНИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ В КАЧЕСТВЕ ЗОНДОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОМАКРОМОЛЕКУЛ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

Биологические объекты содержат в своем составе большое разнообразие биомакромолекул. Это белки, нуклеиновые кислоты и некоторые другие соединения. Поиск простых и удобных методов исследования биологических систем, в частности, использование красителей-зондов, является важным для экспериментальных и диагностических целей. Такими зондами могут служить цианиновые красители (ЦК). Наличие в их структуре гибкой полиметиновой цепочки, колебания и вращения в которой рассеивают энергию возбуждения, а также способность красителей к образованию агрегатов различного типа в зависимости от условий, приводит к сильной зависимости их спектрально-флуоресцентных свойств от молекулярного окружения и дает возможность использования некоторых ЦК в качестве зондов для биомолекул. Ряд ЦК используются

как зонды для ДНК и других нуклеиновых кислот, но ощущается недостаток зондов для прочих биомакромолекул. Нами разработано несколько эффективных спектрально-флуоресцентных зондов на основе ЦК для сывороточных альбуминов, коллагенов, гиалуроновой кислоты, хондроитин-сульфата. В частности, один из ЦК, пиридиниевая соль 3,3'-ди-(γ -сульфопропил)-4,5,4',5'-добензо-9-этилтиакарбоцианин-бетаина (ДЭЦ) является специфичным для сывороточного альбумина человека. Большой длинноволновый сдвиг спектра поглощения (сдвиг максимума от 535 до 612 нм) и резкий рост флуоресценции (квантовый выход флуоресценции возрастает от ~ 0 до 0.57) делает краситель ДЭЦ очень хорошим спектрально-флуоресцентным зондом для данного белка. Этот же краситель взаимодействует и с коллагенами – образует на их молекулах J-агрегаты, имеющие еще более длинноволновый спектр поглощения (с максимумом около 650 нм) и флуоресценцию. Измерение ширины полосы поглощения J-агрегатов позволяет оценить тип коллагена, присутствующего в системе. ДЭЦ был успешно использован нами для количественного определения альбумина и обнаружения коллагенов в различных биологических системах, в частности, в стекловидном теле глаза плодов человека. Но с сывороточными альбуминами других позвоночных ДЭЦ реагирует гораздо слабее, причем с более сложным механизмом взаимодействия, что не позволяет использовать его в качестве зонда для этих альбуминов.

Известно, что некоторые скварилиевые красители (которые можно рассматривать как цианиновые красители, в полиметиновую цепочку которых внедрен скварилиевый цикл) перспективны в качестве зондов для биологических систем. Наши исследования показали, что индолиевый скварилиевый краситель, имеющий в своей структуре сульфогруппы для повышения растворимости в воде и придания молекуле отрицательного заряда, эффективно взаимодействует с сывороточными альбуминами не только человека, но и других животных (быка, крысы, кролика и др.) с резким ростом флуоресценции и может быть использован в качестве зонда для их определения в биологических системах. Данный краситель был применен нами, в частности, при анализе стекловидного тела глаза крысы, цыпленка и лягушки.

Мы также показали, что цианиновый краситель 3,3',9-триметилтиакарбоцианин-иодид (Суап 2) образует на молекулах гиалуроновой кислоты (ГК) H-агрегаты (тримеры), имеющие спектр поглощения с максимумом около 445 нм, в то время как исходный

краситель имеет полосу с максимумом 535 нм (агрегаты не флуоресцируют). Было изучено влияние рН среды и изменения структуры красителя на его агрегацию на ГК. Поскольку агрегаты Суан 2 начинают образовываться уже при малой концентрации ГК (порядка 5×10^{-7} моль/л), данный краситель предложен нами в качестве спектрального зонда для ГК и был успешно использован для обнаружения ГК и оценки ее концентрации в стекловидном теле глаза цыпленка. Кроме того, Суан 2 эффективно взаимодействует и с другим гликозаминогликаном – хондроитин-сульфатом. В отличие от ГК, краситель связывается с биополимером в мономерной форме с резким ростом флуоресценции, что может быть использовано для детектирования хондроитин-сульфата в биологических системах.

Таким образом, цианиновые красители являются перспективными для разработки на их основе эффективных спектрально-флуоресцентных зондов для обнаружения различных биомакромолекул.

Авторы выражают благодарность проф. Б.И. Шапиро за предоставление цианинового красителя ДЭЦ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 10-03-00647а).

ТЕПЛЯКОВА Т.В., КОСОГОВА Т.А.

Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

ОСОБЕННОСТИ ОТБОРА В КУЛЬТУРУ ЭФФЕКТИВНЫХ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ ШТАММОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ГРИБОВ ИЗ МЕСТООБИТАНИЙ ЮГА ЗАПАДНОЙ СИБИРИ

Впервые из природных местообитаний юга Западной Сибири выделены в культуру 85 штаммов (изолятов) из 45 видов и 35 родов базидиальных грибов, что открывает перспективы пополнения коллекций активными продуцентами для создания новых лечебно-профилактических препаратов.

Проведен первичный скрининг водных экстрактов грибов, выращенных на питательных средах, в соответствующих подразделениях Вектора на противовирусную активность. Определены 14 кандидатных видов грибов, проявляющих высокий эффект в

отношении вирусов, патогенных для человека: гриппа, герпеса, лихорадки Западного Нила, иммунодефицита, осповакцины, натуральной оспы, оспы обезьян. В отношении всех вирусов были эффективны экстракты из чаги (*Inonotus obliquus*). Другие виды: *Daedaleopsis confragosa*, *Fomes fomentarius*, *Ganoderma applanatum*, *Inonotus obliquus*, *Ischnoderma benzoinum*, *Laetiporus sulphureus*, *Laricifomes officinalis*, *Lycoperdon perlatum*, *Lycoperdon umbrinum*, *Phallus impudicus*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius*, *Trametes gibbosa*, *Trametes versicolor* проявляли противовирусную активность в отношении 2-6 вышеназванных вирусов.

При выделении базидиомицетов в культуру и последующих пересевах особое внимание уделялось микроскопическому контролю на присутствие в колониях базидиомицетов микофильных грибов. Недооценка данного явления привела к тому, что практически все штаммы съедобных грибов, отобранные в 50-70-е годы XX века для промышленного культивирования, оказались несовершенными гифомицетами (Бухало А.С., 1988). О постоянном присутствии микофильных грибов в культурах, выделяемых из дикорастущих грибов, свидетельствуют и наши исследования. У 18 видов в колониях на более поздних стадиях их развития (от 2-х недель и более) с помощью микроскопических исследований были обнаружены микофильные грибы.

Нами установлено, что микофильные грибы могут присутствовать в культурах многих съедобных и лекарственных грибов длительное время в форме мицелия (гифа паразита в гифе базидиомицета). Присутствие микофила в пересеваемых колониях долгое время может не проявляться, данное явление можно обнаружить путем исследования образцов из разных частей колонии под микроскопом. При определенных условиях преимущественное развитие может получить на питательных средах гриб-микофил. Даже специалисту-микологу, не знакомому с особенностями жизнедеятельности микофильных грибов, не всегда будет понятна причина массового размножения другого гриба, а не базидиомицета.

Наиболее часто встречался микофильный гриб с тонкими гифами, на протяжении которых имелись утолщения, которые, по-видимому, играли роль в осуществлении контакта с гифами гриба-хозяина для извлечения питательных веществ. Присутствие микофила в старых колониях хорошо выявлялось на фоне появления пустых гиф гриба-хозяина. По-видимому, этот микофил широко распространен в природе и не имеет узкой

специализации. Ранее он отмечался нами в колониях стереумовых грибов, полученных из рассевов высотных проб воздуха (Сафатов А.С., Теплякова Т.В. и др., 2009). Из микофильных грибов, имеющих спороношение, нами отмечены грибы из родов *Fusarium*, *Trichoderma*. Очень важно наблюдать за мицелием колоний длительное время. Одним из способов очистки от микофила на плотных средах можно считать отсев мицелия с периферии колонии на новые чашки.

У чаги (*Inonotus obliquus*) в культуре встретились своеобразные, очень разветвленные веточки мицелия, при этом мицелий хозяина не имел пустых гиф. Возможно, это гриб-симбионт, входящий в ассоциацию с грибом-хозяином. По данным Рудакова О.Л. (1981) в таких сложных колониях могут присутствовать и бактерии. Поддержание в культуре таких симбиотических культур и использование их в биотехнологических разработках требует более детального их изучения. Это даст возможность управлять биотехнологическими процессами ассоциации продуцентов биологически активных соединений, которые находятся в симбиотических отношениях.

Результаты исследований свидетельствуют о перспективности отбора эффективных штаммов базидиальных грибов с противовирусными свойствами из лесных местообитаний Сибири, а также необходимости дальнейшего изучения микофильных грибов.

ТЕРТЫШНАЯ Ю.В.¹, ПАНТЮХОВ П.В.², ШИБРЯЕВА Л.С.¹, ПОПОВ А.А.²

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

²Российский экономический университет им.Г.В.Плеханова, Москва, Россия

ИССЛЕДОВАНИЕ ТОНКИХ ПЛЕНОК

НА ОСНОВЕ БИОПОЛИМЕРА – ПОЛИ-3-ГИДРОКСИБУТИРАТА

Поли-3-гидроксибутират – биополимер, который является продуктом микробиологического синтеза и выделяется из биомассы бактерий различных штаммов. Его называют «зеленым» полимером, поскольку ПГБ абсолютно нетоксичен: разлагается на CO₂ и воду, совместим с организмом человека, способен к биodeградации. По данным из разных источников ПГБ полностью деградирует в почве в течение 4-6 месяцев.

Благодаря своим свойствам, ПГБ часто используется для получения биоразлагаемых композиционных материалов, с прогнозируемым сроком службы.

В работе исследовали тонкие пленки на основе крупнотоннажного промышленного полимера полиэтилена низкой плотности (ПЭНП) и ПГБ различного состава, содержание ПГБ составило от 2 до 32 мас.%. Определено, что при окислении композиций ПГБ деструктурирует, образуя низкомолекулярные радикалы, и инициирует окисление ПЭ. Методом ИК – спектроскопии определена величина оптической плотности полосы 1728 см^{-1} (колебания карбонильных групп) и получена зависимость накопления карбонильных групп от времени термоокисления: с глубиной окисления и повышения содержания ПГБ в смеси количество карбониллов возрастает.

С помощью оптической микроскопии определены параметра трещин после климатического воздействия при $T = 30 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ и заражения почвенными грибами (*Aspergillus Niger*, *Aspergillus flavous*, *Penicillium Chrysogenum*, *Trichoderma Viride*). Показано, что величина трещин прямопропорциональна содержанию ПГБ, наибольший размер трещин наблюдается для образцов с 16 и 32 мас.% ПГБ. Оценка грибостойкости показала такую же зависимость, поскольку ПГБ – превосходная питательная среда для микроорганизмов. Наличие поверхностных трещин способствует проникновению внутрь спор грибов и бактерий почвы, которые развиваются, благодаря ПГБ, и ускоряют распад ПЭ матрицы.

ТИМОШЕНКО Т.Е.

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

ИЗМЕНЕНИЕ ОБЪЕМА И ФОРМЫ ЖИВЫХ ЭРИТРОЦИТОВ КРЫС ПОД ВЛИЯНИЕМ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Наше исследование направлено на изучение молекулярных механизмов стимулирующего действия низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ) видимого спектра на микроциркуляцию крови. Известно, что НИЛИ влияет на деформируемость эритроцитов – ключевой параметр, определяющий массоперенос между кровью и тканями в процессе микроциркуляции. С использованием MDC гемоанализатора в опытах по

облучению диодным лазером крови крыс линии Вистар *in vitro* в термостатированной кювете при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ было показано, что видимый красный свет ($\lambda = 650$ нм, плотность мощности 15 мВт/см^2 , экспозиция 15 мин) вызывает увеличение среднего клеточного объема эритроцитов (MCV) – от $49,5 \pm 3,2$ фл в контроле до $52,0 \pm 4,1$ фл после облучения. Кроме того, было показано, что эффект увеличения MCV эритроцитов после облучения связан с дополнительным поступлением в клетки воды и более выражен для деоксигенированной крови по сравнению с оксигенированной – MCV в среднем увеличивался на 6,2 % и 4,3 % соответственно. (Тимошенко, Дворецкий. Рос. физиол. журн. им И.М.Сеченова, 96, № 10, 2010).

В ходе дальнейших исследований с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM 710 (Carl Zeiss) изучали свежеприготовленные препараты живых эритроцитов крыс. Суспензию эритроцитов разводили изотоническим физиологическим раствором на фосфатном буфере в отношении 1:10. Микросъемку препаратов проводили в термостатированной камере микроскопа LSM-710 при постоянной температуре 37°C . Время анализа каждой пробы крови ограничивалось $30 \pm$ мин, в течение которых сохранялись признаки активной жизнедеятельности эритроцитов. Это выражалось в непрерывных колебаниях жидкости, непосредственно вокруг каждой отдельной клетки, очевидно вызванных известными флуктуациями плазматических мембран эритроцитов. Затем начинался процесс слипания клеток в конгломераты. В результате этих исследований было продемонстрировано, что при вышеупомянутых условиях облучения НИЛИ вызывает восстановление нормальной дискоидной формы у некоторой части эритроцитов с выростами – эхиноцитов, и увеличение их диаметра. Обязательным условием в этих опытах являлось сохранение подвижности эритроцитов. При прочих равных условиях облучение крови при комнатной температуре не приводило к изменениям объема и формы эритроцитов. Анализируя влияние изменения pH крови на лазерное воздействие, нам удалось обнаружить потенцирующее действие на эффект увеличения MCV эритроцитов вследствие облучения присутствия в газовой среде, в которой экспонировалась кровь перед облучением, следов аммиака. В этом случае та же доза НИЛИ приводила к минимальным проявлениям гемолиза. Мы связываем это явление с известным феноменом выпрямления складчатости белков в присутствии мочевины - *urea- induced protein unfolding*. Имеются данные, что аквопорины мембран эритроцитов

проницаемы для аммиака и мочевины. (Ripoche et al., Transfusion clinique et biologique, 13, 2006), а структурный белок цитоскелета эритроцитов спектрин может изменять конформацию, разворачивая складчатость под влиянием небольших концентраций мочевины (MacDonald, Cummings, PNAS, 10, 2004). В последнее время было показано, что трансформация эритроцитов нормальной двояковогнутой формы в эхиноциты может быть вызвана дефицитом энергии при снижении уровня АТФ (Diez-Silva et al., MRS Bull. 35, N 5, 2010). Следовательно, для поддержания дискоидной формы эритроцитов, которая характеризуется оптимальной гибкостью и способностью переносить кислород, нужна энергия. Мы предположили, что влияние света на объем и форму эритроцитов по своему молекулярному механизму подобно действию сдвигового напряжения на клетки крови, при котором происходит принудительное разворачивание спектрина цитоскелета эритроцитов (Jonson et al., Science, 317, N3, 2007). Энергия света соответствующей длины волны, подобно механическому стимулу, по-видимому, может преобразовываться в химическую энергию переноса заряда и фосфорилирования структурных белков цитоскелета. При этом донором электрона может служить азот пептидных аминок групп.

ТИМЧЕНКО Л.Д., ГОРЯЙНОВА Е.Г.

Ставропольский государственный университет, Ставрополь, Россия

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА «БИОРЕГЕНЕРИН-ГЕЛЬ» НА ИНТЕНСИВНОСТЬ РЕГЕНЕРАЦИИ КОЖИ ПРИ РЕЗАНОЙ РАНЕ И ТЕРМИЧЕСКОМ ОЖОГЕ У ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС СТОКА W1STAR

Репаративная активность кожи представляет собой сложный комплекс процессов, обусловленных, прежде всего, особенностями регенерации отдельных клеток, тканей и тканевых комплексов, входящих в состав кожи как органа. В настоящее время имеются литературные данные о том, что важнейшим критерием оценки структурно-функциональной полноценности кожи является соотношение уровня ее пролиферации (интенсивность митоза), и деструкции (апоптотическая и некротическая гибель клеток). Эти процессы находятся в тесной зависимости друг с другом, обеспечивая совокупность внутри и межклеточных взаимоотношений, составляющих основу регуляции клеточного

роста и дифференцировки, а значит и регенерации ткани (Сидорова В.Ф., 1976; Швембергер И.Н., 2002; Шилов В.Н., 2006).

На сегодняшний день, известно большое количество препаратов, оказывающих стимулирующее влияние на регенерацию кожных покровов (Крутова Т.В. и др., 1984; Матасов В.М. и др., 1995; Полевое В.Н. и др., 1995; Пономарев, А.Ю. и др., 1995; Алексеев А.А. и др., 2010). Перспективными считаются эмбрионально-плацентарные ткани, стволовые клетки в связи с содержанием в них высокоактивных биологических компонентов (альфа-фетопротеин, факторы роста, гиалуроновая кислота, гормоны и др.), комплексное сочетание которых влияет на разные звенья механизма регенерации и патогенез раневого процесса, что обуславливает их использование при тяжелых, в том числе ожоговых травмах (Волков В.Г. и др., 2000; Молдогазиева Н.Т. и др., 2006; Barid A., et al., 1989; Berse V., et al., 1992). Применение этих тканей затруднено эпидемическими, экономическими и этическими проблемами (Плечева Д.В., 2004). Альтернативным сырьем для таких препаратов могут выступать эмбриональные ткани птиц. Имеются единичные сообщения о наличии таких препаратов (Маханьков О.В. и др., 2006; Попов Г.К. и др., 2006). Однако их потенциал еще не раскрыт, поскольку не достаточно сведений о спектре их влияния на различные показатели организма и местные реакции в коже, свидетельствующие об интенсивности регенераторного процесса при различных повреждениях.

В связи с вышеизложенным нами был разработан и испытан новый биологически активный препарат «Биорегенерин-гель» на основе активированной эмбрионально-яичной массы. Действие препарата оценивали при двух видах повреждений, отличающихся по сложности механизма патогенеза (резаная рана и термический ожог), а также типу и времени заживления. При термическом ожоге использовали препарат в форме геля, а при резаной ране, им пропитывали хирургический шелк №4. Сравнение эффективности препарата «Биорегенерин-гель» проводили с эффективностью традиционно используемых средств на животных контрольной группы, у которых резаную рану ушивали обычной хирургической нитью, а термический ожог обрабатывали препаратом актовегин-гель и гентамициновой мазью (1:1).

Баланс клеточной пролиферации, запрограммированной и индуцированной гибели клеток в коже под влиянием различных форм препарата «Биорегенерин-гель» уже к 4-м

суткам после повреждения смещается в сторону митоза эпителиальных клеток. Наряду с этим у животных в группах, где использовались традиционные средства, к этим же суткам продолжал нарастать апоптозный и некротический индекс клеточных элементов кожи. К 10-м суткам в группе, где для обработки термического ожога применяли «Биорегенерин-гель», соотношение митотического индекса к апоптозному составило 1:2,2; а митотического индекса к некротическому - 1:2,3; а у животных в группе, где для обработки раны использовали актовегин-гель и гентамициновую мазь, соотношение митотического индекса к апоптозному и митотического индекса к некротическому составили 1:5,9 и 1:7,9 соответственно.

При резаной ране также к 10-м суткам у животных экспериментальных групп отмечали рост митотической активности на фоне снижения некротической гибели клеток. Так, в группе, где использовали обычную хирургическую нить соотношение митотического индекса к апоптозному и митотического индекса к некротическому составило 1:1,7 и 1,4:1 соответственно. В группе, где применяли хирургическую нить, пропитанную препаратом «Биорегенерин-гель» соотношение митотического индекса к апоптозному составило 1,3:1; а митотического индекса к некротическому - 5,7:1.

Таким образом, независимо от типа повреждения и способа применения нового биологически активного препарата «Биорегенерин-гель» происходит повышение митотической активности эпителия на фоне снижения деструктивных процессов в коже по сравнению с результатами в группах, где использовались традиционные средства. Такая динамика репаративного процесса при использовании препарата проявляется на 6 суток раньше, чем без него.

ТИХОНОВА Л.А., БЕЛОУШКО Е.Е., КОСЕНКО Е.А., КАМИНСКИЙ Ю.Г.

*Пуцинский государственный естественно-научный институт, Пуцино, Россия
Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пуцино, Россия*

НОВАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ ДЛЯ ДЕТОКСИКАЦИИ АММИАКА

Целью работы была разработка клеточной технологии для детоксикации нейротоксина аммиака в крови. Новая биотехнология основывается на внедрении в

эритроциты специальных ферментов и последующего введения этих клеток в кровь тем же животным. Такие эритроциты с модифицированным составом внутриклеточной среды и предназначенные для метаболического удаления аммиака из окружающей среды названы аммоцитами. Задача исследования состояла в изучении способности аммоцитов, нагруженных глутаматдегидрогеназой (ГДГ-аммоцитов) или аланиндегидрогеназой (АДГ-аммоцитов) удалять аммиак из крови мышей с экспериментальной гипераммониемией и исследование метаболических свойств этих клеток.

Одним из главных нейротоксинов в организме млекопитающего является аммиак. При высоких концентрациях аммиак вызывает функциональные нарушения в центральной нервной системе, которые могут привести к коме и смерти. Удаление аммиака из крови представляет собой новую, еще не изученную и актуальную медико-биологическую задачу. Однако до сих пор нет ни одного агента, обладающего способностью удалять высокие концентрации аммиака из крови в течение короткого периода времени. ГДГ катализирует аминирование 2-оксоглутарата аммиаком, АДГ – аминирование пирувата. Оба фермента отсутствуют в эритроцитах животных и человека. Могут ли АДГ-аммоциты и ГДГ-аммоциты снижать концентрацию аммиака в крови и изменяется ли функциональная активность эритроцитов после их нагрузки чужеродными ферментами, пока не известно.

В наших пилотных экспериментах введение аммоцитов мышам с гипераммониемией приводило к ускорению снижения концентрации аммиака в крови уже в первые 30–120 мин. Активность эндогенных Na,K-АТФ-азы и фосфофруктокиназы в аммоцитах оставалась на том же уровне, что и в интактных эритроцитах, а активность гексокиназы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, лактатдегидрогеназы, пируваткиназы, аспартатаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы снижалась на 10-20%, что свидетельствует о сохранении целостности эритроцитарной мембраны. Внутриклеточная концентрация АТФ в аммоцитах двух типов остается стабильной. Аммоциты переживают в кровотоке у мышей по меньшей мере 2 суток, сохраняя при этом активными инкапсулированные в них ферменты. Таким образом, аммоциты являются функционально активными клетками и могут использоваться в качестве защитной системы при патологической гипераммониемии. Метод приготовления аммоцитов следует рассматривать как новая биотехнология, применимая в медицине и ветеринарии при

многочисленных заболеваниях, связанных с острым повышением концентрации аммиака в крови.

Работа поддержана Министерством образования и науки РФ.

ТИХОНОВА О.В.¹, ВАСИЛЬЕВА Б.Ф.¹, ЗЕНКОВА В.А.¹,
КАТРУХА Г.С.¹, РЕЗНИКОВА М.И.¹, КОРОЛЕВ А.М.¹, ДЬЯКОВ М.Ю.²,
БИЛАНЕНКО Е.Н.², КАМЗОЛКИНА О.В.², ЕФРЕМЕНКОВА О.В.¹

¹Институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе РАМ, Москва, Россия

²Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносов,

Биологический факультет, Москва, Россия

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ СВОЙСТВ АСКОМИЦЕТНОГО ГРИБА *XYLARIA ACUTA*

В настоящее время при изыскании новых биологически активных веществ природного происхождения особое внимание уделяют редким или малоизученным видам, рассматривая их в качестве потенциально наиболее перспективных продуцентов новых соединений. В ходе проведения исследований по изысканию новых антибиотиков у штаммов грибов, выделенных из природных местообитаний, особое внимание уделяется природным соединениям, преодолевающим лекарственную устойчивость патогенных бактерий. В качестве тест-объектов для определения антибиотической активности использовали 18 штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также 2 штамма грибов.

При первичном скрининге для последующего химического изучения был выбран штамм, который при глубинном культивировании проявляет антимикробную активность на стабильно высоком уровне. При глубинном культивировании гриб отличается высокой скоростью роста на различных средах. Этот штамм был выделен при сборе коллекции макромицетов в субтропической зоне России (в Краснодарском крае) из плодового тела базидиального гриба *Ganoderma lucidum*. На основании морфологических свойств и анализа последовательности гена рибосомальной РНК указанный гриб отнесен к виду *Xylaria acuta*. Исследуемый штамм образует четыре антибактериальных вещества,

эффективных в отношении устойчивого к метициллину штамма *Staphylococcus aureus* ИНА 00761 (MRSA), а также в отношении устойчивого к гликопептидам штамма *Leuconostoc mesenteroides* VKPM В-4177, которые по предварительным данным являются ранее неописанными соединениями.

ТКАЧЕНКО О.В.¹, ЛОБАЧЕВ Ю.В.¹, ЕВСЕЕВА Н.В.², МАТОРА Л.Ю.²,
БУРЫГИН Г.Л.², ЩЕГОЛЕВ С.Ю.²

¹*Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова,
Саратов, Россия*

²*Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН,
Саратов, Россия*

ИЗУЧЕНИЕ РАСТИТЕЛЬНО-МИКРОБНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ КАК НАПРАВЛЕНИЕ АГРОБИОТЕХНОЛОГИИ

Использование потенциала ассоциативных бактерий, стимулирующих рост и развитие растений, открывает перспективы получения высококачественных, экологически чистых продуктов питания. Признанным модельным объектом в исследовании феномена растительно-микробной ассоциативности являются бактерии рода *Azospirillum*, благодаря их способности увеличивать продуктивность сельскохозяйственных культур. К настоящему моменту установлено, что стимулирующим эффектом обладают как интактные клетки азоспирилл, так и изолированные компоненты их наружной мембраны, в частности, липополисахарид (ЛПС).

На основании имеющихся данных было сделано предположение о том, что введение клеток ассоциативных рост-стимулирующих бактерии или их ЛПС в питательную среду для культивирования *in vitro* соматических клеток, тканей или органов может оказывать влияние на физиолого-морфологические и морфометрические показатели роста растений, а также повышать их адаптационную способность.

Анализ полученных результатов показал, что бактерии рода *Azospirillum* оказывают воздействие на рост микроклонов картофеля в культуре *in vitro*. В соответствующих условиях при совместном культивировании эти бактерии инокулируют корни

микрклонов, вызывают усиление их ветвления, что влияет на интенсивность развития междоузлий и листового аппарата, а также способствует повышению адаптации растений к условиям выведения в грунт (*ex vitro*). Кроме этого, было установлено влияние ЛПС *A. brasilense* Sp245 на морфогенез соматических клеток в культуре *in vitro* пшеницы. Показано, что ЛПС азоспирилл может не только стимулировать митотическую активность клеток растений *in vivo*, но и регулировать процессы их дифференциации в культуре *in vitro*. Полученные данные могут быть внедрены в практику, как элемент оптимизации существующих агробιοтехнологий.

ТРЕТЬЯКОВА И.Н., БАЖИНА Е.В., ИВАНИЦКАЯ А.С.,
ВОРОШИЛОВА Е.В., ПАК М.Э., ШУВАЕВ Д.Н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт леса им. В.Н. Сукачева Сибирского отделения Российской академии наук, Красноярск, Россия

БИОТЕХНОЛОГИЯ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ ХВОЙНЫХ, ПРОИЗРАСТАЮЩИХ В СИБИРИ ЧЕРЕЗ СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ

Одним из перспективных направлений в лесной биотехнологии микрклонального размножения за последние 20 лет является соматический эмбриогенез - уникальная способность растительных клеток передавать имеющуюся у них генетическую информацию и давать начало целым организмам. При этом соматические клетки растений становятся на путь эмбриогенеза и формируют массовые растения, идентичные материнскому генотипу.

Соматический эмбриогенез в культуре *in vitro* начали изучать в Институте леса им. В.Н.Сукачева СО РАН в начале 21 века у видов *Larix*, *Pinus*, *Picea*, *Abies* произрастающих на территории Сибири (Красноярский край, Хакассия, Прибайкалье). Незрелые зиготические зародыши и мегагаметофиты, полученные от открыто опыленных и само- и перекрестно опыленных шишек хвойных вводили в культуру *in vitro*: у *L. sibirica*, *L. gmelinii* на модифицированную среду MSG и АИ (патент №2431651), у *P. sibirica*, *P. pumila* и *Abies sibirica* на модифицированную среду 1/2LV, у *Picea ajaensis* на среду DCR. Во все среды вводили гормоны (ИУК, 2,4-Д, 6-БАП), в разных концентрациях и в разном

соотношении их друг с другом, а также дополняли среды глютамином, гидролизатом казеина, аскорбиновой кислотой. Пролиферацию эмбриональной массы вызывали на тех же средах с уменьшенной вдвое концентрацией цитокининов. Соматические зародыши вызревали на базальной среде с АБК (60-120 мМ) и ПЕГ. Для видов *Pinus* требовалась обработка культур низкими положительными температурами. Прорастание соматических зародышей шло на безгормональных базальных средах, дополненных активированным углем, с последующим переводом проростков в экпочву.

Несмотря на видовую специфику, морфогенез эмбриогенных структур у эксплантов шел по одной схеме: растяжение соматических клеток, и их асинхронное деление, образование глобулярных и торпедообразных зародышей, формирование их биполярной структуры, вызревание зародышей и образование растений. Однако экспланты только единичных растений - доноров формировали пролиферирующие эмбриогенные клеточные линии и в них соматические зародыши. Эмбриогенные клеточные линии были получены при открытом опылении и контролируемом опылении у *L. sibirica* и *Pinus pumila*, *P. sibirica* и *Picea ajaensis*. Эти линии отличались по пролиферационной активности. За 10 мес. культивирования объем эмбриональной массы у разных линий изучаемых видов составил 140-580 гр., за 1 год он достигал 3,5кг. Число соматических зародышей в 100мг³ пролиферирующей эмбриональной массы у разных клеточных линий варьировало от 210 до 410 шт. Спада пролиферационной активности в эмбриогенных клеточных линиях за 2 – 3 года культивирования не наблюдалось. Нарастание эмбриональной массы шло по экспоненте. Вызревание соматических зародышей и образование сеянцев было отмечено у *L. sibirica* и *Pinus pumila*. Из 1 гр эмбриогенного каллуса получали 50-60 проростков и 10-15 сеянцев.

У *Pinus sibirica* зрелых соматических зародышей получить не удалось. Однако наблюдения за ростом эмбриогенного каллуса данного вида показали, что он шел наиболее интенсивно у эксплантов, полученных в вариантах контролируемого опыления, в которых использовалась пыльца уникальных деревьев кедров-акселератов с однолетним циклом развития женских шишек.

Соматический эмбриогенез проходил под строгим генетическим контролем. Только экспланты зародышей семян, полученные от донорских материнских деревьев с высоким репродуктивным потенциалом формировали эмбриогенный каллус и соматические

зародыши. Изучение молекулярных механизмов, вовлеченных в контроль/регуляцию соматических зародышей, их вызревание и прорастание, а также исследование гормонального контроля процесса соматического эмбриогенеза позволят понять многие аспекты морфогенеза и в целом биологии развития голосеменных растений.

Таким образом, у представителей сибирских видов хвойных путем подбора состава питательных сред на клеточном уровне нами впервые в России были получены эмбриогенные каллусы различного генетического происхождения, способные длительное время продуцировать эмбрионально-суспензорную массу, в которой формировались соматические зародыши и растения. Полученные разработки по биотехнологии микрклонального размножения хвойных через соматический эмбриогенез и создание длительно пролиферирующих клеточных линий направлены на сохранение ценного генофонда хвойных видов и их плантационное лесовыращивание.

Работа поддержана РФФИ (грант № 11-04-00281).

ТРОШИНА Е.М.,

ЩЕКУТЬЕВ Г.А.

ФГБУ «НИИ нейрохирургии им. акад. Н.Н.Бурденко» РАМН, Москва, Россия

ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ВЫЗВАННЫХ ПОТЕНЦИАЛОВ В ПРОЦЕССЕ ВОССТАНОВЛЕНИЯ БОЛЬНЫХ С НЕЙРОТРАВМОЙ

Проведено комплексное нейрофизиологическое обследование 19 больных, перенесших черепно-мозговую травму с периодом длительной комы, с анализом соматосенсорных (ССВП), акустических (АСВП) и зрительных (ЗВП) в ранние сроки после травмы, 12 пациентов обследовано в динамике.

ССВП позволяют оценить состояние проводимости по афферентным путям спинного мозга через ствольные отделы в кору головного мозга. Анализировались значения латентностей, амплитуда вызванного ответа и межпиковые интервалы (МПИ) компонентов ССВП, оценивалось центральное время проведения (ЦВП). При динамическом обследовании отмечено, что абсолютные значения латентностей компонентов ССВП значимо не изменяются, более динамичными являются изменения межпиковых интервалов, преимущественно МПИ N13-P20 и значения ЦВП. Амплитудные

параметры ССВП на стороне более измененного ответа у больных с ЧМТ тесно коррелируют со степенью угнетения сознания и исходами травматической болезни. Положительная динамика амплитудных показателей ССВП предсказывает благоприятный исход, тогда как отсутствие динамики патологически измененных ответов прогнозирует длительное тяжелое состояние больного и вероятный неблагоприятный витальный исход. Отсутствие ВП, хотя бы в одном из полушарий на протяжении нескольких суток, с высокой вероятностью предсказывает неблагоприятный исход травматической болезни мозга.

АСВП отражают состояние слухового нерва и стволовых проводящих структур головного мозга, однако, в динамической оценке тяжести повреждения мозга у больных с ЧМТ значения параметров компонентов АСВП оказываются информативными только в сопоставлении с клиническими данными относительно уровня и степени дисфункции стволовых структур мозга.

Анализ ЗВП, зарегистрированных по стандартной методике, не выявляет значимых их динамических изменений у обследованных пациентов. Более информативным является топографическое картирование по максимуму амплитуды компонентов ЗВП преимущественно поздних компонентов зрительного ответа с латентностью выше 100 мс чувствительных к изменениям состояния внимания, уровня бодрствования, эмоциональному состоянию человека. Прогностическая значимость ЗВП у пациентов с хроническим и обратимым посткоматозным вегетативным состоянием (ПКВС) оценивалась в сопоставлении параметров вызванных зрительных ответов у здоровых испытуемых. Показано, что для ЗВП в норме характерно наличие комплекса негативно-позитивных колебаний с латентностями в диапазоне от 60 до 400 мсек практически без асимметрии и достаточно широкое распространение вызванного ответа по областям коры с акцентом по амплитуде в затылочных областях. Топографическое картирование мощности ЗВП показывает отчетливое преобладание максимума активности в задних отделах полушарий сагиттально с неустойчивой и нерезкой асимметрией.

При ПКВС отмечались выраженные изменения ЗВП, касающиеся конфигурации ответа в целом: резкое нарушение формы, обеднение компонентного состава, увеличение латентности и уменьшение амплитуды сохранных, но редуцированных компонентов. У больных с хроническим ПКВС ЗВП в процессе динамического наблюдения существенно

не изменялись. Сохранялась крайне низкая амплитуда ответа, нестабильность его конфигурации и нарушение формы за счет увеличения временных параметров сохранных компонентов. Максимум мощности в ранние сроки после ЧМТ был локализован в правой лобно-височной области, а при обследовании в динамике его перемещения носили хаотичный характер. При обратимом ПКБС для ЗВП была характерна динамичность амплитуды потенциала от исследования к исследованию с отчетливой тенденцией к повышению, устойчивая во времени выраженность основных компонентов ответа, в динамике топографии максимума ответа отмечалась приуроченность его к проекционной зоне неспецифических срединно-стволовых образований в первые 1-2 месяца нахождения больных в бессознательном состоянии с последующим перемещением к специфической проекционной области зрительного анализатора через 4-6 мес. после травмы.

Прогностически значимым признаком обратимости бессознательного состояния является сторонность проявления максимума исследованной активности с преобладанием мощности ЗВП в левом полушарии при обратимом ПКБС, и в правом полушарии при хроническом ПКБС.

Данное исследование поддержано грантом РФФИ 11-04-12166-офи-м-2011.

ТРУНОВА Л.А.¹, БОЙКО Л.Я.¹, БЕХМЕТЬЕВ Р.Д.²

*Всероссийский научно-исследовательский институт комбикормовой промышленности,
Воронеж, Россия*

Московский государственный университет технологий и управления, Москва, Россия

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ ПРЕСТАРТЕРНЫХ КОМБИКОРМОВ ДЛЯ ПОРΟΣЯТ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРОБИОТИКА СУБТИЛИС

В работе приводятся результаты исследований по повышению качества и совершенствованию технологии престартерных комбикормов для поросят при использовании пробиотика Субтилис.

Использование престартерных комбикормов в рационах поросят с самого раннего возраста стимулирует развитие пищеварительной системы, закладывает базу для роста и получения более высокой продуктивности. Недостаточная активность амилолитических и

протеолитических ферментов у поросят приводит к необходимости специальной обработки зерна в технологии престаартерных комбикормов. Известно, что микрофлора поросят в первую неделю после отъема от свиноматки особенно нестабильна, и необходимо достаточно длительное время для ее формирования. Добавление пробиотика в престаартерный комбикорм может ускорить данный процесс.

Как показали наши исследования, для обработки зерна злаковых и бобовых культур целесообразно применять экструзионную технологию, обеспечивающую перевод крахмала и белков в легко усвояемую форму, инактивацию антипитательных веществ, улучшение санитарного состояния корма, повышения вкусовых качеств. Так, после экструзионной обработки повышается содержание сахаров с 4,5-4,7 % до 8,0-15,7 % и атакуемость крахмала амилолитическими ферментами с 53,7-77,5 мг/г до 225-325,5 мг/г в зерне злаковых культур; значительно снижается препятствующая ферментативному расщеплению белков активность ингибиторов трипсина с 2,03-20,5 мг/г до 0,24-7,0 мг/г и химотрипсина с 1,08-3,63 мг/г до 0,03-0,33 мг/г в бобовых культурах. Наиболее рациональные режимы по энергозатратам и стабильности качества конечного продукта были получены при обработке предварительно измельченных смесей злаковых и бобовых культур. Кроме того, данная обработка обеспечивает полное обеззараживание зерна от грибной и бактериальной микрофлоры. Исходя из того, что гранулированные комбикорма и крупка из гранул по сравнению с рассыпными менее подвержены перепадам температуры при хранении, динамика роста влажности их менее интенсивна, и процессы развития грибной микрофлоры в таком комбикорме замедленны, как и процессы окисления и гидролитического расщепления жиров, престаартерные комбикорма для поросят вырабатывались в виде крупки после предварительного пропаривания комбикорма при давлении пара 0,3-0,4 МПа до температуры 70-80 °С и влажности 14-15 %, последующего прессования и измельчения гранул на вальцовом станке при величине зазора между валками 1,8 мм.

В рецептуру опытных престаартерных комбикормов из расчета 400 г на 1 тонну был включен пробиотический препарат Субтилис производства НИИ пробиотиков, представляющий собой микробную массу спорообразующих бактерий *B. Subtilis* и *B. Licheniformis*, обладающий антагонистическим действием к широкому спектру патогенных микроорганизмов, возбудителей заболеваний желудочно-кишечного тракта, легочных

инфекций, а также иммуномодулирующим воздействием на организм, кроме того, способствующий выработке ферментов (альфа-амилаза, целлюлаза, декстраназа, левансахараза, мальтаза, бета-глюканаза), что должно положительно отражаться на усваивании корма и продуктивности поросят.

Смешивание пробиотика осуществлялось на стадии приготовления премикса, дозирование – на узле дозирования макрокомпонентов премикса из расчета 40 кг на 1 тонну. Вводить препарат в комбикорм возможно и на стадии приготовления предварительной смеси белково-минерального сырья, тогда дозирование следует осуществлять на узле дозирования микрокомпонентов из расчета 1,14-1,34 кг на 1 тонну, или на стадии приготовления комбикорма, дозирование – на узле дозирования микрокомпонентов из расчета 0,4 кг на 1 тонну.

На основании проведенных исследований разработаны рецептура и технология производства престартерных комбикормов для поросят. Апробация разработки в условиях «Спецхоза «Октябрь» Бутурлиновского района Воронежской области показала их высокую эффективность. При использовании престартерных и стартерных комбикормов, выработанных по рецептам ВНИИКП, живая масса поросят в 60 дневном возрасте была на 27,7 –33,1% выше, чем в контрольной группе, получавшей престартерный комбикорм фирмы «XL Гамбургер Ляйстунгсфуттер» (Германия), и стартерный комбикорм, выработанный в цехе хозяйства. В опытных группах снизились затраты корма на 1кг прироста живой массы. При этом, дополнительная прибыль от реализации мясной продукции составила 17,93-19,51 руб. на 1 кг прироста живой массы или 295,8- 338,1 рублей на одного поросенка.

ТРУС Е.Н., ЕГОРОВА З.Е.

Белорусский государственный технологический университет, Минск, Беларусь

ВИДОВАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БАЦИЛЛЯРНОЙ МИКРОБИОТЫ МЯСОРАСТИТЕЛЬНЫХ КОНСЕРВОВ ДЛЯ ДЕТСКОГО ПИТАНИЯ

В настоящее время в Беларуси высокими темпами развивается производство продуктов для детского питания, имеющих высокую биологическую и пищевую ценность.

Сбалансированность этих продуктов по аминокислотному и минеральному составу достигается за счет добавления к овощной основе продуктов животного происхождения (мяса, жиров, субпродуктов), растительных масел, а также круп. Учитывая расширение ассортиментного ряда мясорастительных консервов, разработка научно обоснованных режимов их стерилизации представляет как практический, так и научный интерес.

Необходимо отметить, что одним из этапов разработки оптимального режима стерилизации консервов является подбор тест-микробактерии, который основан на результатах исследования остаточной микробиоты консервированного продукта. Цель данной работы заключалась в видовой идентификации остаточной микробиоты новых видов мясорастительных консервов для детского питания.

Объектами исследования были образцы 6 наименований мясорастительных консервов, фасованные в стеклянные банки ПТ-190, изготовленные в производственных и лабораторных условиях. Предметом исследования были чистые культуры микроорганизмов, выделенные из консервированных продуктов. Идентификацию бактерий осуществляли по сумме основных фенотипических признаков согласно классификации, изложенной в 9-м издании руководства по систематике бактерий, используя определители бактерий Bergey, справочные пособия и монографии. Принадлежность изолятов к спорообразующим бактериям определяли посредством фазово-контрастной микроскопии. С целью максимального выявления в исследуемых образцах спорообразующих видов проводили индукцию спорообразования путём лимитирования чистых культур бактерий по источникам углерода и азота. При изучении физиолого-биохимических свойств бактерий общепринятыми методами исследовали каталазную активность, отношение к источникам углерода, способность к гидролизу крахмала, казеина, разжижению желатина, нитратредуцирующую активность, образование ацетилметилкарбинола, потребность в кислороде, рост на средах с повышенным содержанием *NaCl* и при повышенных температурах.

Всего из объектов исследований было выделено 23 грамположительные спорообразующие культуры. Все выделенные штаммы продуцировали каталазу, проявили способность к росту при 50°C и в анаэробном агаре, сбраживали глюкозу. 70 % всех изолятов расщепляли крахмал, 9 % выделенных микроорганизмов образовывали ацетилметилкарбинол на среде Кларка. На основании совокупности физиолого-

биохимических свойствами была установлена предварительная видовая принадлежность изолятов, а именно: *B. macerans*, на долю которого приходилось 65 % от всех выделенных культур, *B. laterosporus* (25 %) и *B. licheniformis* (9 %).

Таким образом, на основании проведенных исследований можно сделать вывод о целесообразности использования штамма *B. macerans* в качестве дополнительного тест-микроорганизма при разработке режимов стерилизации новых видов мясорастительных консервов для детского питания.

ТУХБАТОВА Р.И., ФАТТАХОВА А.Н., АЛИМОВА Ф.К.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ TRICHODERMA HARZIANUM ИЗ ПОГРЕБЕННЫХ ПОЧВ

Несмотря на то, что различными авторами накоплено большое количество данных по разным аспектам жизнедеятельности и функционирования грибов *Trichoderma*, и они являются продуцентами метаболитов широкого спектра действия, вопрос об их использовании в качестве медицинских агентов остается открытым и может представлять интерес в дальнейших научных исследованиях.

В связи с вышесказанным целью работы явилась характеристика биологической активности жидкого препарата *Trichoderma harzianum* 206 на фоне пирена в опытах *in vivo*.

Штамм *T. harzianum* 206 был выделен из погребенной почвы Больше-Кляринского городища (10-11 вв., Камско-Устьинский район Республики Татарстан) и в предыдущих исследованиях *in vitro* показал наличие цитотоксической активности в отношении клеточной линии HeLa и ее отсутствие в отношении нормальных клеток.

Эксперименты *in vivo* проводили на мышах линии SwissWebster, у которых моделировали патологические изменения путём подкожного введения пирена. Было исследовано 3 группы мышей: 1-я - интактная (контроль); 2-я - опытная (в течение 7 суток ежедневно подкожно на спине вводили пирен по 50 мкл в концентрации 20 мкг/мл, начиная с 8-х суток – физиологический раствор в том же объеме); 3-я - опытная (в течение

7 суток ежедневно подкожно на спине вводили пирен по 50 мкл в концентрации 20 мкг/мл, начиная с 8-х суток - жидкий препарат *Trichoderma* по 250 мкл). На 15-е сутки мышей умерщвляли, вскрывали и отбирали внутренние органы для проведения гистологического анализа.

Под воздействием пирена слой эпидермиса уменьшался примерно в 3 раза по сравнению с контролем. Количество волосяных фолликулов также сильно снижалось. У мышей 3-й группы наблюдалось увеличение размера эпидермиса, а также количества волосяных фолликул. В роговом слое видны сформировавшиеся клетки, что может свидетельствовать о хорошей дифференцировке клеток и восстановлении структуры ткани.

На срезах печени контрольных (интактных) мышей хорошо просматривается дольчатая структура органа, гепатоциты имеют неправильную многоугольную форму. Гепатоциты располагаются рядом, образуя при этом печеночные балки или так называемые трабекулы. Клетки и печеночные балки ровные, симметричны относительно кровеносных капилляров. Щелевидные пространства равномерные, хорошо просматриваются. Через 7 дней введения пирена можно отметить, что балочное строение печеночной ткани слабо выражено, обнаружены полностью разрушенные участки. Гепатоциты отличаются небольшими размерами ядер и цитоплазмы. Большая часть цитоплазмы светло окрашена, мелкая, частично - угловатой формы, обеднена хроматином. Ядра мелкие, плохо обозначены, располагаются эксцентрично (по периферии), мелкие ядрышки. Отмечено небольшое содержание двухядерных гепатоцитов (22,20 %). Клетки ретикулоэндотелия малочисленны и имеют мелкие ядра. Также в сосудистой системе выявлены признаки застойной венозной гиперемии, которая проявляется расширением и полнокровием синусоидальных капилляров (преимущественно вокруг центральных вен). В печени мышей, получавших жидкий препарат *T. harzianum* 206, сохранено балочное строение. Гепатоциты среднего размера имеют круглоовальную форму с умеренным количеством хроматина, с одним, реже двумя мелкими ядрышками вблизи кариолемы. Также отмечено увеличение количества ретикулоэндотелиальных клеток и их численности. Заметно ослабевает сосудорасстройство в виде застойного полнокровия синусоидальных клеток и отека перисинусоидального пространства.

Известно, что некоторые метаболиты грибов способны проникать через гематоэнцефалический барьер. При изучении срезов мозга, в первую очередь, обращают внимание на отсутствие хроматолиза и центральное расположение ядра. В мозге мышей 2-й группы, получавших пирен, были обнаружены слившиеся нейроны и единичные нейроны с эксцентрично расположенным ядром, хроматолиза нет. В мозге мышей 3-й группы, получавших жидкий препарат *T. harzianum* 206, не выявлено особых отличий от контроля: если в контроле много мелких клеток Пуркинье, то здесь они крупные и светлые.

Таким образом, нами впервые показана возможность использования метаболитов грибов рода *Trichoderma* для снижения токсичного действия пирена на стоке мышей Webster, выявлена тенденция к восстановлению печеночной ткани и эпидермиса.

УВАРОВА Е.А.¹, ЗАГОРСКАЯ А.А.¹, БЕЛАВИН П.А.¹, НОСАРЕВА О.В.¹,
ТАТЬКОВ С.И.¹, КАКИМЖАНОВА А.А.², ДЕЙНЕКО Е.В.¹

¹ФГБУН Институт Цитологии и Генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

²Национальный Центр Биотехнологии Республики Казахстан,

Астана, Республика Казахстан

АНАЛИЗ ИММУНОГЕННОСТИ ТРАНСГЕННОРЬ МОРКОВИ, ПРОДУЦИРУЮЩЕЙ АНТИГЕНА rESAT6 ИЛИ rCFP10 *Mycobacterium tuberculosis* ПРИ ОРАЛЬНОЙ ИММУНИЗАЦИИ МЫШЕЙ

Получение рекомбинантных белков для терапевтических целей – одно из наиболее приоритетных направлений современной биотехнологии. Известные ограничения традиционных систем продукции рекомбинантных белков, основанных на клетках бактерий, дрожжей и млекопитающих, а так же недостаток производственных мощностей современных биофармацевтических предприятий и их высокая себестоимость уже сейчас приводят к нехватке многих жизненно-важных биофармацевтиков. Именно это и послужило толчком к появлению на рубеже 21 века новой технологической платформы - «молекулярного фермерства» - использованию трансгенных растений и животных в качестве недорогих и эффективных живых «фабрик»

Технологические платформы создания биофармацевтиков на основе трансгенных растений и животных интенсивно развиваются биотехнологическими фирмами за рубежом. Проводятся клинические испытания на разных стадиях следующих фармацевтических белков: гликоцеребролидаза (суспензионная культура клеток табака; Protalix), инсулин (семена подсолнечника; SemBioSys), антитела для диагностики онкологических заболеваний (семена кукурузы; NeoRx/Monsanto), вакцина для профилактики болезни Ньюкасла кур (растения табака; Dow AgroSciences), полученных на основе трансгенных растений.

Использование генетически модифицированных растений для пероральной доставки антигена в организм теплокровных представляется вполне реальным на данный момент времени, поскольку слизистая оболочка желудочно-кишечного тракта млекопитающих функционирует как часть иммунной системы, а функцию защитной капсулы, ограждающей белок от разрушающего действия желудочных ферментов, может выполнять целлюлозная оболочка клеточной стенки растений. В случае использования растений, пригодных для употребления без предварительной тепловой обработки, не требуется выделения и очистки рекомбинантного белка.

Проводятся работы по созданию трансгенных растений моркови с генами белков оболочки возбудителя туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis* для изучения эффективности представления рекомбинантных антигенов иммунной системе организма животных при пероральной доставке. Разрабатывается технология наработки биологически активных рекомбинантных белков в тканях корнеплодов трансгенных растений моркови.

Для трансформации растений созданы кассеты экспрессии (pBI_cfp10 и pBI_esat6), в которых последовательности генов *esat6* или *cfp10* *M.tuberculosis* были под контролем промотора вируса мозаики цветной капусты (P35S). Перенос созданных генетических конструкций в ядерные геномы клеток каллусных линий моркови проводили методом агробактериальной трансформации с помощью почвенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens*. В работе использовали морковь (*Daucus carota* L.) сорта Нантская. В результате были получены растения, содержащие в составе ядерного генома последовательности генов *esat6* или *cfp10*. Наличие генов в составе генома подтверждали ПЦР. Экспрессию белка в растениях оценивали методами Дот- и Блот-гибридизации.

Ответные иммунные реакции на рекомбинантные белки rESAT6 и rCFP10 оценивали двукратно после скармливания смеси измельченных корнеплодов моркови лабораторным животным (мыши линии ICR, самки, возраст 1,5 мес.) из расчёта 5 г моркови на 1 животное. Клеточное звено иммунных ответов у животных оценивали по способности лейкоцитов периферической крови к трансформации и пролиферации под воздействием антигенов (реакция бласттрансформации – РБТЛ).

При оценке специфического иммунного ответа клеток иммунизированных животных на стимуляцию рекомбинантными антигенами rESAT6 либо rCFP10 *in vitro* было отмечено достоверное повышение активности лимфоцитов на 28-е сутки после начала иммунизации. Наиболее выражена стимуляция лимфоцитов была в группах, иммунизированных rESAT6. При исследовании уровня антител в сыворотке крови иммунизированных мышей была отмечена индукция специфичных IgG к рекомбинантным антигенам rESAT6 либо rCFP10. В дальнейшем предполагается провести сравнительный анализ возможности усиления ответных иммунных реакций при доставке в организм одновременно двух антигенов в сочетании с иммуномодулятором (дельтафероном человека).

УЛАХАНОВА Д.П., ЖАРИКОВА Г.Г., ЛЕОНОВА И.Б.

Российский экономический университет имени Г.В. Плеханова, Москва, Россия

**НАПРАВЛЕНИЯ РАЗВИТИЯ ПИЩЕВОЙ МИКРОБИОЛОГИИ
В ЛАБОРАТОРИИ МИКРОБИОЛОГИИ РОССИЙСКОГО ЭКОНОМИЧЕСКОГО
УНИВЕРСИТЕТА ИМЕНИ Г.В. ПЛЕХАНОВА**

Лаборатория микробиологии в коммерческом училище была открыта одной из первых в Москве в 1907 году. Уже тогда было очевидно, что без знания микробиологии невозможно выработать приёмы и способы сохранения качества пищевых продуктов в процессе производства, транспортирования, хранения и реализации. Сотрудниками лаборатории были выдающиеся, высокообразованные специалисты - Я.Я.Никитинский (мл.), Б.С. Алеев, В.С. Загорянский, Ф.М.Чистяков, К.А. Мудрецова-Висс.

Современная лаборатория микробиологии была аккредитована в системе Госстандарта России для проведения исследований качества пищевых продуктов с целью их сертификации, и ей было присвоено название: «Испытательная лаборатория микробиологии пищевых продуктов РЭА им. Г.В. Плеханова» (Аттестат аккредитации № РОСС RU ПР97). В это время было много заказов по исследованию качества и безопасности пищевых продуктов. Как правило, пищевые продукты отвечали требованиям безопасности по микробиологическим показателям, но отдельные образцы пищевых продуктов имели повышенное содержание микроорганизмов. Параллельно развивалась и научная деятельность лаборатории, которая не прекращается и в настоящее время. Основным направлением исследований лаборатории микробиологии является микробиология кондитерских изделий, под руководством Г.Г. Жариковой.

По направлению микробиология кондитерских изделий к настоящему моменту изучен количественный и качественный состав микрофлоры кондитерских изделий [1]. Была разработана балловая шкала органолептической оценки шоколада, которая была неоднократно апробирована в лаборатории микробиологии при выполнении дипломных и научно-исследовательских работ [2]. Установлено, что стафилококки остаются в жизнеспособном состоянии в бисквитных тортах в течение месяца в том же количестве на 1 грамм массы торта при хранении в холодильнике [3]. Разработаны методы выделения микроорганизмов из кондитерских изделий [4].

В последнее время показано, что в кондитерских изделиях содержится консорциум микроорганизмов, состоящий из десятков различных видов популяций, и количество их в процессе хранения изменяется волнообразно, что подчиняется фундаментальным законам популяционной экологии [5,6].

Список литературы:

1. Леонова И.Б. Характеристика качества шоколада и какао порошка по микробиологическим критериям. Автореф. канд. дисс. РЭА — М.: 1993 — 2 п.л.
2. Леонова И.Б., Селезнёва Г.Д., Жарикова Г.Г. Балловая шкала оценки качества шоколадных изделий по органолептическим показателям. V Плехановские чтения РЭА-М: 1992 стр. 9-10
3. Орлянская Е.В., Козьмина А.О., Леонова И.Б., Жарикова Г.Г. Качество бисквитных тортов со сливочной отделкой по микробиологическим показателям. // Сб. науч.

Тр. Потребительский рынок: состояние и перспективы. — Екатеринбург: 2001 — стр. 39-40.

4. Скокан Л.Е., Жарикова Г.Г. Разработка методов определения микробиологических показателей в кондитерских изделиях и критериев оценки их качества. Брошюра. Пищевая и перерабатывающая промышленность Серия 17 Кондитерская промышленность, вып.1 АгроНИИТЭИПП — М.: 1996 —2,25 п.л.

5. Жарикова, Г.Г. Микробиологические исследования шоколада при хранении/Г.Г. Жарикова, И.Б. Леонова, Д.П. Улаханова//Кондитерское производство, - 2010.-№ 4.-С.22–23

6. Жарикова, Г.Г. Изменение микробиоты шоколада в процессе хранения /Г.Г. Жарикова, И.Б. Леонова, Д.П. Улаханова//Товаровед продовольственных товаров, - 2011 .-№7. - С. 32 - 36

УСТИНОВА А.А., РЯБИНИН В.Е.

ВГОУ ВПО "Челябинская государственная медицинская академия"

Минздравсоцразвития России, Челябинск, Россия

СОСТОЯНИЕ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ И ПРОБЛЕМА ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИИ НА ВОСТОЧНО-УРАЛЬСКОМ РАДИОАКТИВНОМ СЛЕДЕ

Более чем 40-летняя деятельность ПО “Маяк” привела к локальному накоплению чрезвычайно больших количеств радионуклидов и значительному загрязнению Уральского региона долгоживущими продуктами деления. Аномально высокой является радиационная нагрузка в зоне междуречья Теча-Мышеляк площадью около 30-40 км². В ней сосредоточено более 200 могильников, из которых 25 продолжают заполняться, с содержанием 500 тыс. тонн твердых отходов, до 20 тыс. м³ жидких отходов суммарной активностью 150 Мки находится в спецхранилищах, не менее 900 МКю жидких отходов захоронены в емкостях, продолжается сброс среднеактивных жидких отходов в бессточные озера Карачай и Старое болото /120 МКю и 2 МКю соответственно/. Таким образом, чрезвычайная ситуация, связанная с накоплением радиоактивных отходов в общей концентрации более 1 млрд. Кю и при наличии подземных вод, сообщающихся с

открытой гидрографической системой Обского бассейна, требуют разработки стратегии охранных мероприятий для предотвращения аварийных ситуаций и глобальной делокализации области загрязнения. Даже неполный анализ особенностей положения Челябинской области, концентрации промышленности, нерационального ведения хозяйственной деятельности, наличия зараженных радионуклидами районов и др. приводит к необходимости создания оптимальной региональной системы контроля и анализа экологического состояния природной среды.

Изучение действия радиоактивного загрязнения на живую природу показало, что преобладающая доля энергии излучения (до 75%) приходилась на бета-частицы. Поэтому мышевидные грызуны, размеры тела, которых сравнимы с длиной пробега бета-частиц, получают максимальную дозу на все тело. Кроме того, эти животные обитают преимущественно в почве или на ее поверхности, осуществляя, таким образом, полный контакт с радионуклидами. Исследования на млекопитающих начались лишь в 1962 г., однако исходя из их радиочувствительности специалисты предположили, что в “острый” период все виды млекопитающих получили за 1957-1958 гг. летальные дозовые нагрузки при плотности загрязнения 1000 Ки/км^2 и выше. Увеличилась смертность и снизилась продолжительность жизни животных, изменились пространственная и возрастная структура популяций. Таким образом, на 1 этапе в течение примерно 15 лет шел отбор наиболее радиорезистентных животных. Однако к исходу 1 этапа, когда сменилось около 30 поколений животных, популяции по многим показателям сравнялись с контрольными. Более того, дополнительное облучение животных показало, что летальные дозы для животных, обитающих в зоне ВУРСа, оказались в 1,3 раза выше, чем для контрольных. На клеточном и молекулярном уровнях биоиндикации воздействие загрязняющих факторов чаще всего скрыто от наблюдателя, однако его можно измерить с помощью молекулярно-биологических, биохимических и физиологических методов.

В настоящей работе представлены результаты исследования некоторых морфофункциональных и биохимических параметров у мышевидных грызунов, обитающих на территории ВУРСа. Показано, что хроническое действие радиации вызывает существенные сдвиги в системе антиоксидантной защиты организмов, активности ферментов углеводного, белкового обмена, процессов биотрансформации и детоксикации.

УШАКОВА Н.А.¹, АБРАМОВ В.М.², ХЛЕБНИКОВ В.С.²,
КУЗНЕЦОВ Б.Б.³, СЕМЕНОВ А.М.⁴, МЕЛЬНИКОВ В.Г.⁵

¹Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва, Россия

²Институт инженерной иммунологии, Любучаны, Московская обл., Россия

³Центр “Биоинженерия” РАН, Москва, Россия

⁴Кафедра микробиологии, Биофак МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁵Международный научно-технический центр, Москва, Россия

СВОЙСТВА БИОПЛЕНКИ *Lactobacillus plantarum*, ПОЛУЧЕННОЙ МЕТОДОМ ТВЕРДОФАЗНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

На рынке имеется большое количество продуктов функционального питания, фармпрепаратов, предназначенных для восстановления нарушенного биоценоза кишечника и содержащих живые полезные микроорганизмы – пробиотики. Пробиотики получают с помощью жидкофазного культивирования на питательных средах, методом, предложенным еще Л. Пастером в 19 веке. Однако в последние годы установлено, что бактерии, обитающие в природе, в значительной мере отличаются по свойствам от культур, полученных в «классических» лабораторных условиях. В природе бактерии растут и размножаются, образуя биопленку. Биопленка – это сообщество микроорганизмов, формирующееся на поверхности объектов внешней среды и тканей живых организмов, состоящее из микробных клеток и межклеточного матрикса. Учитывая, что полезные для здоровья человека микроорганизмы в природе также растут в виде биопленки, мы предприняли попытку получить *in vitro* биопленку пробиотического штамма *Lact. plantarum* 8-РА-3 и оценить возможность ее использования для восстановления нарушенной антибиотиками нормальной лактофлоры кишечника у мышей. В литературе описано немало способов получения биопленок, однако все они биотехнологически малоэффективны. Нами впервые была использована с этой целью технология твердофазного культивирования.

При твердофазном культивировании пробиотического штамма *Lact. plantarum* 8-РА-3 на пшеничных отрубях, пропитанных средой МРС, через 48 ч ферментации наблюдалось образование биопленки на частицах растительного носителя. При высушивании ферментированных лактобациллами отрубей происходило уменьшение

значения КОЕ в смывах с сухой массы с $23,0 \times 10^8$ КОЕ/г до менее, чем 10^4 КОЕ/г в двух- и трехсуточных образцах. Однако по данным флуоресцентной микроскопии в этих смывах, окрашенных с помощью Live/Dead Kit, более 40% некультивируемых бактерий были метаболически активными. В результате содержания мышей на рационе с введением в комбикорм сухой массы отрубей, ферментированных *Lact. plantarum* 8-РА-3 в течение 72 ч, отмечалось восстановление в толстой кишке животных нормального уровня лактобацилл, ингибированного интрагастральным введением антибиотика амикацина. Из фекалий таких мышей был выделен штамм, генетически идентичный штамму *Lact. plantarum* 8-РА-3. Полученные данные свидетельствуют о том, что штамм *Lact. plantarum* 8-РА-3, при выращивании его в виде биопленки на отрубях и последующем высушивании биомассы, переходит в некультивируемое состояние, но не теряет при этом жизнеспособности и биологической активности. Некультивируемые (покоящиеся) формы в биопленке *Lact. plantarum* 8-РА-3 могут эффективно преодолевать желудочно-кишечный барьер, а затем восстанавливать культивируемость и другие биологические функции, способствуя нормализации резидентной микрофлоры, нарушенной под влиянием антибиотиков. Результаты наших исследований свидетельствуют о целесообразности применения биопленок для создания медицинских пробиотических препаратов и продуктов функционального питания нового поколения.

УШАКОВА Н.А.¹, АБРАМОВ В.М.², ХЛЕБНИКОВ В.С.², МЕЛЬНИКОВ В.Г.³

¹ *Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н.Северцова РАН, Москва, Россия*

² *Институт инженерной иммунологии, Любучаны, Московская обл., Россия*

³ *Международный научно-технический центр, Москва, Россия*

ПОЛУЧЕНИЕ МЕТОДОМ ТВЕРДОФАЗНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БИОПЛЕНКИ *Lactobacillus plantarum* 8-РА-3 И ЕЕ СВОЙСТВА

В настоящее время имеется большое количество продуктов функционального питания, фармпрепаратов, предназначенных для восстановления нарушенного биоценоза кишечника и содержащих живые полезные микроорганизмы – пробиотики. Пробиотики получают с помощью предложенного еще Л. Пастером в 19 веке метода глубинного

культивирования. Однако в последние годы установлено, что бактерии, обитающие в природе, в значительной мере отличаются по свойствам от клеток культур, полученных в жидких питательных средах. В природе бактерии растут и размножаются, образуя биопленку. Биопленка – это сообщество микроорганизмов, формирующееся на поверхности объектов внешней среды и тканей живых организмов, состоящее из микробных клеток и межклеточного матрикса. Способ существования бактерий в биопленке активно исследуется. В основном изучают биопленки болезнетворных бактерий для того, чтобы научиться эффективно бороться с хронической инфекционной патологией. Недавно D. Williams и W. Costerton продемонстрировали неоспоримые преимущества биопленок стафилококков перед их лабораторными культурами при моделировании инфекционного процесса на животных. Учитывая, что полезные для здоровья человека микроорганизмы в природе также растут в виде биопленки, мы предприняли попытку получить *in vitro* биопленку пробиотического штамма *Lactobacillus plantarum* 8-PA-3 и оценить возможность ее использования для восстановления нарушенной антибиотиками нормальной лактофлоры кишечника у мышей.

Для получения биопленки нами была использована технология твердофазного культивирования. Твердофазные процессы применяются в биотехнологии для получения антибиотиков, ферментов, органических кислот, пищевых и кормовых добавок, биофармацевтических продуктов и др. Твердофазная ферментация характеризуется ростом микроорганизмов на влажных (уровень влажности ферментационной массы 30-75%) твердых субстратах в отсутствие свободной воды. В качестве субстратов для культивирования используется растительное сырье: зерновые, бобовые, отходы мукомольной, маслостойной, целлюлозно-бумажной промышленности, отруби, жмыхи. В данной работе пшеничные отруби (как твердый сухой носитель) пропитывали жидкой питательной средой MRS для лактобацилл. Особое внимание уделили вопросу выживаемости клеток при высушивании ферментационной массы, что имеет принципиальное значение для разработки технологии получения пробиотических препаратов нового поколения.

При твердофазном культивировании *Lactobacillus plantarum* 8R-A3 на пшеничных отрубях, к 48 ч образовалась биопленка на поверхности носителя. Продолжение ферментации вызвало падение количества КОЕ с 96% от начального общего числа клеток

до 8.8% к 72 ч. При повышении температуры с 37⁰С до 45⁰С, приводящем к высушиванию ферментационной массы, показатель КОЕ снижался до величины <10⁴. В сухих препаратах среди клеток, окрашенных с помощью LIVE/DEAD Kit, сохранилось до 40% бактерий с признаками живых при доминировании овоидных структур в 72-ч массе.

Полученные данные указали на то, что твердофазное культивирование лактобацилл с последующим высушиванием биомассы привело к образованию значительного количества некультивируемых, но жизнеспособных клеток. Переход пробиотиков в некультивируемое состояние может положительно сказаться на выживаемости бактерий при прохождении ими агрессивной среды желудка и тонкого кишечника. Но способны ли некультивируемые клетки восстанавливать репродуктивную функцию и исходный уровень биологической активности? Известно, что пассаж покоящихся форм патогенных бактерий через восприимчивый организм может привести к индукции у них культивируемого состояния. Для исследования данного вопроса было изучено влияние ферментированных пшеничных отрубей на эффективность восстановления уровня лактобацилл в фекалиях мышей, получавших и не получавших антибиотик амикацин. После содержания мышей на рационе с введением 0,05% высушенных 72-ч ферментированных отрубей, из толстой кишки выделен штамм, генетически идентичный *L. plantarum* 8R-A3. У животных с ингибированными амикацином кишечными лактобациллами восстановился их нормальный уровень. Предполагается, что *L. plantarum* 8R-A3 образует некультивируемые формы, реанимирующиеся при пассаже через животный организм и проявляющие пробиотическую активность. Биопленка, образованная при твердофазном культивировании, способствует выживанию клеток лактобацилл при высушивании ферментационной массы.

ФАДЕЕВА Е.О.

Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н.Северцова РАН, Москва, Россия

**ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ МИКРОСТРУКТУРЫ КОНТУРНОГО ПЕРА В
КОНТЕКСТЕ ПРОБЛЕМЫ ТАКСОНОМИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ
ПТИЦ В ЦЕЛЯХ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ**

В настоящее время в практике биологической экспертизы при идентификации того или иного вида птиц широко используются морфологические особенности оперения, в частности, тип оперения крыла (эутаксическое или квинтокубитальное, диастатаксическое или аквинтокубитальное). Более детальная идентификация таксона проводится по внешним морфологическим признакам отдельных перьев или одного пера (форма, размеры, пропорции). На фоне исчерпывающих описаний макроморфологических особенностей оперения практически неизученным остается строение микроструктуры (тонкого строения) перьев птиц. Вместе с тем, именно такие исследования позволяют не только выявлять специфичность строения элементов пера, отражающую адаптации птиц к условиям обитания, но и эффективно диагностировать виды по перьям и их фрагментам для решения задач биологической экспертизы в авиации и криминалистике.

С целью выявления основных видоспецифических характеристик тонкого строения пера, имеющих важное таксономическое значение, нами проведено сравнительно-микроскопическое исследование тонкого строения дефинитивных контурных птиц с применением сканирующего электронного микроскопа (Чернова и др., 2009; Фадеева, 2010, 2011; Фадеева, Бабенко, 2010, 2011; Фадеева, Чернова, 2010).

Для проведения сравнительного электронно-микроскопического анализа использовали наиболее информативные фрагменты пера — бородки I (бородки первого порядка) и бородки II (бородки второго порядка) контурной и пуховой частей опахала, препараты которых были приготовлены стандартным, многократно апробированным методом (Чернова и др., 2006). Подготовленные препараты напыляли золотом методом ионного напыления на установке Edwards S-150A (Великобритания), просматривали и фотографировали с применением сканирующего электронного микроскопа JEOL-840A (Япония), при ускоряющем напряжении 10 кВ.

В результате исследования были выявлены характеристики достаточно информативные в аспекте таксономической диагностики при комплексном анализе микроструктуры пера. Так, конфигурация поперечного среза основания бородки I специфична на уровне не только семейства, но и вида, и, безусловно, имеет диагностическое значение. Информативно строение кутикулы бородок I и, прежде всего, орнамент поверхности кутикулы: форма и рельеф ее клеток. Диагностическим признаком может служить и архитектура сердцевины, о которой можно судить, сопоставив форму полостей и перегородок на поперечном и продольном срезах бородки I, например, выявленные четкие видовые различия в конфигурации воздухоносных полостей. В структуре бородок II пуховой части контурного пера диагностическими признаками являются, прежде всего, конфигурация апикального края сегмента, а также специальные выросты базальной клетки.

Представленные характеристики могут использоваться для определения вида птиц, что существенно расширяет, при создании соответствующей базы данных, потенциальные возможности диагностики пера на основе его микроструктуры для целей биологической экспертизы.

ФАРХУТДИНОВ Р.Р.

Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия

ОКСИДАТИВНЫЙ СТРЕСС, СПОСОБЫ ВЫЯВЛЕНИЯ И КОРРЕКЦИИ

На основании анализа современных данных и результатов собственных исследований обсуждаются механизмы образования, физико-химические свойства свободных радикалов (СР), их значение в норме и при патологии, способы регуляции свободнорадикального окисления (СРО) в организме, причины нарушения и вытекающие следствия. Рассматриваются методы исследования, перспективы применения регистрации хемилюминесценции (ХЛ) для изучения процессов СРО.

Вторая половина 20 века ознаменовалась огромными достижениями в области исследования СРО, которые тесно связаны с именами отечественных ученых. Начальным этапом было изучение простых химических реакции, в ходе которых появлялись активные

частицы- СР. Оказалось, что и в биологических объектах, организме человека и животных постоянно протекают жизненно важные реакции с участием СР. Наиболее распространены реакции присоединения к кислороду последовательно от одного до четырех электронов в окислительных процессах, катализируемых ферментами класса оксигеназ. При этом образуются продукты, получившие обобщенное название –«активные формы кислорода» (АФК). Взаимодействие АФК с ненасыщенными жирными кислотами инициирует перекисное окисление липидов (ПОЛ), сопровождается появлением перекисных радикалов, которые вступают в реакции с новыми молекулами окисляющегося соединения. Конечными продуктами ПОЛ являются кетоны, альдегиды, другие токсические соединения, предельные углеводороды.

Под влиянием СРО меняются физико-химические свойства биологических мембран. Скорость СРО и содержание СР в организме в норме поддерживается на определенном уровне сложной, многоступенчатой системой регуляции. Её нарушение, недостаток или избыток СР, накопление токсических продуктов окисления является молекулярной основой развития различных патологических процессов, вызывает преждевременное старение, ведет к росту заболеваемости, инвалидности и смертности.

В последнее время в клинической практике начинают все шире использоваться антиоксиданты (АО)- природные и синтетические препараты, влияющие на СРО. Однако вопрос о целесообразности и четких показаний к их применению нельзя считать окончательно решенным. Кроме того, многие известные медикаментозные средства способны влиять на процессы СРО, что необходимо учитывать в повседневной врачебной практике.

Судить о состоянии СРО удастся по ряду признаков. Наличие свободных радикалов можно непосредственно обнаружить с помощью физических методов исследования. К ним, например, относится электронный парамагнитный резонанс (ЭПР), основанный на измерении магнитного момента образца и регистрация хемилюминесценции (ХЛ)- свечения, возникающего при взаимодействии радикалов.

Получить представление о СРО удастся и по косвенным признакам: измеряя концентрацию начальных, промежуточных и конечных продуктов, участвующих в реакциях окисления. Однако нестабильность СР, быстрый распад и включение в метаболизм продуктов СРО затрудняют их обнаружение в биологическом материале.

Регистрация ХЛ, как способ исследования СРО, выгодно отличается тем, что при минимальном количестве пробы позволяет выявить даже наиболее реакционноспособные, короткоживущие радикалы, которые другими методами не регистрируются. Измерение ХЛ ведется в естественных условиях, нет необходимости специальной и длительной подготовки материала к исследованию, во время которого количество СР и продуктов окисления может измениться. Это единственный метод исследования СРО, отвечающий всем требованиям, предъявляемым к экспресс способам анализа.

Уже первые попытки применения ХЛ методов исследования в биологии, медицине, сельском хозяйстве и т.д., свидетельствуют об уникальных их возможностях. Обращает внимание сочетание ценности и объективности получаемой информации с простотой, незначительными затратами времени и средств на проведение анализа. Применение этого метода дает возможность изучать участие СР в обмене веществ, в физиологических и патологических процессах, исследовать влияние на СРО физических, химических факторов, биологически активных соединений и т.д.

В заключении следует подчеркнуть, что совершенствование и внедрение в практику эффективных способов оценки состояния СРО остается актуальной проблемой, представляющей несомненный теоретический и практический интерес.

ФАТЕЕВА Е.В., МОКШИН Е.В., ЕМЕЛЬЯНОВА И.С., ЛУКАТКИН А.С.

Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, Саранск, Россия

ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ МИНЕРАЛЬНОЙ ОСНОВЫ СРЕДЫ И ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ПОБЕГООБРАЗОВАНИЕ *CYMBIDIUM HYBRIDS* В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Ассортимент декоративных растений с каждым годом расширяется за счет интродукции красивых дикорастущих видов и создания новых сортов. Современные сорта орхидей, полученные с использованием видов, происходящих из тропиков и субтропиков, занимают ведущее место в мировой цветочной индустрии. Под растения орхидных, выращиваемых на срез или как горшечные культуры, заняты значительные площади в хозяйствах Азии и в Европе. Современные цветоводы редко ограничиваются

выращиванием одного–двух видов простых в выращивании орхидей. В основном используются сорта гибридного происхождения, которые тяготеют к теплому содержанию. Широкое культивирование орхидных во многих странах обусловлено их высокой декоративностью, оригинальностью, многообразием форм и окрасок цветков, долголетием и длительным периодом цветения. В сравнении с большинством традиционных культур закрытого грунта многие высокодекоративные виды орхидных имеют преимущества: они цветут в осенне-зимний период, не требуют дополнительного освещения и высокой температуры воздуха. Одним из эффективных способов ускоренного получения ценного оздоровленного материала орхидных является их клональное микроразмножение *in vitro*.

Методы клонального микроразмножения, разработанные для ряда видов растений, убедительно показывают не только их преимущество перед традиционными методами размножения, но и особенность, которая заключается в том, что до сих пор эти методы базируются на эмпирических подходах и поэтому требуют спецификации основной методики. Эта особенность учитывается как при работе с определенными видами и сортами растений, так и при использовании определенных типов эксплантов, изолированных от исследуемых видов и сортов. Определяющим фактором, регулирующим органогенез в культуре *in vitro*, зачастую является концентрация минеральной основы среды. Биогенные элементы должны присутствовать в питательной среде в доступной форме. Как правило, ионы металлов, сера, фосфор и микроэлементы добавляют в среду в виде минеральных солей. Минеральная основа среды практически одинакова для большинства видов растений, культивируемых *in vitro*. Однако для некоторых видов, вводимых в культуру, готовые прописи имеющихся сред не подходят. Кроме того, большое значение имеет и время культивирования.

В связи с этим целью работы было выяснение влияния концентрации минеральной основы питательной среды Мурасиге-Скуга (МС) и сроков культивирования на образование побегов цимбидиума гибридного (*Cymbidium hybrids*). В качестве объекта использовали стерильные пробирочные растения. Посадку эксплантов (псевдобульбы) осуществляли на агаризованную (0,7%) среду по прописи Мурасиге и Скуга (рН 5,6–5,8) с добавлением, сахарозы (40 г/л), угля (0,1%), варьируя концентрацию минеральной основы

(полная, 1/2, 1/4, 1/8). Культивирование осуществляли в баночках объемом 150 мл при постоянном освещении белыми люминесцентными лампами и температуре 23–25 °С.

Через 16 недель культивирования оптимальное значение по формированию побегов было достигнуто на среде с 1/2 от полной МС – 4,4 шт./эксплант. Несколько ниже этот показатель был на средах с 1/4 и 1/8 МС – 3,7 и 2,3 шт./эксплант, соответственно. На полной среде формировалось в среднем 2,0 шт./эксплант.

При изучении влияния концентрации минеральной основы МС на длину побега установили, что максимальной она была на полной среде МС (8,5 мм). Снижение концентрации минеральной основы среды приводило к уменьшению длины побега. Так, на среде с 1/2 МС длина побегов составила 5,5 мм, а минимальный размер отмечен на среде с 1/8 солей МС – 2,4 мм.

Также была исследована динамика формирования побегов *de novo* в зависимости от длительности культивирования, путем сравнения морфометрических показателей на второй и четвертый месяцы после посадки. Установлено, что на средах с 1/4 и 1/8 МС количество побегов за этот период возросло почти в 2 раза, тогда как на средах с 1/2 МС и полным составом солей в большей степени увеличивалась длина побегов, но количество – лишь на 15%.

Таким образом, в результате исследований установлено, что выращивание цимбидиума гибридного на полной среде МС благоприятно влияет на длину формирующихся побегов, тогда как среда с 1/2 МС дает преимущество в количестве формирующихся псевдобульб. Увеличение сроков культивирования до 16 недель увеличивает выход побегов *de novo* в среднем на 40%

ФЕДОРЕНКО Б.Н.

Московский государственный университет пищевых производств, Москва, Россия

АДАПТАЦИЯ БИОТЕХНИКИ К НАНОМОЛЕКУЛЯРНЫМ БИОМЕМБРАННЫМ ТЕХНОЛОГИЯМ

В работе проведен анализ современного состояния фундаментальных и прикладных аспектов прогрессивных наномолекулярных биомембранных технологий, обеспечивающих повышение эффективности и экономичности биоиндустрии.

Практическая реализация наномолекулярных биотехнологий нуждается в принципиально новом поколении биотехники — мембранных биореакторах, которые представляют собой результат адаптирования технических систем к специфическим свойствам и особенностям биологических объектов. В работе рассмотрены принципы разработки мембранных биореакторов, функциональной особенностью которых является то, что протекающие в них процессы биосинтеза или биокатализа сопровождаются непрерывным выделением из реакционного пространства образующихся продуктов с помощью мембран, смещая при этом динамическое равновесие системы в сторону их образования, и тем самым существенно повышая продуктивность процесса.

Проанализированы особенности конструктивного устройства и принципов функционирования основных типов мембранных биореакторов: а) с выносной мембранной системой; б) со встроенной мембранной системой; в) с иммобилизованными на мембранах клетками или ферментами.

Рассмотрены технологические возможности нового метода культивирования микроорганизмов в мембранном биореакторе и представлена математическая модель этого процесса.

Жидкофазная мембранная система такого биореактора, обеспечивающая бесперебойное удаление продуктов метаболизма из биореактора через пористые селективные мембраны, и по сути, играющая роль искусственной почки, представляет собой пример адаптации оборудования к условиям наиболее благоприятного развития живых организмов в биотехнических системах.

Показаны технологические возможности мембранной аэрации в биореакторах, позволяющей исключить системы очистки и обеззараживания воздуха и газовых выбросов соответственно на входе и выходе биореактора, исключить пенообразование в процессе культивирования, повысить надежность асептики процесса и улучшить экологическую безопасность производства.

Газофазная мембранная система биореактора, обеспечивающая аэрацию культуральной жидкости с помощью диффузионных селективных мембран, и по сути, играющая роль искусственного легкого, представляет собой еще один пример адаптации оборудования к условиям наиболее благоприятного развития живых организмов в биотехнических системах.

Рассмотрены перспективы создания мембранных биореакторов для бесклеточного биосинтеза, концепция которого заключается в следующем: если во внутреннем пространстве биореактора, ограниченном полупроницаемыми мембранами, разместить набор очищенных клеточных компонентов, содержащий генетический материал в виде информационной РНК, транспортной РНК, белоксинтезирующих частиц рибосом, легко выделяемых из клетки, и некоторых белковых факторов, и к этой системе непрерывно подводить строительный материал белка - аминокислоты и энергию в форме аденозинтрифосфата (АТФ) и гуанозинтрифосфата (ГТФ), то в ней будет целенаправлено синтезироваться белок в соответствии с заложенной в биореактор матрицей - информационной РНК, содержащей генетический код. Для бесклеточного синтеза белка применяют мембранные биореакторы проточного типа, у которых на входе располагают ультрафильтрационную мембрану, пропускающую низкомолекулярные субстрат и энергоносители, а на выходе - микрофильтрационную, пропускающую синтезируемый белок. Примечательно, что из биореактора через мембрану выводится лишь синтезируемый белок, а остальные компоненты, участвующие в синтезе белка, задерживаются, несмотря на то, что теоретически они должны были бы также проникать через мембрану.

Жидкофазная мембранная система для бесклеточного синтеза белка, по сути, играющая роль искусственной клетки, представляет собой еще один пример адаптации оборудования к процессам, протекающим в живой природе.

Итак, адаптация конструктивных особенностей биотехники на основе методов бионики лежит в основе одного из основных перспективных направлений развития биотехнических систем.

Одним из результатов этого развития являются мембранные биореакторы – новое поколение биотехники для наномолекулярных биомембранных технологий, в которых, благодаря сочетанию в себе преимуществ биологических и мембранных процессов, создаются принципиально новые технологические возможности, и обеспечивается высокоэффективная и экономичная реализация биотехнологических процессов.

ФЕДОРОВА М.С., БАХИРЕВА О.И.

*Пермский национальный исследовательский политехнический университет,
Пермь, Россия*

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ОЧИСТКИ ПРИРОДНЫХ ВОД ОТ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ И СТРОНЦИЯ

Уральский регион в настоящее время представляет собой высокоразвитый агропромышленный комплекс. На фоне химического загрязнения природной среды он испытывает на себе самые разнообразные по генезису радиационные воздействия. На территории региона проводились массовые подземные технологические взрывы, испытания ядерного оружия, сосредоточено производство и хранение ядерных боеприпасов, проводится переработка ядерного горючего. Несмотря на все меры, связанные с радиационной безопасностью, техногенные радионуклиды продолжают поступать в окружающую среду.

Целью работы является выделение микроорганизмов, способных извлекать ионы стронция из природных вод, содержащих соли жесткости. В ходе работы были выполнены следующие задачи: выделение микроорганизмов способных поглощать стронций; исследование динамики роста полученной культуры; определение оптимальных условий жизнедеятельности культуры (диапазона устойчивости микроорганизмов к различным концентрациям Sr^{2+} и Ca^{2+}); определение глубины утилизации ионов стронция и кальция из растворов; изучение конкурентоспособности поглощения ионов кальция и стронция.

Для выделения чистых культур брали пробы почвы близ Ледяной пещеры и воды из р. Сылва и скважины для получения питьевой воды в г. Кунгур Пермский край. Причиной для выбора места забора проб послужил, тот факт, что в данных местах отмечено высокое содержание ионов кальция, магния и стронция. Также в данном районе находятся месторождения таких минералов, как гипс, кальцит, целестин и др. Таким образом, повышенное содержание данных ионов дает среду, в которой возможно существование микроорганизмов поглощающих ионы кальция, магния и стронция.

Накопительную и чистую культуры получали, руководствуясь стандартными методиками. В качестве твердой и жидкой питательных сред использовали мясопептонный

агар (МПА) и мясопептонный бульон (МПБ) соответственно. В результате получили восемь основных доминирующих культур.

Проверили чувствительность данных микроорганизмов к высоким концентрациям ионов кальция и стронция (от 1 г/л до 100 г/л) диско-диффузионным методом. Анализ показал, что все полученные микроорганизмы обладают крайне низкой чувствительностью к присутствию данных ионов, так как даже при концентрации 100 г/л во всех случаях по каждому иону происходило полное зарастание плотной питательной среды. В некоторых случаях наблюдался активный рост именно вокруг дисков, пропитанных раствором стронция и кальция. На основании полученных данных можно сделать вывод, что полученные микроорганизмы, несомненно, обладают сильной выносливостью, что позволяет надеяться на высокую поглотительную способность выведенных микроорганизмов к ионам кальция и стронция.

Далее исследовали способности микроорганизмов аккумулировать стронций и кальций из растворов, и конкурентоспособность их поглощения.

Исходная концентрация ионов стронция и кальция в средах составляла по 60 мг/л соответственно. Для изучения конкурентоспособности поглощения ионов кальция и стронция была приготовлена среда с концентрацией ионов стронция и кальция 1:10, потому что в природных водах примерно такое же соотношение концентраций ионов стронция и кальция.

Культивирование вели на орбитальных шейкерах при $T=25^{\circ}\text{C}$ и $V=180$ об/мин в течении трех суток, прирост биомассы фиксировали на КФК-2 при $\lambda=590$ нм. Измерение остаточной концентрации стронция осуществляли на атомно-абсорбционном спектрофотометр (ААС) - Thermo iCE 3500.

Изучение динамики роста выделенных культур показало, что все полученные микроорганизмы в той или иной степени способны поглощать ионы стронция и кальция. Наибольшее количество ионов было поглощено в стационарной фазе роста микроорганизмов.

Анализ данных показывает, что наибольшее количество стронция и кальция было поглощено культурой «Скважина I» в процессе роста клеток. При этом следует отметить, что максимальная сорбционная активность культуры проявляется в отношении ионов

кальция, но ненамного больше чем к ионам стронция. Это можно объяснить тем, что кальций более «привычен» для биологических систем, чем стронций.

Результаты эксперимента показали, что микроорганизмы «Скважина I» можно рассматривать как биосорбент в очистке природных вод от ионов стронция в присутствии солей жесткости.

ФЕДОТОВА В.Ю.¹, ИСЛАМОВ Р.Р.², РИЗВАНОВ А.А.¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

²Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ НА ОСНОВЕ АДЕНОВИРУСА ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ НЕЙРОНАЛЬНОЙ МОЛЕКУЛЫ КЛЕТОЧНОЙ АДГЕЗИИ NSAM

По данным ВОЗ средняя продолжительность жизни за последние 60 лет значительно увеличилась. А с увеличением продолжительности жизни стареет население и как следствие, проблема нейродегенеративных заболеваний приобретает внушительные масштабы. На сегодняшний день, существующие методы лечения дают лишь симптоматическое облегчение, не устраняя самой проблемы. Однако перед нами открываются большие перспективы, т.к. сейчас можно воздействовать на заболевание на уровне генов, используя разработки генной и генно-клеточной терапии.

Важным условием для проведения успешной генотерапии является эффективная доставка рекомбинантного гена в клетки-мишени и обеспечение его длительной и эффективной экспрессии. Однако адресная доставка генов пока является серьезной проблемой в генной терапии. Перспективными для генотерапии являются векторы на основе вирусов, в частности аденовирусов, обеспечивающие эффективную трансдукцию и относительно длительную экспрессию рекомбинантных генов. Аденовирусы способны трансдуцировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки. Также векторы на основе аденовирусов не встраиваются в геном клетки-хозяина, тем самым не вызывая, инсерционного мутагенеза и злокачественной трансформации клетки.

Нейрональная молекула клеточной адгезии (neural cell adhesion molecule – NCAM) играет решающую роль в развитии нейронов, синаптической пластичности и регенерации. NCAM — гомофильно связывающийся гликопротеин, экспрессируется на поверхности нервных клеток, клеток нейроглии, скелетных мышечных волокон. Межклеточные взаимодействия NCAM в нейроонтогенезе и посттравматической регенерации обеспечивают выживание и миграцию нейронов, направленный рост нейритов, синаптогенез. NCAM не только «склеивает» клетки друг с другом, но также способен индуцировать внутриклеточные сигнальные каскады, приводящие к различным событиям, включая рост аксонов и выживание нейронов.

Целью нашей работы стало создание рекомбинантного аденовирусного экспрессионного вектора на основе pAD/CMV/V5-DEST (далее pAd), экспрессирующего нейрональную молекулу клеточной адгезии (NCAM). Для этого была применена технология Gateway-клонирования (Invitrogen, США).

Рекомбинантный аденовирус получали в несколько этапов. Для начала, полученный методом ПЦР, фланкированный *att* сайтами ПЦР-продукт кДНК целевого гена *ncam-1* использовали для рекомбинации по технологии Gateway (Invitrogen, США) с вектором-донором (pDONR₂₂₁) для создания исходного клона (pDONR₂₂₁-NCAM). Затем путем рекомбинации исходного клона с вектором-назначения (pAd/CMV/V5-Dest), получили экспрессионный клон (pAd-NCAM). Полученными конструкциями трансфецировали клетки линии НЕК293А (human embryonic kidney 293A). Эффективность трансфекции подтвердили с помощью иммуноцитохимического анализа с применением специфичных антител (CD56-PE, ООО "Сорбент"). Затем путем трансфекции клеток линии НЕК293А были получены репликативно-дефектные вирусные частицы Ad5-NCAM. В дальнейшем, полученные конструкции будут использованы для модификации мононуклеарных клеток пуповинной крови человека, что предположительно повысит адресную миграцию генетически модифицированных клеток в нервную ткань и позволит повысить эффективность генно-клеточной терапии нейродегенеративных заболеваний.

ФЕКЛИСТОВА И.Н., БЕЛЯЕВ С.А.

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

**ВЛИЯНИЕ ФЕНАЗИН-1,6-ДИКАРБОКСИЛАТА, СИНТЕЗИРУЕМОГО
БАКТЕРИЯМИ *P. CHLORORAPHIS* КМБУ PHZ 139, НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ
КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ГЛИОМЫ ЧЕЛОВЕКА U-251 MG**

Важнейший современный подход при создании новых противоопухолевых лекарств основан на идентификации молекулярных мишеней, специфических для раковой клетки, и направленном поиске ингибиторов этих мишеней, что должно обеспечить более эффективную селективную (менее токсичную) терапию опухолей. Ведется активный скрининг индукторов апоптоза опухолевых клеток, ингибиторов ангиогенеза, важнейших ферментов нуклеинового обмена – топоизомераз I и II, теломеразы, протеинкиназ различного типа, регулирующих клеточный цикл, а также направленный поиск препаратов, преодолевающих лекарственную резистентность опухолей или предотвращающих ее развитие. Известно, что некоторые из антибиотиков феназинового ряда обладают противоопухолевой активностью и действуют на молекулярном уровне, вызывая повреждения ДНК путем интеркаляции между парами азотистых оснований, а также нарушением вторичной спирализации ДНК за счет взаимодействий с топоизомеразой II. Так, например, бис(феназин-1-карбоксиамид) оказывает ингибирующее действие на раковые клетки человека (P388 лейкемии, легочной карциномы), XR5944 – соединение феназинового ряда – подавляет развитие рака груди и т.д.

В настоящей работе исследована способность антибиотика феназин-1,6-дикарбоксилата, выделенного из культуральной жидкости *P. chlororaphis* КМБУ phz 139, подавлять рост клеток глиомы человека линии.

В экспериментах *in vitro* использовали перевиваемую линию клеток U-251 MG – глиомы человека, полученную из Коллекции культур клеток Института цитологии (Санкт-Петербург). Линия клеток имеет следующие характеристики: количество полиплоидов – 1,4%, кариология: $2n=46$, предел изменчивости 39–52 хромосом, модальное число хромосом 48, 50; канцерогенна.

Для изучения цитотоксического эффекта и времени его проявления в динамике роста культуры клеток глиомы человека U-251 MG в питательную среду вносили

препараты антибиотика в концентрациях 0,625–10 мкг/мл. Проводили подсчет живых клеток через 24, 48 и 72 ч после внесения феназинов и исследовали особенности морфологии клеток.

Через 24 ч после внесения феназин-1,6-дикарбоксилата, синтезируемого *P. chlororaphis* КМБУ phz 139, в культуры не выявлено выраженных изменений в морфологии клеток, рисунке монослоя по сравнению с контрольной культурой (в питательную среду которой не вносили препараты антибиотиков).

Действие феназин-1,6-дикарбоксилата, синтезируемого бактериями *P. chlororaphis* КМБУ phz 139, проявлялось через 48 ч и носило двоякий характер: дозы антибиотика в пределах 0,625-3,750 мкг/мл оказывали цитостатический эффект. При дальнейшем увеличении дозы феназин-1,6-дикарбоксилата наблюдался цитоцидный эффект: 100 %-ная гибель клеток наступает при 10 мкг/мл (IC50 7,1 мкг/мл). Цитотоксический эффект антибиотика выражался в вакуолизации клеток и отслоении части клеток от поверхности флакона.

Таким образом, впервые установлено, что антибиотик феназин-1,6-дикарбоксилат, выделенный из культуральной жидкости *P. chlororaphis* КМБУ phz 139, способен оказывать прямой цитотоксический эффект в отношении клеток глиомы человека линии U-251 MG.

ФЕКЛИСТОВА И.Н., КУЛЕШОВА Ю.М., МАКСИМОВА Н.П.

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

ИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ МЕТАБОЛИТОВ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ РОСТОСТИМУЛИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ БИОПРЕПАРАТА СТИМУЛ

Группу бактерий, обладающих совокупностью полезных для растений свойств, принято обозначать как PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria), т.е. ризобактерии, способствующие росту растений. Среди PGPR различных таксономических групп особого внимания заслуживают ризосферные бактерии рода *Pseudomonas*, все изученные механизмы положительного влияния которых на растения можно подразделить на два типа. В первом случае подразумевается прямая стимуляция роста растений, обусловленная

синтезом регуляторов роста типа индолилуксусной кислоты, гиббереллинов, улучшением фосфорного питания растений путем перевода некоторых солей в растворимые соединения, фиксацией атмосферного азота, регуляцией синтеза этилена корнями, повышением устойчивости к солям тяжелых металлов и т.д. Ко второму типу относится опосредованная стимуляция в результате вытеснения и подавления почвенных фитопатогенов за счет синтеза антибиотиков и сидерофоров данной группой бактерий.

В НИЛ молекулярной генетики бактерий Белорусского государственного университета разработан биологический препарат Стимул на основе ризосферных бактерий *P. fluorescens* S-32, предназначенный для стимуляции роста и развития растений. Целью настоящей работы явилась идентификация факторов, обеспечивающих ростостимулирующий эффект данного биопрепарата.

Концентрацию гиббереллинов, синтезируемых бактериями, определяли флуориметрически. Установлено, что уровень синтеза гиббереллинов бактериями *P. fluorescens* S-32 соответствует $15,23 \pm 0,41$ мг/л.

Выделение гиббереллинов было проведено с помощью ТСХ. Путем сопоставления значения *R_f* компонентов, а также их окраски с данными, представленными в литературных источниках, установлено, что бактерии *P. fluorescens* S-32 синтезируют следующие гиббереллины: А6, А5, А4 и комплекс А1/А3.

Помимо биохимической идентификации гиббереллинов был проведен биотест с использованием семян латука *Lattuca sativa*. Установлено, что все компоненты, идентифицированные нами, как гиббереллины, способны стимулировать рост гипокотилей латука: длина подсемядольного колена в контрольном варианте составила 3,4 мм, а у растений, обработанных гиббереллинами, варьировала от 8,7 до 11,3 мм, причем наибольшая длина гипокотилия наблюдалась у растений, семена которых были обработаны комплексом гиббереллинов А1/А3.

Известно, что усиление роста корней является одним из основных маркеров, по которым судят об эффективности применения бактерий PGPR-группы. Быстрое образование корневой системы путем удлинения первичных корней или пролиферации боковых и придаточных корней выгодно для молодых растений т.к. способствует их закреплению в почве и увеличению потребления воды с растворенными питательными веществами. Большинство ризосферных бактерий синтезирует индолилуксусную кислоту,

что приводит к стимуляции роста корней. Количество ИУК в культуральной жидкости *P. fluorescens* S-32 было определено спектрофотометрически и составило $7,31 \pm 0,27$ мкг/мл; при внесении в ростовую среду 50 мкг/мл триптофана (предшественника ИУК) концентрация гормона увеличивалась в 2,3 раза и достигала $16,8 \pm 0,31$ мкг/мл.

Исследования показали, что обработка семян рапса бактериями *P. fluorescens* S-32 привела к увеличению длины корней по сравнению с контрольным вариантом (без обработки) в 1,28 раза (с 49,77 мм до 63,71 мм). Кроме того, наблюдалось увеличение числа придаточных корней в 1,31 раза. Следует отметить, что сходный эффект наблюдался при обработке семян раствором ИУК (10 мкг/мл).

Одним из факторов, определяющих стимуляцию роста растений, может являться синтез бактериями сидерофоров. Было установлено, что бактерии *P. fluorescens* S-32 синтезируют до 570 мкг/мл пиовердина, а также доказана ростостимулирующая активность пигмента: обработка растений рапса чистым препаратом пиовердина привела к увеличению массы корней и проростков на 13 % и 15 % соответственно.

Таким образом, идентификация факторов, определяющих ростостимулирующую активность биопрепарата Стимул, показала наличие гиббереллинов и ИУК, а также пиоверидинов в составе культуральной жидкости бактерий *P. fluorescens* S-32.

ФИЛИППОВА Е.И., БАРДАШЕВА А.В., ДУРЫМАНОВ А.Г., ТЕПЛЯКОВА Т.В.

Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

ГЕМАГГЛЮТИНИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ВОДНЫХ ЭКСТРАКТОВ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ

Базидиальные грибы тысячелетиями используются в народной медицине из-за широкого спектра биологически активных веществ. По литературным данным (Цивилева О.М. и др., 2000; Степанова Л.В. и др., 2009) известно, что экстракты грибов могут проявлять гемагглютинирующую активность, которая является показателем присутствия лектинов. Данные соединения найдены практически во всех живых организмах, стоящих на самых разных уровнях эволюционного развития. Наиболее полно изучены лектины

растительного происхождения, которые нашли широкое применение в различных областях биологических и медицинских исследований. Лектины грибов обладают различными биологическими функциями, такими как противоопухолевая, иммуномодулирующая, антипролиферативная, противомикробная. Они способны активировать макрофаги и лимфоциты, ингибировать ВИЧ-1 обратную транскриптазу, регулировать клеточный рост (Yanrui Li et al., 2010). В настоящее время лектиновая активность высших грибов относительно мало изучена.

Нами был проведен первичный скрининг гемагглютинирующей активности шести образцов экстрактов, приготовленных из культивированного мицелия и плодовых тел базидиальных грибов, проявляющих противовирусный эффект в клеточной культуре MDCK в отношении вируса гриппа.

Материалы и методы исследования. В работе использовались экстракты грибов *Inonotus obliquus*, *Ganoderma applanatum*, *Fomes fomentarius* из культивированного мицелия и плодовых тел. Подготовка образцов из культивированного мицелия осуществляли путем фильтрования биомассы грибов через капроновый фильтр для отделения ее от культуральной жидкости. Мицелий измельчали на гомогенизаторе в дистиллированной воде в соотношении 1:5, с последующей обработкой на ультразвуковом дезинтеграторе при амплитуде 24 мкм. Для отделения водорастворимой фракции образцы центрифугировали при 4000 об/мин в течение 20 минут. Образцы из плодовых тел измельчали на мельнице (диаметр сита 0,25 мм) и выдерживали на кипящей водяной бане в течение 6 часов. Полученные экстракты центрифугировали 20 минут при 4000 об/мин.

Реакцию гемагглютинации проводили в 96-луночном планшете, с лунками V-образной формы. Исследовали 12 разведений шести образцов. Для этого в каждую лунку вносили по 100 мкл фосфатно-солевого буферного раствора (рН = 7,3-7,5). В первые колонки добавляли по 100 мкл водных экстрактов 6-ти исследуемых образцов и осуществляли 12 последовательных 2-кратных разведений с равными объемами (по 100 мкл в каждой лунке). Затем, в каждую лунку вносили по 40 мкл эритроцитов морской свинки с концентрацией $83,2 \times 10^6$ эр/мл. Оставляли на 4 часа в холодильнике при температуре 4°C.

Результаты исследования. В ходе проведенного эксперимента было выявлено, что гемагглютинирующей способностью обладают образцы *Inonotus obliquus* (биомасса

склероция) и *Ganoderma applanatum* (культивированный мицелий). Одна гемагглютинирующая единица (ГАЕ) соответствует 5 мкг/мл сухого вещества *Inonotus obliquus*, 40 мкг/мл *Ganoderma applanatum*.

В настоящее время продолжаются исследования по изучению гемагглютинирующей активности водных экстрактов и некоторых соединений из вышеназванных грибов с целью выявления роли лектинов в противовирусной активности базидиомицетов.

ФИЛИППОВА Л.В., БЫКОВА А.А., БЫСТРОВА Е.Ю., НОЗДРАЧЕВ А.Д
Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

РОЛЬ ЭКСПРЕССИИ TLR4 В НЕЙРОНАХ ЭНТЕРАЛЬНОЙ ЧАСТИ МЕТАСИМПАТИЧЕСКОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ КРЫСЫ

Нейроны энтеральной части метасимпатической нервной системы в нормальных условиях, по-видимому, не подвергаются прямому воздействию со стороны содержимого кишки. Тем не менее, некоторые патологические состояния инфекционной или неинфекционной природы могут приводить к нарушению целостности эпителия. В этом случае бактерии и вирусы могут проникать через эпителиальный слой с помощью специализированных клеток, расположенных в слизистой оболочке и Пейеровых бляшках, т.е. в тех местах, где имеется тесный контакт клеток иммунной системы и нервных волокон.

Взаимодействие между энтеральными нейронами и микроорганизмами может быть основой для стимуляции нейроиммунномодулирующих механизмов, принимающих участие в кишечном гомеостазисе. Известно, что важная роль в противоинфекционной защите принадлежит системе врожденного иммунитета и одному из важнейших ее компонентов – Толл-подобным рецепторам (TLR), которые в ответ на инфекционные агенты запускают каскад внутриклеточных сигнальных путей, приводящих к продукции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов и хемокинов, и реализации воспалительного ответа.

С целью выяснения возможного участия энтеральных нейронов в этих процессах исследовали экспрессию рецепторов TLR4 в нейронах миэнтерального и подслизистого сплетений различных отделов кишки крыс, которую выявляли иммуногистохимически. Эксперименты проводили на самцах крыс линии Спрэг-Дули, которые содержались в стандартных условиях вивария, получали пищу и питье *ad libitum*. Для выявления экспрессии TLR4 использовали первичные кроличьи антитела к рецепторам TLR4 крысы (1:300, Abcam), первичные моноклональные мышинные антитела к нейрофиламентам 200 (1:1500, Sigma), вторичные антитела Alexa Fluor 488 козы против IgG кролика (1:1000, Invitrogen) и вторичные антитела Alexa Fluor 568 осла против IgG мыши (1:1500, Invitrogen). Для оценки интенсивности окрашивания проводили морфометрические исследования с использованием конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 710 фирмы Carl Zeiss (**Центр коллективного пользования "Конфокальная микроскопия"** ФНБУ ИФ РАН) и программы компьютерного анализа изображений ImageJ. Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью программы Statistica 6.0. Для сравнения отдельных групп использовали непараметрический критерий Манна-Уитни.

Результаты проведенного исследования показали, что TLR4-иммунореактивные нейроны и нервные волокна присутствуют в подслизистом и мышечном слоях всех изученных участков кишки. При этом двенадцатиперстная кишка по сравнению с другими участками оказалась наиболее плотно иннервирована TLR4-иммунореактивными клетками. На каждом 20 мкм срезе в межмышечном сплетении двенадцатиперстной кишки обнаруживалось от 40 до 130 TLR4-иммунореактивных клеток, в подслизистом сплетении – от 30 до 110. В тощей кишке их число в обоих сплетениях не превышало 40. В мышечном и подслизистом слое ободочной кишки в среднем присутствовало по 50 окрашенных нейронов. По критерию Манна-Уитни ($P \leq 0.05$) число TLR4-иммунореактивных клеток в двенадцатиперстной кишке достоверно больше, чем в тощей и ободочной. Таким образом, выявлена определенная тенденция к уменьшению числа экспрессирующих TLR4 нейронов от проксимального к дистальному отделу кишки.

Наличие экспрессии Толл-подобных рецепторов в нейронах метасимпатической нервной системы свидетельствует о том, что микроорганизмы могут потенциально вступать во взаимодействие с нейронами ее энтеральной части. Таким образом, сенсорные

нейроны через Толл-подобные рецепторы, по-видимому, способны напрямую участвовать в быстрых защитных механизмах кишечной стенки, типа активации локального аксон-рефлекса и высвобождения различных медиаторов и нейропептидов в ответ на местный патологический процесс.

Работа поддержана грантом РФФИ № 12-04-00665.

ФРОЛКОВА К.С.

Пермский научный исследовательский политехнический университет, Пермь, Россия

ЭНАНТИОСЕЛЕКТИВНАЯ МИКРОБНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ АМИДОВ АРОМАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Некоторые ароматические нитрилы и амиды являются естественными метаболитами бактерий и растений, а трансформирующие их бактерии распространены в различных типах почв. В то же время, ароматические нитрилы и амиды являются сложными субстратами для биокатализаторов. Микроорганизмы, способные к биотрансформации таких соединений, могут быть использованы для биокаталитического синтеза ценных фармацевтических препаратов (ибупрофен, напроксен, кетопрофен и др).

Ибупрофен ((RS)-2-(4-изобутилфенил)-пропионовая кислота) является наиболее популярным и действенным нестероидным противовоспалительным средством (НПВС) на рынке лекарств. Известно, что биологической активностью обладает только S-изомер, тогда как R-ибупрофен неактивен. В отличие от химического синтеза биокаталитический метод может позволить производить активный S-энантиомер в один этап, без сложных процессов разделения, в мягких условиях, без примесей и с хорошим выходом.

Цель – выделение и идентификация почвенных бактерий, трансформирующих ароматические нитрилы и амиды, а также анализ промежуточных продуктов их метаболизма.

В ходе работы были проанализированы образец почвы естественной среды города Соликамск села Городище с глубины 3-20 см, образцы почв ила реки Ива, ила очистных сооружений.

. Выделение культур проводилось методом прямого посева на селективную среду, содержащую в качестве источника углерода - 0,1% глюкозу, в качестве источника азота - 10 мМ ацетонитрил. В результате селекции почвы Соликамского района было выделено более 30 изолятов, способных трансформировать первичные нитрилы. Однако наибольшую нитрилгидратазную и амидазную активность имели 5 штаммов.

По совокупности морфологических признаков, метода окраски по Граму, тесту с КОН, стандартных хемотаксономических и биохимических признаков, а также ПЦР-анализа было установлено, что культуры относятся как к грамположительным культурам, так и к грамотрицательным, в частности, к роду *Rhodococcus* и к роду *Pseudomonas*.

Как известно, для бактерий характерны два основных пути метаболизма нитрилов: 1) одностадийный гидролиз, осуществляемый ферментом нитрилазой с образованием соответствующей кислоты; 2) гидратация ферментом нитрилгидратазой до амида с последующим гидролизом амидазой амида до кислоты. Что было подтверждено в ходе ПЦР-анализа. Ген, отвечающий за выработку фермента нитрилазы, среди данных штаммов обнаружен не был. Однако был обнаружен ген, вырабатывающий фермент нитрилгидратазу и амидазу. Из этого следует, что данным культурам присущ двустадийный гидролиз нитрилов.

Была проведена реакция трансформации ибупрофен амида (конечная концентрация в реакционной среде – 2 мМ). В результате анализа промежуточных продуктов метаболизма с помощью хромато-масс-спектрометрии было установлено, что из 5 активных культур только штамм *R. erythropolis* 5-212 способен трансформировать ибупрофен амид до ибупрофена, который является нестероидным противовоспалительным средством. В результате проведенных реакций трансформации 1,5 мМ ибупрофен амида штаммом *R. erythropolis* 5-212 в течение 12 часов при 50°C, выход продукта составлял 80,3%.

В результате селекции из речного ила было отобрано 30 изолятов, из ила очистных сооружений – 31.

Методом спектрофотометрии определена нитрилгидратазная активность выделенных изолятов. Было установлено, что при росте выделенных из ила р. Ива культур на среде с ПА наибольшую нитрилгидратазную активность проявляли 12, а на среде с АцН – 8 штаммов. Такое же соотношение наблюдалось и для изолятов ила очистных

сооружений: при культивировании на среде с ПА наибольшая нитрилгидратазная активность определена для 10, а на среде с АцН – для 7 штаммов.

Методом окраски по Грамму и теста с КОН была определена грам-принадлежность выделенных культур. Установлено, что большинство почвенных изолятов принадлежит к грамположительной группе микроорганизмов, тогда как грамотрицательные встречались реже.

В дальнейшем будет проведена трансформация амидов с активными штаммами из почвы реки Ива и ила очистных сооружений.

ХАЗЕЕВА Г.Д., МИРСАЯПОВА И.А.

ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерство здравоохранения и социального развития Российской Федерации, Уфа, Россия

РАЗРАБОТКА ВЫСОКОТЕХНОЛОГИЧНЫХ СПОСОБОВ ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ ВНЕБОЛЬНИЧНЫХ ПНЕВМОНИЙ (ВП)

Внебольничные пневмонии исключительно распространены. В Российской Федерации - это порядка 14-15% в общей структуре заболеваемости или более 1,5 миллионов заболевших в год. Показатели летальности населения при этом занимают пятое место в общей структуре частоты летальных исходов.

Типичными возбудителями данного заболевания являются *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae*, выявляемыми в 30-50% и 10% случаев заболевания соответственно. Несколько реже (3-5%) при ВП обнаруживают *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*. Однако не исключается, что истинная частота встречаемости и видовой состав возбудителей ВП могут существенно отличаться от приведенных литературных данных, поскольку для лабораторного их выявления и идентификации используются методы, информативность которых в зависимости от вида бактерий, исследуемого материала, фазы заболевания и т.д., может варьировать в очень широких пределах.

Наиболее проблематичным в настоящее время является низкая чувствительность и специфичность применяемых методов лабораторной этиологической диагностики, их продолжительность - до 3 недель, а также распространенная практика приема антибактериальных препаратов до обращения за медицинской помощью. В результате установить этиологический диагноз и, соответственно, провести эффективную этиотропную терапию не удается у 50-70% заболевших ВП. Помимо указанного низкая эффективность этиологической расшифровки ВП определяет высокую частоту развития осложнений, неэффективность противоэпидемических мероприятий, приводит к формированию антибиотикорезистентности и возрастанию частоты внутрибольничных инфекций.

Цель работы - разработка новых диагностических систем и повышение эффективности диагностики внебольничных пневмоний различной этиологии с помощью современных молекулярно-генетических методов.

Впервые подобраны и апробированы олигонуклеотидные праймеры к гену 16S рРНК и факторам патогенности следующих возбудителей внебольничной пневмонии: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*. На их основе впервые сконструированы новые тест-системы для достоверной этиологической расшифровки ВП методом ПЦР в классическом варианте и ПЦР в режиме «реального времени», отличающиеся высокой чувствительностью, возможностью количественного определения специфических фрагментов ДНК исследуемых пневмопатогенов в клиническом материале, автоматической регистрацией и интерпретацией полученных результатов.

Разработанный и испытанный на клиническом материале способ обнаружения возбудителей ВП (*S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *M. catarrhalis*) методом ПЦР позволяет применять его для уверенной этиологической расшифровки этиологии ВП.

ХАЛИНА Е.В., ВАРАКИН Е.А., ТУПИН П.А., РУДАКОВА В.А.,

ЧУХЧИН Д.Г., НОВОЖИЛОВ Е.В.

Северный арктический федеральный университет им. М.В. Ломоносова,

Архангельск, Россия

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ СТОЧНЫХ ВОД ЦЕЛЛЮЛОЗНО-БУМАЖНОГО ПРОИЗВОДСТВА НА ФЕРМЕНТАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ ОЧИСТНЫХ СООРУЖЕНИЙ

Биологические методы играют главную роль в технологии очистки основной массы сточных вод, что обусловлено технологическими и экономическими преимуществами этих методов по сравнению с механическими или физико-химическими.

Возможности методов биологической очистки к настоящему времени далеко не исчерпаны. Одним из основных путей интенсификации биологической очистки сточных вод является использование биологических систем с прикрепленной (иммобилизованной) микрофлорой. Прикрепление микроорганизмов к твердому носителю увеличивает продолжительность их пребывания в реакционной среде, значительно уменьшается прирост избыточной биомассы, вследствие чего снижаются затраты на утилизацию больших объемов активного ила. Таким образом, отпадает необходимость в рециркуляции биомассы, принципиально неизбежной при очистке сточных вод в традиционных аэротенках, работающих на дисперсной биомассе.

В основе процессов биологической очистки сточных вод лежит биохимическое окисление органических загрязнений микроорганизмами активного ила. Клетки микроорганизмов перерабатывают загрязнения сточной жидкости за счет выделяемых ими ферментов (главным образом за счет дегидрогеназ). Количество и активность дегидрогеназ определяет скорость и глубину процессов биологического окисления, поэтому для биологической очистки сточных вод актуальной является количественная оценка влияния сточных вод на дегидрогеназную активность ила – основной показатель, характеризующий его качество.

Как известно из литературы, биоплёнка активного ила в развитом состоянии представляет собой довольно объёмные по толщине образования. Проникновение кислорода вглубь их сильно затруднено, поэтому большинство микроорганизмов

био пленки функционируют в анаэробных условиях. Именно по значению дегидрогеназной активности можно контролировать процесс биологической очистки.

Единственная известная из технической литературы методика количественной оценки дегидрогеназной активности имеет ряд существенных недостатков: многостадийность, трудоёмкость, большая длительность определения - около 1,5 часов. На кафедре биотехнологии САФУ была разработана новая методика определения дегидрогеназной активности, принцип которой основан на измерении скорости восстановления метиленового синего. Использование метиленового синего в качестве единственного реагента позволяет значительно ускорить выполнение анализа, дает возможность автоматизировать процесс определения дегидрогеназной активности, повысить воспроизводимость и точность анализа.

Для определения дегидрогеназной активности в автоматическом режиме на кафедре биотехнологии САФУ была разработана установка. Принцип работы установки основан на количественном определении скорости цветной ферментативной реакции в суспензии микроорганизмов. Устройство ячейки позволяет контролировать температуру в пробе, определять оптическую плотность, производить перемешивание, исключая попадание кислорода воздуха в среду. Эта установка дает возможность многократно (десятки и сотни раз) выполнять измерение дегидрогеназной активности в одной пробе биологического материала. Весь анализ проходит за 5...10 минут, погрешность определения менее 5%. В настоящее время установка патентуется, имеется положительное решение о патенте на полезную модель.

С помощью новой методики становится возможным экспресс-обнаружение живых активно функционирующих микроорганизмов в мутных и сильнозагрязненных производственных средах, что ранее было невозможно. Именно такой средой является суспензия активного ила.

Для исследования отбирали активный ил, иммобилизованный на насадке (био пленка) из биореактора производства биологической очистки ОАО «Архангельский ЦБК». Дегидрогеназную активность находили как тангенс угла наклона касательной к кривой, отражающей зависимость показаний прибора от продолжительности реакции. Закономерности протекания окислительно-восстановительных реакций под действием

дегидрогеназ имеют сложный характер и несут информацию не только о содержании дегидрогеназ, но и о соотношении анаэробных и аэробных микроорганизмов биопленки.

Предложены новые характеристики оценки процесса биологической очистки, которые позволяют контролировать и регулировать биохимическое окисление микроорганизмами биопленки загрязнений сточных вод.

ХАЛТУРИН М.Б.

Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Киев, Украина

ЭКСПРЕСС КЛАСИФИКАЦИЯ ВОДОЕМОВ КОМПЛЕКСНОГО НАЗНАЧЕНИЯ

В связи с тем, что на данный момент отсутствует единая система классификации водоемов комплексного назначения, в частности малых (до 1000 га), целью нашей работы было проанализировать известные классификации и на их основе создать более универсальную экспресс-методику для их классифицирования. На данный момент существует только узконаправленные классификации водоемов, большинство из которых разрабатывались давно (до 60-70-х годов XX столетия), и не отвечают новым задачам, в связи с изменениями экологического и технологического состояния окружающей среды.

За основу данной работы были взяты классификации: Д. Е. Хатчинсона (1957), С. П. Китаева (1984), О. Ф. Якушка (1981, 1995), П. В. Тюрина (1961), В. Шеперклауса (1936), ГОСТ 17.1.1.02-77.

Для создания экспресс классификации были задействованы гидрологические, гидроморфологические, ихтиологические, а для более полной информации о водоеме – дополнительно гидрохимические и гидробиологические методики исследования.

Согласно предложенной классификации водоемы делятся:

на подклассы: по площади (большие – свыше 10 тыс. га, средние – 1-10 тыс. га, малые – до 1 тыс. га), по глубине (большие – свыше 4 м, средние – 2-4 м, малые – до 2 м), по форме водоема (большие – неправильной формы, много заливов, средние – извилистые, малые – правильной формы), по водообмену (большие – свыше 5 водообменов в год, средние – от 0,1-0,5 водообменов в год, малые – до 0,1 водообмена в год), по количеству комплексов использования (большие – свыше 4 направлений, средние – 3 направления,

малые – 2 направления использования), по ихтиологическому разнообразию (большие - свыше 10 видов, средние – 5-10 видов, малые – до 5 видов);

на значения: М – малые, С – средние, Б – большие. Используя первые буквы значения каждого подкласса, согласно их параметров, получаем класс водоема.

В предлагаемой классификации в отличие от ГОСТа 17.1.1.02-77 есть преимущество в возможности возврата от класса водоема к его приблизительным исходным данным. Классификация разрабатывалась и дорабатывается как теоретически, так и практически на водоемах комплексного назначения лесостепной зоны Украины.

Таким образом, предлагаемая экспресс классификация позволит систематизировать рыбохозяйственные водоемы комплексного назначения, что даст возможность получить необходимую объективную информацию о них и определиться с приоритетностью использования водоемов разными потребителями.

ХАМАШКЕЕВА М.Т., БУБЕЕВ А.Т., ЦЫРЕНОВ В.Ж.

*Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления,
Улан-Удэ, Россия*

СКРИНИНГ ЭФФЕКТИВНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ ЦЕЛЛЮЛАЗ

Необходимость исследования механизма биоконверсии растительного сырья обусловлена прогрессирующим дефицитом невозобновляемых источников энергии и материалов. Перспективным с экологической точки зрения, является целлюлозосодержащее сырьё.

Целлюлозолитические микроорганизмы являются основными деструкторами целлюлозы в природе. Большая часть целлюлозы в природе разлагается анаэробными микроорганизмами. В промышленных целях используется сравнительно небольшое количество видов микроорганизмов, в основном относящихся к роду *Trichoderma*. Известно, что одним из очень активных продуцентов целлюлаз является микроскопический гриб *Trichoderma reesei*. Однако очень большая длительность культивирования, сравнительно низкая продуцирующая способность большинства

грибных микроорганизмов создают необходимость дальнейших поисков перспективных продуцентов.

Цель исследования: выделение и поиск эффективных продуцентов целлюлозолитических ферментов.

Задачи исследования:

1. Скрининг микроорганизмов, обладающих целлюлозолитической активностью;
2. Исследование динамики роста культуры микроорганизма и его целлюлозолитической активности по отношению к карбоксиметилцеллюлозе.

Экспериментальная часть

Для выделения аэробных целлюлозолитических бактерий использовали селективную среду Гетчинсона, для анаэробов – среду Имшенецкого. Для преимущественного роста целлюлозолитических бактерий в качестве единственного источника углерода вносили хроматографическую бумагу в количестве 10 г/л, температуру культивирования поддерживали на уровне 55 °С.

Проведён скрининг целлюлозолитических микроорганизмов, выделенных из навоза крупного рогатого скота. В результате отобрано 5 бактериальных штаммов аэробного типа дыхания. Изучение целлюлазной активности отобранных штаммов по изменению концентрации восстанавливающих сахаров показало, что наиболее активным является штамм № 13.

Определяли экзо- и эндо-целлюлазную активности выделенного микроорганизма по отношению к карбоксиметилцеллюлозе и восстанавливающие сахара по методу Шомоди-Нельсона. Целлюлазную активность биомассы и культуральной жидкости определяли в течение 7 суток.

На основании совокупности исследованных морфологических, культуральных, физиолого-биохимических характеристик исследуемой культуры выделенный штамм отнесен к роду *Bacillus*. Для достоверной идентификации видовой принадлежности необходимо провести дополнительное изучение его филогенетических характеристик.

В ходе эксперимента отслеживали рост культуры *Bacillus spp* путём подсчёта количества колоний, выросших на селективной питательной среде Гетчинсона. Эксперимент проводили в течение 7 суток.

Максимальное накопление биомассы наблюдается на 1-е и 2-е сутки. Резкое увеличение биомассы коррелируется с результатами исследования ферментативной активности, увеличение которой также наблюдается на первые сутки.

Это можно объяснить высокой активностью культуры по отношению к единственному источнику углерода – целлюлозе. В первые сутки синтезируются ферменты, обладающие эндоцеллюлазной активностью, т.е. гидролизующие целлюлозу, осуществляя ее деполимеризацию, диспергирование и в определенной степени разрушение кристаллической структуры – происходит подготовка субстрата.

Уменьшение КОЕ на 3-и сутки, возможно, объясняется адсорбцией клеток на волокнах целлюлозы, т.к. из рисунка 3 видно, что ферментативная активность биомассы клеток достигает максимума на 5-е сутки.

В работе показана целлюлозолитическая активность культуральной жидкости штамма *Bacillus* sp. №13, которая достигает максимального значения на 1-е (2,2 мг/мин) и 5-е (1,9 мг/мин) сутки культивирования, а также активность внутриклеточных целлюлаз, максимальное значение которых наблюдалось на 5-е сутки (1,27 мг/мин).

ХАХАЛЕВА А.С., СОКОЛОВА Г.Ф.

Государственное научное учреждение Всероссийский научно – исследовательский институт орошаемого овощеводства и бахчеводства, г. Камызяк, Россия

ИЗУЧЕНИЕ ЗАЛЕЖНЫХ ЗЕМЕЛЬ ДЛЯ ВВОДА В СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЙ ОБОРОТ

В Астраханской области в дельте Волги предполагается введение в эксплуатацию значительного количества залежных (брошенных) земель, которые находятся в таком состоянии разное время. Нашими исследованиями предусматривалось выявление засоренности залежных участков, изучение в динамике агрохимических и физических почвенных изменений, с целью определения наиболее предпочтительных земель для ввода в активный сельскохозяйственный оборот. А также рассмотрено использование сорной растительности на различных по продолжительности залежных землях в качестве кормов для скота.

В результате проведенных исследований установлено, что с увеличением продолжительности залежи до пяти лет общее количество сорняков уменьшается в 1,5 раза; свыше десяти лет – в 2 раза. Рассматривая процентное соотношение однолетних и многолетних сорняков на различных по длительности залежам видно, что на однолетней залежи преобладают однолетние сорняки. На длительных по срокам залежах в 3 раза возрастает количество многолетних сорняков, которые способствуют увеличению общей сырой массы сорно-полевой растительности в 1,5-1,9 раза.

С увеличением срока залежи общее количество сорняков значительно уменьшается. Соответственно снижается количество органических остатков, поступающих в почву. Содержание гумуса на десятилетней залежи, в среднем на 0,4% меньше, чем на однолетней залежи. На залежных землях в результате биологического закрепления возможно накопление азота. Так, после годичного пребывания участка в залежи, содержание легкогидролизуемого азота, в среднем 1,35 раза превышает содержание его на старых залежах.

Обогащение верхнего слоя почвы фосфором связано с деятельностью растений, поглощающих корнями соединения фосфорной кислоты из глубоких слоев почвы и частично оставляющих фосфаты при отмирании в верхнем слое, где сосредоточена основная масса корней. Наибольшее накопление подвижного фосфора к осеннему обследованию происходит на однолетней залежи. Содержание фосфора увеличивается на 24%. Соответственно, на 12% и 10% его больше на пятилетней и десятилетней залежах.

Залежные земли, находясь, длительное время без искусственного орошения, превращаются в зоны, обязательным элементом которых является засоление почвы. Процессы соленакопления всегда в большей или меньшей степени обязаны испарению (осадков выпадает от 120 до 230 мм, испаряемость достигает 600-900 и более, то есть в 4-5 раз больше). И в условиях засушливого климата накопившиеся в почвах и грунтовых водах массы вторичных соединений (соли, глинистые минералы) имеют тенденцию к сохранению даже после прекращения процессов соленакопления. Нашим южным районам характерно почти полное отсутствие периодов сезонного рассоления. Исследования показали повышенное содержание суммы водорастворимых солей на десятилетней залежи, особенно в конце жаркого лета.

Анализируя значения плотности сложения почвы на залежных землях в течение вегетации, можно сказать, что на однолетней залежи по всей исследуемой глубине они наименьшие – от 1,18 до 1,29 г/см³.

Удельная масса почвы на залежных землях практически одинакова на однолетней и пятилетней залежах 2,64-2,66 г/см³.

Вследствие небольшого количества осадков и высокой испаряемости в почве создается большой дефицит влаги, вызывающий засыхание некоторых растений уже в середине лета. На десятилетней залежи по всему исследуемому горизонту в июле зафиксирована самая низкая влажность почвы – 5-13%, которая не способствовала прорастанию на ней сорной растительности. Больше влаги, в среднем на 2-5% , отмечено на однолетней залежи.

При сравнении физических показателей почв различных залежных земель видно, что десятилетняя залежь менее предпочтительна для возделывания сельскохозяйственных культур.

По питательности существенной разницы между залежами не выявлено, в среднем она составила 0,17 к.ед./кг. По содержанию переваримого протеина при этом следует отметить однолетнюю залежь (42,5 г/к.ед.). Длительные залежи отличаются значительным накоплением валовой энергии, превышающим в среднем в 3,6 раза содержание ее на однолетней залежи.

Установлено, что наилучшие показатели химического состава (содержание сырого протеина, жира, золы, клетчатки и БЭВ) сорные растения (кормовые травы) имеют на однолетней залежи. Существующие кормовые угодья, ввиду присутствия на них в значительных количествах эфемеров, характеризующихся ранним использованием, не могут обеспечить поголовье скота полноценными.

Таким образом, проведенный агрохимический анализ почв залежных земель разной продолжительности позволяет утверждать, что предпочтение следует отдавать 3-5-летним залежам. При вводе таких участков в производственный процесс, с соблюдением всех рекомендаций агрофитоценозы способны давать высокие урожаи сельскохозяйственных культур.

ХАЦАЕВА Р.М.

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем
экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва, Россия*

РАЗВИТИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ АДАПТАЦИЙ ЖЕЛУДКА САЙГАКА В ПРЕНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ

В исследованиях было прослежено развитие обменных и пищеварительных функций желудка плодов сайгака с помощью гистологических, гистохимических и биохимических методов.

Исследования показали, что камеры желудка у сайгака, с начала своего формирования участвуют в углеводном обмене, о чем свидетельствует наличие большого количества гликогена в слизистой оболочке всех камер желудка уже у 45-дневных плодов. С началом дифференцировки структур слизистой оболочки сычуга начинается изменение локализации гликогена и уменьшение его количества. В преджелудках ранних плодов гликоген выявляется в пузырьчатых клетках эпителия. Характер его локализации говорит о расходовании на процессы дифференцировки морфологических структур слизистых оболочек. Несмотря на расходование гликогена на дифференцировку, его количество в верхних пузырьчатых клетках на протяжении плодного периода увеличивается, что свидетельствует о его использовании для общих нужд плода, заменяя тем самым печень. К рождению, с повышением гликогендепонирующей функции печени, количество гликогена в преджелудках значительно снижается.

Об участии камер желудка в общем обмене плода свидетельствует накопление жидкого содержимого в полостях камер с момента их образования, до заглатывания амниотической жидкости и начала секреторной деятельности желез сычуга. В раннеплодный период наблюдается образование большого количества вакуолей в эпителии, способствующих транспорту веществ. По мере дифференцировки слизистой и развития на ее поверхности гликокаликса, образование вакуолей затрудняется, и выделение веществ происходит через межклеточные пространства. К рождению экскреторная функция слизистой оболочки камер желудка уменьшается. Этому способствует и включение амниотрофного питания в позднеплодный период путем заглатывания амниотической жидкости.

Вслед за обменными, включаются пищеварительные функции желудка плода с развитием желез в сычуге. Первые признаки секреции гастронов появляются в середине раннеплодного периода. В состав их секрета в это время входят: гликоген, нейтральные гликопротеины, следы липазы и пепсина. Позже появляются кислые гликопротеины. Активность пепсина в сычуге нарастает постепенно до позднеплодного периода. Активность липазы повышается равномерно. Усиление активности ферментов к рождению способствует более активному участию слизистой оболочки в пищеварительных процессах. О транспорте веществ свидетельствует наличие в эпителии камер желудка ферментов: липазы и фосфатаз, локализующихся по клеточным границам эпителиального пласта, в эндотелии кровеносных сосудов и нервных клетках.

Таким образом, проведенные исследования показывают развитие физиологических адаптаций желудка плодов сайгака в пренатальном онтогенезе через участие в обменных и пищеварительных процессах, обеспечивающих питание плода амниотрофным и гемотрофным путями, благодаря их экскреторной способности и ферментативной активности, а также формированию защитных свойств поверхности слизистой оболочки с образованием гликокаликса.

ХАШИМОВА З.С., КАХАРОВА К.А., КУЗНЕЦОВА Н.Н.

Институт биоорганической химии им. акад. А.С. Садыкова АН РУз,

Ташкент, Узбекистан

РОЛЬ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР В ИССЛЕДОВАНИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Клеточные культуры находят все более широкое применение в исследовании биологически активных веществ. При использовании клеточных культур, как правило, бывает нетрудно установить, что при определённой концентрации добавленное в культуру вещество находится в контакте с клетками в течение данного периода времени. Это обеспечивает получение реальных значений скорости включения или метаболизма исследуемых соединений.

В работе изучено влияние низко- и высокомолекулярных соединений и выявлено цитотоксическое действие ряда алкалоидов и гликопротеидов растений на различные типы растительных и животных клеточных культур. Действие веществ исследовали в логарифмической и стационарной фазах роста клеток по включению ^3H - тимидина в клетки, подсчету живых клеток и МТТ- тесту. Выявлено, что некоторые низкомолекулярные вещества, выделенные из растений, проявляют острую цитотоксическую активность, т.е. в дозах 10 мкг/мл и 1 мкг/мл гибель клеток составило более 90% в первые часы введения веществ.

Установлена совокупность структурно-функциональных свойств экстензино- и лектиноподобных белков хлопчатника.

Показана полифункциональность экстензиноподобного белка, т.е. помимо структуроподдерживающей конформации, белок проявляет цитотоксическое, дозозависимое влияние, действующее на S-период клеточного деления. Для этого впервые в культуре клеток в качестве инструмента был использован метод сочетанного действия клинических противоопухолевых препаратов, действующих на митоз и S- период клеточного деления и показано, что экстензиноподобные белки хлопчатника преимущественно действуют на S- период клеточного деления.

Для выявления роли олигосахаридных фрагментов в составе экстензиноподобного белка последние были дегликозилированы. Для определения биологической активности дегликозилированный экстензиноподобный белок вводили в клетки меланомы В-16 в логарифмической фазе роста клеток в дозе 100 мкг/мл. Действие белка определяли в цитотоксическом тесте по включению ^3H – тимидина. Показано, что цитотоксичность белка более выражена в случае его дегликозилирования. Из этих данных следует, что при дегликозилировании структура гликопротеида претерпевает определенные конформационные перестройки, вследствие чего меняется и биологическая активность. Предполагаем, что в белке антенны сахаров, «узнающие» и в дальнейшем осуществляющие связь с клетками – мишенями находятся в более выгодном конформационном (стерическом) состоянии и, вследствие этого, увеличиваются места посадки белка на клеточной поверхности.

Впервые показана способность экстензиноподобных белков хлопчатника вызывать агрегацию клеток.

Нами также изучается активность ряда ферментов под действием веществ.

ХОРИН А.Н., НАЗАРЕНКО Л.В.

ГБОУ ВПО "Московский городской педагогический университет", Москва, Россия

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ШКОЛЬНОГО ЭКОЛОГИЧЕСКОГО ОБРАЗОВАНИЯ

Преобладание потребительского отношения к природе сопровождало человечество на всех этапах его существования. Однако, только сейчас, это отношение стало рассматриваться как причина возникновения экологических проблем в локальном, региональном, государственном и планетарном масштабах. На всех уровнях предпринимаются попытки прогнозировать, предупреждать и улучшать экологическую обстановку. Несмотря на это, данная проблема не разрешается, и с каждым днем становится более реальной. Первой причиной этого можно считать то, что доминирующий прагматизм является основой товарно-денежных отношений в современном мире. Попытки интегрировать в данные отношения мероприятия по охране природы носят малоэффективный характер. Второй причиной, является отсутствие информации о позитивных результатах проводимых природоохранных мероприятий. Третьей – глобальность разрабатываемых мероприятий и уровни их рассмотрения не позволяют отдельно взятому гражданину определить свое место в решении экологических проблем.

Определению личностного статуса гражданина должно способствовать экологическое просвещение, позволяющее на основе полученных знаний сформировать и развить у учащихся внутреннюю мотивацию позитивной поступочной деятельности по отношению к природе.

Исходя из того, что трудно определить роль учащихся в разрешении экологических проблем, при структурировании учебного материала основное внимание необходимо уделять рассмотрению локальных и региональных экологических проблем местности, где проживает обучающийся. Такое перемещение акцента на экологические проблемы своей местности, позволяет определить причины, уровень, последствия конкретного нарушения в отношениях человека с окружающей средой. Видение местной экологической проблемы будет способствовать ее анализу и определению путей ее разрешения. При этом очевидной

является роль каждого учащегося в разрешении экологического конфликта в масштабах двора, улицы, микрорайона, сквера, лесопарка и др.

Экологическое образование предполагает не только передачу экологических знаний в ходе обучения. Важным является экологическое воспитание подрастающего поколения. Основным акцент при этом должен быть направлен на формирование внутренней мотивации личности, способности и потребности к позитивной поступочной деятельности к объектам природы. Важно, чтобы учащиеся понимали, что природа является не объектом потребления, а субъектом охраны и заботы. Субъектно-субъектные отношения между человеком и природой должны складываться на основе общепринятых этических норм и правил, которые, перефразировав известное изречение, можно сформулировать следующим образом: «Поступай с природой так, как хочешь, чтобы поступали с тобой».

Необходимо отметить, что формирование внутренней мотивации личности, способности и потребности к позитивной поступочной деятельности к объектам природы является важнейшей задачей экологического образования. Формирование позитивной поступочной деятельности по отношению к объектам природы не укладывается в рамки строго регламентированного учебного процесса. Так, как формирование внутренней мотивационной сферы начинается намного раньше, чем изучение экологии в школе, возникает необходимость расширения образовательного пространства в рамках общеобразовательного учреждения. Одним из подходов к такому расширению может быть привлечение родителей к совместной экологической деятельности. Однако не следует при этом полагаться на собственную инициативу родителей. Им очень трудно выработать собственную стратегию экологического воспитания детей. Необходима совместная деятельность родителей и педагогического коллектива школы в вопросе экологического образования. Совместная природоохранная деятельность, личный пример родителей и учителей, видение результатов своего труда будут способствовать формированию внутренней позиции учащихся, определять их значимость в разрешении экологических проблем.

Таким образом, формирование этических норм по отношению к природе необходимо начинать с младшего школьного возраста и постоянно развивать в течение всего образовательного процесса в школе с учетом возрастных психологических особенностей учащихся.

ХОЛЯВКА М.Г., КОВАЛЕВА Т.А., ВОЛКОВА С.А.,

ХРУПИНА Е.А., АРТЮХОВ В.Г.

Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

ПОЛУЧЕНИЕ ФРУКТОЗЫ ИЗ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОКАТАЛИЗАТОРА НА ОСНОВЕ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ИНУЛИНАЗЫ

Исследования в области получения высокостабильных гетерогенных биокатализаторов на основе иммобилизованных ферментов приобретают все большую актуальность. При промышленном масштабировании каталитических процессов гетерогенный режим их проведения является экономически более выгодным по сравнению с гомогенными технологиями, так как при этом значительно упрощается и удешевляется весь производственный цикл. Особое значение в настоящее время имеют исследования по иммобилизации инулиназы (КФ 3.2.1.7), которая может применяться в производстве углеводных продуктов диетического назначения. Исследования иммобилизованной инулиназы в ближайшие годы, возможно, помогут расширить наши представления о процессе ферментативного гидролиза полисахаридов и усовершенствовать существующие технологические пути получения фруктозы.

Цель нашего исследования заключалась в получении гетерогенного ферментного препарата на основе иммобилизованной инулиназы из *Helianthus tuberosus*, предназначенного для получения углеводов диетического назначения из экстрактов инулинсодержащих растений. Для решения поставленной задачи было необходимо осуществить поиск наиболее перспективного носителя для иммобилизации инулиназы из *Helianthus tuberosus*, изучить физико-химические и кинетические свойства гетерогенных препаратов, определить более перспективные растения для получения из их экстрактов фруктозы в промышленных условиях.

Объектами исследования были фракции белка, выделенные из клубней *Helianthus tuberosus*, проявляющие инулиназную активность. В качестве субстрата использовали инулин фирмы MP biomedical. Содержание белка в пробах определяли методом Лоури, каталитическую активность фермента измеряли спектрофотометрически резорциновым

методом. Подготовку ионитов к иммобилизации осуществляли путем 4-кратной кислотнo-щелочной обработки, иммобилизацию фермента проводили по стандартной методике.

Нами был предложен адсорбционный способ иммобилизации инулиназы на ряде синтетических катионитов и анионитов, позволяющий сохранять до 80,4 % (при связывании с матрицей КУ-2) активности нативного фермента. Показано, что ряд ионообменных смол (АВ-17-2П, КУ-2, КУ-2-8чС, АВ-16-ГС, АМ 21А, ЭДЭ-10П, АН-12П, ИМАС-НР, PUROLITE) и волокон (ВИОН КН-1, ВИОН АН-1 и КОПАН-90) может применяться в качестве носителей для адсорбции инулиназы.

В ходе проведенных исследований были подобраны оптимальные условия функционирования гетерогенных биокатализаторов на основе инулиназы из *Helianthus tuberosus*, иммобилизованной на синтетических ионообменных смолах КУ-2, КУ-2-8чС и АВ-17-2П, исследованы их физико-химические свойства и кинетические аспекты реакции гидролиза инулина. Установлено, что перспективными условиями для промышленного применения фермента, иммобилизованного на всех исследуемых носителях, являются температура 60-70 °С и рН от 5 до 7. Показано, что высокое сродство к субстрату проявляет энзим, адсорбированный на катионите КУ-2. Продемонстрировано, что при 10-кратном использовании гетерогенных образцов на основе КУ-2, КУ-2-8чС и АВ-17-2П их активность не изменялась.

Новые технологии комплексной переработки экстрактов растений могут дать мощный импульс развитию различных областей биотехнологии, поэтому мы проанализировали ряд подходов к получению инулинсодержащего экстракта из клубней топинамбура (*Helianthus tuberosus*). Рассмотрев данные других авторов и учитывая результаты, полученные в нашей лаборатории, мы выбрали для работы изложенную ниже методику.

Предварительно высушенный растительный материал тщательно промывали и измельчали, затем добавляли дистиллированную воду в соотношении 1 часть растительной биомассы и 9 частей воды. Далее препарат инкубировали при 70 °С в течение 45 мин, затем его фильтровали для удаления балластных веществ. Эту схему мы применяли для получения экстрактов из топинамбура (*Helianthus tuberosus*), цикория (*Cichorium intybus*), девясила (*Inula helenium*), лопуха (*Arctium lappa*), чеснока (*Allium*

sativum), одуванчика (*Taraxacum officinale*), подсолнечника (*Helianthus annuus*), лука (*Allium cepa*).

Полученные результаты показывают, что иммобилизованный на КУ-2 препарат инулиназы проявляет максимальную каталитическую способность при гидролизе экстрактов клубней топинамбура, корней цикория и девясила, которые, по этой причине, являются перспективными растительными объектами для промышленного использования с целью получения фруктозы ферментативным путем.

ХОМУТОВ С.М.^{1,3}, ШУТОВ А.А.^{1,3}, БИРИХ К.², ДОНОВА М.В.^{1,3}

¹*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН,
Пушино, Россия*

²*Metgen Oy, Финляндия*

³*ООО Фарминс, Пушино, Россия*

ГИДРОКСИЛИРОВАНИЕ ДЕГИДРОЭПИАНДРОСТЕРОНА БАКТЕРИАЛЬНЫМИ ЛАККАЗАМИ

Лакказы (benzenediol:oxygen oxidoreductases, E.C.1.10.3.2), полиядерные медь-содержащие оксидазы, катализируют окисление широкого спектра органических соединений с восстановлением молекулярного кислорода до воды, что делает их привлекательными биокатализаторами различных биопроцессов: делигнификации и отбеливания бумаги, детоксификации и обесцвечивания красителей в текстильной промышленности, разложения ксенобиотиков, очистки сточных вод (Riva, 2006; Baldrian,2006; Rodriguez Couto and Toca Herrera, 2006; Guardina et al.,2010; Madhavi and Lele, 2009).

Перспективным процессом представляется окисление стероидных соединений с помощью лакказ при невысоких температурах в водных растворах. Однако, литературные данные по окислению стероидов лакказ медиаторными системами (ЛМС) ограничиваются димеризацией стероидных гормонов с фенольной структурой А-цикла (Tanaka, 2009, Suzuki, 2003, Yarovolov, 1994, Nicotra, 2004).

Целью данной работы было изучение возможности структурной модификации нефенольных стероидов с помощью ЛМС. В частности, изучали возможность окисления аллильного водорода при C7 у 3 β -гидрокси-андрост-5-ен-17-она (ДГЭА) с целью получения биологически активных гидроксированных производных. Препараты на основе 3 β ,7 α -дигидроксистероидов применяются в терапии нейродегенеративных заболеваний, иммунных расстройств, в качестве антиглюкокортикоидных агентов, антиконвульсантов и антидепрессантов (Dray, Cotillon, 1999). Ранее нами было предложено использование 7-гидроксипроизводного ДГЭА в качестве ключевого соединения в комбинированном синтезе производных витамина D (Lobastova et al., 2009). Таким образом, окисление 3 β -ол- Δ^5 -стероидов с помощью ЛМС может быть рассмотрено в качестве пути синтеза стероидных структур с широким спектром биологической активности.

В работе использовали рекомбинантную бактериальную лакказу из *Bacillus subtilis*, полученную по оригинальной технологии (Метген, Финляндия). В качестве медиаторов в ЛМС были тестированы синаповая кислота, 4'-гидрокси-3',5'-диметоксиасетофенон, 1-гидроксибензотриазол, N-гидрокси-ацетанилид, 4-гидрокси-3,5-диметоксибензальдегид, 2,2,6,6-тетраэтил-1-пиперидин-1-оксил. Для создания стабильных высокодисперсных систем липофильного стероида в водных растворах использовали мицеллярное и молекулярное капсулирование субстрата с помощью Tween 20 и метилированного β -циклодекстрина, соответственно. Мониторинг процесса трансформации проводили методами ТСХ и ВЭЖХ. Контроль лакказной активности проводили стандартными спектрофотометрическими методами по динамике окисления ABTS.

ЛМС трансформацию проводили при термостатированном перемешивании (250 об/мин) при 50 $^{\circ}$ C в колбах с рабочим объемом 20мл и 100 мл в течение 72 часов. Лакказная активность реакционной смеси составляла 0.5 ед. на 1 мг стероида.

Установлено, что ЛМС катализирует окисление ДГЭА с образованием 3 β ,7 α - и 3 β ,7 β -дигидроксиандрост-5-ен-17-она в качестве основных продуктов трансформации. При этом в отсутствие медиаторов гидроксированные продукты не обнаруживались. Наиболее эффективными медиаторами были 1-гидроксибензотриазол и 4'-гидрокси-3',5'-диметоксиасетофенон.

Таким образом, впервые показано образование 7-гидроксипроизводных 3-гидрокси- Δ^5 -стероидов с помощью лакказ-медиаторных систем. Дальнейшие работы будут

направлены на изучение возможности регио- и стереоспецифического окисления других нефенольных стероидов с помощью бактериальных и грибных лакказ.

ХИСАМОВА А.И., ЮГИНА Н.А., МИХАЙЛОВА Е.О., ШУЛАЕВ М.В.

Казанский национальный исследовательский технологический университет,

Казань, Россия

АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ГУМИНОВОГО ПРЕПАРАТА НА РОСТ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВХОДЯЩИХ В СОСТАВ МИКРОФЛОРЫ АКТИВНОГО ИЛА

Действие биологически активных веществ, используемых в сверхнизких концентрациях, которые по своим свойствам близки к природным регуляторам роста, представляет интерес для специалистов в области биотехнологии для решения задач, связанных с повышением продуктивности, качества и адаптивного потенциала, как сельскохозяйственных растений, так и решения задач в области защиты окружающей среды.

Целью исследования был анализ влияния гуминового препарата Б на рост микроорганизмов с целью оптимизации процесса биологической очистки сточных вод.

В качестве объекта исследований была выбрана культура бактерий *Bacillus megaterium*, входящих в состав микрофлоры активного ила очистных сооружений. Изучение влияния гуминового препарата непосредственно на рост бактерий осуществлялось на жидкой среде, содержащей пептон. Конечные концентрации препарата в среде составляли $1 \cdot 10^0$, $1 \cdot 10^{-1}$, $1 \cdot 10^{-2}$, $1 \cdot 10^{-3}$ и $1 \cdot 10^{-4}$ г/л; в качестве контроля использовалась среда без гуминового препарата. Результаты исследований показали, что применение гуминового препарата Б стимулирует рост микроорганизмов на 8-32 ч роста в концентрациях $1 \cdot 10^{-1}$, $1 \cdot 10^{-2}$ г/л на 16-30 % и 26-47% относительно контроля, соответственно. Внесение в среду гуминового препарата в концентрациях $1 \cdot 10^{-3}$, и $1 \cdot 10^{-4}$ г/л, приводило на 8-24 ч к снижению роста бактерий на 12 и 24 % относительно контроля, соответственно. В тоже время на 32-48 ч роста гуминовый препарат оказывал ингибирующее воздействие на рост культуры микроорганизмов во всех концентрациях.

Максимальный эффект наблюдался для концентраций $1 \cdot 10^{-1}$ и $1 \cdot 10^{-2}$ г/л. Исходя из этого, можно предположить, что данный препарат способен различное действие на бактерии, что требует дальнейшего подбора концентраций и изучения влияния гуминового препарата на рост и жизнедеятельность как данных микроорганизмов, так и других составляющих биоценоза активного ила.

ХОХЛОВА И.Ю.¹, ЖДАНОВА О.С.², ЧУБИК М.В.¹

¹*Национальный исследовательский Томский политехнический университет, Томск, Россия*

²*Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия*

ИССЛЕДОВАНИЕ ПИОЦИАНИНА В КАЧЕСТВЕ ПЕРСПЕКТИВНОЙ АНТИБИОТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ

Систематическое применение антибактериальных препаратов в ветеринарии и сельском хозяйстве, неконтролируемый прием антибиотиков среди населения, привело к распространению антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов. Поэтому в настоящее время практический интерес представляет модификация представителей известных групп антибиотиков с целью получения субстанций с более ценными свойствами. Базой для такого решения может стать пиоцианин – антибиотик феназинового ряда, выделяемый *Pseudomonas aeruginosa* в процессе естественной жизнедеятельности.

Целью данного этапа работы является исследование свойств пиоцианина, в задачи входит оптимизация способа его выделения и поиск возможных путей модификации.

Пиоцианин - водорастворимый пигмент, обладающий бактерицидным действием, продуцируемый синегнойной палочкой (*Pseudomonas aeruginosa*) [1].

В работе использовались водные фильтраты, полученные из культуральной жидкости посредством стерилизующей фильтрации на базе лаборатории кафедры микробиологии и вирусологии СибГМУ. Пиоцианин, содержащийся в растворе экстрагируют от органических остатков хлороформом (соотношение 1:2). Затем производят извлечение пиоцианина в водную фазу экстракцией 0.1М HCl, после чего pH раствора доводят до нейтрального значения с использованием 1 N NaOH, затем снова экстрагируют хлороформом. Для более полного извлечения пиоцианина экстракцию

проводят дважды. После этого раствор концентрируют вакуум-испарителем и сушат на воздухе [2]. Чистота полученного пиоцианина подтверждена методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) (элюент толуол:ацетон 3:1). Для подтверждения полученной структуры был проведен анализ газовой хроматографии масс-спектрометрии (ГХМС).

Пиоцианин относится к антибиотикам-антоганистам клеточного дыхания. Обладая способностью легко проникать внутрь бактериальных клеток и вступать там в окислительно-восстановительные реакции, принимая электроны от глутатиона и NADH и превращаясь в относительно стабильные анионы, пиоцианин вызывает генерацию активных форм кислорода (O^{2-} , $OH\cdot$ и H_2O_2), имеющих высокую реакционную способность, результатом чего является индукция окислительного стресса и последующая гибель микроорганизмов [4].

Для первичного исследования абиотических свойств пиоцианина был проведен опыт с использованием метода перпендикулярных штрихов [3].

Из лабораторных исследований видно, что пиоцианин наиболее эффективен в отношении грамположительных бактерий (*St. aureus*). Этот результат не может быть конечным, так как продуцент вещества и тест-организмы выращивали на одной среде, хотя известно, что одна и та же среда не всегда пригодна для продуцента антибиотика и тест-организмов.

На данном этапе лабораторных исследований можно сделать вывод, что *Pseudomonas aeruginosa* является продуцентом легкодоступного антибиотика, практически не использовавшегося ранее. Выделение пиоцианина не требует особых условий культивирования продуцента, методика зарекомендовала себя как доступная и легковоспроизводимая.

Пиоцианин представляет собой широкий спектр возможностей для изучения его свойств. Полученные результаты являются основой для дальнейших, более детальных исследований, которые предполагают изучение зависимости выхода пиоцианина от времени культивирования и состава питательной среды, сравнение с уже известными антибиотиками, определение области и способа его применения.

В перспективе исследования предполагается модификация молекулы пиоцианина химическими методами, опираясь на механизм его действия. Это позволит повысить его

антибиотические свойства и получить принципиально новую фармакологическую субстанцию.

Работа выполнена при финансовой поддержке ГК 3.308.2012 и ГК 16.512.11.2127.

ХОХОЛОВ Ю.А., ОЗЕРЕЦКОВСКИЙ Н.А., НИКИТИНА Т.Н.,
СНЕГИРЕВА И.И., ЗАТОЛОЧИНА К.Э., АЛЕКСИНА С.Г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, Москва, Россия

ОСТИТЫ У ДЕТЕЙ ПОСЛЕ ВАКЦИНАЦИИ ПРОТИВ ТУБЕРКУЛЕЗА, ПРОБЛЕМА И ПУТИ ЕЕ РЕШЕНИЯ

Иммунизация вакциной БЦЖ относится к наиболее важным мерам, предупреждающим туберкулез. Широкий охват прививками вакциной БЦЖ детей раннего возраста является обоснованным, так как анализ эпидемической ситуации по туберкулезу, начиная с 90-х годов, свидетельствует о подъеме эндемии заболевания.

Иммунизация детей препаратом из живых аттенуированных бактерий сопровождается опасностью развития осложнений, среди которых наиболее тяжелым является специфическое поражение костей – БЦЖ-оститы.

Актуальность этой проблеме придает факт возрастания количества указанной патологии во многих странах, в том числе и в России. По некоторым данным в период с 1995 по 2009 годы показатель частоты БЦЖ-оститов в России вырос с 0,3 до 6,62 на 100 000 первично привитых. В отдельных регионах России реальная частота БЦЖ-оститов может быть в 20 – 25 раз выше официальных средних и сопоставима с ранее установленными показателями европейских стран.

Проанализированы материалы на детей в период с 2001 по 2010 годы, привитых вакцинами БЦЖ и БЦЖ-М (акты расследований поствакцинальных осложнений, выписки из историй развития и болезни детей, индивидуальные карты беременных и родильниц) поступившие в ГИСК им. Л.А.Тарасевича, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

За 10 лет осложнения после иммунизации против туберкулеза со стороны костной системы были выявлены у 430 детей. В течение последних 10 лет произошел

значительный рост патологии, причем это касается обоих типов вакцин - БЦЖ и БЦЖ-М, в большей степени это относится к БЦЖ вакцине. Вырос удельный вес оститов и относительно других видов осложнений (подкожные инфильтраты, холодные абсцессы, регионарные лимфадениты и др.) — с 5,0 % в 2001 г. до 21,3 % в 2010 г. Интервал между прививкой и постановкой диагноза варьировал от 5 до 36 месяцев, в среднем он составил 15,5 месяцев. Окончательный диагноз БЦЖ-остита был установлен в сроки до 1 года у 31,0 %, через 1 - 2 года – в 51,0 %, более чем через 2 года – в 18,0 % . Для БЦЖ-оститов более характерным является поражение костей нижних конечностей до 50,0 % – 60,0 % случаев.

Подлежит всестороннему рассмотрению комплекс мероприятий, направленных на снижение частоты развития диссеминированных форм осложнений БЦЖ-вакцинации, (увеличение возраста первично вакцинированных, селективная вакцинация детей из групп риска, и др.) в том числе создание новых противотуберкулезных вакцин, проходящих оценку в научных лабораториях. Лучшее понимание иммунологических недостатков БЦЖ-вакцин и знания генома микобактерий дают возможность для создания новых препаратов. Новыми направлениями в разработке вакцин являются снижение первичного инфицирования населения микобактериями туберкулеза, предотвращение реактивации латентной инфекции и лечебные вакцины для предупреждения рецидивов у больных туберкулезом.

ХРАМЕЕВА Н.П.

Российский экономический университет имени Г.В. Плеханова, Москва, Россия

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА ПИЩЕВЫХ НАПИТКОВ

Общепринято считать, что одной из основных причин многих заболеваний является накопление свободных радикалов в организме человека. Концентрация свободных радикалов возрастает за счет снижения активности естественной антиоксидантной системы человека, связанной, в частности, с некачественным питанием. Вредное воздействие «свободных радикалов» можно уменьшить либо за счет систематического употребления некоторых биологически активных добавок (БАД), либо употреблением продуктов питания и напитков, обладающих хорошей антиоксидантной активностью.

Например, чай, овощи, фрукты, ягоды богаты ингибиторами, способными замедлять процессы окисления.

В данной работе исследования проводились с позиции изучения влияния на антиоксидантные свойства безалкогольных напитков исходного сырья и способов получения продукта.

Для проведения исследований, нами был опробован новый потенциометрический метод исследования антиоксидантной активности (АОА), основанный на измерении сдвига потенциала платинового электрода, в медиаторной системе $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$, как источник информации АОА анализируемой среды.

Измерение потенциала медиаторной системы обусловлено взаимодействием антиоксиданта с окисленным компонентом (Fe^{3+}) этой системы.

Анализировались свежеприготовленные соки из ягод, хранившихся в морозильной камере бытового холодильника в течение 6 месяцев. Значения АОА находились в пределах от 18 до 3 ммоль экв./дм³. Наибольшее количество антиоксидантов было найдено в соке из чёрной смородины. Соки из клюквы, черники образуют группу с относительно одинаковым значением АОА. Ниже всего показатель был в соке красной смородины. В промышленных соках значения АОА находились в пределах от 8,0 до 1,2 ммоль экв./дм³. Самое большое содержание АОА было обнаружено в нектаре из шиповника. Величины АОА в соках из чёрной смородины, ежевики, клюквы были примерно одинаковыми. Наименьшее содержание антиоксидантов обнаружено в соке из яблок.

Известно также, что вина, особенно красные, содержат довольно большое количество полифенольных соединений, которые и обеспечивают их антиоксидантную активность. Анализировались образцы красных и белых сухих вин. Белые сорта: Шардоне, Рислинг и красные: Мерло, Каберне отечественного производства. Значения АОА были в пределах от 1,6 до 32,0 ммоль экв./дм³. Самые большие значения наблюдались в образцах красных сухих вин, что связано с более высоким содержанием полифенолов в красных сортах винограда и особенностями производства красных вин.

Таким образом, сравнение антиоксидантной активности промышленных и свежеприготовленных соков ягод позволяет прийти к выводу, что АОА свежеприготовленных соков была выше, чем в промышленных, что логично.

По результатам исследования более 10 сортов зелёного и чёрного чая достаточно высокая АОА определена как для зеленых (10,4 ммоль экв./дм³), так и для чёрных (12,7 ммоль экв./дм³). Такие значения (вопреки общепринятому мнению, что антиоксидантные свойства зеленых сортов выше, чем у чёрных) обусловлены, очевидно, хорошим качеством сырья и точным соблюдением технологии его переработки.

Полученные результаты были сравнены с показателями ORAC-метода оценки антиоксидантного потенциала в продуктах. Этот метод широко используется в Европе и Америке, в качестве стандартного. Следовательно, используемый нами метод определения АОА удовлетворяет необходимым требованиям.

ЦВЕТКОВ Е.А., МАСАЛОВ И.С., ЛОКШИНА Е.И., ВЕСЕЛКИН Н.П.

Федеральное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

РОЛЬ СЕРОТОНИНА (5-НТ) В МОДУЛЯЦИИ СИНАПТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРОЕКЦИОННЫХ НЕЙРОНОВ ДОРСОЛАТЕРАЛЬНОГО ЯДРА АМИГДАЛЫ (ДЛА) КРЫСЫ

Серотонин (5-НТ) является одним из наиболее важных нейромодуляторов центральной нервной системы. Механизмы модуляции 5-НТ синаптической передачи во многих структурах головного мозга пока что недостаточно хорошо изучены. Нами было проведено исследование роли серотонина в модуляции синаптической активности проекционных нейронов амигдалы крысы. Исследование проводилось на фронтальных содержащих амигдалу срезах головного мозга толщиной 300 мкм 20-25 дневных крысят. Регистрация постсинаптических токов (ПСТ) производилась на some проекционных нейронов дорсолатерального ядра амигдалы методом «пэтч-кламп» в конфигурации «целая клетка». Действие серотонина исследовалось в условиях фармакологической изоляции возбуждающей глутаматергической и тормозной ГАМКергической фракций ПСТ. В этих условиях было обнаружено, что 5-НТ достоверно ($p < 0.05$) снижает амплитуду возбуждающих ПСТ на 41.08 ± 6.43 %, а тормозных ПСТ на 58.92 ± 6.43 %. В последующем было установлено, что эти эффекты подавляются антагонистом 5-НТ_{1,2} рецепторов

малеатом метилсергида. В то же время антагонист 5-HT_{3,4} рецепторов SDZ202-557 не оказывает влияния на эффект 5-HT.

Полученные в работе результаты свидетельствуют о том, что серотонинергическая модуляция синаптической активности проекционных нейронов дорсолатеральной амигдалы происходит преимущественно с участием 5-HT_{1,2} рецепторов, но не 5-HT_{3,4} рецепторов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 11-04-00868) и программы Президиума РАН «Молекулярные механизмы физиологических функций».

ЦИРКУНОВА Ж.Ф., МИХАЙЛОВА Р.В., ШАХНОВИЧ Е.В., ЛОБАНОК А.Г.

Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

ВЛИЯНИЕ ЭТАНОЛА НА БИОСИНТЕЗ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ PENICILLIUM ADAMETZII ЛФ F-2044.1 И P. VARIANS F-102

Перспективы развития биотехнологии неразрывно связаны с исследованиями ферментов – уникальных по чувствительности и специфичности биокатализаторов белковой природы. Наибольший интерес вызывают биокатализаторы, продуцируемые микроорганизмами. Из группы ферментов, окисляющих глюкозу, по теоретической и практической значимости необходимо выделить глюкозооксидазу (β -D-глюкозо: O₂-1-оксидоредуктаза, КФ 1.1.3.4). Данный фермент катализирует окисление β -D-глюкозы до β -D-глюконо- δ -лактона и перекиси водорода с использованием молекулярного кислорода в качестве акцептора электронов.

Каталитическое действие глюкозооксидазы лежит в основе энзиматического метода определения глюкозы в биологических жидкостях. Метод необходим для клинической диагностики заболеваний, связанных с нарушением углеводного обмена. Специфичность и высокая чувствительность глюкозооксидазы обуславливают ее использование глюкозооксидазы в биосенсорных технологиях, применяемых для экспресс-анализа углеводов и аналитического контроля биотехнологических процессов. Перспективно также использование фермента в медицинской практике в качестве терапевтического

препарата и создание на основе глюкозооксидазы биопрепаратов для защиты растений. Кроме того, глюкозооксидаза является незаменимым ферментом в пищевой и химической промышленности.

Ранее нами были отобраны перспективные продуценты внеклеточной глюкозооксидазы - *Penicillium adametzii* ЛФ F-2044.1 и *P. varians* F-102. Целью настоящей работы было изучение влияния этанола на рост продуцентов и синтез глюкозооксидазы.

При изучении влияния этанола на биосинтез глюкозооксидазы спирт использовали в концентрациях 0,25-3,0%, грибы выращивали глубинным способом в колбах Эрленмейера на оптимизированной питательной среде в течение 4 сут.

Показано, что этанол, добавленный в питательную среду в концентрациях 0,25-2% не оказывает влияния на рост продуцентов, количество биомассы *P.adametzii* ЛФ F-2044.1 и *P. varians* F-102 не изменяется и составляет 7-8,5 мг/мл. Однако этот показатель снижается при росте продуцентов на среде, содержащей 3,0% этанола (4,5-5,0 мг/мл).

Установлено, что этанол является эффективным стимулятором синтеза глюкозооксидазы грибами. Максимальный эффект обнаружен при использовании 1,5% этанола для *P.adametzii* ЛФ F-2044.1 и 1,0 % - для *P. varians* F-102. Уровень образования фермента при культивировании *P.adametzii* ЛФ F-2044.1 на питательной среде содержащей этанол повышается на 25%, а *P. varians* F-102 – на 35%.

Выявлена зависимость стимулирующего эффекта этанола на продукцию фермента грибами от времени их внесения в среду культивирования. Установлено, что максимальный уровень образования глюкозооксидазы *P.adametzii* ЛФ F-2044.1 отмечен при добавлении этанола на 2 или 3 сут роста, а *P. varians* F-102 – или в момент посева гриба или на 1 сут культивирования.

В результате проведенных исследований показано стимулирующее действие этанола на образование глюкозооксидазы *P.adametzii* ЛФ F-2044.1 и *P. varians* F-102, определена его оптимальная концентрация и время внесения в среду культивирования.

ЧАБАН Н.Г.¹, БУКИН В.И.¹, СТЕПАНОВ А.Е.¹, РАПОПОРТ Л.М.², ЦАРИЧЕНКО Д.Г.²

¹ГБОУ ВПО «Московский государственный университет тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

²ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М.Сеченова», Москва, Россия

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К СОЗДАНИЮ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ УРОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Мочекаменная болезнь (МКБ) встречается не менее, чем у 1-3 % населения. Больные МКБ составляют около 30-40% больных урологических стационаров. Мужчины в 2-2,5 раза чаще женщин болеют нефролитиазом, причем наибольшая частота заболевания у них приходится на четвертое и пятое десятилетия жизни. МКБ значительно чаще наблюдается у лиц из обеспеченных слоев общества, ведущих сидячий, малоподвижный образ жизни и подверженных ожирению. Дистанционная ударно-волновая литотрипсия (ДУВЛ) является основным методом разрушения камней на сегодняшний день, однако ее применение возможно только для разрушения камней с невысокой плотностью с неровными изъеденными краями и неоднородной структурой. Она не позволяет предотвратить развитие МКБ и имеет послеоперационные осложнения. Имеющиеся российские и зарубежные препараты не обладают высокой эффективностью для литолиза, особенно оксалатных камней. Поэтому поиск новых препаратов или комплекса новых препаратов с известными препаратами и изучение их литолизных свойств является чрезвычайно важной задачей, так как может спасти больных от хирургического вмешательства или сократить количество сеансов ДУВЛ.

Нами для вывода из организма человека мочевых камней предложено использовать фитотерапию, основанную на природных флавоноидах. Для этих целей использовали экстракты природных флаваноидов и их смеси с известными фитопрепаратами, которые в настоящее время ни в России, ни за рубежом для этих целей не применяют. Сопоставление литолизных свойств известных препаратов со свойствами исследованных экстрактов показывает, что для литолиза оксалатов, которые чаще всего встречаются в составе мочевых камней, наиболее эффективными препаратами являются предложенные нами композиции. В работе показано, что при воздействии указанных препаратов на камни

in vitro масса последних уменьшается на 40 - 45,5 %, т.е. в десятки раз выше, чем при использовании других литолизных средств.

ЧЕПИСЮК Н.В.

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

ДВУХКОМПОНЕНТНАЯ СИСТЕМА ВЕКТОРНОЙ ИНТЕГРАЦИИ ДЛЯ КЛОНИРОВАНИЯ В КЛЕТКАХ *BACILLUS SUBTILIS*

Бактерии *B.subtilis* являются одним из удобных и широко используемых объектов биотехнологии благодаря их способности синтезировать широкий спектр различных биологически активных веществ в окружающую среду. Их применение в биотехнологии обуславливает необходимость наличия соответствующего молекулярно-биологического инструментария для клонирования в клетках бактерий гомологичного и гетерологичного генетического материала. В настоящее время для этих целей используются плазмидные векторы, в частности векторы эктопической интеграции. Особенностью данных векторов является их неспособность к автономной репликации в клетках бактерий *B.subtilis*. Наследование их происходит только при условии интеграции в состав хромосомы. Интеграция может происходить за счет процесса одиночной рекомбинации между областями гомологии вектора и хромосомной ДНК. Особенностью векторов эктопической интеграции является их интеграция в область отличную от целевой (клонлируемой) последовательности, и, как следствие, они используются для клонирования гетерологичных последовательностей ДНК.

Основной целью исследования являлась разработка двухкомпонентной системы эктопической интеграции для клонирования в клетках бактерий *B.subtilis*. Для достижения поставленной цели было необходимо сконструировать хелперный вектор, а также серию векторов эктопической интеграции (ВЭИ) для клонирования в них гетерологичного генетического материала. Основная роль вектора-хелпера – это обеспечение интеграции ВЭИ в хромосому клетки. При этом рекомбинация должна происходить между областями гомологии вектора-хелпера, встроенного в хромосому, и вектора эктопической интеграции.

В качестве основы для конструирования хелперного вектора использовали плазмиду pMUTIN4. В ее состав входят детерминанты антибиотикорезистентности, обуславливающие устойчивость клеток *E.coli* к ампициллину (ген β -лактамазы) и эритромицину, а для *B.subtilis* только к эритромицину. В pMUTIN4 также локализованы структурный ген β -галактозидазы *lacZ* и регуляторный ген *lacI*. pMUTIN4 содержит ColE1-репликон, позволяющий плазмиде автономно реплицироваться в клетках *E. coli*, но не в грамположительных бактериях *B.subtilis*. Наследоваться в клетках этих бактерий плазида может только в случае интеграции в хромосому клетки-хозяина при условии наличия в составе pMUTIN4 последовательности гомологичной участку на хромосоме *B.subtilis*. Такой последовательностью стал фрагмент промоторно-операторной области биотинового оперона *B. subtilis*, клонирование которого в области полилинкера pMUTIN4 позволило создать вектор-хелпер pW2. Его встраивание в хромосому происходит за счет одиночной гомологичной рекомбинации между клонированным в его составе участком и соответствующим участком хромосомы. Таким образом был получен рекомбинантный штамм *B.subtilis* 2W2.

Основой для создания серии ВЭИ послужил ряд векторов, используемых при молекулярном клонировании в клетках бактерий *E.coli*: pUC18, pBR322, pMTL21C, RSF1010. Клонирование в клетках данных бактерий часто используется в качестве начального этапа при конструировании рекомбинантных молекул, предназначенных для клонирования в клетках других бактерий, включая *B. subtilis*. В состав указанных векторов были введены маркер антибиотикорезистентности к хлорамфениколу для отбора в клетках *B.subtilis*, а также последовательность *spac*-промотора, способного работать в клетках *B.subtilis*, с целью дальнейшего использования ВЭИ в качестве векторов экспрессии при клонировании генов в *B.subtilis*. Сконструированные ВЭИ размером от 3,5 до 16 тысяч пар нуклеотидов не имеют областей гомологии для рекомбинации с исходной нуклеотидной последовательностью хромосомы *B.subtilis*, однако они имеют гомологичные последовательности с pW2 в хромосоме *B.subtilis* 2W2. К таким областям гомологии относятся: последовательность гена β -лактамазы, ориджина репликации, гена β -галактозидазы. Трансформация *B.subtilis*2W2 полученными ВЭИ ведет к их встраиванию в хромосому по одной из гомологичных областей. Отбор таких трансформантов

производиться по признаку устойчивости клеток к хлорамфениколу, а анализ соответствия механизма встраивания ожидаемому – посредством ПЦР-анализа.

Таким образом, в ходе работы нами была создана двухкомпонентная система эктопической интеграции для клонирования в клетках *B.subtilis*, основанная на применении вектора-хелпера, обеспечивающего интеграцию ВЭИ различного размера в хромосому бактерий *B. subtilis*.

ЧЕРЕВАТЕНКО А.М., ДЬЯЧЕНКО О.В., ТАРЛАЧКОВ С.В.,

ШЕВЧУК Т.В., ЗАХАРЧЕНКО Н.С., БУРЬЯНОВ Я.И.

Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,

Пушино, Россия

ТРАНСГЕН-ИНДУЦИРОВАННАЯ АКТИВАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРОГРАММ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К АБИОТИЧЕСКИМ И БИОТИЧЕСКИМ СТРЕССАМ

У высших растений существует интегральная молекулярно-генетическая система взаимосвязанных физиологических ответов на абиотические и биотические стрессы. Подходы к созданию устойчивых к абиотическому стрессу растений, применяемые в последнее время малоэффективны, поскольку направлены на изменение только одного из многочисленных звеньев метаболитного защитного ответа растений. Эпигенетическое метилирование генома играет ключевую роль в регуляции механизмов адаптации растений к неблагоприятным условиям окружающей среды, таким как водный и солевой стрессы. Факультативные галофитные растения *Mesembryanthemum crystallinum* отвечают на солевой стресс переключением СЗ-фотосинтеза на САМ-метаболизм и увеличением уровня ССWGG-метилирования (W= А или Т) повторяющихся последовательностей ядерного генома.

Для изучения роли энзиматического метилирования ДНК в модификации метаболизма и адаптации к стрессовым условиям были получены модельные растения с трансген-индуцированным метилированием с помощью ДНК-метилтрансферазы EcoRII,

метилирующей внутренней цитозин в последовательности CCWGG. У таких растений ожидается получение более полного защитного ответа на солевой и водный стрессы. Впервые разработаны методы регенерации и трансформации растений *Mesembryanthemum crystallinum*. Получена специализированная конструкция, содержащая ген метилтрансферазы EcoRII, модифицированный присоединением сигнала ядерной локализации вируса SV40, под контролем промотора 35S РНК вируса мозаики цветной капусты. Полученной конструкцией с помощью агробактериальной инфильтрации проведена генетическая трансформация растений *Mesembryanthemum crystallinum*, получены трансгенные растения первого поколения. Рестрикционным анализом генома полученных трансформантов показана защита их геномной ДНК от гидролиза специфичными метилчувствительными эндонуклеазами, что свидетельствует о функциональной активности трансгена. Трансформированные растения фенотипически отличались от контрольных.

Предложенный подход позволит выявить связь между гиперметилованием специфических последовательностей в геноме *Mesembryanthemum crystallinum* и адаптацией этих растений к солевому стрессу и водному дефициту при переключении комплексных метаболических программ защитного ответа.

ЧЕРЕВАТЕНКО А.М., ТАРЛАЧКОВ С.В.,

РУДЕНКО Н.В., ДЬЯЧЕНКО О.В., ШЕВЧУК Т.В.

Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,

Пушино, Россия

ГЕТЕРОЛОГИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА РАСТИТЕЛЬНОЙ ДНК- МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ В ЖИВОТНЫХ КЛЕТКАХ

Исследование молекулярных механизмов функционирования ДНК-метилтрансфераз в клетках эукариотических организмов, в том числе и в клетках человека, ставит вопросы анализа участия сайт-специфических ДНК-метилтрансфераз в интегральном механизме модификации и ремоделирования структуры хроматина. В

настоящее время только устанавливается картина сложноразветвлённой сети взаимосвязанных реакций модификации и ремоделирования структуры хроматина, в том числе и роль различных ДНК-метилтрансфераз человеческой клетки в этих процессах. Известно, что нарушения нормальной картины метилирования ДНК сопровождается канцерогенез и генетические заболевания человека. В настоящий момент в исследовании сайт-специфического метилирования генома эукариот существует значительный пробел, связанный с изучением только CpG-типа этой модификации. В то же время, у эукариот обнаружены другие типы метилирования ДНК: симметричный CpHpG-тип (H – A, T или C) и несимметричный тип метилирования CpH. Растущее внимание к динамике картины метилирования генома эукариот, на фоне которой развиваются патологические процессы жизнедеятельности, ставит вопрос о дифференциальном анализе нормального и патологического типов метилирования ДНК, и их взаимном влиянии друг на друга.

Процесс метилирования осуществляют ферменты цитозин(C5)-ДНК-метилтрансферазы (EC 2.1.1.37), которые катализируют перенос метильной группы с S-аденозилметионина (SAM) на остатки цитозина в специфических последовательностях дуплексной ДНК с образованием m⁵C и S-аденозилгомоцистеина (SAH).

Целью данной работы являлось изучение влияния активности ДНК-метилтрансферазы SMT3 на морфолого-биохимические характеристики животных клеток.

ДНК-метилтрансфераза SMT3 растительный фермент, относящийся к семейству хромометилаз и обладающий CpHpG-сайтспецифичностью. Ферменты этого семейства — мономерные белки, содержащие в своей структуре хромодомен между I и IV блоками, который необходим для связи с белками хроматина и ядерной мембраной.

Для проявления метилтрансферазной активности SMT3 необходимо наличие гистона H3, диметилированного по положениям K9 и K27. Лизин H3K9 метилируется гистоновой метилтрансферазой *KRYPTONITE*, фермент, модифицирующий H3K27 пока не установлен. Активная форма фермента SMT3 представляет собой гомодимер, хромодомены субъединиц которого связываются с метильными группами K9 и K27 гистона H3, и выполняет перенос метильной группы с SAM на цитозин в последовательности CpHpG. При этом метилируется цитозин только одной цепи.

Для анализа влияния CpHpG-специфичного гиперметилирования на морфолого-биохимические особенности животных клеток была создана генетическая конструкция на

основе вектора рEGFP, содержащая ген растительной ДНК-метилтрансферазы СМТ3 под контролем промотора цитомегаловируса. Полученной конструкцией были трансформированы клетки эмбрионального почечного эпителия человека НЕК293. В качестве контроля для трансформации клеток НЕК293 использовали ненагруженный вектор рEGFP. После проведенной селекции на основе устойчивости к генетицину G418 были отобраны и получены стабильные клеточные линии, экспрессирующие ген СМТ3 и GFP в контрольном варианте. Показаны фенотипические отличия клеток, экспрессирующих ген СМТ3, от контрольных клеток, трансформированных ненагруженным вектором рEGFP. Кроме того, экспрессирующие СМТ3 клетки, отличаются от контрольных выраженным изменением уровня метилирования генома в последовательностях CpWpG (W — А или Т).

Гетерологичная экспрессия генов ДНК-метилтрансфераз с различной сайтовой специфичностью может стать хорошим инструментом для анализа структуры хроматина клеток эукариот, находящихся в различных физиологических условиях. В том числе при адаптации к стрессам, антибиотикам и при канцерогенезе

ЧЕРЕНКОВ И.А., СЕРГЕЕВ В.Г.

ФГБОУ «Удмуртский государственный университет», Ижевск, Россия

БИОСЕНСОР ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ «РЕСПИРАТОРНОГО ВЗРЫВА» ПРИ ФАГОЦИТОЗЕ

Фагоцитоз – один из древнейших защитных механизмов. У позвоночных животных это один из элементов неспецифического иммунитета.

Известно, что нейтрофилы в процессе фагоцитоза реализуют механизм «респираторного взрыва». Этим термином обозначают быструю метаболическую реакцию клеток, характеризующуюся резким усилением окислительных процессов. Повышение потребления кислорода нейтрофильным гранулоцитом обусловлено активацией преимущественно митохондриальных ферментов, расположенных в составе плазмолеммы и в мембранах фагосом, что приводит к образованию реактивных биоокислителей (перекиси водорода, супероксидных и гидроксильных радикалов,

синглетного кислорода и т. п.). Реакцию «респираторного взрыва» можно использовать для оценки активности фагоцитоза.

Целью настоящей работы является создание биосенсора для количественной оценки «респираторного взрыва» нейтрофилов в процессе фагоцитоза.

Принцип работы предлагаемого биосенсора – электрохимическое определение количества перекиси водорода, выделяемой нейтрофилами, по изменению силы тока при фиксированном потенциале на модифицированном пероксидазой хрена печатном графитовом электроде.

В качестве основы использовали *screen-printed* электроды («Русенс», Россия). На обезжиренную поверхность рабочего электрода наносили 2 мкл раствора пероксидазы хрена (1 *kU*) (*Sigma-Aldrich*). Электроды оставляли во влажной камере при температуре 4⁰С на 12 часов для иммобилизации. Затем выдерживали при комнатной температуре и покрывали раствором желатина (желатин замедляет вымывание фермента и является подложкой для адгезии клеток). Отмывали электрод избытком забуференного физиологического раствора (ЗФР). На поверхность рабочего электрода наносили 2 мкл взвеси нейтрофилов ($2,5 \times 10^9$ /л), выделенных из крови практически здоровых доноров. Выдерживали 40 минут при комнатной температуре в противопылевой камере. Иммобилизацию клеток контролировали, окрашивая отдельные электроды акридиновым оранжевым и изучая их в люминесцентном микроскопе *Nicon Eclipse E 200*.

Определяли фоновое значение силы тока. Для этого на поверхность электрода наносили 100 мкл ЗФР и измеряли ток при фиксированном потенциале +210 мВ в течение 600 с. Затем электрод промывали ЗФР и проводили измерения в растворах бактериального липополисахарида (ЛПС) («Медгамал», Россия) различной концентрации (5 мкг/л, 0,5 мкг/л, 0,05 мкг/л).

При внесении ЛПС изменение силы тока более чем в два раза превышает фоновое значение. Обращает на себя внимание нелинейный характер зависимости изменений силы тока от концентрации ЛПС. Так, максимальная из использованных концентраций ЛПС показала более низкие абсолютные значения тока, чем минимальная, а токи, соответствующие средней концентрации ЛПС (0,5 мкг/л), были близки к фоновым значениям.

Внесение в измерительную ячейку взвеси частиц латекса в растворе ЛПС сопровождалось резким увеличением силы тока. Показатели силы тока при этом возрастали почти в 10 раз по сравнению с фоновыми значениями и превосходили таковые для раствора ЛПС. Микроскопическое исследование рабочего электрода после измерения показало наличие на его поверхности клеток с фагоцитированными частицами латекса, что позволяет связать изменения аналитического сигнала биосенсора с процессом фагоцитоза.

Возможной областью применения описанных биосенсоров может стать клиническая лабораторная диагностика, где подобные сенсоры можно использовать для определения фагоцитарной активности нейтрофилов. По нашим предварительным данным, наблюдаются различия аналитического сигнала биосенсора при использовании нейтрофилов от разных доноров, коррелирующие с традиционными показателями фагоцитарной активности клеток. Отметим, что манипуляции по подготовке биосенсора к работе и сама процедура измерения осуществляются проще и требуют меньших временных и финансовых затрат, чем принятые в клинической диагностике методы изучения фагоцитоза.

Предлагаемый сенсор найдёт применение и для изучения фундаментальных аспектов фагоцитоза. Моделирование различных условий фагоцитоза – вариации состава среды, объектов фагоцитоза, времени и способа прайминга клеток, состава и микрорельефа подложки – позволят выяснить новые детали механизмов антимикробной активности фагоцитов.

Таким образом, предлагаемая схема модификации электрода позволяет использовать его в качестве биосенсора для изучения процесса фагоцитоза.

ЧЕРЕНКОВА Е.Е.¹, ИСЛАМОВ Р.Р.², РИЗВАНОВ А.А.^{1,2}

¹ФГАОУ ВПО "Казанский (Приволжский) федеральный университет", Казань, Россия

²ГБОУ ВПО "Казанский государственный медицинский университет", Казань, Россия

МУЛЬТИЦИСТРОННЫЕ ВЕКТОРА ДЛЯ ГЕННОЙ И ГЕННО-КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА

На сегодняшний день нет эффективных способов лечения нейродегенеративных заболеваний человека, в том числе бокового амиотрофического склероза. Существующие

методы лечения симптоматичны и не позволяют замедлить или обратить основную причину заболевания — нейродегенерацию мотонейронов спинного мозга. В связи с этим встаёт вопрос разработки принципиально новых методов генно-клеточной терапии нейродегенеративных заболеваний. Мультицистронные генные конструкции способны существенно повысить эффективность генной и генно-клеточной терапии бокового амиотрофического склероза. 2А-олигопептиды, полученные из вируса ящура, могут успешно применяться в биотехнологии в качестве нового инструмента для ко-экспрессии множественных, дискретных белков с одной открытой рамки считывания, что позволит создать конструкции, обеспечивающих одновременную экспрессию несколько терапевтических генов для дальнейшего применения в лечении нейродегенеративных заболеваний.

Цель данной работы — создание аденовирусных конструкций, одновременно экспрессирующих гены сосудистого эндотелиального фактора роста (*vegfl21*, *vegfl65*) и ген основного фактора роста фибробластов (*fgf2*), соединенных в одной открытой рамке считывания при помощи 2А-пептидных последовательностей.

Для создания мультицистронных конструкций проводили ПЦР-амплификацию с геноспецифичными праймерами, содержащими сайты рестрикции и 2А-пептидные фрагменты (P2A, T2A, E2A) с последующим клонированием в плазмидный вектор pDONR221, который совместим с Gateway-системой рекомбинации. Данная система базируется на сайт-специфической рекомбинации между *att*-сайтами плазмид-доноров (pDONR-VEGF121-FuP2A-FGF2, pDONR-VEGF165-FuP2A-FGF2) и вектора – назначения (pAd/CMV/V5-DEST).

Были разработаны конструкции на основе вектора pAd/CMV/V5-Dest, содержащие терапевтические гены: сосудистый эндотелиальный фактор роста — *vegfl65*, *vegfl21*, основной фактор роста фибробластов — *fgf2*, содержащие 2А-пептидный фрагмент. Трансфекция клеток НЕК293А (human embryonic kidney, 293А) рекомбинантными плазмидами (pAd-VEGF121-FuP2A-FGF2, pAd-VEGF165-FuP2A-FGF2) с последующим иммунофлуоресцентным анализом с применением специфичных антител подтвердила экспрессию обоих генов. Таким образом, получены рекомбинантные аденовирусы, одновременно экспрессирующие нейропротекторные и проангиогенные факторы VEGF121, VEGF165 и FGF2. В дальнейшем полученные вирусы будут использованы в

экспериментах *in vitro* и *in vivo* для разработки методов генной и генно-клеточной терапии различных заболеваний человека, в том числе нейродегенеративных.

ЧЕРЁМИН А.М.¹, КЛОТОВЕ Б.¹, ИГОНИНА О.Н.¹,
ЗАХАРОВА М.В.², ШАРИПОВА М.Р.¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

²Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.Скрябина, Пушино, Россия

СИСТЕМА ЭКСПРЕССИИ ГЕНА СУБТИЛИЗИНОПОДОБНОЙ ПРОТЕИНАЗЫ *BACILLUS PUMILUS*

Протеолитические ферменты находят широкое применение в практике научных исследований, а также в промышленности, сельском хозяйстве и медицине. Грамположительные спорообразующие бактерии *B.pumilus* секретируют в среду различные протеиназы, среди которых доминирующим ферментом является субтилизиноподобная сериновая протеиназа. Ген белка клонирован, определена последовательность нуклеотидов (AN AY754946.2). Установлено, что белок обладает фибринолитической и тромболитической активностями. Целью работы являлось получение конструкции, обеспечивающей высокую и стабильную экспрессию гена субтилизиноподобной протеиназы *B.pumilus*. Ген субтилизиноподобной протеиназы *B.pumilus* был клонирован в вектор рНТ01 («MoBiTec»), несущий искусственный P_{g_{lac}} промотор под контролем lac-оператора. P_{g_{lac}} – IPTG-индуцибельный, сильный промотор, обеспечивающий экспрессию в штаммах *B.subtilis*. Использование данного вектора позволяет получить количество рекомбинантного целевого белка, на 16% большее тотального пула белков *B.subtilis*. С плазмиды рCS9, несущей полный ген субтилизиноподобной протеиназы, с помощью ПЦР была амплифицирована его структурная область, размер которой составлял 1147 п. н. Полученный амплификат расщепляли рестриктазами по сайтам BamHI и XhoI и лигировали в вектор рНТ01, рестрицированный по этим же сайтам. Лигазной смесью трансформировали штамм *E. coli* DH5α и отбирали клоны, несущие плазмиду рНТ01-argVp. Клоны отбирали по молекулярной массе, с помощью ПЦР и рестрикционного анализа. После отбора искомой

конструкции проводили секвенирование клонированной вставки. Выравнивание последовательностей показало отсутствие мутаций и сдвига открытой рамки считывания гена целевого белка. Таким образом, была получена плазида рНТ01-argBr, обеспечивающая экспрессию гена субтилизиноподобной протеиназы *B. pumilus*.

ЧЕРНОВ А.С.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, Пущино, Россия

ОПИОИДНАЯ И НЕОПИОИДНАЯ РЕЦЕПЦИЯ β -ЭНДОРФИНА В РАННЕМ РАЗВИТИИ ЭМБРИОНОВ МЫШИ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

β -Эндорфин – опиоидный нейропептид, регулирует основные функции организма, активно участвуя во взаимосвязи нервной, иммунной и эндокринной систем. В 1979 г. Хазум и др. обнаружили, что специфическое связывание ^{125}I -меченного β -[D-Ala²]эндорфина с трансформированными Т-лимфоцитами человека ингибируется β -эндорфином и β -[D-Ala²]эндорфином, в то же время на связывание не влияли аналоги энкефалина, β -липотропин, опиоидные агонисты и антагонисты. Это открытие дало основание предположить наличие неизвестных рецепторов β -эндорфина неопиоидной природы.

Позднее Ван Ден Бергом и соавт. была подтверждена гипотеза о том, что молекула β -эндорфина содержит два различных участка, один из которых служит для связывания с опиоидными, а другой с неопиоидными (не чувствительными к блокатору опиоидных рецепторов налоксону) рецепторами. В настоящее время неопиоидные рецепторы β -эндорфина остаются малоизученными и данные о них разрозненны.

β -эндорфин в значительных количествах был обнаружен в половых железах: фолликулярные клетки секретируют β -эндорфин и регулируют созревание и овуляцию ооцитов, а клетки эндометрия продуцируют β -эндорфин во время имплантации эмбриона в стенку матки. Из этого можно предположить, что β -эндорфин может оказывать непосредственное воздействие на развитие ранних эмбрионов.

В связи с этим целью нашей работы было исследовать влияние β -эндорфина (0,1 мкМ) на развитие 2-, 4- и 8-клеточных эмбрионов мыши *in vitro*, а также определить возможные пути передачи внутриклеточного сигнала при действии β -эндорфина на ранние эмбрионы.

Было показано, что гормон не оказывал влияния на развитие 2-клеточных эмбрионов, но увеличивал жизнеспособность 4- и 8-клеточных эмбрионов. В присутствии β -эндорфина (0,1 мкМ) увеличивалось количество сформировавшихся бластоцист и уменьшалось количество аномально развитых бластоцист.

Используя специфический блокатор опиоидных рецепторов налоксон (1 мкМ), нами было установлено, что стимулирующее действие β -эндорфина на развитие ранних эмбрионов осуществляется через неопиоидные рецепторы β -эндорфина.

Для определения возможного пути передачи внутриклеточного сигнала β -эндорфином у ранних эмбрионов, нами было исследовано его влияние на изменение уровня внутриклеточного Ca^{2+} , с использованием флуоресцентного зонда (Fluo-3 AM). Также было проведено исследование с применением специфических блокаторов активности фосфолипазы C и аденилатциклазы для выявления их роли в процессе передачи сигнала β -эндорфином.

Было показано, что β -эндорфин инициирует медленный (35-40 мин) выход ионов Ca^{2+} в цитоплазму из внутриклеточных депо у 4- и 8-клеточных эмбрионов мыши. В то время как у 2-клеточных гормон приводил к быстрому (в течение 2 мин) высвобождению Ca^{2+} , однако при совместном добавлении β -эндорфин и налоксона также наблюдали медленный выход Ca^{2+} . С помощью блокатора активности фосфолипазы C и аденилатциклазы было установлено, что на 2-клеточные эмбрионы мыши β -эндорфин воздействует как через опиоидные, так и неопиоидные рецепторы. В то время как на 4- и 8-клеточные эмбрионы воздействие осуществляется только через неопиоидные рецепторы, причем в передаче сигнала участвует аденилатциклазная сигнальная система.

Таким образом, выявленная нами способность β -эндорфина стимулировать процессы первичной дифференцировки у ранних эмбрионов мыши, образование зрелых бластоцист и выход их из оболочки оплодотворения дает право считать, что β -эндорфин играет роль неспецифического фактора роста в регуляции доимплантационного развития мыши.

ЧИГЛИНЦЕВА М.Н.^{1,2}, КАМЗОЛОВА С.В.¹, МОРГУНОВ И.Г.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина РАН, Пушкино Московской обл., Россия

²Филиал Московского государственного университета в г. Пушкино,

Пушкино, Московская обл., Россия

БИОСИНТЕЗ α -КЕТОГЛУТАРОВОЙ КИСЛОТЫ ИЗ РАПСОВОГО МАСЛА

α -Кетоглутаровая кислота (КГК) широко используется в химической промышленности в качестве исходного сырья для получения различных полимеров; пластмассы на основе КГК обладают повышенной прочностью и термостойкостью, что в сочетании со способностью к биодegradации делает их перспективным сырьем для расходных материалов, смол, пигментов, пластификаторов, для синтетических целей, хладагентов, антифризов, растворителей, а также в аналитической химии. В пищевой промышленности КГК используется как пищевая добавка, а вместе с солями щелочных металлов – в качестве консервирующего агента для мясных и рыбных продуктов, а также различных напитков. КГК применяется в медицине при противоопухолевой терапии, лечении шизофрении, алкоголизма и других социально-значимых заболеваний, в клинической практике для диагностики большого спектра заболеваний (например, гепатитов, инфекции миокарда, дистрофии мышц, дерматитов и др.), а также в качестве компонента инфузионных растворов и эластомеров, которые используют для заживления ран. Современная спортивная медицина рассматривает КГК в качестве перспективного анаболического средства.

Во всем мире КГК производят путем химического синтеза. Процесс производства многостадийный, связан с использованием токсичных и взрывоопасных веществ, таких как толуол, хлороформ, диэтиловый эфир, абсолютный этанол, металлический натрий.

В последние годы наиболее перспективным рассматривается микробиологический синтез КГК, при котором произведенный продукт характеризуется высокой чистотой. По оценке специалистов замена химического метода получения КГК на микробиологический снизит не только риск загрязнения окружающей среды, но и увеличит производство КГК с 10 до 100 000 т/год, что, в свою очередь, может существенно расширить сферы применения КГК и химических соединений, полученных на её основе.

Цель настоящей работы заключалась в изучении закономерностей биосинтеза КГК у дрожжей *Yarrowia lipolytica*, способов управления их биосинтетической активностью и разработке на этой основе эффективного метода получения КГК. В качестве источника углерода было выбрано рапсовое масло. Использование масла в качестве субстрата обеспечивает образование продукта с высоким уровнем чистоты, который позволяет использовать КГК не только в химической промышленности, но и в медицине, пищевой промышленности и сельском хозяйстве.

В результате работы впервые обнаружена способность дрожжевых организмов синтезировать в значительных количествах КГК из рапсового масла. В качестве продуцента отобран природный штамм *Y. lipolytica* 212. Подобраны условия культивирования продуцента, обеспечивающие максимальную продуктивность биосинтеза КГК, они включали: ограничение роста дрожжей источником тиамина; избыток азота, стабильное поддержание рН на уровне 3,5-4,0; интенсивная аэрация среды и содержание масла в среде не выше 20 г/л. В условиях периодического режима *Y. lipolytica* 212 достигнуты высокие показатели: концентрация КГК в среде 123 г/л, продуктивность ферментера 0,80 г/л·час, выход КГК – 120% от потреблённого масла.

ЧИКУРОВА Е.А., БАСКИНА С.Л.

Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва, Россия

ДЕМОНСТРАЦИЯ АГРЕССИИ И ПОДЧИНЕНИЯ У ТЕЛЯТ КОСТРОМСКОЙ ПОРОДЫ ВО ВРЕМЯ ХЕНДЛИНГА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВОЗРАСТА

В работе анализировались поведенческие реакции, демонстрирующие агрессию и подчинение у телят разного возраста во время хендлинга, при воздействии на разные участки тела.

Исследования проводили на Костромской таежной научно-опытной станции ИПЭЭ РАН в августе и декабре 2008 года и сентябре 2009 года на трех телочках-ровесницах костромской породы. На время проведения каждой серии экспериментов (в серии по 20 экспериментов для каждого теленка) телочкам исполнилось соответственно 4, 9 и 16 месяцев. Животные содержались на огороженном участке леса, площадью 20 га. В загоне

площадью 8x8 м их подкармливали травой и сеном, где проводили и эксперименты по хендлингу при отсутствии в нем подкормки. Телят по очереди заводили в загон, надевали на них веревочный недоуздок и привязывали, а затем проводили чистку резиновой скребницей и щеткой из стандартного набора для чистки лошадей. Во время чистки проводилась видеозапись. Между экспериментами телята чистке не подвергались. При анализе видеозаписи учитывали первую поведенческую реакцию теленка на прикосновения к какой-либо области тела. Подходящими для анализа были признаны следующие реакции: (демонстрирующие подчинение) опускание головы с вытянутым носом ниже холки; нос к земле; стоит неподвижно; отворачивается; отступает; приближается на зов; (агрессивные) кивок вниз, кивок в бок, вздергивание головы и набычивание.

Количество агрессивных реакций в зависимости от возраста телочек изменялось неравномерно – больше всего агрессивных реакций отмечено у нетелей в 16 месяцев, а меньше всего – в 9 месяцев. Количество реакций подчинения с возрастом менялось недостоверно. Больше всего агрессивных реакций встречалось у телочек во всех возрастах при чистке головы и живота. У 4-месячных телочек больше агрессивных реакций при чистке живота, реже - при чистке головы и задних ног, остальные области тела вызывают достоверно меньше агрессивных реакций. У 9-месячных телочек агрессивных реакций при чистке головы и живота поровну, чистка остальных частей тела вызывает достоверно меньше агрессивных реакций. У 16-месячных больше всего агрессивных реакций при чистке головы, реже – при чистке живота и передних ног и достоверно меньше при чистке всего остального.

Наибольшее количество реакций подчинения вызывает прикосновение к спине у 4-месячных и 16-месячных телят, а у 9-месячных – к бедру и боку тела, но без достоверных различий с частотой реакций подчинения при прикосновении к спине. Прикосновения к голове, хвосту и крупу вызывают меньше реакций подчинения. Во всех возрастах, демонстрируя подчинение, чаще всего телята стояли неподвижно, обычно с отведенными назад ушами. Опускание головы с вытянутым носом ниже холки с отведенными назад ушами встречалось реже, в 16 месяцев при опускании головы уши иногда оставались настороженными, что свидетельствует о меньшем страхе. Чем телята становятся старше, тем меньше демонстрируют реакцию «нос к земле, уши назад» и чаще отворачиваются.

Отступление чаще встречается у 9-месячных телочек, чем у 4-месячных, 16-месячные телята отступают гораздо реже. С возрастом телята стали охотнее подходить на зов. Интересно, что у 16-месячных телят появилось продолжение этой реакции прямо противоположное подчинению – попытка вытеснить человека из занимаемого им пространства. 16-месячные телята во время хендлинга демонстрируют новые реакции «стоит расслабленно» и «подставляется под щетку», что свидетельствует об их привыкании к хендлингу и возросшем доверии к человеку.

Самая часто встречаемая агрессивная реакция телят в возрасте 4 месяцев – кивок вниз; в 9 месяцев – кивок в бок; в 16 месяцев – набычивание.

У телочек в возрасте 4 месяцев при чистке живота происходит максимальное количество всех агрессивных реакций, кроме кивка вниз. Кивком вниз чаще всего теленок реагирует на чистку головы, достоверно реже – на чистку живота и задних ног.

9-месячные при воздействии на область головы угрожают чаще всего кивком вниз, при чистке живота происходит максимальное количество кивков в бок.

У 16-месячных телочек при чистке головы чаще других реакций проявляется набычивание, реже кивок вниз и вздергивание головы. Во всех случаях – это максимальное количество вышеуказанных реакций. При чистке живота чаще встречается набычивание, реже, кивок вниз и кивок в бок (максимум), а при чистке передних ног чаще встречается вскидывание головы.

ЧУБИК М.В., ЧУБИК М.П., ОСИПОВА Н.А.

Национальный исследовательский Томский политехнический университет, Томск, Россия

ПЕРСПЕКТИВЫ СОЗДАНИЯ НОВОГО СОРБЕНТНОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ ОЧИСТКИ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ ОТ РАДИОАКТИВНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ

С бурным развитием промышленности появилась необходимость разработки методов очистки окружающей среды, в частности сточных и промышленных вод, от радиоактивных загрязнителей и токсических химических веществ. Решение данной проблемы состоит в разработке простых и эффективных методов удаления ионов металлов из загрязненных объектов. Существуют методы очистки сточных и промышленных вод

при помощи наночастиц, которые, как известно, адсорбируют загрязняющие вещества благодаря своей высокой удельной площади поверхности. Но из-за маленьких размеров наноматериалы с адсорбированными на них ионами тяжелых металлов трудно удалять, в частности из очищенной воды. В конечном итоге будет происходить загрязнение воды еще и наноматериалами. Решением проблемы безопасного извлечения наночастиц стало нанесение наноматериалов на носители, которые было бы удобно и быстро извлекать из очищаемой среды. В качестве таких носителей рассматривают плесневые грибы. Известно, что они могут адсорбировать ионы тяжелых и радиоактивных металлов из раствора и накапливать их внутри клетки, что обеспечивает дополнительную сорбцию радиоактивных материалов из загрязненной среды - это процесс микробиологической адсорбции. Например, J.L. Zhou использовал биомассы различных видов плесневых грибов в изучении биосорбции цинка [1], а M. Tsezos и B. Volesky [2] использовали биомассу *Rhizopus arrhizus* для поглощения урана из растворов при pH=4. Японские ученые [3] в своих исследованиях использовали различные микроорганизмы, такие как бактерии, дрожжи, актиномицеты и плесневые грибы, при изучении поглощения урана из индивидуального раствора и из смеси, содержащей ионы различных тяжелых металлов. Группа ученых [4] исследовала механизм биосорбции ионов металлов (цинка, меди, кобальта, никеля и кадмия) грибными биомассами.

Это направление является актуальным, поскольку загрязнение окружающей среды радиоактивными ионами, которые могут попадать в грунтовые воды и загрязнять запасы питьевой воды, представляет собой серьезную угрозу здоровью человека.

В данной работе мы рассматриваем возможность сорбции наночастиц на мицелии плесневых грибов с целью создания нового материала для очистки природных, сточных, промышленных вод от радиоактивного загрязнения.

Мы изучали взаимодействие наночастицы плесневых грибов *Aspergillus niger*. Культивирование грибов проводилось на основе стандартных методик [5] в течение 5 суток. Осаждение наночастиц на мицелии проводили согласно следующей методике: в колбы с дистиллированной водой добавили нанопорошок и небольшие фрагменты промытого мицелия, и продолжали культивирование на термостате в течение 3 суток. Фиксировали адсорбцию наночастиц на мицелии с помощью электронной микроскопии. В результате работы мы установили факт фиксации наночастиц на модифицированном

мицелии *Aspergillusniger*, а также локализацию указанных наночастиц в грибнице – внешняя или внутренняя сторона клеточной стенки, внутриклеточное пространство.

Таким образом, в настоящее время актуальным является создание новых материалов для извлечения радионуклидов из окружающей среды. Мы планируем разработать эффективный сорбент путем композиционирования дешевых и доступных природных и технологических продуктов.

Список литературы

1. J.L. Zhou // *ApplMicrobiolBiotechnol.* 1999. Вып. 51. С. 686-693.
2. M. Tsezos, B. Volesky // *Biotechnology and Bioengineering.* 1982. Вып. 24. С. 385-401.
3. A. Nakajima, T. Sakaguchi // *ApplMicrobiolBiotechnol.* 1986. Вып. 24. С. 59-64.
4. Md. NaseemAkhtar, K. SivaramaSastry. P. Maruthi Mohan // *BioMetals.* 1996. Вып. 9. С. 21-28.
5. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. Практикум по микробиологии. М.: Издательский центр «Академия», 2005. 608 с.

ЧУГУНОВ А.О.¹, КОНДРАТЬЕВ М.С.², ПРУДЧЕНКО И.А.¹, СУХАНОВА Т.В.¹

¹*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия*

²*Институт биофизики клетки, Пущино, Россия*

ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ СТРУКТУРЫ ДЕЛЬТА-СОН ИНДУЦИРУЮЩЕГО ПЕПТИДА ПРИ РАЗЛИЧНОЙ ИОННОЙ СИЛЕ РАСТВОРА МАТЕМАТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Введение. Дельта-сон индуцирующий пептид (ДСИП, TrpAlaGlyGlyAspAlaSerGlyGlu) является регуляторным нейропептидом, обладающим стресс-протекторной и адаптогенной активностью, и представляет собой действующий компонент лекарственного препарата «Дельтаран».

Структура ДСИП, как и структуры других коротких пептидов, в водном растворе находится в состоянии динамического равновесия между упорядоченной и неупорядоченной формой. Согласно данным Gray et al. (1994), состав растворителя

существенно влияет на структуру данного пептида, так в водном растворе фосфатного буфера молекула ДСИП содержит 2 участка с β -поворотами, в то время как в трифторэтаноле принимает вид спиралеподобной структуры Согласно данным Иванова и др. (1987), ДСИП присутствует в растворе как в виде развернутой, так и квазициклической структур.

При хранении в водном растворе в молекуле ДСИП происходят изменения, которые выражаются в появлении дополнительных пиков на хроматограмме. Так при инкубации ДСИП при комнатной температуре дополнительный значимый пик на хроматограмме появляется через 1-3 сут. в 0.9% NaCl и PBS (pH 7,4) в отличие от деионизованной воды, где пептид сохраняет первоначальную структуру в течение 1-2 мес. Было высказано предположение, что ионная сила (ИС) раствора оказывает влияние на пространственную конформацию молекулы ДСИП. Целью данной работы было исследовать влияние ИС на структуру ДСИП математическими методами.

Материалы и методы. В данной работе использовался ДСИП, синтезированный в лаборатории химии пептидов (ИБХ РАН), PBS (Панэко, Россия), NaCl (Реахим, СССР), ацетонитрил (Biosolve, Нидерланды), трифторуксусная кислота (ТФУ) (Aldrich, USA) и вода, очищенная с помощью установки Millipore.

ДСИП растворяли в воде, 0,9% NaCl и PBS (pH 7, 4) из расчета 0,1 мг/мл. Предполагаемые изменения молекулы ДСИП определялась с помощью обращено-фазовой ВЭЖХ. Наличие дополнительного пика (пиков) на хроматограмме свидетельствовало об изменениях в структуре ДСИП.

Для моделирования структуры ДСИП в воде и солевых растворах использовались два подхода. Так для изучения структуры ДСИП в воде, невяной воде и без воды применяли концепцию альтернативного водородного связывания, представленную Khechinashvili N.N. et al, (2006, 2007), разработанную в Лаборатории моделирования биомолекулярных систем ИБХ РАН Исследование молекулярной динамики ДСИП при изменении ИС проводили в программе GROMACS 4.5 (100 нс, 310 К, $5 \times 5 \times 5$ нм³ ячейка с явно заданной водой), при этом для каждого случая (вода, 0,154 М NaCl и 1, 54 М NaCl) рассчитывали по 2 траектории для накопления статистики.

Результаты и обсуждение. Было показано, что в воде даже при комнатной температуре ДСИП сохранял стабильность (дополнительные пики на хроматограмме не

образовывались) в течение 1-2 мес., в то время как в 0,9% (0,154 M) NaCl ок. 3 сут, а в PBS ок. 1 сут. наблюдались изменения в хроматограмме образца.

Согласно концепции альтернативного водородного связывания было показано, что в воде ДСИП присутствует в виде развернутой структуры и альфа-спирали, предпочтительные конформации отсутствуют.

Исследование молекулярной динамики при увеличении ИС показало увеличение конформационной подвижности пептида, возрастание времени нахождения ДСИП в развернутой конформации и скорости структурной перестройки пептида. Кроме того, с увеличением ИС картина водородных связей «размывается», приобретая более случайный характер (при нулевой ионной силе h-связи стабилизируют структуры, содержащие β -поворот). Следовательно, структура пептида теряет стабильность и становится «неопределенно сильно подвижной» (в смысле конформации).

Вывод. Таким образом, был показано, ИС оказывают влияние на пространственную структуру ДСИП, усиливая подвижность цепи и возможно, способствуя изменениям в структуре молекулы.

ЧУПОВ В.С.

Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург, Россия

НЕКОТОРЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ (БИОПОЛИТОЛОГИЧЕСКИЕ) ПРЕДПОСЫЛКИ ФОРМИРОВАНИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ ИДЕИ

Мы не останавливаемся здесь на таких очевидных «биологических» аспектах национальной идеи, как народное здравоохранение, генетический груз, экологическая безопасность и пр. Они должны войти в качестве составных частей в более общую программу сохранения и развития биологической формы движения материи в нашей области вселенной (НОВ). В этом отношении может представлять интерес дискуссия, развертывающаяся на Любичевских чтениях 2011, 2012 гг. На них сразу несколько авторов представили сообщения, связанные с проблемами существования и развития человеческого общества в целом.

В случае развития любой системы, говорить о целесообразности ее существования невозможно без применения понятия цели. Рассматривая этот вопрос А. А. Поздняков (2012: 137) пишет: «Для каждой системы ... можно указать такое ее состояние, в котором будет достигнуто оптимальное функционирование. Это состояние системы следует рассматривать в качестве цели данной системы». При подобном подходе важно определиться с границами систем и соотношением их целей. Из общей теории систем известно, что оптимальное выполнение системой ее функций возможно только при не оптимальных условиях функционирования ее подсистем. Например, победа команды в гонках формулы 1 (оптимальная цель) связана с работой на износ двигателя, покрышек и самого водителя (не оптимальные условия работы подсистем, но в условиях системы, которая только и обеспечивает их существование – вне системы гонок ни ее болиды, ни их гонщики вообще не нужны). И в этом отношении весьма важен выбор главной и вспомогательных целей развития общества. Если коммерческий успех ставится не в качестве средства, для достижения более важных, витальных целей жизни общества, то сама жизнь такого общества ставится под угрозу. И современное состояние России – хороший тому пример.

Для того, чтобы правильно позиционировать себя в пределах системы государства все его подсистемы – экономическая, политическая, юридическая, наука, искусство, образование и т. д. „должны представлять себе общую цель системы, а также пути и методы движения к ней. У нашего государства нет явно выраженной цели существования. Но это не значит, что ее нет у общества. И общество в конце концов обяжет государство к этой цели двигаться. Пока же в обществе идет обсуждение этой цели. Научное сообщество Любищевских чтений достаточно представительно, чтобы некоторые аспекты этой проблематики высветить.

Так Ч. М. Нигматуллин (2012: 124) отмечает, что цель существования биосферы – «... поддержание жизни и оптимизационное изменение условий ее существования».

В. И. Дроганов, анализируя витальные потребности и средства выживания биоты, приходит к выводу, что « ... у живой материи Земли должны быть виды организмов, обеспечивающие размножение этой материи во Вселенной. По сути, таким видом является человечество, так, как оно сегодня способно доставить зародыши жизни на планеты других галактик».

А. П. Корж, отмечает: «По всей видимости продолжается «эволюция эволюции», которая на современном этапе полностью зависит от человека. К сожалению человечество еще не до конца осознало всю ответственность и трагичность нынешнего момента».

А. Б. Савинов (2012: 40), солидаризуясь с Б. Ф. Чадовым (2011: 267) отмечает, что «здоровое общество должно иметь стратегию добра и зла, построенную на правильном понимании Мира».

Интересно в плане выбора целеполагания замечание Ю. В. Линника (2011: 240) о том, что в процессе развития конкурируют не развивающиеся структуры, а цели-аттракторы, и вывод А. В. Кудряшова (2011: 214) о том, что поставленная цель деятельности – это определенный проект результата.

Автор этих строк, анализируя становление целеполагания биологической формы движения материи в НОВ пишет: «... идея, заключенная в строении материи (сильный антропный принцип), стремится осознать себя и получить возможность операционального действия через биологический интеллект. ... И в будущем, может быть не нашему виду *Homo sapiens*, но виду потомку *H. eusapiens* ... человеку по настоящему разумному, ... придется по-настоящему решать, что делать в Мире и с Миром, уже не в качестве Адама и Евы, призванных возделывать Райский сад, но в роли самого демиурга.» (Чупов, 2012: 58).

Как видно ученое сообщество предполагает существующими у человечества весьма серьезные цели, но в то же время, явно выражается и сомнение, что в своем теперешнем состоянии оно готово эти цели осуществлять. Но постепенно готовится к тому, чтобы быть демиургом вселенной человечество должно. Реальной же целью на настоящий момент, национальной идеей для нашей страны, ее народа и руководства могла бы стать идея наведения порядка на ее территории, создания условий для наиболее благоприятного, удобного и безопасного проживания и позитивной деятельности ее населения. Иными словами национальной идеей России могла бы стать идея превращения ее в страну предпочтительного проживания, при осознании в качестве отдаленной цели подготовки человечества к деятельности в качестве демиурга вселенной. Можно было бы подумать, что последнее положение излишне. Добиться безбедного существования можно было бы и без постановки последней задачи. Но это вряд ли возможно. В природе существует ряд глобальных опасностей – от падения крупных метеоритов, до ограниченности времени существования биологических видов. В том числе не вечен и вид *Homo sapiens* L. (Chupov

V., Machs E. Saltation in the evolution and destiny of species *Homo sapiens* L. // Ed. Yacunin Problems of contemporary world futurology. 2011. P. 200 – 236). Без постановки крупных задач демиургического характера решать подобные проблемы невозможно. Поэтому было бы желательно, чтобы государственные структуры ориентировались на решение будущих проблем, а не на примерку на себя одежд прошлых веков.

При частичной поддержке программы «Динамика генофондов» и грантов РФФИ 09-04-014-69; 09-04-01469а.

ЧУПЫРКИНА А.А.¹, ШАМОНОВ Н.А.¹, ЛОБАНОВА Н.В.¹,

ФИЛИППОВА Е.А.¹, САУТКИНА Е.Н.²

¹ ООО «Фармапарк», Москва, Россия

² ФГУП "Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов", Москва, Россия

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ОЧИСТКИ ИНТЕРФЕРОНА БЕТА-1а ИЗ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ КЛЕТОК СНО

Рассеянный склероз – воспалительное заболевание нервной системы, приводящее к демиелинизации нервных волокон с последующей заменой их соединительной тканью. Рассеянный склероз занимает третье по частоте место (после сосудистых заболеваний и эпилепсии) среди заболеваний ЦНС. В России этим тяжелым заболеванием страдает, по разным данным, 150-200 тысяч человек.

В настоящее время основными лекарственными средствами, используемыми для лечения этого заболевания, являются препараты на основе интерферона-бета (Avonex, Rebif, Betaseron and Extavia), проявляющие эффективное противовоспалительное действие, результатом чего является снижение частоты и тяжести течения заболевания.

Интерферон-бета-1а (действующее начало препаратов Avonex и Rebif) – гликопротеин, поэтому его продукция осуществляется биотехнологическим способом в эукариотических клетках. Основной задачей настоящей работы была разработка экономичного, легко масштабируемого и воспроизводимого способа очистки

интерферона-бета-1а из культуральной жидкости клеток СНО, культивируемых в бессывороточной среде.

Хорошие результаты были достигнуты при использовании двухступенчатой очистки интерферона-бета-1а на аффинном сорбенте Blue Sepharose 6 FF, с последующим концентрированием на СМ-сефарозе и переводом в буфер готовой лекарственной формы на колонке HiTrap desalting. При использовании такой схемы очистки выход процесса достигал примерно 65%. Чистота интерферона-бета-1а, определенная методами HPLC и SDS-электрофорезом (в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях), составляла 97%.

Таким образом, был предложен простой и экономичный способ очистки рекомбинантного интерферона-бета-1а, позволяющий удовлетворить запросы потребителей в недорогом и качественном отечественном препарате.

ЧУРИЛОВ Г.И.¹, ПОЛИЩУК С.Д.², НАЗАРОВА А.А.²

*¹Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова,
Рязань, Россия*

*²Рязанский государственный агротехнологический университет имени П.А. Костычева,
Рязань, Россия*

ОСОБЕННОСТИ МИНЕРАЛЬНОГО ОБМЕНА РАСТЕНИЙ КУКУРУЗЫ В ПРОЦЕССЕ ОНТОГЕНЕЗА ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С НАНОЧАСТИЦАМИ МЕДИ

Наночастицы биогенных металлов обладают высокой биологической активностью. Предыдущими исследованиями было определено влияние нанопорошков железа, кобальта и меди на показатели роста и развития лекарственных и сельскохозяйственных растений, а также на морфологические, биохимические, физиологические и продуктивные показатели. Результаты показали, что наночастицы биогенных металлов в определенных концентрациях повышают качество сельскохозяйственной продукции, энергию прорастания и всхожесть (до 5-8%), рост растений (до 10%), площадь листовой поверхности (до 12%), а также урожайность растений и семян (до 15-20%). Для

дальнейшего изучения влияния металлов в наноразмерном состоянии на процессы обмена в растительном организме и для определения возможного токсического эффекта наночастиц необходимо определить показатели минерального обмена растений.

Целью проведенного исследования стало изучение влияния наночастиц меди на динамику содержания минеральных веществ в процессе онтогенеза в надземной и подземной частях растений кукурузы.

В полевых условиях перед посевом семена кукурузы были обработаны наночастицами меди в концентрации 0,1 г на гектарную норму высева семян. Данная концентрация была определена в лабораторных условиях как оптимальная. Минеральный состав листьев, стеблей и корней растений кукурузы определяли в различных фазах вегетации. Результаты исследований показали, что на разных фазах развития растений в их корнях, стеблях и листьях происходило уменьшение концентрации одних элементов при увеличении других. Независимо от предпосевной обработки семян концентрация меди, кадмия и свинца уменьшалась. Содержание железа в надземной части опытных растений в фазе 8 - 9 листьев было больше, чем в контроле в на 50%, а в корнях - примерно во столько же меньше. На этой фазе корни растений, семена которых подвергали предпосевной обработке, превосходили по содержанию марганца примерно вдвое. Преимущество по содержанию этого элемента сохранялось в стеблях и листьях растений, произрастающих на опытном участке, до начала цветения.

В течение развития растений разной направленностью отличались изменения концентраций поллютантов – кадмия и свинца. Содержание свинца к началу цветения в стеблях растений, семена которых подвергали предпосевной обработке, было выше, чем в контроле в 2 раза, а кадмия - в 3 раза меньше. В листьях контрольной группы свинца было меньше, чем в опытной на 50%, а кадмия – на 30% больше. На этой фазе развития растения существенно отличались по содержанию меди: стебли растений опытной группы по ее концентрации превосходили контрольную в 3 раза.

К завершению развития растений, по достижении кукурузой восковой спелости концентрация всех анализируемых элементов значительно уменьшилась. Наиболее интенсивно уменьшалось содержание химических элементов от вегетативных органов к семенам в растениях, семена которых подвергали обработке. Содержание меди в семенах

этих растений было меньше, чем в контроле в 2 раза, марганца – в 3, свинца – в 1,4 и кадмия – в 1,6 раза, а железа, напротив, – в 2 раза больше контроля.

Следовательно, наночастицы меди влияют на динамику аккумуляции поллютантов и эссенциальных элементов в процессе роста и развития растений. Направленность и диапазон этих изменений существенно варьируют в онтогенезе растения. Но к завершению развития растений под влиянием нанопорошка меди происходит уменьшение содержания, меди, марганца, кадмия и свинца как в надземной части, так и в зерне созревшей кукурузы.

ЧУРИЛОВ Г.И.¹, ПОЛИЩУК С.Д.², НАЗАРОВА А.А.²

*¹Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова,
Рязань, Россия*

*²Рязанский государственный агротехнологический университет имени П.А. Костычева,
Рязань, Россия*

АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ РАСТЕНИЙ ПРИ ОБРАБОТКЕ СЕМЯН ТОКСИЧНЫМИ КОНЦЕНТРАЦИЯМИ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК

Быстрое развитие нанотехнологий и наноматериалов неизбежно приводит к все более широкому влиянию их достижений на различные живые системы. Наноматериалы характеризуются высокой проникающей способностью, химической (в т.ч. каталитической) активностью, что делает их потенциально опасными веществами способных воздействовать на биохимические реакции. Как правило, любая новая, тем более высокотехнологичная, продукция нуждается в тщательном и всестороннем исследовании на предмет безопасности для человека и окружающей среды.

Одним из важнейших критериев адаптивной устойчивости растения является его биохимический статус. Колебания концентрации важнейших антиоксидантных ферментов, таких как пероксидазы, супероксиддисмутазы, способны отразить негативный эффект, оказываемый факторами среды на гомеостаз растительного организма. Существенное отклонение показателей биохимического статуса растений от нормы может служить сигналом о наличии токсического эффекта со стороны изучаемого наноматериала.

Целью проведенного исследования стало изучение влияния различных концентраций углеродных нанотрубок (CNT от 0,01 г до 1000 г на гектарную норму высева семян) на активность в проростках вики ферментов пероксидазы и супероксиддисмутазы.

Опыт был проведен в лабораторных условиях в соответствии с ГОСТ 12038-84. В исследовании использовались семена вики сорта «Льговская». Семена закладывались в чашки Петри по 50 семян в каждой. Затем помещались в термостат, где прорастали при постоянной температуре 23°C.

Результаты исследования показали, что активность пероксидазы различна в зависимости от концентрации углеродных нанотрубок (CNT) в культивационной среде. Также различается активность пероксидазы по месту нахождения: корни или ростки. Однако, характер изменений активности пероксидазы для вики примерно одинаковый.

С повышением содержания углеродных нанотрубок наблюдается увеличение активности фермента в корнях вики от 2,6% (CNT – 0,01) до 18,0% (CNT – 10). При более высоком содержании нанотрубок концентрация пероксидазы уменьшается на 6,2% (CNT – 100) и на 23,2 % (CNT – 1000).

В ростках вики активность пероксидазы при низких концентрациях углеродных нанотрубок уменьшается с 13,1% выше контроля для (CNT-0,01) до 8,5% (CNT-1,0). При более высоких концентрациях активность уменьшается более значительно: на 3,2% (10), на 8,0% (100), на 14,0% (1000) относительно контроля.

Количество фермента супероксиддисмутазы в корнях опытных образцов вики с увеличением содержания углеродных нанотрубок плавно возрастает до 10,2% (CNT- 1,0), затем резко увеличивается, достигая максимума +78,6% (CNT-100), и уменьшается на 24,3% при содержании CNT-1000.

Активность супероксиддисмутазы в ростках опытных образцов вики в растворах углеродных нанотрубок низкой концентрации увеличивается при содержании CNT -0,1 с - 2,7% до +1,3% при CNT-1,0, а при концентрации CNT-1000 резко падает на 56,7% относительно контроля.

Таким образом, высокие концентрации углеродных нанотрубок достоверно изменяют активность ферментов пероксидазы и супероксиддисмутазы как в надземной, так и в подземной частях проростков вики. Начиная с концентрации 100 г на гектарную

норму высева семян отклонения активности ферментов от контроля составляет более 30%, что указывает на опасность накопления таких концентраций углеродных нанотрубок в окружающей среде.

ЧХЕНКЕЛИ В.А., ГОРЯЕВА Н.А.

Иркутская государственная сельскохозяйственная академия, Иркутск, Россия

ПРИМЕНЕНИЕ ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ГРИБА – КСИЛОТРОФА РОДА *TRAMETES* ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ У ЦЫПЛЯТ

На сегодняшний день одним из приоритетных направлений развития микологии и биотехнологии является разработка технологий с использованием грибов - ксилотрофов для получения биологически активных соединений. Многие из них являются фармакологически более активными. По сравнению с продуктами химического синтеза, они менее токсичны и более эффективны для применения в медицинской и ветеринарной практике. Особое место препараты на основе грибов рода *Trametes*, обладающие комплексным действием на организм. Таким полифункциональным препаратом является Леван -2, прошедший широкие производственные испытания в качестве лечебно-профилактического средства при желудочно-кишечных болезнях молодняка.

В птицеводстве с использованием интенсивной технологии одной из проблем является снижение уровня неспецифической резистентности организма птицы и их устойчивости к действию неблагоприятных факторов внешней среды, в том числе патогенной и условно-патогенной микрофлоры. Традиционно в технологических схемах выращивания цыплят при инфекционных кишечных болезнях применяются antimicrobные препараты. Сегодня в качестве их альтернативы предлагается использование пробиотиков, которые также не всегда эффективны для предотвращения заселения кишечника цыплят патогенными бактериями. Таким образом, в систему борьбы с массовыми кишечными болезнями цыплят могут быть включены комплексные препараты нового поколения, в том числе и препараты, получаемые с использованием методов биотехнологии на основе грибов – ксилотрофов.

Цель работы состояла в сравнительном изучении влияния пробиотиков лактура, естура и лактобифадола и препарата Леван -2 на основе гриба–продуцента, получаемого методом жидкофазной ферментации, при их использовании в качестве профилактических средств на формирование биоценоза кишечника цыплят, резистентность организма к инфекциям, вызываемым возбудителями семейства *Enterobacteriaceae*. Исследования проводили на цыплятах кросса Dekalb (Голландия). В широком производственном эксперименте в СХ ОАО “Белореченское” по применению пробиотиков брали цыплят в возрасте от 4 до 42 сут. В каждой группе было задействовано по 45 000 - 50 000 голов цыплят. Пробиотики вносили в корм согласно инструкциям к применению и в соответствии с практическим использованием в СХ ОАО “Белореченское”: лактур- 1 кг/т; естур -2 кг/т; лактобифадол - 2 кг/т до 10 дней, 2 кг/т – до 40 - 45 сут. Леван -2 с профилактической целью добавляли только в систему поения из расчёта 20 мл препарата на 1 л воды.

Установлено, что срок заселения желудочно–кишечного тракта цыплят основными физиологическими группами нормальной микрофлоры (лактобактериями, бифидобактериями, *E. coli* с нормальной ферментативной активностью, *Bac. subtilis*) происходит уже к 20 -25 сут. при использовании лактура и естура, наблюдали при использовании лактобифадола и препарата Леван -2. Статистически значимо ($P < 0,05$) на 22 -26 % увеличивается содержание грибов и дрожжей на 16 -18 % в биоценозе при использовании пробиотиков, что связано с понижением уровня рН при повышении содержания органических кислот, в частности, молочной кислоты, образующейся в процессе метаболизма лактобактерий и бифидобактерий. При использовании Левана -2 наблюдали угнетение бактерий группы *E. coli*, энтерококков, а также снижение численности стафилококков. Закономерности, выявленные в соотношении бактерий в биоценозе кишечника у цыплят в 20 -25 -суточном возрасте, сохранялись и на 40 - 45-й день исследований. Установлено, что при использовании пробиотиков и Левана- 2 происходит повышение количества эритроцитов, содержания гемоглобина в крови, повышение ЛАСК и БАСК, что свидетельствует о повышении сопротивляемости организма цыплят. Результаты были подтверждены и при анализе производственных показателей при выращивании цыплят (отход, живая масса, расход кормов и др.). Так, отход цыплят через 4 недели при использовании естура составлял 1,37 %, лактура - 0,95

%, Левана -2 – 0 %, лактобифадола -1,13 %, живая масса - 260, 266, 268 и 274 г, соответственно (при норме 260 г). Таким образом, наиболее эффективным является использование в производственных условиях лактура до 20 -25 –суточного возраста цыплят. Как с точки зрения заселения желудочно–кишечного тракта цыплят основными физиологическими группами нормальной микрофлоры, повышения иммунологической резистентности организма цыплят, так и с точки зрения экономичности использования препаратов (цена лактура - 215 руб./кг; естура - 215 руб./кг; лактобифадола - 260 руб./кг). Однако для коррекции состава микробиоценоза цыплят необходимо проводить снижение содержания грибов и дрожжей. С этой целью можно дополнительно использовать, например, йодсодержащий препарата Монклавит -1, что повлечёт за собой дополнительные расходы. Использование препарата Леван -2 как в системе ветеринарно-санитарных мероприятий при борьбе с колибактериозом птицы, так и в комплексе санитарно-противоэпидемических мероприятий для профилактики острых кишечных бактериальных инфекций является на сегодняшний день более эффективным, корректным и экономически обоснованным.

ЧХЕНКЕЛИ В.А., КАРПОВА Е.А.

Иркутская государственная сельскохозяйственная академия,

Иркутск, Россия

**КОНСТРУИРОВАНИЕ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ
НА ОСНОВЕ ГИДРОЛИЗАТА БИОМАССЫ ГРИБА – ПРОДУЦЕНТА TRAMETES
PUBESCENS (SHUMACH.:FR.) PILAT.**

Одним из основных микробиологических методов диагностики возбудителя сибирской язвы, как из патологического материала, так и продуктов питания, кормов, объектов окружающей среды (почвы, воды, воздуха, смывов) является посев материала для исследования культуральных и морфологических свойств возбудителя на универсальные питательные среды (мясо-пептонный бульон (МПБ), мясо-пептонный агар (МПА), агар Хоттингера). В связи с высокой себестоимостью питательных сред с использованием мяса, мясных и рыбных полуфабрикатов сегодня существует острая

необходимость поиска и апробации подходящего для этой цели стандартного и недорогого сырья. Требования к сырью, предназначенному для производства питательных основ, включают содержание необходимого полноценного белка, минимальное содержание жира, высокую биологическую ценность, хорошую растворимость, соответствие нормативным документам, экономическую эффективность применения. Современные требования к качеству и стандартности питательных сред для культивирования возбудителей особо опасных инфекций с одновременным упрощением и удешевлением производства определяют актуальность проведенных нами исследований.

В этом отношении биомасса бактерий, грибов отвечает всем требованиям. С другой стороны, актуальность использования побочных продуктов и отходов биотехнологических производств, вызванная обострением экологических проблем, не вызывает сегодня сомнения. На наш взгляд, сегодня заслуживает внимания в качестве источника белка биомасса гриба – базидиомицета *Trametes pubescens* (Shumach.:Fr.)Pilat. как отход производства полифункционального препарата Леван -2 антимикробного и иммуностимулирующего действия, который используется в качестве лечебно – профилактического средства при массовых желудочно–кишечных заболеваниях молодняка.

Цель работы состояла в разработке питательной среды для культивирования возбудителя сибирской *Bacillus anthracis* на основе биомассы гриба – продуцента.

В настоящее время в разработке полноценных питательных сред мясные основы в основном уступают место казеину, широкое распространение получили также гидролизаты рыбного сырья и дрожжей.

Предлагаемый нами способ получения гидролизата биомассы включает следующие операции: биомассу гриба - продуцента с влажностью 70-90 % (после центрифугирования) нагревают до 46-50 °С и в эту биомассу вносят протосубтилин Г10Х в количестве 0,2-0,5 % к сухой биомассе. Гидролиз проводится в течение 20-30 ч при постоянной температуре и перемешивании. Таким образом, питательная среда для культивирования микроорганизмов рода *Bacillus* и, в частности, возбудителя сибирской язвы - *B. anthracis*, содержит питательную основу, дрожжевой автолизат, натрий хлористый, воду, а в качестве питательной основы - ферментализат биомассы гриба – продуцента.

Для приготовления плотной питательной среды дополнительно добавляется агар-агар в количестве 15-20 г/л. Для приготовления питательной среды гидролизат биомассы можно разводить водопроводной водой до содержания аминного азота 100 ± 10 мг%, корректировать рН до требуемой величины, добавлять 0,3 % NaCl и воду до 1 л. Для приготовления плотной среды в нее необходимо добавлять 15-20 г/л агар-агара. Среду следует разливать в пробирки или колбы и стерилизовать автоклавированием при 110°C 30 мин. В этом случае готовая среда содержит следующие компоненты, г/л: ферментализат биомассы гриба-продуцента - 350 (содержание аминного азота 90 мг%); NaCl - 30; водопроводная вода – остальное; $\text{pH} 7,2 \pm 0,2$.

На полученной основе можно готовить полноценную и доступную жидкую или плотную питательную среду для культивирования и других возбудителей инфекционных болезней. В питательную основу можно добавлять при необходимости другие компоненты для расширения спектра культивируемых микроорганизмов в зависимости от их питательных потребностей.

Для оценки пригодности предлагаемых питательных сред было проведено выращивание возбудителя сибирской язвы и сапрофитных микроорганизмов рода *Bacillus* на разработанных жидких и плотных питательных средах. Контрольными были стандартные среды производства НИЦФ (г. СПб). Показано, что разработанные нами питательные среды на основе ферментализата биомассы гриба-продуцента при выращивании на них микроорганизмов рода *Bacillus* по культуральным свойствам не уступают коммерческим аналогам, приготовленным на ферментативной основе говяжьего мяса (бульону Хоттингера и агару Хоттинге-ра), а также МПБ и МПА. При этом нужно учитывать, что производить среды на гидролизатах биомассы гриба-продуцента в 3-5 раз выгоднее экономически.

Проведенные исследования могут служить моделью при изучении использования других видов сырья для приготовления питательных сред.

ШАГИМАРДАНОВА Е.И.¹, МАЛИКОВА А.З.¹, ЗАХАРОВ И.С.¹,

ГУСЕВ О.А.¹, ОКУДА Т.², ШАРИПОВА М.Р.¹

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

² Национальный институт агробиологических наук, Цукуба, Япония

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКРОБНЫХ СИМБИОНТОВ

ХИРОНОМИДЫ *POLIPEDILUM VANDERPLANKI*

Стремительное развитие метагеномики привело к повышению интереса к изучению симбиотических взаимоотношений между микроорганизмами с хозяевами и их взаимного влияния на метаболизм, образ жизни, продолжительность существования. Хотя традиционно, наибольшее внимание уделялось патогенным бактериям, патогены представляют собой лишь небольшую часть симбионтов животных. Бактерии могут быть выгодными и важными партнерами для жизнедеятельности и развития своих хозяев. Насекомые представляют собой удобную модель для исследования динамики и последствий взаимодействий животных с микроорганизмами. Показано, что в некоторых видах насекомых симбиотические бактерии являются необходимым механизмом выживания и формируют основу физиологии хозяина и его экологической адаптации. Даже если бактерии не строго необходимы для выживания хозяина, полученные экспериментальные данные позволяют предположить, что микробиота оказывает влияние на фенотип хозяина и может опосредовать взаимодействия макроорганизма с потенциальными патогенами.

Объектом данного исследования служила африканская хирономида *Polipedium vanderplanki*. Личинки этого организма способны к погружению во временное аметаболическое состояние, что обеспечивает выживание при полном отсутствии воды. Такое состояние «временной смерти» называется криптобиозом. Существует теория, что эволюция криптобиоза у хирономиды проходила в тесном взаимодействии с микроорганизмами, что сказалось на генетическом аппарате, как хозяина, так и симбионтов. Изучение этих взаимодействий позволит выяснить пути коэволюции живых существ и развития механизмов устойчивости к экстремальным условиям среды. Поэтому целью нашей работы явилась выделение и идентификация микробных симбионтов хирономиды *P. vanderplanki*. На первом этапе работы с использованием универсальных

бактериальных праймеров и матрицы общей геномной ДНК хирономиды был получен пул амплифицированных последовательностей гена 16s рРНК. Полученные амплификаты были клонированы в бактериальный вектор pGEM-T (Invitrogen, США) и трансформированы в клетки *E. coli*. Было отобрано 400 положительных клонов, несущих вставку гена 16s рРНК. Секвенирование плазмидной ДНК выявило наличие генов, принадлежащих к 12 ти бактериальным родам. Среди них встречались представители родов *Aeromonas*, *Flectobacillus*, *Oxalobacteraceae*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Chryseobacterium* и других. Культура *Acinetobacter* была выделена в чистом виде и культивирована в стандартных лабораторных условиях. Нами исследован ряд свойств данного микроорганизма. Исследование динамики роста показало, что в богатой питательной среде бактерии-симбионты проходят полный цикл развития и достигают максимального роста к 14 часу. Было установлено, что данный штамм обладает устойчивостью к группе антибиотиков пенициллинового ряда. Показано, что данный штамм является активным продуцентом индустриально важных ферментов, таких как протеиназ, рибонуклеаз и фитаз. Таким образом, штамм *Acinetobacter sp.* выделенный из африканской хирономиды *P. vanderplanki* может быть перспективным объектом использования в биотехнологии.

Работа выполнена при финансовой поддержке федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг.

ШАМОЛИНА И.И.¹, БЕЛОВА Н.В.²

¹ Санкт-Петербургский Государственный университет технологии и дизайна,

Санкт-Петербург, Россия

² Ботанический институт им. В.Л.Комарова Российской академии наук,

Санкт-Петербург, Россия

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ РАЗРАБОТКИ В ТЕКСТИЛЬНОЙ ОТРАСЛИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ

В работе приводится анализ применения базидиальных грибов для создания биотехнологий в текстильной отрасли. Рассмотрены направления использования, методы и

виды грибов. Сформулированы перспективы создания новых разработок на основе базидиомицетов.

В последние два десятилетия значительное внимание с точки зрения решения научных и прикладных задач уделено вопросам участия природных биодеструкторов, высших базидиальных грибов, в процессах деградации целлюлозных и лигноцеллюлозных материалов. Окислительные ферменты базидиомицетов охарактеризованы присутствием комплекса ферментов - лигнин пероксидазы, Mg-пероксидазы и лакказы, участвующих в биодеструкции. Установлена низкая субстратная специфичность отмеченных ферментов и способность к трансформации разнообразных органических, в том числе ароматических соединений. Эти исследования открыли широкие возможности практического использования оксидоредуктаз базидиомицетов. Многочисленные исследования были выполнены по использованию ферментов грибов, прежде всего лакказ, для очистки и утилизации различного рода промышленных отходов.

В текстильном производстве, характеризующимся большими объемами твердых и жидких отходов, стоит важная проблема по их утилизации.

Основной сырьевой прядильной культурой для производства волокон в России является лен. Переработка льна сопряжена с образованием значительного количества твердых отходов. В связи с тем, что высшие базидиальные грибы доминируют в исследованиях по биоконверсии, мы использовали виды съедобных дереворазрушающих грибов *Flammulina velutipes* и *Pleurotus ostreatus* для утилизации текстильных отходов,

Переработка первичных отходов льна с образованием продуктов с пониженным содержанием лигнина и повышенным содержанием белка была осуществлена с использованием базидиомицетов *Trametes hirsuta*, *Pleurotus ostreatus*, *Pholiota highlandensis*. Все исследуемые базидиомицеты росли на отходах переработки льна – костре, корнях и полове в отсутствии дополнительных питательных веществ.

Ферментные комплексы базидиомицетов рода *Trametes*, показали эффективность при модификации ими льноволокна и хлопко-льняных материалов (пряжи, ткани) и сократили применение хлорита натрия. При этом степень белизны и прочности пряжи не отличались от таковых при традиционном отбеливании.

Для трансформации не утилизируемых отходов, содержащих шерсть, использовали виды грибов, отличающихся высокой биологической активностью - *Coriolopsis caperata*,

Pholiota highlandensis, *Trametes hirsuta*, *Trametes maxima*, *Trametes ochracea*. Штаммы видов базидиомицетов, используемых в разработках, были получены из Коллекции культур базидиомицетов LE BIN.

Для решения проблемы очистки жидких стоков текстильного производства, содержащих азо-красители, за рубежом были привлечены базидиальные грибы родов *Lenzites*, *Phanerochaete*, *Pleurotus*, *Polyporus*, *Russinoporus*, *Trametes*. Наиболее эффективными оказались виды *Trametes*. Все перечисленные таксоны базидиомицетов представлены широким разнообразием природных отечественных штаммов в специализированной Коллекции LE BIN.

Отдельное направление связано с использованием пигментов, вторичных метаболитов грибов, для окраски шерстяных и шелковых тканей. На 14 Международном симпозиуме (Швеция, 2010) были представлены виды окрашивающих базидиальных грибов и отмечены успехи «green chemistry» с их использованием. В отечественной текстильной отрасли грибные пигменты не нашли пока своего применения.

Перспективы применения высших базидиальных грибов в текстильной отрасли могут быть связаны также с разработкой биотехнологий, как на основе ферментов (в нативной или иммобилизованной форме), так и грибного мицелия и вторичных метаболитов. Применение медицинских базидиомицетов может оказаться перспективным при создании текстиля с заданным биологическим эффектом, например, антибиотическим или антифунгальным. Высокая сорбционная способность мицелия высших грибов может быть использована при создании волокна, обогащенного ионами металлов.

ШАПОШНИКОВ А.В., ШИДЛОВСКИЙ Ю.В.

Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

SAYP – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ ФАКТОР ТРАНСКРИПЦИИ ВЫСШИХ ЭУКАРИОТ

В работе проводились исследования новых функций белка SAYP в модельном организме *Drosophila melanogaster*. SAYP - транскрипционный коактиватор РНК-полимеразы II, имеющий гомологи среди всех многоклеточных организмов. Он служит

основой для сборки большого суперкомплекса, объединяющего коактиваторы Brahma и TFIID. Brahma – фактор ремоделинга хроматина, осуществляющий освобождение промоторной области от нуклеосомы, для того, чтобы с ней могли связаться общие факторы транскрипции. TFIID - транскрипционный фактор, который распознает промотор и привлекает общие факторы транскрипции для образования инициаторного комплекса. SAYP участвует в работе экдизонового каскада и JAK/STAT пути. Помимо этого, ранее имелись данные об участии SAYP в работе иммунной системы дрозофилы.

В иммунном ответе дрозофилы на бактерии участвует сигнальный IMD-путь, при активации которого происходит синтез антимикробных пептидов, требуемых для обезвреживания микроорганизмов. Нами было показано участие SAYP и компонентов TFIID и Brahma комплексов в активации генов антимикробных пептидов IMD-пути. Также мы продемонстрировали, что нокдаун SAYP приводит к снижению экспрессии генов антимикробных пептидов.

Помимо ассоциации с TFIID и Brahma, SAYP связан с аппаратом 3'-процессинга транскриптов. Одним из факторов 3'-процессинга является белковый комплекс CPSF, который, как предполагается, сначала привлекается в промоторную область, а в процессе транскрипции переносится РНК-полимеразой II на 3'-конец. Мы показали, что субъединицы CPSF взаимодействуют с белком SAYP и одной из субъединиц комплекса TFIID, а также что CPSF привлекается на гены антимикробных пептидов при активации IMD-пути.

Итак, SAYP – многофункциональный транскрипционный фактор, важный для активации нескольких сигнальных путей и связанный с различными молекулярными процессами в ядре.

ШАРАВИН Д.Ю., КОВАЛЕВСКАЯ Н.П.

ФГБУ Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

ВЛИЯНИЕ НА РАЗВИТИЕ ПШЕНИЦЫ ФИТОГОРМОНОВ, СИНТЕЗИРУЕМЫХ ГАЛОФИЛЬНЫМИ АЗОТФИКСИРУЮЩИМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ

Одной из проблем современного агропромышленного производства является природное и техногенное засоление почв. Повышение засоленности почв отрицательно

влияет на развитие растений и приводит к значительному снижению продуктивности сельскохозяйственных культур. Инокуляция растений бактериальными препаратами с целью увеличения показателей урожайности становится весьма привлекательной и уже используется на практике во многих регионах мира. Выяснение тонких механизмов формирования и функционирования уникальных биологических систем – ассоциаций бактерий и растений – представляет значительный фундаментальный интерес. Синтез ассоциативными микроорганизмами фитогормонов (ауксинов, гиббереллинов и цитокининов) рассматривается как одна из основных форм взаимодействия между микрофлорой и растением-хозяином. Установлено, что некоторые фитогормоны, такие как, индолил-3-уксусная кислота (ИУК), могут инициировать экспрессию генов, связанных с выживанием растений в стрессовых условиях.

Целью настоящей работы было изучение влияния фитогормонов галофильных азотфиксирующих бактерий на развитие семян пшеницы в условиях солевого стресса.

Из образцов засоленных почв природного и техногенного происхождения на среде Гальченко с добавлением от 50 до 150 г/л NaCl и 2% метанола в отсутствие солей содержащих азот было получено 20 накопительных культур галофильных азотфиксирующих метиловобактерий. Инокуляцию сухих семян пшеницы проводили

суспензией бактерий, дважды отмытых от культуральной среды физраствором. Проращивание семян проводили в стерильных флаконах с 1 мл 1% раствора NaCl. В качестве контроля использовали проростки, инокулированные бактериями.

Было установлено, что при солевом стрессе в несколько раз повышалась интенсивность синтеза каротиноидов и хлорофиллов в листовой части растений, которые предварительно были обработаны бактериальной суспензией. Проростки семян, инокулированные галофильными азотфиксирующими метиловобактериями, развивались значительно быстрее, чем в контроле, характеризовались увеличением массы и усилением ветвления корней. Известно, что эти изменения корневой системы растений индуцируются фитогормонами, продуцируемыми бактериями: индолилуксусной кислотой и цитокининами. Микробиологическими и молекулярно-генетическими методами удалось установить наличие метиловобактерий в корневой и листовой частях 14-ти дневных проростков. Гены *ipdC* и *miaA*, контролирующие пути биосинтеза ауксинов и цитокининов метиловобактерий были обнаружены только в корневой части растений. Было выдвинуто

предположение, что при прорастании семян пшеницы в условиях солевого стресса уже на первых этапах формирования растения происходит заселение корневых волосков проростков галофильными азотфиксирующими метиловобактериями, фитогормоны которых, инициируют запуск адаптивных механизмов выживания растения в неблагоприятных условиях.

Таким образом, галофильные азотфиксирующие метиловобактерии оказывают положительное влияние на развитие проростков пшеницы в условиях солевого стресса, синтезируя фитогормоны и улучшая азотное питание растений, поэтому являются перспективной группой для разработки экологически безопасного бактериального препарата – стимулятора роста растений.

Работа выполнена при поддержке грантов для молодых учёных УрО РАН и программы «УМНИК».

ШАХОВА К.А.¹, КОТЕЛЬНИКОВА Т.В.¹, БАБАЕВ А.А.², КОНТОРЩИКОВА Е.Ю.¹,
НОВИКОВ Д.В.², КАРАУЛОВ А.В.³, БАРЫШНИКОВ А.Ю.⁴, НОВИКОВ В.В.²

¹*Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород, Россия*

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

³*Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова, Москва, Россия*

⁴*Российский онкологический научный центр им. Н.Н.Блохина РАМН, Москва, Россия*

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ ПРОФИЛЬ ПРОТЕОМА КРОВИ ОНКОГИНЕКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

Среди разнообразия белков протеома крови человека важное место занимают растворимые дифференцировочные молекулы клеток иммунной системы, участвующие в регуляции противоопухолевого иммунного ответа. Однако информация о структурно-функциональном состоянии пула растворимых молекул адгезии и входящих в его состав олигомерных и гетеромерных белковых наноструктур требует дополнения. Интегральные представления о сывороточном составе пула растворимых (s-форм) молекул адгезии

имеют потенциальное мониторинговое значение и могут быть получены при анализе множества составляющих его компонентов, в том числе с использованием биочипов.

Цель - оценка сывороточного уровня суммарных и олигомерных фракций растворимых молекул CD8, HLA I, CD25, CD38, растворимых молекул адгезии CD54 (ICAM-1) CD50 (ICAM-3) и CD18 (β_2 -цепь интегринов), а также растворимых белковых комплексов, состоящих из молекул CD8 и HLA I, CD18 и CD54, CD18 и CD50 в крови больных миомой матки и раком эндометрия.

Материалы и методы. В работе использованы 40 образцов крови пациенток с гистологически подтвержденным диагнозом миомы матки и 20 образцов больных раком эндометрия I стадии. Контрольную группу составили образцы крови 150 здоровых доноров.

Содержание растворимых антигенов определяли с помощью разработанных ранее иммуноферментных методов с использованием моноклональных антител серии ИКО.

Результаты. В сыворотке крови больных миомой матки обнаружено повышение содержания суммарной и олигомерной фракций растворимых молекул CD8 на фоне статистически значимого увеличения уровня растворимых комплексов CD8-HLA I в 1,6, 1,7 и 1,2 раза соответственно. Также при миоме матки наблюдалось повышение сывороточного содержания растворимых молекул адгезии sCD50, sCD54 в 3,1 и 2,1 раза соответственно. Сывороточное содержание суммарного sCD18 белка находилось в пределах нормы. На этом фоне содержание растворимых белковых комплексов CD18-CD54 статистически достоверно не менялось, а уровень ассоциатов CD18-CD50 проявлял лишь тенденцию к увеличению. Только при миоме матки наблюдалось увеличение по сравнению со здоровыми донорами суммарной фракции растворимого белка sCD38 в 1,4 раза на фоне нормального содержания олигомерной фракции CD38 антигена.

Содержание суммарной и олигомерной фракций растворимых молекул CD25 находилось в пределах нормальных значений как при миоме матки, так и при раке эндометрия.

У больных раком эндометрия выявлено повышение содержания суммарной и олигомерной фракций растворимых молекул CD8 в 1,3 и 1,9 раз соответственно. Содержание суммарных фракций sCD18 и sCD50 белков у женщин, больных раком эндометрия, находилось в пределах нормы, уровень суммарной фракции sCD54 молекул

увеличивался в 2,2 раза по сравнению с нормой. Обнаружена тенденция к повышению уровня олигомерного sCD54 антигена при неизменном содержании олигомерного sCD50 антигена. Концентрация растворимых комплексов CD18-CD54 в сыворотке крови больных женщин повышалась в 1,8 раза, что отражает изменения в состоянии интерактома крови.

Выводы. Выявленные изменения в сывороточном содержании тестируемых белков адгезии и их растворимых ассоциатов отражают изменения состояния протеома и интерактома крови у больных миомой матки и раком эндометрия. Полученные данные дополняют представления о разнообразии и структурно-функциональном состоянии пула растворимых молекул клеток иммунной системы человека, как одной из составляющих протеома крови с учетом белок-белковых взаимодействий и их роли в модификации функционального состояния пула данных белков.

ШЕВЧЕНКО Г.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия

ВОЗМОЖНОЕ УЧАСТИЕ ЦИАНОБАКТЕРИЙ В ФОРМИРОВАНИИ ГОРМОНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ РАСТЕНИЙ

Происхождение и эволюция гормональной системы растений в настоящее время практически не исследованы. В литературе господствует представление о том, что хлоропласты – важная мишень действия цитокининов и абсцизовой кислоты (АБК) произошли в результате эндоситоза древних фотосинтезирующих цианобактерий в эукариотическую клетку. Ранее в цианобактериях был обнаружен ген, кодирующий изопентенилтрансферазу, ключевой фермент синтеза цитокининов, были идентифицированы изопентениладенин, *транс*-зеатин и другие цитокинины, а также АБК в количествах, сопоставимых с их содержанием у растений. Кроме того, была показана активация *транс*-зеатином синтеза РНК в транскрипционной системе цианобактерий *in vitro*. В связи с этим, важным представляется вопрос о том, могли ли в процессе эволюции цианобактерии привнести цитокинины и АБК, а также отдельные элементы их сигнальной систем в растительную клетку. Для решения этой задачи мы предприняли поиск

цитокинин- и АБК-связывающих белков у цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803. Нами был выделен и охарактеризован растворимый цитокинин-связывающий белок с молекулярной массой 67 кДа (СВР 67) *Synechocystis*. СВР67 выделяли двумя независимыми методами: с помощью аффинной хроматографии на зеатинрибозид-Сефарозе и иммуноаффинной хроматографии с использованием моноклональных антител к СВР70 кДа кукурузы. Цитокинин-связывающая активность СВР67 установлена по его взаимодействию с антиидиотипическими антителами, выделенными из сыворотки против антител к зеатину и взаимодействующими с белками по сайту связывания зеатина. Показана высокая специфичность взаимодействия зеатина с СВР67. СВР67 цианобактерий активировал элонгацию транскрипции *in vitro* в лизате клеток *Synechocystis*, а также в лизате хлоропластов ячменя, что говорит о большой функциональной консервативности выделенного СВР67. Известно, что метаболизм хлоропластов наряду с цитокининами регулирует и АБК. С помощью метода аффинной хроматографии на АБК-сефарозе нами был выделен ряд АБК-связывающих белков (АСБ) *Synechocystis*. Фракция этих АСБ была специфична к АБК и не взаимодействовала с другими фитогормонами и, как и СВР *Synechocystis*, активировала тотальную транскрипцию *in vitro* в лизате *Synechocystis*. В этой фракции с помощью антиидиотипических антител к АБК были выявлены полипептиды с массами 23, 50, 60 и 67 кДа, а с помощью антител к растительному АБК-связывающему белку ААГ2.1, участвующему в антистрессовых реакциях растений, детектированы два полипептида-гомолога ААГ2.1. Совокупность полученных результатов указывает на возможность существования отдельных компонентов системы восприятия сигналов цитокининов и АБК у эволюционного предшественника хлоропластов – цианобактерий, которые могли привести их в растительную клетку.

ШЕСТАКОВА Н.Н.¹, ТИХОНОВ Д.Б.¹, БЕЛИНСКАЯ Д.А.¹, БАРЫГИН О.И.¹,
НАГАЕВА Э.И.¹, ВАНЧАКОВА Н.П.²

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение наук Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П.Павлова, Санкт-Петербург, Россия

СОЗДАНИЕ КОМПЛЕКСНОЙ ПРОТИВОЗУДНОЙ И ПРОТИВОБОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ ДЛЯ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ, ПОЛУЧАЮЩИХ ХРОНИЧЕСКИЙ ГЕМОДИАЛИЗ

После двух лет гемодиализа более половины больных хронической почечной недостаточностью (ХПН) страдают от скелетно-мышечных болей и зуда, интенсивность которых мало изменяется после процедуры гемодиализа. Психическое состояние таких больных часто осложнено депрессией и чувством тревоги. Нами разработана технология выявления и отбора среди антидепрессантов и антиконвульсантов препаратов, обладающих способностью управлять синдромами зуда и боли у больных ХПН. Используя методы теоретического конформационного анализа пространственных структур антидепрессантов и результаты клинических исследований, мы показали, что эффективность препарата зависит от наличия в его структуре специфически V-образной пространственной группировки, состоящей из двух взаимоцентрированных ароматических колец, расположенных под углом 120⁰. Условиям критерия удовлетворяли следующие трициклические и тетрациклические антидепрессанты: дезипрамин, миансерин, тианептин, amitриптилин, мirtазапин, имипрамин, мапротилин, хлорпрозамин, тразодон. Нами впервые была клинически подтверждена эффективность миансерина и тианептина для управления синдромом зуда у больных ХПН. Стандартизованное клинико-психопатологическое исследование 100 больных ХПН показало, что миансерин особенно эффективен для мужчин (редукция синдрома зуда при лечении миансерином составила 73,6%, а при лечении тианептином – 37, 9%); тианептин более эффективен для управления синдромом зуда у женщин. Наличие ароматических колец, расположенных в иной ориентации (циталопрам) не обеспечивает противозудной эффективности препарата.

Структурному критерию удовлетворяют структуры молекул антиконвульсантов карбамазепина, фосфенитоина, окскарбазепина и эсликарбамазепина. В литературе имеются данные об их противоболевой эффективности. Проведенное нами клиническое исследование карбамазепина впервые продемонстрировало его высокую противозудную эффективность: редукция зуда у мужчин, больных ХПН, составила 84%, у женщин - 44%. Облегчение зуда наблюдали на 1 неделе применения при суточной дозе 100 мг (стандартная доза 300мг), противоболевой эффект – на 2-3 неделе на более высокой дозе (200 мг). Антиконвульсант депакин, структура которого не удовлетворяет требованиям структурного критерия, не проявил способности к управлению синдромом зуда у больных ХПН.

Антидепрессанты и антиконвульсанты, выделенные как эффективные для управления болью и зудом, имеют различные механизмы основного действия. По своему трехмерному строению эти молекулы близки по строению к блокаторам каналов NMDA рецепторов. Методом фиксации мембранного потенциала нейрона в конфигурации целая клетка обнаружено, что эффективные противозудные препараты дезипрамин, amitriptилин, хлорпрозамин и миансерин, имеющие в своей структуре V-образную группировку могут блокировать NMDA рецептор. Методами молекулярного моделирования определены специфические места их связывания с NR1 и NR2 субъединицами рецептора, а также 2 места связывания внутри канала.

На основании проведенных комплексных исследований разработана оптимизированная терапия для различных групп больных ХПН, получающих хронический гемодиализ, для управления синдромами зуда и боли с учетом пола и психического состояния пациента. Для мужчин, находящихся в депрессивном состоянии, рекомендуется лечение миансерином, при тревожном состоянии – карбамазепином. Для женщин, в зависимости от характера невротических расстройств настроения и поведения - тианептин (депрессия) и карбамазепин (тревога). Клинические наблюдения показали возможность применения больными ХПН этих препаратов в течение длительного времени благодаря высокой технической эффективности процедуры современного гемодиализа. Такое лечение больных позволяет не только корректировать психическое и эмоциональное состояние, но облегчать их страдания от боли и зуда без увеличения объема назначаемых препаратов, повышать качество жизни пациентов.

Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ (грант №12-04-00454-а).

ШИПИЦИНА А.К., ЧЕРАНЁВА Л.Г.

*Пермский национальный исследовательский политехнический университет,
Пермь, Россия*

ВЛИЯНИЕ ТИОБАКТЕРИЙ НА ПРОЦЕССЫ ВЫЩЕЛАЧИВАНИЯ В ТЕХНОЛОГИИ УТИЛИЗАЦИИ ЦИНК-МАРГАНЦЕВЫХ ЭЛЕМЕНТОВ ПИТАНИЯ

На сегодняшний день остро стоит проблема переработки разных источников питания (аккумуляторов, батареек и т.д.). Экологическая обстановка ухудшается с каждым годом из-за загрязнения почвы и воды тяжёлыми металлами, которые входят в состав различные источники питания. По данным Минрегионразвития РФ наша страна ежегодно производит 30 млн. тонн мусора. В России почти полностью отсутствует культура утилизации использованных элементов питания, в то время как их число ежегодно увеличивается на 50 - 60 тыс. тонн. Этому способствует развитие автотранспорта, распространение компьютеров, а, следовательно, аккумуляторов для источников бесперебойного питания. Батарейка разлагается примерно за десять лет, и за это время она может загрязнить тяжелыми металлами 20 кв. м земли или около 400 литров воды. В состав батареек входят токсичные элементы, такие как цинк, марганец, свинец, кадмий, ртуть, которые могут попадать в живые организмы. Поэтому особенно актуальной становится проблема безопасного сбора и переработки отработавших элементов питания.

У нас есть несколько полигонов, где захороняются отработанные аккумуляторы, и ряд предприятий, занимающихся сбором и утилизацией свинцово-кислотных аккумуляторных батарей. Известные методы переработки включают в себя термическую, пирометаллургическую восстановительную плавку или термохимическую переработку свинцовой массы аккумулятора. Однако, в настоящее время в стране существуют недостаток пунктов приёма и переработки, так как их создание требует немалых капиталовложений. Кроме того, 75% от общего рынка портативных батареек составляют непerezаряжаемые (одноразовые): угольно-цинковые, щелочно-марганцевые, пуговичные

батарейки, литиевые. Они используются в качестве источников питания аппаратуры широкого потребления, прежде всего в устройствах с периодическим использованием. Так как доля выпуска щелочных марганцево-цинковых элементов больше, чем всех других, то для проведения исследований были выбраны такие батарейки. Гарантийный срок хранения щелочных элементов составляет 5-7 лет. Батарейки бывают нескольких видов: мизинчиковые, пальчиковые, крона, бочка, таблетка. Миниатюрный элемент питания марки camelon ALKALINE BATTERY LR521 размером с пуговицу.

Было исследовано влияние на разложение этих батареек микроорганизмов *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Бактерии окисляют многие сульфидные минералы, серу и ряд её восстановленных соединений, закисное железо и др. Источником данных бактерий явились кислые шахтные воды (г.Губаха). Для получения накопительной культуры *Acidithiobacillus ferrooxidans*. использовали среду 9К, pH среды 2. Построены кривые роста бактерий при температурах 23⁰С и 30⁰С, которые показали, что при температуре в 30⁰С развитие культуры идет быстрее.

Предварительно было рассмотрено растворение образцов таблеток из цинка и меди. Для исключения влияния среды на растворение металлов анализировали параллельные пробы: с тиобактериями в среде 9К и с чистой средой 9К. Отмечается положительное влияние бактерий при контакте с образцами цинка (извлечение 36% и 12%). Растворение медных образцов проходило одинаково в параллельных пробах. Контроль за растворением батареек вели через определенные промежутки времени по выщелачиванию ионов цинка, так как цинковая анодная масса находится в центре батареек.

Как видно из таблицы, разрушение элементов питания также происходит быстрее и полнее в присутствии тиобактерий. Видимо, это связано с дополнительным участием *Acidithiobacillus ferrooxidans* в процессах электрохимической коррозии металлосодержащих систем. Таким образом, использование кислых сточных вод с тиобактериями для целей утилизации батареек может позволить решать вопросы экологического плана.

ШИРОКОВ А.В., ЛАСТОЧКИНА О.В., ИЛЬЯСОВА Е.Ю., ПУСЕНКОВА Л.И.
ГНУ Башкирский НИИ сельского хозяйства Россельхозакадемии, Уфа, Россия

**ВЫДЕЛЕНЫ НОВЫЕ ШТАММЫ БАКТЕРИЙ,
ОКАЗЫВАЮЩИХ СТИМУЛИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ НА РОСТ И
РАЗВИТИЕ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ**

На современном этапе развития почвенной микробиологии и биотехнологии большое внимание уделяется разработке и внедрению в сельскохозяйственную практику биологических препаратов на основе живых клеток микроорганизмов и (или) их метаболитов.

Почвенные бактерии в прикорневой зоне растений в определенных случаях формируют микробное сообщество, обладающее способностью стимулировать рост, развитие и иммунный потенциал растений. Стимулирование роста растений может быть обусловлено как влиянием экзогенных метаболитов ризосферных микроорганизмов, так и непосредственным проникновением бактерий во внутренние ткани и органы растений (эндофитные штаммы), влияющих на синтез в растениях фитогормонов различных классов. Одним из главных элементов взаимодействия бактерий (эндофитных или ризосферных) с растением-хозяином является биоконтроль фитопатогенных микроорганизмов, в частности, микромицетов, за счет выделения веществ фунгицидной природы.

Под влиянием так называемых RGPB бактерий запускаются механизмы защитной системы растения-хозяина, обозначенные как «системная индуцированная устойчивость» (СИУ) и «системная приобретенная устойчивость» (СПУ).

Нами выделены три новых штамма бактерий из ризосферы растений, отобранных в различных почвенно-климатических зонах Республики Башкортостан. Определена оптимальная плотность бактериальной суспензии (КОЕ/мл) для каждой культуры, оказывающая максимальный стимулирующий эффект на проростки пшеницы. Выявлено антистрессовое воздействие данных штаммов бактерий на растения при засолении.

Изучение стимулирующего влияния на рост и развитие проростков пшеницы выделенных штаммов проводили по ниже представленной схеме. Семена пшеницы (сорт Башкирская 26) предварительно замачивали в культуральной жидкости (КЖ) различной

плотности (с шагом в 1 порядок) в течение 3 часов. Затем семена проращивали в стерильной водопроводной воде в течение 3 суток при 25⁰С на светоплощадке. После получения трехсуточных проростков их отделяли от эндосперма и выращивали еще 3 суток в тех же условиях. В качестве контроля использовали необработанные КЖ семена. После 6 суток культивирования определяли длину корней, листьев, их сырую и сухую массу.

Было выявлено, что максимальный стимулирующий эффект при минимальной концентрации клеток на проростки пшеницы оказали штаммы, обозначенные А11-1 и А12-2 в концентрации 10³ КОЕ/мл и А10-4 в концентрации 10⁴ КОЕ/мл. При этом во всех экспериментальных образцах, обработанных бактериальной суспензией вышеуказанных штаммов наблюдалось увеличение длины и массы корней и надземной части растений пшеницы на 25-35% по сравнению с контрольными образцами.

Для оценки антистрессового воздействия данных штаммов бактерий на растения пшеницы был проведен следующий эксперимент. Трехсуточные проростки пшеницы помещали на 24 ч в КЖ с концентрацией бактерий, оказывающей максимальный стимулирующий эффект на рост и развитие проростков и после удаления КЖ выращивались в течение 3 суток в стерильной водопроводной воде. Эксперимент проводился в двух вариантах - половина проростков пшеницы подвергались солевому стрессу, путем помещения их 2% раствор NaCl. В качестве контроля использовались необработанные проростки.

Было выявлено, что длина и масса корней и надземной части растений пшеницы, обработанные КЖ выделенных штаммов на 25-30% превышают аналогичные показатели контрольных образцов. Корневая система проростков, предварительно обработанных КЖ и подвергнутых солевому стрессу, по степени развития была аналогична контрольному варианту, не подвергнутому стрессу. Надземная часть проростков, подвергшихся солевому стрессу, по степени развития была аналогична контрольному образцу, выращенному в тех же условиях.

Таким образом, выявлено, что выделенные нами три новых штамма бактерий обладают стимулирующим эффектом на рост и развитие проростков пшеницы, а также обладают антистрессовым эффектом при засолении. По мнению ряда исследователей,

такие эффекты могут быть связаны с синтезом у бактерий метаболитов (элиситоров), влияющих на биохимические пути синтеза фитогормонов различных классов у растений.

ШКУРАТОВ П.П., ОВЧИННИКОВА С.И.

ФГБОУ ВПО «Мурманский государственный технический университет»,

Мурманск, Россия

СОВРЕМЕННЫЕ СПОСОБЫ ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЯ КРИЛЕВОЙ МУКИ

Проблема получения крилевой муки, пригодной в качестве комбикормовой стоит очень остро, поскольку большая ее часть поставляемая в животноводческие хозяйства, в значительной степени обсеменены различной микрофлорой, в т.ч. патогенной. Для решения данной проблемы необходима разработка современных способов предварительного обеззараживания крилевой муки с применением средств и методов, максимально сохраняющих биологическую ценность кормов.

Крилевая мука, как известно, изготавливается в основном на морских судах непосредственно после вылова. При этом основные технологические операции состоят из проварки криля и сушке разваренной массы до содержания влаги не более 10 %.

Наиболее распространенным и достаточно эффективным способом обеззараживания криля является проварка его в открытых или закрытых котлах. В производственных условиях при использовании в открытых котлов обеззараживание наступает через 20 и 30 минут соответственно с момента закипания воды. Следует так же отметить, что обеззараженный криль не изменяет своей структуры и целостности и бульон остается прозрачным с характерным специфическим запахом.

Использование закрытых котлов, работающих под давлением дает возможность повысить температуру нагревания более 100 °С, что позволяет сократить время обеззараживания кормов, но это в свою очередь способствует снижению потерь питательных веществ, в частности, протеина и аминокислот. Другим недостатком этого способа является то, что после обеззараживания криль частично изменяет свою структуру в результате разваривания. Тем не менее, обеззараживание крилевой муки достигается.

Достаточно перспективным средством обеззараживания кормового криля является озон, который широко применяется для уничтожения патогенных микроорганизмов. Однако данный метод требует сложного технологического оборудования, дополнительных затрат труда, времени и энергоресурсов. В связи с этим для обеззараживания крилевой муки более экономически целесообразным представляется использование УФ-излучения, получаемое специальными установками. Крилевая мука, обработанная вышеуказанным способом, по своим показателям соответствует всем предъявляемым требованиям ГОСТ «Крилевая мука кормовая».

ШКУРАТОВА Е.Б., МУХИН В.А.

ФГБОУ ВПО «Мурманский государственный технический университет»,

Мурманск, Россия

Полярный научно-исследовательский институт морского рыбного хозяйства и океанографии (ПИНРО), Мурманск, Россия

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА АКТИВНОСТЬ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫХ ПРОТЕИНАЗ МОРСКИХ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ БАРЕНЦЕВА МОРЯ

Изучение ферментной системы морских беспозвоночных, а именно, активности пищеварительных протеиназ, является весьма актуальным по ряду причин. Пищеварительные органы морских беспозвоночных, как известно, являются отходами промысла и переработки. Отходы промысла морских беспозвоночных в настоящее время используются лишь частично, в основном в качестве корма для пушных зверей, хотя по массе они могут составлять до 90 % от объема вылова. Таким образом, данное сырье является достаточно дешевым с экономической точки зрения. Но основная причина, по которой целесообразно использовать внутренние органы беспозвоночных для получения препаратов протеиназ, состоит в том, что они обладают сравнительно высокой активностью и имеют большой выход при их выделении.

Целью данной работы было исследование влияния температуры на активность пищеварительных протеиназ морских беспозвоночных. Для достижения указанной цели были поставлены следующие *задачи*: определение общей протеолитической активности

пищеварительных протеиназ некоторых беспозвоночных (акклиматизированный камчатский краб *Paralithodes camtschaticus*, северная креветка *Pandalus borealis*, морская звезда *Asterias rubens*) в температурном диапазоне от 5 до 70 °С; определение температурного оптимума активности пищеварительных протеиназ исследуемых организмов.

Объектами исследования служили представители различных таксонов беспозвоночных Баренцева моря: ракообразные – акклиматизированный камчатский краб *Paralithodes camtschaticus*, северная креветка *Pandalus borealis*; иглокожие – морская звезда *Asterias rubens*.

В качестве материала были использованы пищеварительные органы (гепатопанкреас) вышеуказанных организмов.

Порошкообразные ферментные препараты для дальнейших анализов получали из гепатопанкреаса морских беспозвоночных путем осаждения белковых веществ ацетоном. Для этого к гомогенату тканей приливали чистый холодный ацетон в соотношении 1:10 (троекратно).

В исследуемом материале определяли общую протеолитическую активность, используя метод Ансона с некоторыми модификациями. При определении общей протеолитической активности последовательно изменяли температуру раствора в диапазоне от 5 до 70 °С, определяя активность по расщеплению 1 %-ного раствора гемоглобина.

На основе полученных данных были сделаны следующие выводы.

- температурный оптимум протеолитической активности пищеварительных протеиназ исследуемых беспозвоночных (камчатский краб *Paralithodes camtschaticus*, морская звезда *Asterias rubens*, северная креветка *Pandalus borealis*) составляет 50 – 55 °С;
- протеолитическая активность в гепатопанкреасе камчатского краба значительно превосходит таковую в гепатопанкреасе морских звезд и креветки;
- проявление некоторой активности наблюдается при низкой температуре (5 – 15 °С) инкубационной среды;
- при температуре свыше 55 °С отмечается снижение активности, что связано с денатурацией ферментов.

Протеолитическая активность в ферментном препарате из гепатопанкреаса камчатского краба значительно превосходит таковую в ферментных препаратах из гепатопанкреаса морских звезд и креветки. Подобная высокая активность протеиназ является экстенсивной эволюционной компенсацией за слабую дифференциацию пищеварительной системы, невысокую субстратную специфичность ферментов и, как уже отмечалось, за холодную среду обитания (температура воды в Северных морях далека от оптимума проявления активности большинства ферментов).

ШЛЯХОТКО Е.А., САПУНОВА Л.И.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

ВЫДЕЛЕНИЕ И СВОЙСТВА ФИТАЗ, ПРОДУЦИРУЕМЫХ ШТАММАМИ Ф-12 И Ф-99 *BACILLUS SPECIES*

Корма для птицы и сельскохозяйственных животных с однокамерным желудком, основными ингредиентами которых являются злаковые и бобовые культуры, а также шроты и жмыхи семян масличных культур, содержат большие количества антипитательных компонентов. В их число входят соли фитиновой кислоты – фитаты (*мио*-инозитолгексакис-фосфат), запасаемые растениями в качестве резервного источника фосфора. Для гидролиза фитатов, протекающего с образованием *мио*-инозита и неорганических фосфатов, и повышения питательной ценности кормов применяют препараты микробных фитаз (КФ.3.1.3.8, *мио*-инозитол-гексакисфосфат-3-фосфогидролаза и КФ. 3.1.3.26, *мио*-инозитол-гексакисфосфат-6-фосфогидролаза).

Несмотря на достигнутые в последние годы успехи в области получения и использования фитаз, в основном, грибного происхождения, ведутся исследования по обнаружению и идентификации новых ферментных белков. Особое внимание при этом уделяется поиску ферментов, активных и стабильных в широком диапазоне рН и температуры. Указанным критериям в максимальной мере отвечают фитазы бактерий, преимуществом которых являются также относительно высокие скорости роста и сравнительно короткие сроки культивирования.

Ранее нами были изолированы культуры бактерий *Bacillus species* с высоким уровнем синтеза внеклеточных фитаз. Цель настоящего исследования – выделение и характеристика свойств ферментов, синтезируемых штаммами Ф-12 и Ф-99 *Bacillus sp.*

В результате фракционирования этиловым спиртом белков, содержащихся в бесклеточных фильтратах культуральной жидкости бактерий *Bacillus sp.* Ф-12 и Ф-99, были получены препараты фитаз со степенью очистки 1,49 и 1,38 раз соответственно. Как установлено, исследуемые ферменты характеризуются высокой специфичностью к фитату натрия, что согласуется с приведенными в литературе данными. Так, известно, что продуцируемые про- и эукариотами кислые гистидиновые фитазы обладают широкой субстратной специфичностью, тогда как щелочные фитазы бактерий рода *Bacillus* узкоспецифичны и гидролизуют, как правило, только фитат [Gulati et al., 2007; Fu et al., 2008; Jorquera et al., 2008; Yao et al., 2011].

Важнейшими характеристиками фитаз, используемых в качестве кормовой добавки, являются их термо- и рН-оптимумы действия и стабильность. Оптимальные условия действия известных микробных ферментов варьируются в пределах рН 2,5-8,0 и температуры 45-80°C [Radney et al., 2001; Oh et al., 2004]. Как показали результаты наших исследований, максимум активности фитаз исследуемых штаммов *Bacillus sp.* отмечается в диапазоне рН 5,5-7,5. В условиях высокой кислотности среды (рН 4,0) каталитическая активность фитаз обеих культур снижается на 26%, при активной кислотности среды, соответствующей рН \geq 8,0, – на 42-43%; при рН 9,0 ферментные белки полностью неактивны. Температурный оптимум действия фитаз *Bacillus sp.* Ф-99 и Ф-12 приходится на 55°C, в то время как 95-100% их активности обнаруживается в диапазоне температуры 45-55°C. При 60°C активность ферментов *Bacillus sp.* Ф-99 и *Bacillus sp.* Ф-12 составляет соответственно 74 и 49% от максимальной, при 65°C – 20 и 4,5 %. Оптимумы действия фитаз других представителей рода *Bacillus* укладываются в диапазон 55-70°C [Kerovuo et al., 1998; Gulati et al., 2011; Tran et al., 2011].

Щелочные фитазы бактерий рода *Bacillus* являются металлоферментами, проявляющими максимум активности в присутствии ионов Ca^{2+} в концентрации от 1 до 20 мМ [Kerovuo et al., 1998; Idriss et al., 2002]. Согласно полученным данным, максимальная активность фитаз *Bacillus sp.* Ф-99 и Ф-12 наблюдается в среде с 10-20 мМ Ca^{2+} . В случае, когда их содержание в реакционной среде снижается до 5 мМ, активность

синтезируемых штаммами Ф-99 и Ф-12 ферментов уменьшается в 2,25 и 5 раз соответственно, а при сверхоптимальных (до 50 мМ) концентрациях – в 6,7 и 2 раза. Катионы кальция в количестве ≤ 1 мМ и ≥ 100 мМ полностью ингибируют активность обоих ферментных белков. Следовательно, концентрация в кормах кальция является критическим фактором, определяющим эффективность возможного использования фитаз штаммов Ф-99 и Ф-12 *Bacillus* sp. в качестве кормовой добавки.

Таким образом, высокое сродство исследуемых ферментов к фитату, их активность и стабильность в широком диапазоне температуры и кислотности среды позволяют рекомендовать продуцирующие их штаммы *Bacillus* sp. Ф-99 и Ф-12 как основу для получения фитазы или в качестве доноров генов для конструирования высокопродуктивных рекомбинантных штаммов. Создание штаммов и на их основе высокорентабельных технологий получения препаратов фитазы, а также освоение индустриального производства этого вида наукоемкой и высокотехнологичной продукции являются признанными во всем мире приоритетными направлениями фундаментальных и прикладных научных исследований в области биотехнологии.

ШПАК А.Б.

Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН,

Пушино, Россия

Пушчинский государственный естественно-научный институт, Пушино, Россия

ИНФОРМАЦИОННО-ИЗМЕРИТЕЛЬНАЯ СИСТЕМА ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ЭКСТРАКЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

Снижение запасов органического сырья и увеличение его стоимости способствует привлечению внимания исследователей и технологов к использованию возобновляемых растительных ресурсов, к их комплексной переработке с целью получения максимального выхода полезных продуктов. Технологии безотходной переработки растительной биомассы предполагают получение биологически активных веществ (в частности, дигидрокверцетина и арабиногалактана), необходимых для удовлетворения нужд

медицины, фармакологии, сельского хозяйства, парфюмерно-косметической промышленности.

На базе Института биологического приборостроения с опытным производством РАН организовано производство биологически активных веществ из растительного сырья на пилотной установке по запатентованной технологии. Строгое соблюдение технологических режимов процесса экстракции является обязательным условием обеспечения качества конечных продуктов данного производства. На производстве имелись средства отображения информации о параметрах технологического процесса, однако основной проблемой являлось отсутствие средств автоматизированного мониторинга и управления, вследствие чего повышалось влияние человеческого фактора на ход технологического процесса, поскольку последовательность действий и соблюдение рабочих режимов определялось исключительно оператором.

С целью получения оператором информации с высокой достоверностью для эффективного принятия решений по управлению технологическим процессом разработана информационно-измерительная система пилотной установки экстракции. Одной из основных задач при разработке системы было обеспечение возможности ее адаптации для построения АСУ ТП на более крупных предприятиях. Разработка системы мониторинга проводилась на основе существующих наработок в области промышленной автоматизации мониторинга и управления технологическими процессами.

В ходе работы были определены основные информативные параметры, влияющие на ход технологического процесса и определяющие качество конечных продуктов производства. Разработаны структурная и функциональная схемы системы мониторинга. Основу информационно-измерительной системы образуют датчики и программируемые контроллеры ОВЕН (г. Москва). Разработано программное обеспечение системы на базе программного пакета MasterSCADA. Элементы отображения информации (цветовая и световая сигнализации и промышленный компьютер) установлены в шкаф контроля технологического процесса. Компьютер обрабатывает поступающую с контроллеров информацию и представляет ее на мониторе в удобной для восприятия форме. Система информирует о возникновении аварийных ситуаций и выдает рекомендации, необходимые оператору для осуществления управления установкой. Кроме того, информационно-

измерительная система формирует отчеты о состоянии параметров технологического процесса за определенный промежуток времени и фиксирует аварийные ситуации.

Внедрение разработанной информационно-измерительной системы в технологический процесс экстракции привело к существенному снижению количества аварийных ситуаций, возникающих в ходе технологического процесса, за счет более эффективного операторского управления установкой на основе полученных при мониторинге данных, что, в свою очередь, обеспечило воспроизводимость качества конечных продуктов производства.

Аппаратно-программные средства разработанной информационно-измерительной системы технологического процесса экстракции могут быть адаптированы для построения АСУ ТП на промышленных предприятиях по производству биологически активных веществ.

ШПАКОВА Е.А.¹, ДЕРКАЧ К.В.², ШПАКОВ А.О.²

*¹ФГБУН Институт высокомолекулярных соединений Российской академии наук,
Санкт-Петербург, Россия*

*²ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова
Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия*

ДЕЙСТВИЕ ПЕПТИДА, СООТВЕТСТВУЮЩЕГО ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ 612-627 РЕЦЕПТОРА ТИРЕОТРОПНОГО ГОРМОНА, НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ В ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЕ КРЫС

Поиск и разработка пептидов, соответствующих участкам цитоплазматических петель рецепторов серпантинного типа, которые в отсутствие гормональной стимуляции способны селективно взаимодействовать с гетеротримерными G-белками и запускать сигнальные каскады, включающие гомологичный им рецептор, является одной из важнейших проблем современной молекулярной эндокринологии и медицины. Наибольший интерес здесь представляют пептиды, регулирующие активность рецептора тиреотропного гормона (ТТГ), которые могут быть использованы для контроля функций щитовидной железы, поскольку в настоящее время препараты, непосредственно влияющие

на рецептор ТТГ, отсутствуют. Цель исследования состояла в разработке селективных регуляторов функций рецептора ТТГ на основе пептидов, производных С-концевого участка 612–627 третьей цитоплазматической петли (ЦП-3) рецептора ТТГ, и изучения их активности по влиянию на аденилатциклазную сигнальную систему в щитовидной железе и нетиреоидных тканях крыс. Пептид Gln-Tyr-Asn-Pro-Arg-Asp-Lys-Asp-Thr-Lys-Ile-Ala-Lys-Arg-Nle-Ala^{612–627}-Lys-Ala-амид, в котором Met⁶²⁶ заменен близким ему по физико-химическим свойствам норлейцином, и его аналог 612–627-К(Palm)А, модифицированный пальмитатом по С-концевому лизину, были синтезированы твердофазным методом. Пептид 612–627-К(Palm)А повышал базальную активность аденилатциклазы (АЦ) и ГТФ-связывание G-белков во фракциях мембран щитовидной железы, в то время как немодифицированный пептид 612–627-КА был менее активен. В мембранах, обработанных коклюшным токсином, инактивирующим G_i-белки, эффекты пептида 612–627-К(Palm)А сохранялись, в то время в мембранах, обработанных холерным токсином, выключающим из сигнальной трансдукции G_s-белок, они в значительной степени ослаблялись. Эти данные указывают на то, что пептид 612–627-К(Palm)А, как и активированный гормоном рецептор ТТГ, осуществляет свое действие на аденилатциклазную систему в щитовидной железе крыс через чувствительные к холерному токсину G_s-белки. Пептид 612–627-К(Palm)А (10^{-5} – 10^{-3} М) также снижал стимулирующие АЦ и ГТФ-связывание эффекты 10^{-8} М ТТГ в щитовидной железе крыс. Немодифицированный пептид в этом отношении был мало эффективен. Действие пептида 612–627-К(Palm)А характеризовалось рецепторной и тканевой специфичностью. Так в концентрации 10^{-4} М он практически не влиял на стимулирующие АЦ и ГТФ-связывание эффекты β-адренергических агонистов и гипофизарного АЦ-активирующего полипептида-38 в щитовидной железе, хорионического гонадотропина в семенниках и агонистов серотониновых рецепторов в мозге крыс. Таким образом, пептид 612–627-К(Palm)А селективно активирует АЦ и G_s-белки и ингибирует передачу гормонального сигнала через гомологичный ему рецептор. Это доказывает ключевую роль С-концевого участка ЦП-3 рецептора ТТГ во взаимодействии с G_s-белками. Биологическая активность пептида 612–627-К(Palm)А указывает на перспективность модификации пептидов, производных гормональных рецепторов, гидрофобными радикалами для создания на их основе селективных регуляторов гормональных сигнальных систем.

Работа поддержана РФФИ (проект № 12-04-00351).

ШЛОТГАУЭР А.А., ГЛУЩЕНКО О.Ю., ПОЛЯКОВ Н.Э., ЛЁШИНА Т.В.

Институт химической кинетики и горения СО РАН, Новосибирск, Россия

ГЛИЦИРРИЗИНОВАЯ КИСЛОТА – ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ

Глицирризиновая кислота (ГК) – тритерпеновый гликозид, содержащийся в корне солодки, известный своей высокой и разнообразной биологической активностью. ГК и ее производные широко используются в медицине для лечения бронхиальной астмы, экзем, дерматитов, язв желудка и двенадцатиперстной кишки. Целебные свойства корня солодки тысячелетиями использовались и в народной медицине. Однако этим её полезные свойства не исчерпываются. В последние годы было открыто ещё одно замечательное свойство ГК – образовывать супрамолекулярные комплексы типа «гость-хозяин» со многими гидрофобными лекарственными препаратами, а также с холестерином. С использованием различных физических методов, а также тестов на лабораторных животных, показано, что комплексообразование приводит как к улучшению целого ряда характеристик лекарственного соединения, так и к появлению новых свойств.

Создание новых, более эффективных форм лекарственных препаратов является одной из приоритетных задач, стоящих перед российской наукой. Многие существующие лекарственные препараты обладают высокой токсичностью и оказывают ряд нежелательных побочных действий, особенно при введении через желудочно-кишечный тракт. Одно из решений данной проблемы – повышение фармакологической эффективности за счет увеличения биодоступности и изменения фармакокинетических характеристик лекарств. Это позволяет снизить действующие дозы при сохранении лечебного действия. В последнее десятилетие в России и за рубежом активно разрабатываются системы доставки лекарств на основе супрамолекулярных комплексов лекарственных веществ типа «гость-хозяин». Одним из перспективных комплексообразующих соединений, широко исследуемых в настоящее время в ряде институтов СО РАН и СО РАМН, является растительный метаболит - глицирризиновая

кислота [N.E. Polyakov and T.V. Leshina, Glycyrrhizic Acid as a Novel Drug Delivery Vector. Synergy of Drug Transport and Efficacy. *The Open Conf. Proc. J.*, 2 (2011) 64-72]. Ранее авторы уже продемонстрировали возможности данного подхода для увеличения растворимости широкого ряда гидрофобных лекарственных средств, снижения их терапевтической дозы и токсичности. Кроме того, продемонстрирована возможность снижения до 100 раз лекарственных доз при сохранении фармакологического действия препаратов. В частности, впервые в мире получены водорастворимые супрамолекулярные комплексы каротиноидов бета-каротина и кантаксантина с глицирризиновой кислотой. Показано, что ГК не только увеличивает их растворимость в воде в тысячи раз, но и значительно повышает стабильность каротиноидов, включая фотостабильность.

В экспериментах с лабораторными животными с развитым атеросклерозом ГК и ее соли снижают содержание холестерина, липопротеидов низкой плотности и триглицеридов в крови. Новый интересный результат был получен при исследовании комплексов ГК с препаратами блокирующими синтез холестерина. На рынке средств для лечения атеросклероза в настоящее время наиболее распространены лекарства под общим названием статины, мировой рынок которых составляет десятки миллиардов долларов в год, но они имеют ряд существенных недостатков, среди которых, в числе прочих, наличие негативных побочных эффектов и высокая стоимость этих препаратов. Мы показали, что ГК образует стабильные комплексы с симвастатином, аторвастатином и розувастатином. На примере симвастатина продемонстрировано снижение терапевтической дозы и смена механизма ингибирования фермента HMG CoA-редуктазы с конкурентного на бесконкурентный. Это означает отсутствие синдрома привыкания к лекарству.

Важной проблемой является выяснение молекулярного и клеточного механизмов усиления биодоступности лекарственных препаратов при их введении в организм в виде супрамолекулярных комплексов с глицирризиновой кислотой. В частности было обнаружено, что глицирризиновая кислота способна связывать молекулы холестерина, образуя с ними прочные комплексы. С использованием метода ЯМР-релаксации установлено, что присутствие ГК значительно повышает проницаемость клеточных мембран. Кроме того, выявлены изменения упругих свойств мембран эритроцитов методом атомно-силовой микроскопии и обнаружено изменение структуры поверхности

эритроцитов в присутствии ГК. Мы полагаем, что уменьшение жесткости мембран в присутствии ГК может быть следствием её взаимодействия с холестерином.

Таким образом, глицирризиновую кислоту можно рассматривать как перспективное средство доставки лекарственных препаратов и создания новых лекарственных форм.

ШУБАКОВ А.А., МИХАЙЛОВА Е.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии
Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, Россия

ОБЩАЯ ХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВОДО- И ЩЕЛОЧЕРАСТВОРИМЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ ГРИБА *ASPERGILLUS NIGER*

Мицелиальный гриб *Aspergillus niger* является одним из наиболее важных в биотехнологии микроорганизмов. В течение многих десятилетий он используется для получения внеклеточных ферментов и лимонной кислоты. Также *A. niger* применяется для биотрансформаций и обработки отходов.

Грибная клеточная стенка является физически ригидным слоем, который защищает грибную клетку от окружающей среды, медирует межклеточные взаимодействия, и является ответственной за форму клетки. Несмотря на ее центральную роль в росте и выживании, грибная клеточная стенка является достаточно слабо изученной. Свойства клеточных стенок грибов, такие как механическая прочность, морфологические особенности, биологическая активность основаны на их специфическом химическом составе.

В отличие от базидиальных грибов, меньше известно о полисахаридном составе клеточных стенок аскомицетных грибов – представителей родов *Aspergillus*, *Penicillium* и др.

Из культуральной жидкости и из клеточной стенки гриба *Aspergillus niger* ВКМ F-1119, предварительно выращенного в течение 5 сут. в жидкой питательной среде Чапека с 2%-ной глюкозой в качестве источника углерода, выделены полисахаридные фракции и дана их общая химическая характеристика. Выход полисахаридных фракций составляет

0.28% (культуральная жидкость, AN-1), 0.11% (экстракция водой, AN-2), 0.16% (экстракция 0.5% NaOH, AN-3), 0.14% (экстракция 2% NaOH, AN-4).

Данные ВЭЖХ показали, что выделенные полисахаридные фракции имеют полидисперсный характер и степень дисперсности варьирует от 1.8 до 13.0, среднечисловая молекулярная масса – от 7.2 до 11.0 кДа, средневесовая молекулярная масса – от 13.3 до 143.7 кДа. Степень дисперсности и средневесовая молекулярная масса последовательно возрастают в ряду фракций AN-1, AN-2, AN-3, AN-4 и наибольшие их значения определяются во фракции AN-4, экстрагированной 2% NaOH.

Среди внеклеточных полисахаридов гриба *A. niger* доминируют соединения с молекулярной массой менее 50 кДа. В клеточной стенке гриба преобладают полисахариды с более высокой молекулярной массой – более 300 и 100-300 кДа. Преобладающими нейтральными моносахаридами в разных соотношениях являются глюкоза, манноза и галактоза. Наибольшее содержание белка и гликуроновых кислот в выделенных полисахаридах определяется во фракциях с молекулярной массой больше 300 кДа.

ШУБИНА А.Н.¹, ЕГОРОВА А.А.², КИСЕЛЕВ А.В.²

¹ Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург, Россия

² НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия

ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕПТИДНЫХ НОСИТЕЛЕЙ ДЛЯ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В КЛЕТКИ ЭНДОМЕТРИЯ И ЭНДОТЕЛИЯ

Эндометриоз – это одно из наиболее широко распространенных гинекологических заболеваний, для которого актуальна разработка подходов к генной терапии. Один из возможных подходов – это подавление ангиогенеза в месте патологии. Возможной мишенью генной терапии является фактор роста эндотелия сосудов (VEGF-A), стимулирующий пролиферацию эндотелиальных клеток. Перспективным подходом к генной терапии эндометриоза может являться доставка в клетки эндометриоидных опухолей малых интерферирующих РНК (миРНК), подавляющих экспрессию гена *VEGFA*. Для этой цели необходима разработка тканеспецифичной системы доставки нуклеиновых кислот (НК). Ранее нами были разработаны пептидные носители, модифицированные

лигандом хемокинового рецептора CXCR4, присутствующего на поверхности клеток эндометрия и эндотелия.

В работе исследовали следующие пептиды: аргинин-богатый носитель без лиганда (L0), его аналог, модифицированный лигандом к рецептору CXCR4 (L1), две комбинации пептидов L1 и L0: носитель L2 – содержит 50% молекул L1 и носитель L3 - 10% молекул L1. Мы исследовали физико-химические свойства комплексов данных носителей с миРНК с помощью гель-ретардации, теста на вытеснение красителя SybrGreen, а также декстран-сульфатного теста. Для изучения стабильности миРНК в составе комплексов использовали тест на защиту от РНКазы А. Было показано, что исследуемые пептиды эффективно компактизуют миРНК и обеспечивают их защиту от деградации. Для изучения эффективности доставки НК в клетки, ассоциированные с развитием эндометриоза, были проведены трансфекции клеток эндотелия (гибридома E.A.Ну926) и эндометрия человека комплексами носителей с плазмидой, содержащей репортерный ген *lacZ*. Была показана высокая эффективность трансфекции комплексов с носителями L1 и L2, содержащими лиганд к рецептору CXCR4 по сравнению с комплексами с носителем L0, не содержащим лиганда. Это указывает на важную роль рецептор-опосредованного эндоцитоза в процессе доставки комплексов в клетки эндотелия и эндометрия. Кроме того, эффективность комплексов с носителями L1 и L2 была значительно выше по сравнению с эффективностью комплексов со стандартным коммерческим носителем полиэтиленимином. Была исследована токсичность комплексов пептидных носителей с миРНК *in vitro*. Показано, что при низких зарядовых соотношениях токсичность комплексов не превышает допустимых значений. Для подавления экспрессии гена *VEGFA* в клетках, ассоциированных с развитием эндометриоза, были проведены трансфекции клеток эндотелия человека (гибридома E.A.Ну926) комплексами пептидных носителей с миРНК против мРНК гена *VEGFA*. Уровень экспрессии гена *VEGFA* оценивали по отношению к референсному гену β -актина методом ПЦР в реальном времени. При использовании комплексов миРНК с носителями L1 и L2, модифицированными лигандом к рецептору CXCR4, подавление экспрессии достигало 40-50% от базального уровня, и было достоверно выше по сравнению с незащищенной миРНК.

Таким образом, использование пептидов, модифицированных лигандом к рецептору CXCR4, является перспективным подходом к созданию тканеспецифичной

системы доставки нуклеиновых кислот в клетки эндотелия и эндометрия человека. Доставка комплексов данных носителей с миРНК против гена *VEGFA* приводит к подавлению экспрессии данного гена и может быть использована для разработки подходов к генной терапии эндометриоза.

ШУЛЬЦ Е.В., ФАРБЕРОВА Е.А.

Пермский национальный исследовательский политехнический университет,

Пермь, Россия

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ЭДТА НА РОСТ И РАЗВИТИЕ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ

В мире производится примерно 100 000 тонн ЭДТА в год. Исследования показывают постоянное накопление ЭДТА в окружающей среде, поскольку деградация ЭДТА в очистных сооружениях не происходит, а в природе наблюдается лишь разложение комплекса Fe(III)-ЭДТА под воздействием УФ-лучей, которое происходит лишь на поверхности воды. Наличие ЭДТА в воде способствует переходу ионов металлов (в т.ч. тяжелых и токсичных) в растворенное состояние. Эти комплексы проникают в грунтовые воды, и ухудшают качество воды.

Известно, что в большинстве случаев ЭДТА достаточно устойчиво к бактериальной деградации. Показано, что деградация ЭДТА осуществляется монооксигеназной системой. В бактериальных клетках оксигеназные системы выполняют пластическую функцию, окисляя углеродсодержащие вещества, обеспечивают поступление углерода в клетки. Физиологическая роль оксигеназ сводится к конкретной задаче увеличения водорастворимости, полярности окисляемой молекулы.

Целью данного исследования является изучение поведения микроорганизмов по отношению к ЭДТА, выявление оптимальных условий, влияющих на потребление ЭДТА.

Культуру микроорганизмов выделяли из разных источников: проб воды с рек Ирень (г. Кунгур) и Данилиха (г. Пермь); проб почв вдоль проезжей части и вдали от нее. Из полученных колоний микроорганизмов были выбраны три, наиболее хорошо развивающихся на среде МПА. Проведено морфологическое описание колоний. Изучено

влияние различных концентраций ЭДТА на рост микроорганизмов на среде, содержащей глюкозу. Показано, что рост культуры микроорганизмов подавляется с введением ЭДТА в среду в количестве 0,05-0,1Н. Отобрана культуральная жидкость на стационарной фазе роста микроорганизмов и высеяна на среду, содержащую ЭДТА, и после 7 дней культивирования наблюдался их рост, что может свидетельствовать об адаптации микроорганизмов к среде, содержащей ЭДТА в качестве единственного источника углерода. Выделенная адаптированная культура микроорганизмов использовалась во всех дальнейших исследованиях.

Изучение оптимальных условий культивирования адаптированных микроорганизмов показало, что для почвенных микроорганизмов оптимальная температура, при которой потребление субстрата максимально, равна 40°C. Для микроорганизмов, выделенных из рек Ирень и Данилиха, максимальная величина потребления ЭДТА достигается при 26 - 34°C. Влияние величины рН среды изучали в диапазоне от 5 до 9. Показано, что для почвенных микроорганизмов оптимальное значение рН среды, при котором скорость роста максимальна, равно 5. Для микроорганизмов, выделенных из рек Ирень и Данилиха, максимальная скорость роста достигается при рН среды от 7 и выше.

На следующем этапе работы изучен процесс биохимического удаления ЭДТА из водной среды, с использованием адаптированных микроорганизмов. Модельный раствор с содержанием ЭДТА 15,854 г/л обрабатывали культурами адаптированных микроорганизмов в течение 1-13 суток. Анализировали изменение содержания ЭДТА в растворе и биомассе, показано, что степень извлечения ЭДТА из водной среды возрастает с увеличением времени контакта биомассы с модельным раствором.

В результате проделанной работы выделена и адаптирована культура, способная потреблять ЭДТА, как единственный источник углерода и азота, и изучены условия ее культивирования.

ШУТОВА В.В., ЛЫЧАГИНА Н.Г., АКСЕНОВА В.Ю., КОТИНА Е.А.

Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва, Саранск, Россия

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕЛАССЫ В СОСТАВЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ИНОКУЛЯТА ПРОДУЦЕНТА ДЕКСТРАНА

Микробные полисахариды являются перспективным объектом биотехнологии. Область их применения постоянно расширяется. Наиболее широкое распространение получили бактериальные полисахариды декстран, ксантан, альгинат, леван, используемые в фармацевтической, нефтедобывающей, пищевой, текстильной и других областях промышленности. Перспективным направлением применения декстрана является получение биосвязующих для производства биокомпозиционных материалов.

Синтез полисахаридов определяется условиями культивирования продуцента и составом питательной среды, которые определяют возможность и интенсивность их образования, а также состав, структуру и, следовательно, свойства. Существенное значение имеют не только качественный состав используемого углеродного сырья, но также и концентрация, так как эффективный синтез полисахаридов осуществляется на средах с высоким содержанием углеродного субстрата. В данной работе оптимизация состава питательных сред проводилась за счет замены сахаросодержащего сырья побочным продуктом сахарной промышленности – мелассой. Большое содержание сахарозы, позволяет использовать ее для культивирования продуцента декстрана *Leuconostoc mesenteroides*, что считается выгодным с экономической точки зрения.

Целью данной работы является оптимизация состава питательных сред для получения инокулята продуцента декстрана.

Для выращивания и поддержания культуры *L. mesenteroides* использовали сахаросодержащую среду, описанную в регламенте производства полиглюкина на основе декстрана (регламентированная среда) и сахаросодержащую среду Долс. Данные среды использовались в качестве контроля. В опытных средах сахарозу заменяли мелассой в концентрации по сахарозе 17,5% оптимальной для роста *L. mesenteroides*. Также использовали среду, где мелассу разводили водой до концентрации сахарозы 17,5%. Засеянные культуры выращивали в статических условиях при комнатной температуре 3 суток.

В работе проводилось определение общего количества клеток с помощью автоматического счетчика Countess™. Наибольшее содержание клеток приходилось на 2 сутки роста культуры для всех вариантов сред. На среде Долс с сахарозой оно составило $6,7 \cdot 10^9$ клеток/мл, на среде Долс с мелассой $4,3 \cdot 10^9$ клеток/мл. Исходя из полученных результатов, целесообразно именно их использовать для получения инокулята для максимального выхода полисахарида. Наименьшее количество клеток обнаружено в меласной среде, что составило $1,2 \cdot 10^9$ клеток/мл. Показано, что выход декстрана на средах с мелассой может достигать 16 – 39 г/л, что сопоставимо с продукцией декстрана на средах, содержащих сахарозу. При этом не происходило большого закисления среды, и значения рН находились в пределах, оптимальных для роста бактерий и образования декстрана (6,5-8,0).

Инокулят, полученный на средах указанных выше, был использован для дальнейшей работы с целью получения биологического адгезива.

Культивирование бактерии *L. mesenteroides* проводили на комбинированной среде из отходов пищевых производств состоящей из мелассы, барды и молочной сыворотки. Среду засеивали 5, 7 и 10% двухсуточного инокулята.

Использование среды, состоящей из мелассы, барды и молочной сыворотки позволило получить 82,87 г/л декстрана. Наибольший выход полисахарида наблюдался на средах с использованием инокулятов, полученных на средах с сахарозой, а также на регламентированной среде с мелассой. Максимальный выход декстрана наблюдался при добавлении 5% двухсуточного посевного материала во всех вариантах сред. При этом среда для выращивания инокулята и его количество практически не оказывало влияния на изменение рН к 3 суткам культивирования.

ЭЛЬКОНИН Л.А., НОСОВА О.Н., ИТАЛЬЯНСКАЯ Ю.В.

Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Юго-Востока

Россельхозакадемии, Саратов, Россия

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ СОРГО: РЕАЛЬНАЯ ВОЗМОЖНОСТЬ УЛУЧШЕНИЯ ПИТАТЕЛЬНОЙ ЦЕННОСТИ ЗЕРНА ВАЖНЕЙШЕЙ ЗАСУХОУСТОЙЧИВОЙ КУЛЬТУРЫ

Генетическая трансформация является мощным инструментом генетического улучшения возделываемых растений. Генно-инженерные подходы особенно эффективны для изменения состава запасных белков и крахмала, содержания микроэлементов и витаминов, повышения устойчивости к биотическим и абиотическим стрессам. Использование трансгенных технологий для генетического улучшения сорго – высокоурожайной засухоустойчивой злаковой культуры – имеет особое значение, поскольку аридизация климата во многих регионах Земного шара, и России, в том числе, затрудняет устойчивое производство традиционных злаков, таких как пшеница, кукуруза и ячмень. Однако высокоэффективная генетическая трансформация у сорго, несмотря на значительное количество опубликованных работ, остается серьезной проблемой. Основными препятствиями являются низкая частота регенерации трансгенных растений и интенсивный сайленсинг трансгенов.

Нами в течение ряда лет разрабатывались различные подходы для агробактериальной трансформации растений зернового сорго, основанные на использовании методов культуры *in vitro*, либо на инокуляции цветущих изолированных метелок в условиях *in vivo*. В работе использовали разные штаммы *Agrobacterium tumefaciens*; наиболее воспроизводимые результаты были получены со штаммом AGL0/p35SGIB (Pniewski, Kapusta: J Appl Genet, 2005, 46: 139-147), несущем в составе T-ДНК гены *bar* и *gus-intron* под контролем, соответственно, *nos*- и *35S*-промоторов. Для активации *vir*-генов агробактериальную клеточную суспензию перед инокуляцией выращивали в модифицированной среде АВ с добавкой ацетосирингона при t^0 22-23 ^0C .

Метод, основанный на использовании техники культуры *in vitro*, был эффективен для получения трансгенных растений у линий Желтозерное 10 и КВВ-45, незрелые зародыши которых после сокультивирования с агробактериальной суспензией

формировали эмбриогенный каллус. Важнейшими факторами, способствовавшими получению трансгенных растений, являлись приемы, усиливающие эмбриогенные потенции культивируемых тканей, в том числе, культивирование зародышей на питательной среде M11 (Elkonin, Pakhomova, РСТОС, 2000, 61: 115-123), модификация условий сокультивирования, а также низкий уровень селективного агента (глюфосината аммония) в среде для выращивания эмбриогенного каллуса и его полное отсутствие в среде для регенерации. В таких условиях частота незрелых зародышей, продуцировавших каллусы, из которых были регенерированы трансгенные ПЦР-положительные растения, составляла 4.5-7.8%. Потомство таких растений несло маркерный ген (*bar*) и проявляло устойчивость к выращиванию на питательной среде, содержащей глюфосинат аммония.

У линии КВВ 114, незрелые зародыши которой не способны к формированию эмбриогенного каллуса, трансгенные растения были получены путем инокуляции цветущих метелок. В потомстве каждой инокулированной метелки частота ПЦР-положительных трансгенных растений, выживших после обработки листьев раствором гербицида БАСТА, составляла, в среднем, 1%. В потомстве таких трансгенных растений присутствовали ПЦР-положительные проростки, устойчивые к глюфосинату аммония.

Разработанные методы были использованы нами для получения трансгенных растений сорго, несущих генетическую конструкцию, способную инициировать сайленсинг гена, кодирующего запасной белок гамма-кафирин. Как известно, этот белок, располагающийся по периферии белковых телец, в которых депонируются запасные белки эндосперма, отличается высокой устойчивостью к протеолитическому расщеплению, и снижает питательную ценность зерна сорго. В настоящий момент нами получены растения, несущие целевую конструкцию и проводятся эксперименты по изучению ее экспрессии в генотипе трансгенных растений.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант 10-04-00-475.

ЮГИНА Н.А., ХИСАМОВА А.И., АХМАДИЕВА С.В.,
МИХАЙЛОВА Е.О., ШУЛАЕВ М.В.

*Казанский национальный исследовательский технологический университет,
Казань, Россия*

ВЛИЯНИЕ ГУМИНОВОГО ПРЕПАРАТА НА РОСТ МИКРООРГАНИЗМОВ В ПРОЦЕССЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ОЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД

Снижение эффективности биологического метода очистки сточных вод происходит в связи с развитием промышленности и химизацией быта, что приводит к расширению спектра загрязнений в сточных водах, увеличению их токсичности, и, как следствие, к угнетению биоценозов активных илов. Поэтому в последние годы в нашей стране и за рубежом ведутся активные поиски способов интенсификации классических методов биологической очистки. Совершенствование процесса очистки сточных вод идет по нескольким направлениям, одним из которых является использование биологически активных веществ.

Целью исследования был анализ влияния гуминового препарата Б на рост микроорганизмов с целью интенсификации и оптимизации процесса биологической очистки сточных вод.

В качестве объекта исследований была выбрана культура бактерий *Serratia marcescens*, входящих в состав микрофлоры активного ила очистных сооружений. Изучение влияния гуминового препарата непосредственно на рост бактерий осуществлялось на жидкой среде, содержащей пептон. Конечные концентрации препарата в среде составляли $1 \cdot 10^0$, $1 \cdot 10^{-1}$, $1 \cdot 10^{-2}$, $1 \cdot 10^{-3}$ и $1 \cdot 10^{-4}$ г/л; в качестве контроля использовалась среда без гуминового препарата. Результаты исследований показали, что применение гуминового препарата стимулирует рост микроорганизмов на 8-24 ч роста в концентрациях $1 \cdot 10^{-2}$, $1 \cdot 10^{-3}$ г/л на 25-35 % и 12-15% относительно контроля, соответственно. Внесение в среду гуминового препарата в концентрациях $1 \cdot 10^0$, $1 \cdot 10^{-1}$, и $1 \cdot 10^{-4}$ г/л, приводило на 8-24 ч к снижению роста бактерий на 35, 20 и 15 % относительно контроля, соответственно. В тоже время на 32-48 ч роста гуминовый препарат оказывал ингибирующее воздействие на рост культуры микроорганизмов во всех концентрациях. Максимальный эффект наблюдался для концентраций $1 \cdot 10^0$, $1 \cdot 10^{-1}$, и $1 \cdot 10^{-4}$ г/л.

Полученные данные свидетельствуют о способности данного препарата оказывать различное воздействие на рост бактерий в зависимости от концентрации, что может быть использовано для интенсификации биологической очистки сточных вод.

ЮДИНА Н.Ю., АРЛЯПОВ В.А.

Тульский государственный университет, Тула, Россия

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ И СОСТАВА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ПРОБ НА РАБОТУ БПК-БИОСЕНСОРА НА ОСНОВЕ ДРОЖЖЕЙ *DEBARYOMYCES HANSENI* ИММОБИЛИЗОВАННЫХ В МОДИФИЦИРОВАННЫЙ ПОЛИВИНИЛОВЫЙ СПИРТ

Важнейшей интегральной характеристикой качества воды является биохимическое потребление кислорода (БПК). Стандартный метод определения БПК, регламентированный ПНДФ, основан на тестах, продолжительность которых составляет 5 или 20 суток. В силу значительной продолжительности процедуры метод не является адекватным, поскольку представляет результаты анализа со значительной задержкой. Альтернативой являются экспрессные методы определения БПК с использованием биосенсорных анализаторов, основанные на применении микроорганизмов, способных окислять широкий спектр органических соединений. Отличием данного метода от стандартного является сокращение времени анализа с 5 суток до 10 минут.

Целью данной работы является определение характеристик амперометрического БПК-биосенсора кюветного типа на основе дрожжевого штамма *Debaryomyces hansenii*, иммобилизованного в поливиниловый спирт (ПВС) модифицированный N-винилпирролидоном для экспресс-оценки степени загрязнения (БПК) бытовых и промышленных сточных вод.

Применение дрожжевого штамма *Debaryomyces hansenii* как основы рецепторного элемента для определения БПК стоков пищевых и технологических производств позволяет получать данные с высокой корреляцией к стандартному методу. Применение поливинилового спирта, модифицированного N-винилпирролидоном в качестве матрицы,

приводит к увеличению стабильности биорецепторного элемента в течение длительного времени.

В процессе выполнения работы определены кинетические параметры роста культуры дрожжей *Debaryomyces hansenii*. С использованием модельной системы на основе глюкозо-глутаматной смеси определены аналитические и метрологические характеристики биосенсора на основе дрожжевого штамма. Диапазон определяемых концентраций БПК составил 0,1-44,3 мг/дм³. Важнейшим потребительским качеством является устойчивость функционирования сенсора в течение длительного периода времени – долговременная стабильность. Для биорецепторного элемента на основе дрожжей *Debaryomyces hansenii* она составила 40 суток. Дрожжи *Debaryomyces hansenii* обладают широкой субстратной специфичностью и окисляют все представленные классы органических соединений: спирты, углеводы, карбоновые кислоты, аминокислоты, нитрофенолы и поверхностно активные вещества, которые могут быть обнаружены в сточных водах. Это является перспективными с точки зрения возможности их использования для оценки БПК.

Изучено влияние ионов Ni^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Cr^{3+} и $Cr_2O_7^{2-}$ в диапазоне концентраций превышающих ПДК рыбохозяйственных водоемов в 10-100 раз на окислительную способность иммобилизованных дрожжей *Debaryomyces hansenii*. Показано, что при превышении ПДК в 10 раз для всех исследуемых ионов тяжелых металлов, кроме Fe^{3+} и Pb^{2+} , снижение ответов составляет не более 20%, что может свидетельствовать о стресс устойчивости дрожжей. При увеличении ионной силы раствора в 8 раз происходит 50%-ное понижение ответов сенсора. Максимальный ответ биосенсора на основе дрожжей *Debaryomyces hansenii* иммобилизованных в ПВС модифицированный N-винилпирролидоном наблюдается в интервале pH 6,8-7,2.

Температура является важным фактором жизнедеятельности всех дрожжей. Максимальный ответ биосенсора на основе дрожжей *D. hansenii* зафиксирован при 20°C. При понижении температуры до 10°C наблюдается 50% понижение дыхательной активности дрожжей. Наибольшее снижение дыхательной активности наблюдается при температуре 40°C (80%), и может быть обусловлено денатурацией некоторых белков входящих в состав ферментов дрожжей *Debaryomyces hansenii*. Таким образом, для процессов дыхания дрожжей *Debaryomyces hansenii*, иммобилизованных в поливиниловый

спирт, модифицированный N-винилпирролидоном, оптимальным является интервал температур от 15°C до 25°C.

Проведено определение БПК сточных вод и полупродуктов брожения. Впервые показано, что использование дрожжей *Debaryomyces hansenii*, иммобилизованных в поливиниловый спирт, модифицированный N-винилпирролидоном, как основы рецепторного элемента биосенсора позволяет получать данные с высокой корреляцией к стандартному методу.

Работа выполнена при поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы», госконтракт № 16.740.11.0766.

ЯКУШЕВ А.В.

*Факультет почвоведения Московского государственного университета
им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

НАВОЗНЫЕ ЧЕРВИ – РЕГУЛЯТОРЫ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЕ БАКТЕРИЙ В ВЕРМИКОМПОСТАХ

Актуальность исследования в том, что в последние десятилетия в нашей стране активно развивается производство вермикомпостов - высокоэффективных органических удобрений, получаемых при переработке различных отходов дождевыми червями. Причины особого плодородия вермикомпостов и пути его дальнейшего увеличения не вполне понятны. Источниками плодородия называют большую доступность для растений минеральных элементов питания, фитогормоны, особый состав гумуса вермикомпостов.

Новизна. Микробиологический анализ вермикомпоста часто ограничивается анализом численности патогенных, санитарнопоказательных, фитопатогенных видов. Однако минерализация и гумификация осуществляется червями в ассоциации с непатогенными микроорганизмами – свободноживущих и обитающими в кишечнике. Следовательно важно выявить микробную составляющую плодородия вермикомпостов и разработать микробиологические стандарты качества и готовности вермикомпостов. Анализ литературы показал, что состав доминирующих в вермикомпосте микроорганизмов изменяется под действием червей в каждом конкретном случае по

разному. В целом, в компосте и вермикомпосте обитают одни и те же микроорганизмы. Возможно различается не таксономический состав, а физиологическое состояние (активность) микроорганизмов. Ранее автором было показано, что в вермикомпостах снижается доля вегетативной стадии у грибов - гиф и возрастает доля покоящихся форм-спор. Иными словами подавляется активность (жизнедеятельность) грибов.

Цель исследования - проследить влияние дождевых червей на физиологическое состояние в вермикомпостах другой важной группы микроорганизмов - бактерий.

В **задачи** исследования входило: 1. отбор промышленных вермикомпостов 2. сбор дождевых червей 3. отбор корма для червей (исходного сырья для вермикомпостирования) 4. получение свежих экскрементов червей (копролитов). 5. определение физиологического состояния бактерий 6. интерпретация и сравнение активности бактерий в вермикомпосте и аналогичном традиционном компосте, корме и копролитах червей, в корме и готовом вермикомпосте.

Объектами исследования были: 1. вермикомпосты производства ООО «Ростагроэкология» (п. Пирогово, Московская обл.) и ООО «Флора-Л» (п. Песковатый, Липецкая обл.); 2. навозный дождевые черви *Eisenia fetida andrei*, двух производственных линий: «Русский московский гибрид» и свх. Песковатый 3. микробиологический объект исследования - культивируемые гетеротрофный аэробные и факультативно аэробные бактерии.

Метод исследования активности – новый, разрабатываемый автором «Кинетический метод определения физиологического состояния бактерий в природе». Метод основан на представлении о физиологическом состоянии как кинетической величине, определяемой по характеру роста бактерий на питательных средах в лаг-фазе и фазе экспоненциального роста. Для этого в 96-луночных культуральных планшетах изучается рост смешанных жидких периодических бактериальных культур, самопроизвольно возникающих при инокуляции набора микробиологических сред суспензией вермикомпостов, копролитов и т.д..

Результаты. Кривые роста описывали в рамках синтетической хемостатной модели. Было получено 2 кинетических параметра для каждого сообщества возникающего на всём наборе питательных сред: $-\ln(r_0)$ -отрицательный логарифм начального значения переменной физиологического состояния бактерий (чем он меньше, тем активность

бактерий больше) и μ_m -максимальная удельная скорость роста, (чем она больше, тем более быстрорастущие бактерии (r-стратеги) входят в смешанную самопроизвольную культуру. Значения были разбиты на классы по возрастанию и для каждого класса была определена частота встречаемости. На основании результатов сделаны следующие **выводы**: 1. Прохождение через пищеварительную систему червя приводит, в основном, к активизации различных гетеротрофных бактерий в свежих копролитах. 2. Для некоторых бактерий (например род. *Rhodococcus*) наблюдается наоборот снижение активности или отсутствие эффекта. 3. Одновременно изменяется состав доминирующих микроорганизмов – увеличивается доля быстрорастущих r-стратегов. 4. Выявленные особенности сохраняются в готовом вермикомпосте и надёжно выявляется при сравнении с аналогичными компостами. 5. Полученные параметры $-\ln(r_0)$ и μ_m могут быть использованы при оценке качества и готовности вермикомпостов.

Работа выполнена в рамках темы кафедры биологии почв факультета почвоведения МГУ «Биоразнообразие и ценоотические связи почвенных микроорганизмов в наземных экосистемах» гос. регистрационный номер 01 2011 55420 и при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации (грант МК-5552.2011.4) и гранта РФФИ № 11-04-00580-а.

ЯСАКОВ Т.Р., ЖАРИКОВА Н.В., КОРОБОВ В.В., ЖУРЕНКО Е.Ю.,
АНИСИМОВА Л.Г., МАРКУШЕВА Т.В.

Институт биологии Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия

ПЛАЗМИДЫ ДЕГРАДАЦИИ ХЛОРАРОМАТИЧЕСКИХ КИСЛОТ ДЛЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ

В настоящее время особую востребованность получают биологические объекты, входящие в формат технологий, направленных на поддержание условий устойчивого развития общества. В значительной степени активное развитие таких технологий основывается на фундаментальных знаниях о строении геномов живых систем, способствующих реализации возможности управления процессами конверсии поллютантов. Именно поэтому исследования в области геномики прокариот способны

оказать мультипликативный эффект на развитие новых методов поддержания качества среды обитания человека. В ряде исследований показано, что многие экологически значимые признаки бактерий, являющихся традиционными объектами биотехнологий, находятся под контролем плазмид, представляющих собой мобильную генетическую компоненту. Плазмиды способствуют горизонтальному переносу при обмене наследственной информацией в пределах бактериальных сообществ. При этом особый интерес представляют кластеры, контролирующие деструкцию современных загрязнителей, в частности, соединений хлорароматической природы.

В работе приведен сравнительный анализ штаммов бактерий коллекции Института биологии Уфимского научного центра РАН, обладающих способностью осуществлять деструкцию хлорфеноксиуксусных кислот. Анализ плазмидного статуса граммотрицательных бактерий родов *Serratia*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* и *Xanthomonas* обнаружил наличие в их геномах плазмид, контролирующих катаболизм хлорароматических соединений. Установлено, что размеры плазмид колеблются от 27 т.п.н. до 42 т.п.н. Утрата плазмид приводила к потере способности использовать хлорфеноксиуксусной кислоты в качестве источника углерода и энергии.

Новые штаммы и их плазмиды предлагаются к использованию при разработке способов ремедиации среды от хлорфеноксиуксусных кислот нового поколения.

Работа выполнена при содействии Программы Президиума РАН «Живая природа: современное состояние и проблемы развития» и гранта АН РБ «Биотехнологические способы воспроизводства и рационального использования биологических ресурсов».

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

А

АБАЕВА Л.Ф. 770
АБДРАШИТОВА А.С. 394
АБДУЛЛАЕВ С.А. 4
АБРАМОВ А.Ю. 342
АБРАМОВ В.М. 956, 957
АГАФОНОВА Н.В. 5
АЗАРЕНКО А.А. 7
АЗАРКОВИЧ М.И. 8
АЗИЗБЕКЯН Р.Р. 437, 452
АЗНАБАЕВА Л.М. 10
АКИМКИН Т.М. 12, 927
АКИМОВ А.Г. 14
АКИМОВ М.Г. 16
АКИМОВА Н.А. 165
АКИНИНА В.Н. 243
АКСЕНОВА В.Ю. 1074
АЛАДИН Д.Ю. 18, 222
АЛДАРОВ К.Г. 20
АЛЕКСАНДРОВ А.В. 675
АЛЕКСАНДРОВА О.И. 22
АЛЕКСЕЕВА В.В. 24, 378
АЛЕКСЕЕВА О.М. 26
АЛЕКСЕЕНКО Л.В. 93
АЛЕКСИНА С.Г. 1003
АЛЕНТЬЕВ А.Н. 597
АЛЕНЬКИНА С.А. 28
АЛЕХИНА Ю.И. 448
АЛЕХНО В.В. 823
АЛИМОВА Ф.К. 603, 948
АЛФЕРОВ С.В. 573
АЛЬДЕКЕЕВА А.С. 30, 413
АЛЬТШУЛЕР М.Л. 685
АЛЪБЪЕВ А.Ю. 46, 761
АМАГЗАЕВА Г.Н. 32
АМАХИН Д.В. 34
АМЕЛЯКИНА М.В. 36
АМИРХАНОВ Н.В. 277
АМИРХАНОВ Р.В. 277
АМИРХАНОВ Р.Н. 38
АНАНЬИНА Л.Н. 39
АНАНЬКО Г.Г. 42, 44
АНДРЕЕВА И.Н. 46, 761, 795
АНДРЕЕВА И.С. 48, 748
АНДРЕЕВА Л.А. 645
АНДРЕЕВА Л.Ю. 50
АНДРУСЕНКО С.Ф. 52
АНИКАЕВ А.Ю. 53
АНИКИНА Л.М. 675, 677
АНИСИМОВА Л.Г. 415, 1083
АНТИПЬЕВА М.В. 55
АНТИФЕЕВ И.Е. 57
АНТОНОВ С.А. 59

АНТРОПОВА А.Б. 61
АНУФРИЕВА Н.В. 421
АРЛЯПОВ В.А. 336, 1079
АРСЕНЬЕВА Е.Л. 59
АРТОХИН К.С. 63
АРТЮХОВ В.Г. 94, 297, 746, 996
АРТЮШИНА И.Ю. 65
АРУСТАМЯН Л.Э. 67
АРУСТАМЯН Э.С. 67
АРХИПОВА В.И. 69
АРХИПОВА Л.В. 70, 458
АСТАФЬЕВА О.В. 71
АТАМАНЧЕНКО М.П. 653
АТЫКЯН Н.А. 229, 282, 284, 786
АФАНАСЬЕВА Т.М. 566
АФАНАСЬЕВА Ю.В. 811
АФОНИНА В.С. 748
АХАПКИНА И.Г. 61, 73
АХМАДИЕВА С.В. 580, 1078
АХМАТОВА Н.К. 890, 891
АХМАТОВА Э.А. 890, 891
АХМЕДОВ М.И. 571
АХМЕТОВА А.И. 75
АХМЕТОВА А.Ш. 614

Б

БАБАЕВ А.А. 122, 1048
БАБАКИНА Т.М. 286
БАГИН С.В. 486
БАДМАЕВА Т.М. 380
БАЖЕНОВА Б.А. 32, 77, 380
БАЖИНА Е.В. 940
БАЙБОРОДИН С.И. 277, 763
БАЙДЕР Л.М. 430, 464
БАЙМИЕВ А.Х. 635
БАКАХОНОВ А.А. 79
БАЛАШОВА М.В. 80
БАЛУХО А.В. 227
БАЛЬЖИНИМАЕВА С.К. 82
БАЛЮТА А.А. 289
БАНЗАРАКЦАЕВА Т.Г. 470, 755
БАРАНЕЦ А.П. 85, 86
БАРАНОВ Б.А. 870
БАРАНОВА Е.В. 88
БАРАШКИН С.В. 284
БАРДАШЕВА А.В. 975
БАРЫГИН О.И. 1052
БАРЫШНИКОВ А.Ю. 1048
БАСКИНА С.Л. 1023
БАСЫРОВА А.М. 545, 547
БАТАЕВА М.В. 90
БАТАЕВА Ю.В. 91
БАТИНА Е.В. 811

БАУЛИНА Л.В. 93
БАХВАЛОВА В.Н. 20, 601
БАХИРЕВА О.И. 968
БАХМЕТЬЕВА О.И. 94
БАШАРИНА О.В. 297
БЕЗЛЕПКИН В.Г. 900
БЕЗЛЕР Н.В. 382
БЕЗРУЧКО В.В. 920
БЕЗУГЛОВ В.В. 16, 832
БЕЛАВИН П.А. 950
БЕЛЕНОВА А.С. 97, 853
БЕЛИКОВ Н.Е. 225
БЕЛИНСКАЯ Д.А. 1052
БЕЛОВА Н.В. 1043
БЕЛОВОЛОВА А.С. 316
БЕЛОУШКО Е.Е. 99, 936
БЕЛЬИЙ Ю.Ф. 421
БЕЛЬТЮКОВА Н.Н. 128
БЕЛЯЕВ А.А. 245
БЕЛЯЕВ С.А. 972
БЕЛЯЕВА Е.А. 100
БЕЛЯЕВА Т.Н. 807
БЕПЕЕВА А.Е. 326, 332, 620
БЕРЕЖНЕВА З.А. 102
БЕРЕЗИНА Е.В. 104
БЕРЖЕЦ В.М. 112
БЕРЛОВ Д.Н. 106
БЕРСЕНЕВА О.А. 809
БЕХМЕТЬЕВ Р.Д. 944
БЕШКАРЕВА М.А. 108
БИЛАНЕНКО Е.Н. 61, 938
БИЛЯЛОВА А.С. 110
БИРИХ К. 998
БЛИНКОВА Л.П. 112, 113, 685
БОБОШИНА И.В. 820
БОБРОВ М.Ю. 16
БОБРЫШЕВА И.В. 645
БОГДАЕВ А.А. 114, 116
БОГДАЕВ А.Г. 114, 116
БОЕВА Т.В. 117
БОЗОРОВ Б.М. 119
БОЙКО Л.Я. 944
БОКОВА Д.А. 822
БОЛТНЕВА Н.П. 121
БОНДАРЕВ В.П. 912
БОНДАРЕВА В.М. 590, 916
БОНДАРЕНКО И.М. 122
БОРИСЕНКО Е.А. 124
БОРИСЕНКО Е.Г. 124
БОРОВКОВА И.С. 707
БОРОННИКОВА С.В. 128, 820
БОРЩЕВСКАЯ Л.Н. 372
БОТУЗ Н.И. 671
БОЧАРНИКОВА Е.А. 130
БРАЖКИНА М.Ю. 132
БРЕЧАЛОВ А.В. 133

БРИЛКИНА А.А. 104
БУБЕЕВ А.Т. 986
БУБУНЕНКО М.Г. 53
БУДАЕВА А.Е. 77
БУДАРИН С.Н. 396
БУЗМАКОВА Д.Ю. 134
БУКИН В.И. 1009
БУЛГАКОВ В.П. 210
БУРАЕВА Е.А. 637
БУРГАНСКАЯ Е.И. 136
БУРИЛОВ А.Р. 806
БУРМИСТРОВА Н.А. 757
БУРОВА Ю.А. 286
БУРЫГИН Г.Л. 939
БУРЬЯНОВ Я.И. 24, 378, 787, 789, 922, 1012
БУРЯК Г.А. 48
БУТВИЛОВСКИЙ А.В. 137, 139
БУТВИЛОВСКИЙ В.Э. 137, 139, 318
БУЯНОВА А.С. 475
БЫКОВА А.А. 977
БЫСТРОВА Е.Ю. 977
БЫЧКОВ М.Л. 142, 144
БЫЧКОВА А.В. 146, 797

В

ВАВАЕВ А.В. 522
ВАЙДО А.И. 245
ВАЙНЕР О.Б. 484
ВАНЧАКОВА Н.П. 1052
ВАРАКИН Е.А. 983
ВАРВАРИНА Г.Н. 506
ВАРФОЛОМЕЕВ С.Д. 225
ВАСЕТЕНКОВ А.Е. 376
ВАСИЛЬЕВ А.В. 619
ВАСИЛЬЕВ Д.М. 148
ВАСИЛЬЕВ Д.С. 272
ВАСИЛЬЕВ М.М. 597
ВАСИЛЬЕВА А.В. 112
ВАСИЛЬЕВА Б.Ф. 938
ВАШКЕВИЧ И.И. 236
ВАШУРИН А.С. 175
ВДОВИНА В.А. 746
ВЕКШИН Н.Л. 150
ВЕЛИЧКО Н.А. 709
ВЕЛИШАЕВА Н.С. 388
ВЕЛЬМЯЙКИН И.Н. 152
ВЕРЕМЕЙЧИК Г.Н. 210
ВЕРШИНКИН Д.А. 154
ВЕСЕЛКИН Н.П. 34, 555, 1006
ВЕТОШКИНА Д.В. 156
ВЕЧЕРСКИЙ М.В. 158
ВИДЯШЕВА И.В. 22
ВИКУЛОВА М.А. 159
ВИННИЧЕНКО К.Я. 161
ВИНОГРАДОВА А.В. 256

ВИНОКУРОВ А.Ю. 163
ВИШНЕВСКАЯ Ю.А. 289
ВЛАДИМИРОВА С.Ф. 165
ВЛАСОВ Г.П. 272
ВЛАСОВА Т.А. 167
ВОЙНО Л.И. 110
ВОЛКОВ А.Г. 168
ВОЛКОВА Л.В. 134
ВОЛКОВА С.А. 996
ВОЛЧЕНКО В.И. 461
ВОЛЧЕНКО Н.Н. 811
ВОЛЧО К.П. 278
ВОЛЬПИНА О.М. 342
ВОЛЬХИН В.В. 707
ВОРОБЬЕВ А.И. 655
ВОРОБЬЕВ И.И. 655
ВОРОБЬЕВА Н.Е. 353, 511
ВОРОНОВА В.А. 170
ВОРОШИЛОВА Е.В. 940
ВЫСОЦКАЯ О.Н. 172, 880
ВЫСОЦКИЙ В.А. 93

Г

ГАБИБОВ А.Г. 655
ГАГАРИНА А.Ю. 668, 669
ГАГАРИНА И.Н. 668, 669
ГАЙФУЛЛИНА Р.Ф. 351
ГАЛАТЕНКО О.А. 505, 567, 844
ГАЛЬПЕРИНА Е.И. 57, 174
ГАЛЬЧЕНКО В.Ф. 844
ГАМАГА В.В. 328
ГАРАСЬКО Е.В. 175, 177, 178, 477, 597, 722, 729
ГАРБЕР М.Б. 53, 69, 418, 528, 577
ГАРИПОВА С.Р. 542
ГАРМАШ С.А. 180
ГАСКАРОВА Е.Ф. 312
ГАСПАРЯН М.Э. 142, 144, 357
ГАФУРОВ Ю.М. 530
ГЕНЕРОЗОВА И.П. 268
ГЕТМАН И.А. 154
ГИБАДУЛЛИНА Э.М. 806
ГИЛЬМАНОВА Р.И. 182
ГЛАДКИХ Е.Г. 505
ГЛАДКОВ Е.А. 184, 186, 489, 490
ГЛАЗЕР В.М. 657
ГЛАЗОВА А.А. 314
ГЛЕБОВА Н.Н. 446
ГЛУХОВ А.С. 710
ГЛУШАКОВА А.М. 61
ГЛУЩЕНКО О.Ю. 1067
ГНЕЗДИЛОВА Л.А. 90, 159, 324
ГНЕУШЕВА И.А. 221
ГОЛЕНЧЕНКО С.Г. 864
ГОЛИКОВА Л.Н. 876
ГОЛИЧЕНКОВ В.С. 920

ГОЛОФЕЕВСКИЙ В.Ю. 334
ГОЛУБЕВА И.Ю. 454
ГОМАА А.М. 757
ГОМАНКОВА А.И. 312
ГОМБОЕВА С.В. 188
ГОНГАДЗЕ Г.М. 53, 528
ГОНГАЕВА А.Г. 190
ГОНЧАР Д.А. 876
ГОНЧАРОВА Н.В. 191
ГОНЧАРУК Е.А. 194
ГОРБАТКО Е.С. 113
ГОРБАЧЕВА М.В. 454
ГОРИН К.В. 124
ГОРШКОВА О. М. 657
ГОРЬКОВ А.А. 668, 669
ГОРЬКОВА И.В. 668, 669
ГОРЯЕВА Н.А. 1037
ГОРЯЙНОВА Е.Г. 934
ГРАДОВА М.А. 494
ГРАНСТРЕМ О.К. 430
ГРЕТЧЕНКО Г.А. 722
ГРЕЦКАЯ Н.М. 16
ГРИВЕННИКОВ И.А. 59, 645
ГРИГОРЕНКО А.П. 645
ГРИГОРИАДИ А.С. 195, 361
ГРИЧУК Д.В. 657
ГРИШЕЧКИН А.Е. 20
ГРИШИН С.Ю. 197
ГРОМОВА О.Н. 199
ГРУЗДЕВ Д.С. 201
ГРЯДУНОВ Д.А. 154
ГРЯЗНОВ А.Ю. 203
ГУДКОВ С.В. 180
ГУЛАМАНОВА Г.А. 204
ГУЛИЙ О.И. 207
ГУЛИМОВА Л.А. 124
ГУЛЬНЕВА М.Ю. 208
ГУЛЯЕВ А.В. 334
ГУСЕВ О.А. 1042
ГУСИНА Н.Б. 236
ГУТНИКОВА Л.В. 737
ГУЩИНА Е.А. 713
ГЮНТЕР Е.А. 210

Д

ДАВЫДОВ С.О. 212
ДАВЫДОВА Д.А. 619
ДАВЫДОВА Д.Ю. 214
ДАНИЛОВ В.С. 892
ДАНИЛОВ М.Б. 32, 77, 82
ДАНИЛОВА Е.И. 239
ДАНИЛОВА С.А. 216
ДАНИЛОВА Т.Е. 768
ДАНИЛОВА Ю.В. 218
ДАРМОВ И.В. 219

ДАШИНИМАЕВ Э.Б. 619
ДЕГТЯРЁВ С.Х. 292, 876
ДЕДКОВ В.Н. 221
ДЕДКОВ В.С. 876
ДЕЕВА Н.Ф. 18, 222
ДЕЙНЕКО Е.В. 274, 836, 950
ДЕЛЕГАН Я.А. 717
ДЕМАКОВ В.А. 148
ДЕМЕШКО О.Д. 823
ДЕМИДКИНА Т.В. 421
ДЕМИДОВА Е.В. 422
ДЁМИН Д.В. 18, 222, 925
ДЕМИНА Л.Л. 657
ДЕМИНА О.В. 225
ДЕНИСОВА Т.В. 516
ДЕРКАЧ К.В. 203, 590, 591, 1065
ДЖОНСОН М.Е. 715
ДЗЮБА М.В. 136, 201, 374
ДИТЧЕНКО Т.И. 170, 227
ДМИТРИЕВ В.Г. 410
ДМИТРИЕВ С.Е. 50
ДОЛГИХ Д.А. 784
ДОЛГИХ Ю.И. 186, 490
ДОЛОТКАЗИНА А.В. 229, 786
ДОНОВА М.В. 998
ДОЦЕНКО К.Э. 318
ДРАГАВЦЕВ В.А. 231
ДРУЧИНИН А.С. 466
ДУБАСОВ А.Ю. 732, 750
ДУБИНИНА Г.А. 888
ДУБОВСКАЯ Л.В. 236
ДУБРОВСКАЯ Н.М. 272
ДУКОВА В.С. 639
ДУНАЕВСКИЙ Я.Е. 755
ДУНИЧ А.А. 239
ДУРНЕВ Е.А. 238
ДУРЫМАНОВ А.Г. 975
ДЫКМАН Л.А. 207
ДЬЯКОВ М.Ю. 639, 938
ДЬЯЧЕНКО О.В. 241, 922, 1012, 1013
ДЬЯЧУК Т.И. 243
ДЮЖИКОВА Н.А. 245

Е

ЕВДОКИМОВА А.А. 767
ЕВСЕЕВА Н.В. 939
ЕВТУШЕНКОВ А.Н. 85, 86
ЕГОРОВА А.А. 540, 1070
ЕГОРОВА Д.О. 247
ЕГОРОВА З.Е. 191, 249, 898, 946
ЕГОРОВА М.А. 251, 705
ЕМЕЛЬЯНОВА И.С. 152, 963
ЕМЕЛЬЯНОВА О.Ю. 112
ЕНИН Г.А. 432
ЕРГУНОВА О.Т. 253

ЕРЕМЕЕВА Н.И. 255
ЕРЕМЕЕВА Т.В. 256
ЕРКИН Ф.И. 258
ЕРМАКОВ В.В. 657
ЕРМАКОВА Е.В. 844
ЕРМОЛИНА Л.В. 495
ЕРМОШИН А.А. 24
ЕСИПОВ Д.С. 430
ЕФИМЕНКО Т.А. 372
ЕФРЕМЕНКОВА О.В. 372, 505, 938

Ж

ЖАМСАРАНОВА С.Д. 190
ЖАРДЕЦКИЙ С.С. 260
ЖАРИКОВА Г.Г. 165, 952
ЖАРИКОВА Н.В. 415, 1083
ЖАРНИКОВА Е.В. 262
ЖБАНОВ А.Е. 265, 657
ЖДАНОВА О.С. 1001
ЖЕЛЕЗНЯКОВА Г.Ю. 540
ЖЕЛТИКОВА Т.М. 61
ЖЕЛТОВ Ю.И. 675
ЖЕМЧУЖНИКОВ М.К. 266, 503
ЖИГАЧЕВА И.В. 268
ЖИЛИНСКАЯ И.Н. 7
ЖОРИНА Ю.Ю. 270
ЖУРАВИН И.А. 272
ЖУРЕНКО Е.Ю. 415, 1083
ЖУРИНА М.В. 720

З

ЗАБЕЛИН А.В. 844
ЗАВГОРОДНЯЯ Ю.А. 657
ЗАВОДЧИКОВА Р.А. 609
ЗАГОРСКАЯ А.А. 274, 836, 950
ЗАГОСКИНА Н.В. 194, 745
ЗАГРЕБЕЛЬНЫЙ С.Н. 767
ЗАЙЦЕВ Б.Д. 207
ЗАЙЦЕВА Е.В. 113
ЗАНИНА М.А. 298
ЗАРЫТОВА В.Ф. 277, 665, 763, 765, 767
ЗАСЕДАТЕЛЕВ А.С. 154
ЗАТОЛОЧИНА К.Э. 1003
ЗАХАРЕНКО А.Л. 278
ЗАХАРЕНКО Н.А. 280
ЗАХАРКИН Д. О. 282, 284
ЗАХАРКИНА А.С. 286
ЗАХАРОВ И.С. 1042
ЗАХАРОВА М.В. 1019
ЗАХАРЧЕНКО Н.С. 156, 287, 1012
ЗАЯКИН В.В. 197
ЗДОРОВИЛО Н.В. 314
ЗЕЛЁНЫЙ Ю.М. 289

ЗЕМКОВ Г.В. 291
ЗЕМЛЯНСКАЯ Е.В. 292
ЗЕМСКИЙ П.Ю. 295
ЗЕМЧЕНКОВА О.В. 297
ЗЕНИН В.В. 7, 874
ЗЕНКОВА В.А. 372, 938
ЗИМИН А.А. 851
ЗИНОВЬЕВ М.А. 920
ЗОЛОТУХИН А.И. 298
ЗУБАРЕВА К.Ю. 301
ЗУБЕНКО Ю.С. 52
ЗУБКОВ А.В. 303
ЗУБКОВА Е.И. 657
ЗЫРЯНОВА Ю.В. 304

И

ИБРАГИМОВА Ж.Б. 44
ИВАНИЦКАЯ А.С. 940
ИВАНИЦКАЯ Л.Н. 306
ИВАНОВ В.В. 36
ИВАНОВА А.О. 308
ИВАНОВА В.П. 309
ИВАНОВА К.Б. 311
ИВАНОВА Л.А. 312, 314, 316
ИВАНОВА М.А. 318
ИГНАТОВ О.В. 207
ИГНАТОВА П.К. 63
ИГОНИНА О.Н. 1019
ИЛЬИНА А.А. 18, 222
ИЛЬИНА В.Н. 320
ИЛЬИНА Е.С. 278
ИЛЬЯСОВА Е.Ю. 1056
ИЛЮХИН С.А. 322
ИОНИЧЕВ Д.С. 324
ИСАЕВА Е.И. 601
ИСЛАМОВ Р.Р. 970, 1017
ИСМАГИЛОВ З.Р. 277, 763, 765, 767
ИТАЛЬЯНСКАЯ Ю.В. 243, 1076
ИШМУХАМЕТОВА А.Н. 635
ИЩЕНКО А.А. 927

Й

ЙОВАНОВИЧ Л. 657

К

КАБАНОВ А.В. 398, 400
КАБДЕНОВА А.Т. 326, 620
КАБЛОВ В.Ф. 328
КАГАНОВИЧ И.В. 137
КАДЫРОВ Д.И. 330
КАЗАКОВ Д.А. 707
КАЗЬЯНИН А.В. 134

КАКИМЖАНОВА А.А. 950
КАКИМОВА Ж.Х. 332
КАЛЕНИК Т.К. 569
КАЛИНОВСКИЙ В.П. 334
КАМАНИН С.С. 336
КАМАНИНА О.А. 338
КАМЕНСКИЙ А.А. 430
КАМЗОЛКИНА О.В. 938
КАМЗОЛОВА С.В. 340, 501, 1022
КАМИНСКАЯ Е.В. 874
КАМИНСКИЙ Ю.Г. 99, 936
КАМНЕВ А.Н. 657
КАМЫНИНА А.В. 342
КАНАШ Е.В. 675
КАНИЕВА Н.А. 291, 512
КАНОЧКИНА М.С. 124
КАПЕЛИНСКАЯ Т.В. 558
КАПИТОНОВА Ю.В. 8
КАРАБАНОВ Д.П. 344
КАРАВАЕВА О.А. 207
КАРАМАН Ю.К. 346
КАРАНОВА М.К. 347
КАРАСЕВ С.Г. 811
КАРАСЕВА Э.В. 811
КАРАУЛОВ А.В. 1048
КАРИМОВА Ф.Г. 182, 761
КАРЛОВ П.М. 348
КАРМАНОВ И.В. 675
КАРНАЖИЦКАЯ Т.Д. 55
КАРПИНЧИК Е.В. 818
КАРПОВА Е.А. 1039
КАРПОВА М.Ю. 225
КАРЯЧКИНА О.С. 48
КАСЬЯНЕНКО Н.А. 759
КАТАЕВ В.А. 695
КАТАЛЕВСКИЙ А.А. 499
КАТАНАЕВ В.Л. 418, 432
КАТИНА М.Н. 351
КАТРУХА Г.С. 372, 505, 938
КАУХОВА И.Е. 199
КАХАРОВА К.А. 992
КАЧАЕВ З.М. 353
КИЛАДЗЕ А.Б. 354, 355
КИЛЁВА Е.В. 876
КИМ А.Ю. 332
КИМ Я.В. 144, 357
КИРГИЗОВА С.Б. 359
КИРЕЕВА Н.А. 195, 361
КИРИЛЛОВ С.К. 524
КИРЮШЕНКОВА С.В. 524
КИСЕЛЕВ А.В. 540, 1070
КИСЕЛЕВ М.А. 844
КИСЕЛЕВА Е.П. 363
КИЯСОВ А.П. 587
КЛЕПОВ Р.Е. 450
КЛИНОВ Д.В. 20

КЛИШИН А.А. 495
 КЛОТОВ Б. 1019
 КЛЮЕВА Н.З. 30, 413
 КЛЯШТОРНЫЙ В.Г. 53
 КНЯЗЕВ А.Н. 266, 503
 КНЯЗЕВА И.В. 365, 651
 КОБЗЕВ Г.И. 494
 КОБЫЛЯНСКИЙ А.Г. 59
 КОВАЛЕВ Н.Н. 698, 792
 КОВАЛЕВА Н.С. 629
 КОВАЛЕВА Т.А. 97, 518, 994
 КОВАЛЕВСКАЯ Н.П. 1046
 КОВАЛЕНКО Р.И. 691
 КОВАРСКИЙ А.Л. 146, 797
 КОВНИР С.В. 655
 КОДУХОВА Ю.В. 344, 368
 КОЖУРО Ю.И. 370
 КОЗЛОВ Д.Г. 372, 505
 КОЗЛОВ Е.Н. 373
 КОЗЛОВА Ю.Н. 601
 КОЗЯЕВА В.В. 374
 КОКШАРОВА О.А. 376, 736
 КОЛАЧЕВСКАЯ О.О. 378
 КОЛЕСНИКОВ С.И. 516
 КОЛЕСНИКОВА И.С. 380
 КОЛЕСНИКОВА М.В. 382
 КОЛЕСНИКОВА Н.Н. 384, 498
 КОЛЕСОВА О.В. 386
 КОЛОБОВА О.С. 388
 КОЛОМИЕЦ Н.Д. 249
 КОЛОСОВ Л.А. 128
 КОЛЯЧКИНА С.В. 428
 КОМАРОВ В.М. 398, 400
 КОМАРОВА Ю.В. 390
 КОМАРЬКОВ И.Ф. 391
 КОМИССАРОВ Г.Г. 908
 КОМИССАРОВА Л.Х. 392, 439
 КОМОСКО Г.В. 486
 КОМРАТОВ А.В. 394
 КОНДРАТЬЕВ М.Н. 396
 КОНДРАТЬЕВ М.С. 398, 400, 1027
 КОНОН А.Д. 402, 404
 КОНОШИНА С.Н. 301
 КОНТОРЩИКОВА Е.Ю. 1048
 КОРЕНЕВА Е.В. 112
 КОРЕПАНОВ А.П. 53, 528
 КОРНЕВА Н.А. 30, 410, 413
 КОРНЕЕВА М.М. 408
 КОРНИЕНКО С.В. 853
 КОРНИЛОВА Е.С. 807
 КОРОБЕЙНИКОВА А.В. 53, 528
 КОРОБОВ В.В. 415, 1083
 КОРОБОВ В.П. 168
 КОРОВЕВ Д.О. 342
 КОРОЛЕВ А.М. 505, 938
 КОРОЛЕВ Д.С. 286
 КОРОЛЕВА А.В. 384, 416, 498
 КОРОЛЕВА В.В. 535
 КОРОЛЕВА Л.С. 601
 КОРШАК О.В. 643
 КОСЕНКО Е.А. 99, 936
 КОСИЦЫН Н.С. 430
 КОСОГОВА Т.А. 929
 КОСТАРЕВА О.С. 418
 КОСТИН В.Е. 328
 КОСТИНА Е.Е. 406
 КОСТИНА Н.В. 419, 468, 637
 КОСТРОМИЧЕВА Е. В. 668, 669
 КОТЕЛЕВЦЕВ С.В. 657, 723
 КОТЕЛЬНИКОВА Т.В. 1048
 КОТИНА Е.А. 1074
 КОТЛОВ М.И. 421
 КОТОВА Н.В. 543, 794
 КОЧКИН Д.В. 422, 424
 КОЧНЕВА Т.А. 475
 КОШЕЛЕВ В.Б. 430
 КОШЕЛЕВА Ю.С. 683
 КРАВЧЕНКО О.В. 577
 КРАСНОВ А.Н. 511
 КРАСНОВ М.С. 426
 КРИВОШЕЕВ Д.М. 428
 КРИКУНОВА Н.И. 268
 КРОЛЕНКО С.А. 807
 КРУЧИННИНА О.В. 174
 КРУШИНСКИЙ А.Л. 430, 435
 КРЮЧКОВ М.В. 432
 КУДИН К.В. 433
 КУДРЯШОВ В.К. 920
 КУЗЕНКОВ В.С. 430, 435
 КУЗИН А.И. 437
 КУЗНЕЦОВ А.А. 392, 439, 753, 813
 КУЗНЕЦОВ Б.Б. 956
 КУЗНЕЦОВ О.Ю. 442, 444, 817
 КУЗНЕЦОВА А.В. 270, 446
 КУЗНЕЦОВА Е.А. 448, 450
 КУЗНЕЦОВА И.Е. 207
 КУЗНЕЦОВА М.В. 526
 КУЗНЕЦОВА Н.И. 437, 452
 КУЗНЕЦОВА Н.Н. 992
 КУЗНЕЦОВА Т.А. 158
 КУЗНЕЦОВА Т.Г. 454
 КУЗЬМИН С.М. 178
 КУЗЬМИНА Н.С. 199, 303
 КУЛЕШОВА Е.С. 671
 КУЛЕШОВА Ю.М. 456, 973
 КУЛИКОВ А.В. 70, 458
 КУЛИКОВ Д.А. 70, 458
 КУЛИКОВА П.А. 70, 458
 КУРАНОВА А.В. 70, 458
 КУРАНОВА Л.К. 461
 КУРБАТОВА И.Н. 463
 КУРОПТЕВА З.В. 430, 464

КУРЧАЕВА Е.Е. 466
КУТУЗОВ М.М. 278
КУХТА Е.А. 318
КУЧИН И.С. 732
КХАТАБ З.С. 468

Л

ЛАВРЕНТЬЕВА Е.В. 470, 755
ЛАВРИК О.И. 278
ЛАВСКАЯ А.С. 834
ЛАГУНОВА Н.Л. 472
ЛАЗАРЕВА Е.А. 855
ЛАЗАРЕВА Е.В. 657
ЛАЗАРЕВА Н.В. 789
ЛАЗЫКИН А.Г. 486, 711
ЛАКТИОНОВ П.П. 484
ЛАКТИОНОВА А.А. 474
ЛАМБЕРОВА А.А. 475
ЛАМБЕРОВА М.Э. 475
ЛАПЕНКО В.Л. 853
ЛАПЕНКО М.А. 653
ЛАПТЕВ А.В. 225
ЛАПШИН П.В. 194, 745
ЛАРИКОВА Ю.С. 396
ЛАСТОЧКИНА О.В. 1056
ЛАТЫНИНА Т.И. 477
ЛЕБЕДЕВ В.Г. 480, 481, 482, 483
ЛЕБЕДЕВ С.В. 847
ЛЕБЕДЕВ В.П. 161
ЛЕБЕДЕВА А.О. 484
ЛЕВАНОВА Н.А. 485
ЛЕВИН П.П. 906, 908
ЛЕВИНА А.С. 277, 763, 765, 767
ЛЕДНОВА М.И. 306
ЛЕОНОВА В.Б. 146, 797
ЛЕОНОВА И.Б. 952
ЛЕОНТЬЕВА Е.А. 807
ЛЁШИНА Т.В. 1067
ЛЕЩЕНКО А.А. 486, 711
ЛИН Ч. 418
ЛИПАСОВА В.А. 736
ЛИТВИНОВА И.И. 489, 490
ЛИТВИШКО В.С. 491
ЛИТЯГИНА С.В. 648
ЛИХАЧЕВ А.Н. 679
ЛИЯСЬКИН Ю.К. 493
ЛИЯСЬКИНА Е.В. 493
ЛОБАНОВ А.В. 494, 908
ЛОБАНОВА Н.В. 495, 1032
ЛОБАНОК А.Г. 1007
ЛОБАЧЕВ Ю.В. 406, 939
ЛОГВИНОВ С.В. 486, 711
ЛОГВИНОВА Е.Е. 97
ЛОКТЮШОВ Е.В. 287
ЛОКШИНА Е.И. 555, 1006

ЛОМИН С.Н. 378
ЛОПАТИНА О.А. 713, 715
ЛОСЕНКОВА С.О. 524
ЛУЗИНА О.А. 278
ЛУКАНИНА Ю.К. 384, 416, 498
ЛУКАТКИН А.С. 152, 581, 605, 963
ЛУКИН А.Ю. 225
ЛУНДОВСКИХ И.А. 219
ЛУНИН С.В. 499
ЛУНИНА Ю.Н. 340, 501
ЛУНИЧКИН А.М. 266, 503
ЛУСИНЯН И.В. 697
ЛЫСАК В.И. 666
ЛЫСЕНКОВА Л.Н. 505
ЛЫЧАГИНА Н.Г. 1074
ЛЮБАВИНА Н.А. 506
ЛЮБЛИНСКАЯ О.Г. 7
ЛЮБУНЬ Г.П. 22
ЛЮШИНА Г.А. 509
ЛЯХ В.А. 862

М

МАВЗЮТОВ А.Р. 552, 553, 635
МАГАДОВА М.Ю. 511
МАГЗАНОВА Д.К. 291, 512
МАЖУЛИНА И.В. 513
МАЖУЛЬ М.М. 892
МАЗАНКО М.С. 516
МАЗУРКОВА Н.А. 44, 277, 765, 767
МАЙНАГАШЕВ И.Я. 278
МАКАРОВА Е.В. 506
МАКАРОВА Е.Л. 518
МАКАРОВА Е.П. 519
МАКАРОВА М.О. 505
МАККАТЧЕН С. 657
МАКОВА Н.З. 272
МАКСИМЕНКО А.В. 522
МАКСИМЕНКОВА К.И. 524
МАКСИМОВА А.В. 526
МАКСИМОВА Е.М. 528
МАКСИМОВА Н.П. 370, 973
МАКСИМОВА О.В. 113
МАКСИМОВА С.Н. 530
МАКСИМОВА Ю.Г. 148, 532
МАКСЮТОВ И.Ю. 534
МАЛАНИЧЕВА И.А. 372
МАЛАФЕЕВА Э.В. 208
МАЛАХАЕВА А.Н. 394
МАЛИКОВА А.З. 1042
МАЛЫГИН А.В. 161
МАЛЫШЕВА А.А. 506
МАМАЕВА М.Е. 535
МАМЕДОВА Х.Р. 537
МАНУИЛОВА Е.С. 59
МАРЕАЙ М.М. 757

МАРЕНОВА И.И. 616, 618
МАРЕТИНА М.А. 540
МАРИНИЧ Д.В. 241, 922
МАРКОВА О.В. 542
МАРКУШЕВА Т.В. 415, 1083
МАРТИРОСОВА Е.И. 549
МАРТЫНОВА Е.У. 558
МАРЧЕНКО Н.Ю. 543
МАРЧЕНКОВ В.В. 543, 794
МАРЧЕНКОВА С.Ю. 794
МАСАГУТОВА Н.Р. 552, 553
МАСАЛОВ И.С. 555, 1006
МАСЛЕННИКОВ П.В. 556
МАСТАЛЫГИНА Е.Е. 697
МАТВЕЕВА С.В. 480
МАТКОВСКАЯ М.В. 560
МАТОРА Л.Ю. 939
МАТОРИН Д.Н. 657
МАТЫЧЕНКОВ В.В. 562, 564
МАТЫЧЕНКОВ И.В. 130, 564
МАХАЕВА Г.Ф. 121
МАЦ А.Н. 566
МАЧАВАРИАНИ Н.Г. 567
МАШКОВ А.Е. 70, 458
МЕДВЕДЕВА Е.В. 569
МЕДВЕДЕВА Л.П. 243
МЕДЖИДОВ М.М. 571
МЕЗЕНОВА О.Я. 560
МЕЛЬНИК Б.С. 710
МЕЛЬНИК Т.Н. 710
МЕЛЬНИКОВ В.Г. 956, 957
МЕЛЬНИКОВ В.И. 698
МЕНЬКОВ Н.В. 506
МЕЩЕРЯКОВА Е.С. 545, 547
МИНАЙЧЕВА П.Р. 573
МИРЗАЕВА Н.Д. 119
МИРОНОВА К.С. 446
МИРОШНИЧЕНКО О.В. 698
МИРСЯПОВА И.А. 635, 981
МИСИН В.М. 798
МИТРАКОВА М.Е. 574
МИТРОШИН И.В. 577
МИХАЙЛОВ В.М. 874
МИХАЙЛОВ Г.В. 772
МИХАЙЛОВ С.Н. 428, 896
МИХАЙЛОВА Е.А. 578, 1069
МИХАЙЛОВА Е.О. 580, 1000, 1078
МИХАЙЛОВА И.Д. 581
МИХАЙЛОВА Р.В. 582, 599, 823, 1007
МИХАЙЛОВА Ю.В. 584
МИХАЙЛОВИЧ В.М. 154
МИХАЙЛОПУЛО К.И. 363
МИХАЛЕНКО Е.В. 823
МИХНЕНКОВА Н.А. 876
МИХНЮК О.В. 650
МИШАРИНА Т.А. 268

МИЩЕНКО И.А. 585
МИЩЕНКО Л.Т. 239, 585
МИЯНОВИЧ О. 587
МОЖЕНОК Т.П. 807
МОИСЕЕВА И.Я. 825
МОЙСЕЮК И.В. 590, 591
МОКЕЕВА В.Л. 61
МОКШИН Е.В. 152, 605, 963
МОЛДАЛИЕВ Ж.Т. 430
МОНАХОВА Т.В. 416
МООР Н.А. 592, 595
МОРГУНОВ И.Г. 340, 501, 1022
МОРЕВ С.И. 722
МОРЕВА Ж.Г. 597
МОРОЗ И.В. 599
МОРОЗОВ В.И. 643
МОРОЗОВА Е.А. 421
МОРОЗОВА О.В. 20, 601
МОРОЗОВА Ю. А. 603
МОТЫЛЕВА С.М. 448
МОХОВ В.В. 607
МУЗАФАРОВ А.М. 908
МУКАТОВА М.Д. 117
МУРЛАЕВА Е.В. 786
МУРОМЦЕВ А.Б. 609
МУТТАР А.А. 610
МУХА Д.В. 558
МУХАМБЕТАЛИЕВА А. 512
МУХАМЕДШИНА Я.О. 612
МУХАМЕТВАФИНА А.А. 614
МУХАМЕТЗЯНОВА А.Д. 616, 618
МУХИН В.А. 1059
МУЧКАЕВА И.А. 619
МЫРЗАГУЖИНОВА Д.К. 326, 620
МЯСОЕДОВА В.В. 622

Н

НАГАЕВА Э.И. 1052
НАЗАРЕНКО Л.В. 8, 994
НАЗАРКИНА М.И. 493
НАЗАРОВА А.А. 623, 625, 726, 728, 1033, 1035
НАЛИВАЕВА Н.Н. 272
НАМ И.Я. 197
НАМСАРАЕВ Б.Б. 755
НАУМЧИК И.В. 236
НГУЕН ТХИ ЧАНГ 626, 629
НГУЕН ЧЫОНГ ЗАНГ 124
НЕГАНОВА М.Е. 630
НЕЕЛОВ И.М. 272
НЕЗГОВОРОВ Д.В. 631
НЕКРАСОВ А.Е. 830
НЕСТЕРОВ Д.В. 847
НЕТЕСОВА Н.А. 767
НЕФЕДЬЕВА Е.Э. 666
НЕЧАЕВА Т.Л. 194

НЕЧАЕВА Ю.С. 128
НЕЧЕСОВА Т.А. 834
НЕЧИТАЙЛО Г.С. 439, 633
НИГМАТУЛЛИНА Л.Р. 635
НИКИТИН В.А. 636
НИКИТИНА В.Е. 28
НИКИТИНА Т.Н. 1003
НИКИФОРОВА О.В. 685
НИКОЛАЕВА А.М. 566
НИКОЛАЕВА Т.Н. 194
НИКОЛАЕНКО М.А. 437
НИКОЛАЙЧИК Е.А. 85, 86
НИКОЛАШИНА К.А. 573
НИКОНОВ О.С. 69
НИКОНОВ С.В. 53, 69, 577
НОВИКОВ В.В. 122, 506, 1048
НОВИКОВ В.Е. 322
НОВИКОВ Д.В. 535, 1048
НОВИКОВА Е.М. 419, 468, 637, 804
НОВИКОВА К.И. 639
НОВИЧЕНКО О.В. 641
НОВОЖИЛОВ А.В. 643
НОВОЖИЛОВ Е.В. 983
НОВОСАДОВА Е.В. 645
НОВОСЕЛОВА Н.Ю. 647
НОЗДРАЧЕВ А.Д. 977
НОСАРЕВА О.В. 950
НОСКОВ С.М. 208
НОСОВ А.М. 422, 424
НОСОВА О.Н. 1076
НУРБАКОВ А.А. 495

О

ОБРУЧЕВА Н.В. 648
ОВЕЧКИНА Г.В. 148
ОВОДОВ Ю.С. 210, 578
ОВЧИННИКОВА С.И. 650, 1058
ОГОРОДНИКОВА Т.И. 46, 761, 795
ОГУЛЯ А.П. 365, 651
ОЗЕРЕЦКОВСКИЙ Н.А. 1003
ОКТАБРЬСКИЙ О.Н. 509
ОКУДА Т. 1042
ОЛЬКИН С.Е. 48
ОРЛОВА И.Г. 653
ОРЛОВА Н.А. 655
ОСИНА Н.А. 394
ОСИПОВА Н.А. 1025
ОСЛИНА Д.С. 4
ОСТРОВСКИЙ Д.Н. 814
ОСТРОУМОВ С.А. 265, 657, 658, 713, 715, 723, 884
ОТРОШКО Д.Н. 811
ОХОТИН В.Е. 430

П

ПАВЛИЙ С.А. 207
ПАВЛОВ В.Г. 661
ПАВЛОВА А.П. 663
ПАВЛОВА А.С. 277, 665, 763
ПАВЛОВА В.А. 666
ПАВЛОВА Е.Е. 104
ПАВЛОВСКАЯ Н.Е. 221, 668, 669, 671
ПАК М.Э. 940
ПАНИН М.С. 657
ПАНОВА А.А. 673
ПАНОВА Г.Г. 675, 677
ПАНОВА И.Г. 927
ПАНТЮХОВ П.В. 384, 679, 931
ПАРАМОНОВ И.Н. 448
ПАРАМОНОВА Н.Ю. 681
ПАРИСЕНКОВА О.В. 683
ПАРФЕНЮК В.И. 178
ПАРФЕНЮК С.А. 404
ПАХОМОВ Ю.Д. 113, 685
ПЕРЕСЬКО Р.В. 139
ПЕРЕТОЛЧИН Д.В. 686
ПЕРК А.А. 689, 693
ПЕТЕНКОВА А.А. 691
ПЕТРИЦКАЯ Е.Н. 770
ПЕТРОВ К.А. 693
ПЕТРОВА Е.И. 413
ПЕТРОВА И.В. 695
ПЕТРОВА Л.Н. 630
ПЕТРОВА Н.В. 22, 182
ПЕТРОВА Т.Н. 90
ПЕТРОВА Ю.Г. 605
ПЕТРОВСКАЯ Л.Е. 784
ПЕТРОВСКИХ В.П. 566
ПЕХТАШЕВА Е.Л. 697
ПИВНЕНКО Т.Н. 698
ПИВОВАРОВА И.А. 653
ПИКУЛЕНКО М.М. 701
ПИНЕЛИС В.Г. 430
ПИРОГ Т.П. 402, 404
ПISKУРЕВА В.А. 703
ПИЩУЛИНА Л.А. 112
ПЛАКУНОВ В.К. 720
ПЛАЩИНА И.Г. 549
ПЛЕХАНОВА А.С. 705
ПЛОТНИКОВА Е.Г. 39, 247
ПЛОТНИКОВА Н.П. 707
ПЛЫНСКАЯ Ж.А. 709
ПОВАРНИЦЫНА Т.В. 710
ПОГОРЕЛЬСКИЙ И.П. 219, 486, 711
ПОДОЙНИЦЫН С.Н. 439
ПОДЧЕРНЯЕВА Р.Я. 713, 715
ПОЗДИНА С.Ю. 717
ПОЗДНЯКОВА Н.В. 720
ПОЗДНЯКОВА С.И. 297

ПОЗДЫШЕВА Т.И. 722
ПОКЛОНОВ В.А. 657, 723
ПОЛЕТАЕВА И.И. 430
ПОЛЕХИН С.А. 668, 669
ПОЛЕЩУК Д.В. 530
ПОЛИКАРПОВА А.В. 725, 894
ПОЛИКСЕНОВА В.Д. 818
ПОЛИЩУК С.Д. 623, 625, 726, 728, 1033, 1035
ПОЛЯКОВ Н.Э. 1067
ПОЛЯКОВСКИЙ В.М. 280
ПОМИНОВ А.В. 243
ПОНОМАРЕВ А.П. 729
ПОНОМАРЕВА А.А. 761
ПОНОМАРЕВА Л.В. 677
ПОПЕЙКО О.В. 210
ПОПКОВ П.Н. 732, 750
ПОПОВ А.А. 384, 416, 498, 679
ПОПОВ А.А. 734, 931
ПОПОВ А.Л. 734
ПОПОВ В.А. 34
ПОПОВ В.Н. 114, 116, 408, 853
ПОПОВА А.А. 736
ПОСТНИКОВА М.В. 574, 663
ПОТАПОВИЧ М.И. 610, 864
ПОТАПЧЕНКО А.А. 610
ПРАДУН О.М. 818
ПРАЗДНОВА Е.В. 737
ПРЕСНЯКОВА Н.Б. 506, 535
ПРИСТАВКА А.А. 809
ПРИСЯЖНЕНКО О.К. 85, 86
ПРИЩЕПО А.Ю. 316
ПРОКОПКИНА Ю.О. 433
ПРОКУЛЕВИЧ В.А. 433, 610, 864
ПРОНКИН П.Г. 738, 927
ПРОШИН А.Н. 121, 630
ПРУДНИКОВ П.С. 740, 743
ПРУДНИКОВА Е.Г. 301, 743
ПРУДЧЕНКО И.А. 1027
ПРЯДЕХИНА Е.В. 745
ПУНТУС И.Ф. 472, 717
ПУСЕНКОВА Л.И. 1056
ПУСТОВАЯ О.В. 306
ПУТИНЦЕВА О.В. 94, 746
ПУТЛЯЕВ Е.В. 855
ПУХОВСКАЯ С.Г. 175
ПУЧИНЬЯН Д.М. 22
ПУЧКО Е.Н. 787
ПУЧКОВА Л.И. 748
ПУШКАРЁВ С.А. 732, 750
ПЫШНАЯ С.В. 439, 753
ПЫШНЫЙ М.Ф. 439, 753

Р

РАДИОНОВ Н.В. 757
РАДНАГУРУЕВА А.А. 470, 755

РАЗИНА В.С. 908
РАЗУМОВСКАЯ Р.Г. 512
РАЛДУГИНА Г.Н. 757
РАМАЗАНОВ Р.Р. 759
РАПОПОРТ Л.М. 1009
РАХМАТУЛЛИНА Д.Ф. 46, 761
РАХМЕДОВ Б.Ч. 491
РАЧКОВ К.В. 828
РЕВИН В.В. 282, 284, 493, 786
РЕВТОВИЧ С.В. 421
РЕДИКУЛЬЦЕВ Ю.В. 920
РЕЗНИКОВА М.И. 372, 938
РЕЙХАРДТ Б.А. 647
РЕПКОВА М.Н. 277, 763, 765, 767
РЕПНИК В.А. 314
РЕУТОВ В.П. 430, 435
РИЗВАНОВ А.А. 351, 587, 881, 894, 970, 1017
РИМАРЕВА Л.В. 36, 828
РИНЧИНОВ А.С. 768
РОГАЕВ Е.И. 645
РОГАТКИН Д.А. 770
РОГАТКИН Е.В. 70, 458
РОГАЧЕВА О.Н. 772
РОГОВА Т.В. 338
РОГОЖИН В.В. 686, 774, 777, 781, 878
РОГОЖИН Ю.В. 777
РОГОЖИНА Т.В. 779, 781
РОДИОНОВ С.Н. 328
РОДИОНОВ Ю.В. 783
РОЖКОВ В.П. 174
РОЗЕНФЕЛЬД М.А. 146, 797
РОЗОВА Х.А. 480
РОМАНОВ Г.А. 154, 378, 428, 896
РОМАНОВА И.В. 784
РОМАНОВА М.А. 229, 786
РУДАКОВА В.А. 983
РУДЕНКО Н.В. 787, 922, 1013
РУКАВЦОВА Е.Б. 24, 287, 787, 789
РУМЯНЦЕВ Е.В. 177
РУПОШЕВ А.Р. 790
РУСАНОВА Е.В. 770
РЫБНИКОВА Е.И. 792
РЯБИНИН В.Е. 750, 954
РЯБОВА Н.А. 794
РЯЗАНЦЕВА И.Н. 795

С

САВВАТЕЕВА-ПОПОВА Е.В. 772
САВЕНКО Ю.Н. 245
САВЧИКОВА Е.В. 481
САГИТОВА А.И. 415
САДЧИКОВ А.П. 657
САЖИНА Н.Н. 798
САЗЫКИН И.С. 468, 737, 801, 803, 804, 806
САЗЫКИНА М.А. 419, 468, 637, 737, 801, 803, 804, 806

САЛАХУТДИНОВ Н.Ф. 278
САЛОВА А.В. 807
САЛОВАРОВА В.П. 809
САЛОМАТИНА О.В. 278
САЛЫКИНА М.А. 430
САМКОВ А.А. 811
САМКОВА С.М. 811
САМОЙЛОВ И.Б. 439, 813
САМОСУДОВА Н.В. 430
САМЧЕНКО А.А. 398, 400
САНДАНОВ А.А. 814
САПРОНОВ Н.С. 647
САПУНОВА Л.И. 1061
САУЛЬСКАЯ Н.Б. 904
САУТКИНА Е.Н. 495, 1032
САФАТОВ А.С. 48
САФОНОВА М.А. 442, 444, 817
САФРО М.Г. 592, 595
САФРОНОВА Н.Ф. 243
САХАРЧУК Т.Н. 818
САЩЕНКО В.П. 597
САЯПИНА Л.В. 394
СВЕНСКАЯ Ю.И. 822
СВЕТЛАКОВА Т.Н. 820
СВИНОВ М.М. 430
СВИРИДОВ В.В. 303
СВИРИДОВ О.В. 236, 834
СЕВЕРИН Ф.Ф. 50
СЕВЕРЮХИНА А.Н. 822
СЕВОСТЬЯНОВ С.М. 18, 222, 925
СЕЛЕЗНЕВА Ю.В. 85, 86
СЕЛИВАНОВА О.М. 794
СЕМАШКО Т.В. 582, 823
СЕМЕНОВ А.М. 956
СЕМЕНОВ Я.С. 178
СЕМЕНОВА Е.Ф. 825
СЕМЕНЧИК Е.А. 370
СЕМИСОТНОВ Г.В. 543, 794
СЕРБА Е.М. 828
СЕРГЕЕВ А.В. 432
СЕРГЕЕВ В.Г. 1015
СЕРГЕЕВА Л.И. 378
СЕРЕБРЯКОВА Л.А. 830
СЕРЕБРЯКОВА О.Г. 121
СЕРЕГИН Ю.А. 495
СЕРКОВ И.В. 121, 630, 832
СЕРЧЕНЯ Т.С. 834
СИДОРЧУК Ю.В. 274, 836
СИЗЕНЕВА Е.С. 838
СИЗОВ А.Д. 657
СИЗОН А.Н. 920
СИКОРСКАЯ Е.В. 543
СИЛЬНИКОВ В.Н. 601
СИМОНЕНКО Е.А. 840
СИМОНОВИЧ Е.И. 842
СИНЕВА О.Н. 844
СИНЕНКО О.С. 24
СИНЕОКИЙ С.П. 372
СИНИЦЫН П.Г. 50
СИНЦОВ К.Н. 238
СИНЬКЕВИЧ И.А. 648
СИНЬКО Г.В. 494
СИПАЙЛОВА О.Ю. 847
СИРОТКИН А.С. 845
СИРОШ А.А. 100
СКЛАДНЕВ Д.А. 849
СКОБЛИКОВ Н.Э. 851
СКРЯБИН К.Г. 838
СЛЕПЯН Л.И. 199
СЛИВКИН А.И. 97, 853
СЛИВКИН Д.А. 97
СМЕРТИНА Е.С. 862
СМИРНОВ А.А. 855
СМИРНОВ А.К. 856
СМИРНОВА Г.В. 509
СМИРНОВА Г.Н. 70, 458
СМИРНОВА Т.А. 858
СМОЛЕНСКИЙ И.В. 860
СМУРОВ А.В. 657
СНЕГИРЕВА И.И. 1003
СОВГИР Н.В. 864
СОВКОВА И.В. 866
СОКОЛЕНКО Г.Г. 868
СОКОЛОВ А.Ю. 870
СОКОЛОВ Л.В. 872
СОКОЛОВА А.В. 874
СОКОЛОВА В.А. 876
СОКОЛОВА Г.Ф. 988
СОКОЛОВА Н.А. 328
СОКОЛОВА О.В. 878
СОЛДАТОВ А.А. 657
СОЛОВЬЕВА А.И. 880
СОЛОВЬЕВА В.В. 725, 881, 894
СОЛОДОВНИКОВ В.В. 883
СОЛОМОНОВА Е.А. 657, 884
СОЛОХИНА И.Ю. 886
СОРОКИНА А.Ю. 888
СОРОКИНА Е.В. 890, 891, 892
СОРОКИНА Е.Г. 430
СОРОКИНА О.Н. 146
СОСНИНА А.Е. 442, 444
СОФИЛКАНИЧ А.П. 404
СТАРКОВ А.А. 408
СТАРОВЕРОВ С.А. 207
СТАРОСТИНА И.Г. 894
СТАСЮК А.А. 732, 750
СТЕКЛОВ М.Ю. 896
СТЕПАНОВ А.Е. 897, 1009
СТЕПАНОВ В.И. 36
СТЕПАНОВА О.А. 677
СТЕРНАД А.И. 430
СТЕФАНОВ В.Е. 772, 913

СТИГАЙЛО И.Н. 898
СТОЛБОУШКИНА Е.А. 69
СТОЯНОВА Л.Г. 113, 685
СТРЕЛКОВА И.Ю. 4, 900
СУВОРОВА Е.Е. 902
СУДАКОВ В.Л. 675
СУДОРГИНА П.В. 904
СУЕТИНА И.А. 713, 715
СУЛЬТИМОВА Н.Б. 906, 908
СУМАРУКОВА И.Г. 505
СУПОТНИЦКИЙ М.В. 910, 912
СУРГУЧЕВА Н.А. 844
СУРИН А.К. 543
СУРМА С.В. 913
СУХАНОВА М.В. 278
СУХАНОВА Т.В. 1027
СУХОВ И.Б. 590, 916
СЫТНИКОВА Н.В. 338
СЮЙ СЫЦЗИН 918

Т

ТАВРОВСКАЯ Т.В. 643
ТАЙСОН ДЖ.Ф. 715
ТАМАРОВА Э.Р. 552, 553
ТАРАН О.П. 239, 585
ТАРАН С.В. 585
ТАРАНТУЛ В.З. 645
ТАРАРОВ В.И. 428, 896
ТАРАСЕВИЧ В.А. 818
ТАРАСКЕВИЧ М.Р. 920
ТАРАСОВА О.Д. 372
ТАРЛАЧКОВ С.В. 241, 922, 1012, 1013
ТАРТАКОВСКАЯ Д.И. 923
ТАТАРКИН И.В. 925
ТАТИКОЛОВ А.С. 12, 738, 927
ТАТЬКОВ С.И. 950
ТЕКУТЬЕВА Л.А. 830
ТЕПЛЯКОВА Т.В. 42, 44, 929, 975
ТЕРЕНИНА М.Б. 268
ТЕРЕХОВА Л.П. 505, 567, 844
ТЕРСКИХ В.В. 619
ТЕРТЫШНАЯ Ю.В. 679, 931
ТЕТЕРИН В.В. 219
ТИМИН А.С. 177
ТИМОШЕНКО Т.Е. 932
ТИМЧЕНКО А.А. 432
ТИМЧЕНКО Л.Д. 934
ТИН У.Ф. 418
ТИТОВА М.В. 422
ТИХОНОВ Д.Б. 1052
ТИХОНОВА Л.А. 99, 936
ТИХОНОВА О.В. 938
ТИЩЕНКО С.В. 418
ТКАЧЕНКО Е.И. 334
ТКАЧЕНКО О.В. 406, 939

ТОДЕРАШ И.К. 657
ТОКАРЕВА С.Ю. 204
ТРЕТЬЯКОВ В.Ф. 108
ТРЕТЬЯКОВА И.Н. 940
ТРОПИН И.В. 657
ТРОШИНА Е.М. 942
ТРУНОВА Л.А. 944
ТРУС Е.Н. 946
ТРУСОВА И.Н. 495
ТУМАНОВА Н.Л. 272
ТУПИН П.А. 983
ТУРАШЕВ А.Д. 522
ТУХБАТОВА Р.И. 948
ТУХВАТУЛИН А.И. 485

У

УВАРОВА Е.А. 836, 950
УГРАИЦКИЙ А.А. 920
УДАЛОВА О.Р. 675
УЛАХАНОВА Д.П. 952
УРЕЦКИЙ В.Г. 823
УРУСОВА Н.А. 729
УСОЛЬЦЕВ С.Д. 177
УСТИНОВА А.А. 954
УСТИНОВА Ю.В. 316
УСТЮГОВА Е.А. 113
УХОВ Н.В. 212
УШАКОВА Н.А. 956, 957

Ф

ФАДЕЕВА Е.О. 960
ФАРБЕРОВА Е.А. 1072
ФАРХУТДИНОВ Р.Р. 695, 961
ФАСХИЕВ В.Н. 481
ФАТЕЕВА Е.В. 963
ФАТТАХОВА А.Н. 948
ФЕДОРЕНКО Б.Н. 965
ФЕДОРОВА М.С. 968
ФЕДОТОВА В.Ю. 970
ФЕДЯНИНА Л.Н. 862
ФЕКЛИСТОВА И.Н. 456, 972, 973
ФЕОФАНОВ В.С. 392
ФИЛАТОВА Е.Н. 535
ФИЛИППОВА Е.А. 1032
ФИЛИППОВА Е.И. 975
ФИЛИППОВА Л.В. 977
ФИЛИППОВА С.Н. 844
ФИЛЮК И.В. 404
ФИНОГЕНОВ А.Ю. 610
ФИНОГЕНОВА Е.Г. 610
ФИРИЧЕНКОВА С.В. 681
ФОМИЧЕВА Е.В. 607
ФРАНЦЕВА А.С. 732, 750
ФРОЛКОВА К.С. 979

ФРОЛОВ Г.А. 711

Х

ХАБИБУЛЛИНА Л.И. 580
ХАЗЕЕВА Г.Д. 981
ХАЙДАРОВА Н.В. 59
ХАЛИНА Е.В. 983
ХАЛТУРИН М.Б. 985
ХАМАШКЕЕВА М.Т. 986
ХАРИСОВА А.Р. 415
ХАСИН А.А. 20
ХАУСТОВА Г.А. 518
ХАХАЛЕВА А.С. 988
ХАЦАЕВА Р.М. 991
ХАШИМОВА З.С. 992
ХАЯТОВА З.Г. 351
ХВАТОВ А.В. 384, 416, 498
ХЕЧИНАШВИЛИ Н.Н. 398
ХИСАМОВА А.И. 1000, 1078
ХЛГАТЯН С.В. 112
ХЛЕБНИКОВ В.С. 956, 957
ХМЕЛЬ И.А. 736
ХМЕЛЬНИЦКАЯ Е.А. 22
ХОДЖИЕВА Д. 119
ХОДОНОВ А.А. 225
ХОДЫРЕВА С.Н. 278
ХОЛЯВКА М.Г. 996
ХОМЕНКО Т.М. 278
ХОМЕНКОВ В.Г. 890
ХОМУТОВ С.М. 998
ХОРИН А.Н. 994
ХОРУНЖИЙ Г.Д. 251
ХОХЛОВ Ю.А. 1003
ХОХЛОВА И.Ю. 1001
ХРАМЕЕВА Н.П. 1004
ХРАМЦОВА Е.А. 260
ХРУПИНА Е.А. 996
ХУДОКОРМОВ А.А. 811

Ц

ЦАРИЧЕНКО Д.Г. 1009
ЦВЕТКОВ В.О. 102, 547
ЦВЕТКОВ Е.А. 555, 1006
ЦВЕТКОВА Н.П. 677
ЦЕДИК В.В. 463
ЦИРКУНОВА Ж.Ф. 1007
ЦЫРЕНОВ В.Ж. 768, 814, 986

Ч

ЧАБАН Н.Г. 1009
ЧАН ВАН ТИ 124
ЧЕКУНОВА Л.Н. 61

ЧЕЛЬШЕВ Ю.А. 612
ЧЕПАЛОВ В.А. 693
ЧЕПИСЮК Н.В. 1010
ЧЕПУРНОВА М.А. 156
ЧЕРАНЁВА Л.Г. 1054
ЧЕРЕВАТЕНКО А.М. 241, 1012, 1013
ЧЕРЁМИН А.М. 1019
ЧЕРЕМУХИН В.В. 920
ЧЕРЕНКОВ Д.А. 398
ЧЕРЕНКОВ И.А. 1015
ЧЕРЕНКОВА Е.Е. 1017
ЧЕРЕПНИНА Л.В. 450
ЧЕРНОВ А.С. 1020
ЧЕРНОВ И.Ю. 61
ЧЕРНОВА И.Г. 750
ЧЕРНОУС Е.А. 139
ЧЕРНОУСОВ И.Н. 675
ЧЕРНУХИН В.А. 876
ЧИГЛИНЦЕВА М.Н. 340, 1022
ЧИЖОВА С.И. 154
ЧИЖОВКИНА Е.С. 128
ЧИКУРОВА Е.А. 1023
ЧИСТЯКОВ В.А. 419, 737
ЧИСТЯКОВА О.В. 590, 591, 916
ЧИЧЕРИН И.Ю. 219
ЧУБИК М.В. 1001, 1025
ЧУБИК М.П. 1025
ЧУГУНОВ А.О. 1027
ЧУГУНОВА Е.А. 806
ЧУЛОВСКАЯ С.А. 178
ЧУПОВ В.С. 1029
ЧУПРИНА О.И. 480
ЧУПЫРКИНА А.А. 1032
ЧУРАКОВА М.И. 545
ЧУРИЛОВ Г.И. 1033, 1035
ЧУХЧИН Д.Г. 983
ЧХЕНКЕЛИ В.А. 1037, 1039

Ш

ШАГИМАРДАНОВА Е.И. 1042
ШАЙМАРДАНОВА Г.Ф. 612
ШАЛБУЕВ Д.В. 262
ШАЛИМОВА О.А. 390, 683, 840
ШАМОЛИНА И.И. 1043
ШАМОНОВ Н.А. 1032
ШАПИРО А.Б. 146
ШАПОВАЛОВА А.А. 298
ШАПОШНИКОВ А.В. 1045
ШАРАВИН Д.Ю. 1046
ШАРИПОВА М.Р. 75, 218, 616, 618, 1019, 1042
ШАФИГУЛЛИНА А.К. 587
ШАХНОВИЧ Е.В. 1007
ШАХОВА К.А. 1048
ШАЦКАЯ Н.В. 277, 763
ШАШКОВ А.С. 505

ШВЕДОВА Л.А. 927
ШВЕЙКИНА К.С. 461
ШЕВЕЛЁВ Д.А. 920
ШЕВЦОВ А.А. 513
ШЕВЦОВА Е.Ф. 630
ШЕВЧЕНКО Г.В. 1050
ШЕВЧЕНКО Л.В. 280
ШЕВЧУК Т.А. 402, 404
ШЕВЧУК Т.В. 241, 922, 1012, 1013
ШЕЛЕЙКОВСКИЙ В.Л. 657, 723
ШЕЛУДЬКО Ю.В. 314
ШЕСТАКОВА Н.Н. 1052
ШЕСТАКОВА Т. В. 657, 723
ШЕСТИБРАТОВ К.А. 480, 481, 482, 483
ШИБРЯЕВА Л.С. 931
ШИДЛОВСКИЙ Ю.В. 353, 391, 1045
ШИКИНА Н. В. 277, 763, 765, 767
ШИЛОВ И.А. 388
ШИМАНСКАЯ Е.И. 842
ШИН Б. 715
ШИНГАРОВА Л.Н. 784
ШИПИЛОВ В.Н. 916
ШИПИЦИНА А.К. 1054
ШИРОКОВ А.В. 1056
ШИРШИКОВ Н.В. 920
ШИХАБУДИНОВ А.М. 207
ШКРЫЛЬ Ю.Н. 210
ШКУРАТОВ П.П. 1058
ШКУРАТОВА Е.Б. 1059
ШЛОТГАУЭР А.А. 1067
ШЛЯХОТКО Е.А. 1061
ШЛЯХТИН О.А. 439
ШМЫГАЛЕВА Т.П. 685
ШПАК А.Б. 1063
ШПАКОВ А.О. 203, 590, 591, 916, 1065
ШПАКОВА Е.А. 1065
ШПИГУН О.А. 657
ШПИДОНОВА Е.А. 110
ШПИРНАЯ И.А. 102, 545, 547
ШПИЧКА А.И. 825
ШРЕЙБЕР В. 278
ШУБАКОВ А.А. 578, 1069
ШУБИНА А.Н. 1070
ШУВАЕВ Д.Н. 940
ШУГАЕВ А.Г. 268
ШУЛАЕВ М.В. 580, 1000, 1078
ШУЛЬГА А.О. 260, 838

ШУЛЬЦ Е.В. 1072
ШУМАКОВ А.Р. 334
ШУМКОВА Г.А. 757
ШУТИКОВА А.Л. 698
ШУТОВ А.А. 998
ШУТОВА В.В. 1074

Щ

ЩЕГОЛЕВ Б.Ф. 759, 772, 913
ЩЕГОЛЕВ С.Ю. 939
ЩЕКУТЬЕВА Г.А. 942
ЩЕННИКОВА А.В. 838
ЩЕРБАКОВ А.М. 334
ЩЕРБАКОВА С.А. 394

Э

ЭЛЬКОНИН Л.А. 1076
ЭЛЬ-РЕГИСТАН Г.И. 720

Ю

ЮГИНА Н.А. 1000, 1078
ЮДИНА Н.Ю. 1079
ЮДИНА Т.П. 892
ЮДИНЦЕВА Н.М. 22
ЮНОШЕВ А.С. 484
ЮРИНОВА Г.В. 809
ЮРЬЕВА Н.О. 745
ЮСУПОВА Э.Р. 691
ЮШКОВА Е.И. 671

Я

ЯКОВЛЕВ Л. Ю. 348
ЯКОВЛЕВА И.В. 703
ЯКУШЕВ А.В. 1081
ЯМСКОВ И.А. 426
ЯМСКОВА В.П. 426
ЯНЦ М.А. 746
ЯРЕМЧУК А.С. 280
ЯРМОЛЮК С.М. 12, 927
ЯСАКОВ Т.Р. 415, 1083

СОДЕРЖАНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ	3
АБДУЛЛАЕВ С.А., ОСЛИНА Д.С., СТРЕЛКОВА И.Ю. АНАЛИЗ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК В ПЛАЗМЕ КРОВИ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ НЕИНВАЗИВНЫЙ БИОМАРКЕР ОЦЕНКИ ЛУЧЕВОЙ РЕАКЦИИ ОРГАНИЗМА.....	4
АГАФОНОВА Н.В. АЭРОБНЫЕ МЕТИЛОБАКТЕРИИ КАК СТИМУЛЯТОРЫ РОСТА РАСТЕНИЙ.....	5
АЗАРЕНКО А.А., ЗЕНИН В.В., ЛЮБЛИНСКАЯ О.Г., ЖИЛИНСКАЯ И.Н. ДИСФУНКЦИЯ ЭНДОТЕЛИЯ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ПОВЕРХНОСТНЫХ БЕЛКОВ ВИРУСОВ ГРИППА А.....	7
АЗАРКОВИЧ М.И., НАЗАРЕНКО Л.В., КАПИТОНОВА Ю.В. ОСОБЕННОСТИ ПРОРАСТАНИЯ РЕКАЛЬЦИТРАНТНЫХ СЕМЯН.....	8
АЗНАБАЕВА Л.М. ВЛИЯНИЕ СУББАКТЕРИОСТАТИЧЕСКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ АНТИМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ПЕРСИСТЕНТНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ СТАФИЛОКОККОВ.....	10
АКИМКИН Т.М., ТАТИКОЛОВ А.С., ЯРМОЛЮК С.М. НЕКОВАЛЕНТНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПОЛИМЕТИНОВОГО КРАСИТЕЛЯ СYAN2 С ДНК ХОНДРОИТИН-4- СУЛЬФАТОМ И ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТОЙ: СПЕКТРАЛЬНО-ФЛУОРЕСЦЕНТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ.....	12
АКИМОВ А.Г. СТРАТЕГИИ АНАЛИЗА СЛОЖНЫХ КОММУНИКАЦИОННЫХ СИГНАЛОВ НЕЙРОНАМИ СЛУХОВОГО ЦЕНТРА СРЕДНЕГО МОЗГА ДОМОВОЙ МЫШИ.....	14
АКИМОВ М.Г., БОБРОВ М.Ю., ГРЕЦКАЯ Н.М., БЕЗУГЛОВ В.В. НЕЙРОЛИПИНЫ – ОСНОВА СОЗДАНИЯ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ БОРЬБЫ С НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ.....	16
АЛАДИН Д.Ю., СЕВОСТЬЯНОВ С.М., ДЁМИН Д.В., ДЕЕВА Н.Ф., ИЛЬИНА А.А. ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛЕВИЦЫ ТОНКОЙ <i>AGROSTIS TENUS</i> ДЛЯ ФИТОРЕМЕДИАЦИИ ПОЧВ ЗАГРЯЗНЁННЫХ ПОЛИХЛОРИРОВАННЫМИ БИФЕНИЛАМИ.....	18
АЛДАРОВ К.Г., МОРОЗОВА О.В., БАХВАЛОВА В.Н., ГРИШЕЧКИН А.Е., КЛИНОВ Д.В., ХАСИН А.А. АНАЛИЗ СООТВЕТСТВИЯ ВАКЦИННЫХ ШТАММОВ СОВРЕМЕННЫМ ИЗОЛЯТАМ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА.....	20
АЛЕКСАНДРОВА О.И., ЮДИНЦЕВА Н.М., ЛЮБУНЬ Г.П., ПУЧИНЬЯН Д.М., ПЕТРОВА Н.В., ВИДЯШЕВА И.В., ХМЕЛЬНИЦКАЯ Е.А. НЕТКАНЫЙ МАТЕРИАЛ ИЗ НАНОВОЛОКОНХИТОЗАНА В КАЧЕСТВЕ МАТРИЦЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ КЛЕТОК.....	22
АЛЕКСЕЕВА В.В., ЕРМОШИН А.А., СИНЕНКО О.С., РУКАВЦОВА Е.Б., БУРЬЯНОВ Я.И. МОДИФИКАЦИЯ БИОСИНТЕЗА ИЗОПРЕНОИДОВ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ СТРЕССТОЛЕРАНТНОСТИ У ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА.....	24
АЛЕКСЕЕВА О.М. ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ ФЕНОЗАНА НА КЛЕТОЧНЫЕ И СУБКЛЕТОЧНЫЕ ОБЪЕКТЫ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ.....	26
АЛЕНЬКИНА С.А., НИКИТИНА В.Е. ВЛИЯНИЕ ЛЕКТИНОВ АЗОСПИРИЛЛИ НА МЕТАБОЛИЗМ КОРНЕЙ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ.....	28
АЛЬДЕКЕЕВА А.С., КОРНЕВА Н.А., КЛЮЕВА Н.З. ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ МРНК NAP-22 В ПОЧКАХ У СПОНТАННО-ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ КРЫС (ЛИНИЯ SHR) И ИХ НОРМОТЕНЗИВНОГО КОНТРОЛЯ (ЛИНИЯ WKY) ПОД ВЛИЯНИЕМ СОЛЕВОЙ НАГРУЗКИ.....	30
АМАГЗАЕВА Г.Н., ДАНИЛОВ М.Б., БАЖЕНОВА Б.А. ОПТИМИЗАЦИЯ РЕЦЕПТУРЫ БЕЛКОВО-УГЛЕВОДНО-ЖИРОВОЙ КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ МЯСОПРОДУКТОВ.....	32
АМАХИН Д.В., ПОПОВ В.А., ВЕСЕЛКИН Н.П. ОСОБЕННОСТИ СУММАЦИИ ГАМК- И ГЛУТАМАТ-ОПОСРЕДОВАННЫХ МЕМБРАННЫХ ИОННЫХ ТОКОВ В НЕЙРОНАХ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ.....	34
АМЕЛЯКИНА М.В., РИМАРЕВА Л.В., СТЕПАНОВ В.И., ИВАНОВ В.В. ВЛИЯНИЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ НА СВОЙСТВА ЗЕРНОВОГО СУСЛА В КОМПЛЕКСНОЙ ТЕХНОЛОГИИ СПИРТОВОГО ПРОИЗВОДСТВА.....	36
АМИРХАНОВ Р.Н. РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ИММОБИЛИЗАЦИИ ПЕПТИДНО-НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ НА НАНОЧАСТИЦЫ ДИОКСИДА ТИТАНА И КОЛЛОИДНОГО ЗОЛОТА.....	38
АНАНЬИНА Л.Н., ПЛОТНИКОВА Е.Г. ГАЛОФИЛЬНЫЕ БАКТЕРИИ СЕМЕЙСТВА <i>HALOMONADACEAE</i> РАЙОНА ПРОМЫШЛЕННОЙ РАЗРАБОТКИ ВЕРХНЕКАМСКОГО МЕСТОРОЖДЕНИЯ СОЛЕЙ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ОБЪЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ.....	39
АНАНЬКО Г.Г., ТЕПЛЯКОВА Т.В. НОВЫЕ МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ СПОР ГРИБОВ-ГЕЛЬМИНТОФАГОВ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА БИОНЕМАТИЦИДОВ НА ИХ ОСНОВЕ.....	42

АНАНЬКО Г.Г., ИБРАГИМОВА Ж.Б., МАЗУРКОВА Н.А., ТЕПЛЯКОВА Т.В. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ХИЩНЫХ ГРИБОВ-ГИФОМИЦЕТОВ В ПРОИЗВОДСТВЕ ПРОТИВОПАРАЗИТАРНЫХ И ПРОТИВОВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ.....	44
АНДРЕЕВА И.Н., АЛЪБЬЕВ А.Ю., РАХМАТУЛЛИНА Д.Ф., ОГОРОДНИКОВА Т.И. АБИОТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ КАК РЕГУЛЯТОР ЭНЕРГООБМЕНА РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ.....	46
АНДРЕЕВА И.С., САФАТОВ А.С., БУРЯК Г.А., ОЛЬКИН С.Е., КАРЯЧКИНА О.С. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ОБРАЗЦОВ ВОДЫ ГОРЬКО- СОЛЕННЫХ ОЗЕР КУЧУКСКОЕ И БОЛЬШОЕ ЯРОВОЕ (АЛТАЙСКИЙ КРАЙ).....	48
АНДРЕЕВА Л.Ю., СИНИЦЫН П.Г., СЕВЕРИН Ф.Ф., ДМИТРИЕВ С.Е. АНАЛИЗ ФЕНОТИПА <i>S. CEREVISIAE</i> С ИЗМЕНЁННЫМ УРОВНЕМ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА <i>TMA64</i>	50
АНДРУСЕНКО С.Ф., ЗУБЕНКО Ю.С. ОПТИМИЗАЦИЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ПЕКТИНА.....	52
АНИКАЕВ А.Ю., КОРОБЕЙНИКОВА А.В., КОРЕПАНОВ А.П., БУБУНЕНКО М.Г., КЛЯШТОРНЫЙ В.Г., НИКОНОВ С.В., ГАРБЕР М.Б., ГОНГАДЗЕ Г.М. РОЛЬ БЕЛКА СЕМЕЙСТВА STC В ФОРМИРОВАНИИ ФУНКЦИОНАЛЬНО-АКТИВНОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ РИБОСОМЫ <i>IN VIVO</i>	53
АНТИПЬЕВА М.В., КАРНАЖИЦКАЯ Т.Д. БИОМОНИТОРИНГ КСЕНОБИОТИКОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДАХ ЧЕЛОВЕКА.....	55
АНТИФЕЕВ И.Е., ГАЛЬПЕРИНА Е.И. ОТРАЖЕНИЕ МЫСЛЕННО ВОООБРАЖАЕМЫХ ДВИЖЕНИЙ В ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ЭЭГ.....	57
АНТОНОВ С.А., МАНУИЛОВА Е.С., АРСЕНЬЕВА Е.Л., ХАЙДАРОВА Н.В., КОБЫЛЯНСКИЙ А.Г., ГРИВЕННИКОВ И.А. ПОЛУЧЕНИЕ ЛИНИЙ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЫШИ, СТАБИЛЬНО ТРАНСФИЦИРОВАННЫХ ФАКТОРОМ РОСТА НЕРВОВ, ПОД УПРАВЛЕНИЕМ КОНСТИТУТИВНЫХ И ИНДУЦИБЕЛЬНЫХ ПРОМОТОРОВ.....	59
АНТРОПОВА А.Б., АХАПКИНА И.Г., БИЛАНЕНКО Е.Н., МОКЕЕВА В.Л., ЧЕКУНОВА Л.Н., ГЛУШАКОВА А.М., ЧЕРНОВ И.Ю., ЖЕЛТИКОВА Т.М. ГРИБЫ - КОНТАМИНАНТЫ СЫРЬЯ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ПЫЛЬЦЕВЫХ АЛЛЕРГОВАКЦИН.....	61
АРТОХИН К.С., ИГНАТОВА П.К. ЭКОТЕХНОЛОГИИ В ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ.....	63
АРТЮШИНА И.Ю. УВЕЛИЧЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА ЛЕТУЧИХ АРОМАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ (УСИЛЕНИЕ ЗАПАХА) У РОЗ ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ В ЗАЩИЩЕННОМ ГРУНТЕ И В СРЕЗКЕ.....	65
АРУСТАМЯН Э.С., АРУСТАМЯН Л.Э. ОРГАНИЗАЦИЯ ЛЬГОТНОГО ФИНАНСИРОВАНИЯ ИНВЕСТИЦИОННЫХ ПРОЕКТОВ.....	67
АРХИПОВА В.И., СТОЛБОУШКИНА Е.А., НИКОНОВ О.С., НИКОНОВ С.В., ГАРБЕР М.Б. КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНОВ И ВЫДЕЛЕНИЕ СУБЪЕДИНИЦ ЭУКАРИОТИЧЕСКОГО ФАКТОРА ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ 2.....	69
АРХИПОВА Л.В., КУЛИКОВ Д.А., КУЛИКОВА П.А., СМИРНОВА Г.Н., КУРАНОВА А.В., РОГАТКИН Е.В., МАШКОВ А.Е., КУЛИКОВ А.В. ЭНКОПРЕЗ. СОЗДАНИЕ МОДЕЛИ И НОВОГО СПОСОБА ЛЕЧЕНИЯ.....	70
АСТАФЬЕВА О.В. ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВОМИКРОБНЫХ СВОЙСТВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ КОМПОНЕНТОВ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ И ВОЗМОЖНОСТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ.....	71
АХАПКИНА И.Г. ИСКУССТВЕННЫЕ ПИТАТЕЛЬНЫЕ СУБСТРАТЫ ДЛЯ КЛЕЩЕЙ ДОМАШНЕЙ ПЫЛИ (ACARIFORMES: PYROGLYPHIDAE).....	73
АХМЕТОВА А.И., ШАРИПОВА М.Р. КЛОНИРОВАНИЕ И СЕКВЕНИРОВАНИЕ ГЕНА ФИТАТ-ГИДРОЛИЗУЮЩЕГО ФЕРМЕНТА <i>BACILLUSGINSENGIHUMI</i>	75
БАЖЕНОВА Б.А., ДАНИЛОВ М.Б., БУДАЕВА А.Е. ФУНКЦИОНАЛЬНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ФАРША КОЛБАС-ПОЛУФАБРИКАТОВ ИЗ СУБПРОДУКТОВ ЯКА.....	77
БАКАХОНОВ А.А. ИЗУЧЕНИЕ СОЛЕУСТОЙЧИВОСТИ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ.....	79
БАЛАШОВА М.В. ГМО И ПИЩЕВАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ.....	80
БАЛЬЖИНИМАЕВА С.К., ДАНИЛОВ М.Б. ОРГАНОЛЕПТИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПЕЧЕНОЧНОГО ПАШТЕТА, ВЫРАБОТАННОГО С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БЕЛКОВО-ЖИРОВОЙ ЭМУЛЬСИИ.....	82
БАРАНЕЦ А.П., СЕЛЕЗНЕВА Ю.В., ПРИСЯЖНЕНКО О.К., ЕВТУШЕНКОВ А.Н., НИКОЛАЙЧИК Е.А. АГРОБАКТЕРИАЛЬНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ ТАБАКА ВЕКТОРНОЙ КОНСТРУКЦИЕЙ С ГЕНОМ УСТОЙЧИВОСТИ К ГЛИФОСАТУ.....	85

БАРАНЕЦ А.П., СЕЛЕЗНЕВА Ю.В., ПРИСЯЖНЕНКО О.К., ЕВТУШЕНКОВ А.Н., НИКОЛАЙЧИК Е.А.	
СОЗДАНИЕ ВЕКТОРНОЙ КОНСТРУКЦИИ С ГЕНОМ УСТОЙЧИВОСТИ К ГЛИФОСАТУ.....	86
БАРАНОВА Е.В.	
ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ РЕЗЕРВЫ ОРГАНИЗМА ПРИ ДЕЙСТВИИ ГИПОКСИИ.....	88
БАТАЕВА М.В., ГНЕЗДИЛОВА Л.А., ПЕТРОВА Т.Н.	
ВЛИЯНИЕ ПРОБИОТИКА ЛАКТОБИФАДОЛ НА КАЧЕСТВО СПЕРМЫ БАРАНОВ.....	90
БАТАЕВА Ю.В.	
ЦИАНОБАКТЕРИИ АРИДНОЙ ЗОНЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В АГРОТЕХНОЛОГИЯХ.....	91
БАУЛИНА Л.В., ВЫСОЦКИЙ В.А., АЛЕКСЕЕНКО Л.В.	
ВЛИЯНИЕ СПЕКТРАЛЬНОГО СОСТАВА СВЕТА И ЭЛИСИТОРОВ НА РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ ЗЕМЛЯНИКИ <i>IN VITRO</i> И <i>IN VIVO</i>	93
БАХМЕТЬЕВА О.И., ПУТИНЦЕВА О.В., АРТЮХОВ В.Г.	
ВЛИЯНИЕ ОКСИДА УГЛЕРОДА (II) НА РАЗВИТИЕ ПРОГРАММИРУЕМОЙ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА.....	94
БЕЛЕНОВА А.С., СЛИВКИН А.И., КОВАЛЕВА Т.А., СЛИВКИН Д.А., ЛОГВИНОВА Е.Е.	
РАЗРАБОТКА НОВЫХ БИОПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ГИДРОЛАЗ.....	97
БЕЛОУШКО Е.Е., ТИХОНОВА Л.А., КАМИНСКИЙ Ю.Г., КОСЕНКО Е.А.	
БИОТЕХНОЛОГИЯ ДЛЯ СНИЖЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ АРГИНИНА В КРОВИ.....	99
БЕЛЯЕВА Е.А., СИРОШ А.А.	
ПАКСИЛЛИН КАК ПРОТЕКТОР ОТ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ.....	100
БЕРЕЖНЕВА З.А., ШПИРНАЯ И.А., ЦВЕТКОВ В.О.	
ТРИПСИНОПОДОБНЫЕ ПРОТЕИНАЗЫ И ИНГИБИТОРЫ ТРИПСИНА В ПЛОДОВЫХ ТЕЛАХ ТРУТОВЫХ ГРИБОВ.....	102
БЕРЕЗИНА Е.В., ПАВЛОВА Е.Е., БРИЛКИНА А.А.	
СОДЕРЖАНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ У РАСТЕНИЙ КЛЮКВЫ БОЛОТНОЙ И КРУПНОПЛОДНОЙ В УСЛОВИЯХ <i>IN VIVO</i> И <i>IN VITRO</i>	104
БЕРЛОВ Д.Н.	
ПЕРЕХОД ОТ ДЕТЕКТОРНОГО ВОСПРИЯТИЯ К ОБЪЕКТНОМУ КАК ВОЗМОЖНАЯ ДЕТЕРМИНАНТА ЭВОЛЮЦИИ КОГНИТИВНЫХ ФУНКЦИЙ.....	106
БЕШКАРЕВА М.А., ТРЕТЬЯКОВ В.Ф.	
ПОЛУЧЕНИЕ АВИАЦИОННОГО ТОПЛИВА ДЛЯ СОВРЕМЕННЫХ ДВИГАТЕЛЕЙ ИЗ БИОСПИРТОВ.....	108
БИЛЯЛОВА А.С., ШПИДОНОВА Е.А., ВОЙНО Л.И.	
ВЫСШИЙ БАЗИДИАЛЬНЫЙ ГРИБ <i>LAETIPORUS SULPHUREUS</i> – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ПРОДУЦЕНТ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ.....	110
БЛИНКОВА Л.П., БЕРЖЕЦ В.М., ХЛГАТЯН С.В., КОРЕНЕВА Е.В., ВАСИЛЬЕВА А.В., ЕМЕЛЬЯНОВА О.Ю., ПИЩУЛИНА Л.А.	
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К СОЗДАНИЮ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ АЛЛЕРГЕНОВ ИЗ <i>CANDIDA ALBICANS</i>	112
БЛИНКОВА Л.П., СТОЯНОВА Л.Г., ГОРБАТКО Е.С., ПАХОМОВ Ю.Д., ЗАЙЦЕВА Е.В., УСТЮГОВА Е.А., МАКСИМОВА О.В.	
БАКТЕРИОЦИНЫ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ИСТОЧНИК АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ.....	113
БОГДАЕВ А.А., БОГДАЕВ А.Г., ПОПОВ В.Н.	
НЕКОТОРЫЕ ИТОГИ РАЗВИТИЯ ПРОМЫШЛЕННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШИИИ-ТАКЕ (<i>Lentinus edodes</i> (Berk.)).....	114
БОГДАЕВ А.А., БОГДАЕВ А.Г., ПОПОВ В.Н.	
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОНТРАСТНЫХ ТЕМПЕРАТУР ПРИ СЕЛЕКЦИИ ТКАНЕЙ ПРОМЫШЛЕННОГО ШТАММА ШИИИ-ТАКЕ (<i>Lentinus edodes</i> (Berk.)).....	116
БОЕВА Т.В., МУКАТОВА М.Д.	
БИОСТИМУЛЯТОР ДЛЯ ПРЕПОСЕВНОЙ ОБРАБОТКИ СЕМЯН АРБУЗА.....	117
БОЗОРОВ Б.М., ХОДЖИЕВА Д., МИРЗАЕВА Н.Д.	
ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТИ ВЫСШЕЙ НЕРВНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ У ГРЫЗУНОВ В РАЗЛИЧНЫЕ СЕЗОНЫ ГОДА.....	119
БОЛТНЕВА Н.П., СЕРЕБРЯКОВА О.Г., МАХАЕВА Г.Ф., СЕРКОВ И.В., ПРОШИН А.Н.	
ПОИСК СЕЛЕКТИВНЫХ ИНГИБИТОРОВ КАРБОКСИЛЭСТЕРАЗЫ В РЯДУ N, N-ЗАМЕЩЕННЫХ 5-ИОДМЕТИЛ-2-АМИНОТИАЗОЛИНОВ.....	121
БОНДАРЕНКО И.М., БАБАЕВ А.А., НОВИКОВ В.В.	
СУММАРНАЯ И ОЛИГОМЕРНАЯ ФРАКЦИИ РАСТВОРИМОГО БЕЛКА CD16 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ГЕРПЕСВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЯХ.....	122
БОРИСЕНКО Е.Г., ГОРИН К.В., БОРИСЕНКО Е.А., НГУЕН ЧЫОНГ ЗАНГ, ЧАН ВАН ТИ, КАНОЧКИНА М.С., ГУЛИМОВА Л.А.	
НОВЫЕ ГОРИЗОНТЫ ПРОИЗВОДСТВА ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ НУТРИЕНТОВ.....	124

ВОРОНОВА В.А., ДИТЧЕНКО Т.И. ВЛИЯНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА СТЕПЕНЬ АГРЕГИРОВАННОСТИ КЛЕТОК СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ ЭХИНАЦЕИ ПУРПУРНОЙ.....	170
ВЫСОЦКАЯ О.Н. КРИОБАНК КАК ЭКОНОМНОЕ РЕШЕНИЕ ПРОБЛЕМЫ СОХРАНЕНИЯ БИОРАЗНООБРАЗИЯ РАСТЕНИЙ.....	172
ГАЛЬПЕРИНА Е.И., КРУЧЕНИНА О.В., РОЖКОВ В.П. ПОЛОВЫЕ ОСОБЕННОСТИ БИОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МОЗГА ПРИ ВЕРБАЛЬНОЙ И СТЕРЕОГНОСТИЧЕСКОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ В ПОДРОСТКОВОМ ПЕРИОДЕ.....	174
ГАРАСЬКО Е.В., ВАШУРИН А.С., ПУХОВСКАЯ С.Г. ИССЛЕДОВАНИЕ БАКТЕРИЦИДНЫХ СВОЙСТВ КОМПЛЕКСА ВОДОРАСТВОРИМОГО ПОРФИРИНА С АЦЕТАТОМ СЕРЕБРА.....	175
ГАРАСЬКО Е.В., РУМЯНЦЕВ Е.В., ТИМИН А.С., УСОЛЬЦЕВ С.Д. БИОЦИДНОЕ ДЕЙСТВИЕ ГИБРИДНЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ МЕЗОПОРИСТОГО ДИОКСИДА КРЕМНИЯ И НАНОРАЗМЕРНОГО СЕРЕБРА.....	177
ГАРАСЬКО Е.В., ЧУЛОВСКАЯ С.А., КУЗЬМИН С.М., СЕМЕНОВ Я.С., ПАРФЕНЮК В.И. ФУНГИЦИДНЫЕ СВОЙСТВА КАРТОНА, СОДЕРЖАЩЕГО ДОБАВКИ ПРИРОДНОГО ЦЕОЛИТА.....	178
ГАРМАШ С.А., ГУДКОВ С.В. ВЛИЯНИЕ ИОНОВ УРАНИЛА В КОНЦЕНТРАЦИЯХ, СОДЕРЖАЩИХСЯ В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ И МЕХАНИЗМ ИХ ДЕЙСТВИЯ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ.....	180
ГИЛЬМАНОВА Р.И., ПЕТРОВА Н.В., КАРИМОВА Ф.Г. ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ ЛИСТЬЕВ ГОРОХА ПО ТИРОЗИНУ В МЕХАНИЗМАХ АБК-ИНДУЦИРОВАННОГО СИГНАЛИНГА ПРИ СТРЕССЕ.....	182
ГЛАДКОВ Е.А. ПОЛУЧЕНИЕ ГАЗОННЫХ ТРАВ, ТОЛЕРАНТНЫХ К КОМПЛЕКСНОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ ТОКСИКАНТОВ.....	184
ГЛАДКОВ Е.А., ДОЛГИХ Ю.И. КЛЕТОЧНАЯ СЕЛЕКЦИЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ГАЗОННЫХ ТРАВ, ТОЛЕРАНТНЫХ К НЕБЛАГОПРИЯТНЫМ ЭКОЛОГИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ ГОРОДОВ (НА ПРИМЕРЕ МЕДИ И ЦИНКА).....	186
ГОМБОЕВА С.В. ИЗМЕНЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ.....	188
ГОНГАЕВА А.Г., ЖАМСАРАНОВА С.Д. БИОРЕГУЛЯТОРНЫЕ ПЕПТИДЫ ТКАНИ СЕЛЕЗЕНКИ ЯКОВ БУРЯТСКОГО ЭКОТИПА И ОЦЕНКА ИХ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ.....	190
ГОНЧАРОВА Н.В., ЕГОРОВА З.Е. ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ И АНТАГОНИСТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ТИПИЧНЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СПОРООБРАЗУЮЩЕЙ АЭРОБНОЙ МИКРОБИОТЫ РАСТИТЕЛЬНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	191
ГОНЧАРУК Е.А., НЕЧАЕВА Т.Л., ЛАПШИН П.В., НИКОЛАЕВА Т.Н., ЗАГОСКИНА Н.В. КАЛЛУСНЫЕ КУЛЬТУРЫ РАСТЕНИЙ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ СТРЕССОВЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ.....	194
ГРИГОРИАДИ А.С., КИРЕЕВА Н.А. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРИЕМОВ ФИТОРЕКУЛЬТИВАЦИИ ДЛЯ ОЧИСТКИ ТЕРРИТОРИЙ, ЗАГРЯЗНЕННЫХ ПРЕДПРИЯТИЯМИ НЕФТЕДОБЫВАЮЩИЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ.....	195
ГРИШИН С.Ю., ЗАЯКИН В.В., НАМ И.Я. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ ХОЗЯЙСТВЕННО-ЦЕННЫХ ПРИЗНАКОВ У РОССИЙСКИХ И БЕЛОРУССКИХ СОРТОВ ЛЮПИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДНК-МАРКЕРОВ.....	197
ГРОМОВА О.Н., КАУХОВА И.Е., СЛЕПЯН Л.И., КУЗЬМИНА Н.С. БИОМАССА КЛЕТОК ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ, КАК МАТРИЦА В БИОТЕХНОЛОГИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ.....	199
ГРУЗДЕВ Д.С., ДЗЮБА М.В. МОДИФИКАЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ.....	201
ГРЯЗНОВ А.Ю., ДЕРКАЧ К.В., ШПАКОВ А.О. АКТИВНОСТЬ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗ В СПЕРМАТОЗОИДАХ ЧЕЛОВЕКА С РАЗЛИЧНОЙ ПОДВИЖНОСТЬЮ.....	203
ГУЛАМАНОВА Г.А., ТОКАРЕВА С.Ю. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ФИТОПЛАНКТОНА ДЛЯ ОЦЕНКИ СТЕПЕНИ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ВОДОТОКА В ГОРОДСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОЙ ЗОНЕ (Р. ШУГУРОВКА, Г. УФА).....	204
ГУЛИЙ О.И., ЗАЙЦЕВ Б.Д., КУЗНЕЦОВА И.Е., ШИХАБУДИНОВ А.М., КАРАБАЕВА О.А., ДЫКМАН Л.А., СТАРОВЕРОВ С.А., ПАВЛИЙ С.А., ИГНАТОВ О.В. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФАГОВЫХ МИНИАНТИТЕЛ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ МИКРОБНЫХ КЛЕТОК <i>AZOSPIRILLUM BRASILENSE</i> SR245 С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРОАКУСТИЧЕСКОГО ДАТЧИКА.....	207
ГУЛЬНЕВА М.Ю., МАЛАФЕЕВА Э.В., НОСКОВ С.М. МИКРОЭКОЛОГИЯ КИШЕЧНИКА БОЛЬНЫХ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКОЙ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ПРОБИОТИКОВ.....	208

ГЮНТЕР Е.А., ПОПЕЙКО О.В., ШКРЫЛЬ Ю.Н., БУЛГАКОВ В.П., ВЕРЕМЕЙЧИК Г.Н., ОВОДОВ Ю.С.	
ВЛИЯНИЕ АГРОБАКТЕРИАЛЬНЫХ ГЕНОВ <i>ROL</i> НА СТРОЕНИЕ ПЕКТИНОВ КУЛЬТУР ТРАНСГЕННЫХ КЛЕТОК <i>RUBIA CORDIFOLIA</i>	210
ДАВЫДОВ С.О., УХОВ Н.В.	
НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ КОРНЕВОЙ СИСТЕМЫ ДЕРЕВЬЕВ В ДОЛИНАХ РЕК СЕВЕРА.....	212
ДАВЫДОВА Д.Ю.	
ПОЛУЧЕНИЕ АКТИВНОЙ ФОРМЫ ПРОТЕОСОМНОГО БЕЛКА <i>CHLAMYDIA TRACHOMATIS</i>	214
ДАНИЛОВА С.А.	
ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТРАНСПЛАСТОМНЫХ РАСТЕНИЙ.....	216
ДАНИЛОВА Ю.В., ШАРИПОВА М.Р.	
ТРОМБОЛИТИЧЕСКИЕ И АНТИКОАГУЛЯНТНЫЕ СВОЙСТВА СЕРИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ БАЦИЛЛ.....	218
ДАРМОВ И.В., ПОГОРЕЛЬСКИЙ И.П., ЧИЧЕРИН И.Ю., ЛУНДОВСКИХ И.А., ТЕТЕРИН В.В.	
МИКРОБИОЛОГИЯ ПРОБИОТИКОВ: ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ДИСБИОТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ КИШЕЧНИКА.....	219
ДЕДКОВ В.Н., ГНЕУШЕВА И.А., ПАВЛОВСКАЯ Н.Е.	
ПОЛУЧЕНИЕ БЕЛКОВО-УГЛЕВОДНЫХ КОРМОВЫХ ПРОДУКТОВ ДЛЯ ЖИВОТНОВОДСТВА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГРИБОВ РОДА <i>TRICHODERMA</i>	221
ДЕМИН Д.В., СЕВОСТЬЯНОВ С.М., ДЕЕВА Н.Ф., ИЛЬИНА А.А., АЛАДИН Д.Ю.	
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АМИНОКИСЛОТНЫХ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ РЕМЕДИАЦИИ ПОЧВ ЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЛИХЛОРИРОВАННЫМИ БИФЕНИЛАМИ (ПХБ).....	222
ДЕМИНА О.В., ЛУКИН А.Ю., ЛАПТЕВ А.В., БЕЛИКОВ Н.Е., КАРПОВА М.Ю., ВАРФОЛОМЕЕВ С.Д., ХОДОНОВ А.А.	
АНТИАГРЕГАЦИОННЫЕ СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ 3,5-ЗАМЕЩЕННЫХ ИЗОКСАЗОЛОВ И ИХ 4,5-ДИГИДРОПРОИЗВОДНЫХ.....	225
ДИТЧЕНКО Т.И., БАЛУХО А.В.	
ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ИММОБИЛИЗАЦИИ КЛЕТОК СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ ЭХИНАЦЕИ ПУРПУРНОЙ.....	227
ДОЛОТКАЗИНА А.В., РОМАНОВА М.А., АТЫКЯН Н.А.	
ВЛИЯНИЕ АНТИСЕПТИКОВ НА ОБСЕМЕНЕННОСТЬ СУСЛА.....	229
ДРАГАВЦЕВ В.А.	
ЭКОЛОГО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПРИРОДА СВОЙСТВ ПРОДУКТИВНОСТИ РАСТЕНИЙ И ПУТИ СОЗДАНИЯ ИННОВАЦИОННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ СЕЛЕКЦИИ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ УРОЖАЕВ.....	231
ДУБОВСКАЯ Л.В., ВАШКЕВИЧ И.И., ГУСИНА Н.Б., НАУМЧИК И.В., СВИРИДОВ О.В.	
НАБОРЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВОБОДНОЙ БЕТА-СУБЪЕДИНИЦЫ ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА И АССОЦИИРОВАННОГО С БЕРЕМЕННОСТЬЮ БЕЛКА-А ПЛАЗМЫ В СЫВОРотКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА В ДИАГНОСТИКЕ СИНДРОМОВ ДАУНА И ЭДВАРДСА.....	236
ДУРНЕВ Е.А., СИНЦОВ К.Н.	
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СКАНИРУЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ ПРИ СКРИНИНГЕ ЛИГНИНОЛИЗИРУЮЩИХ МИКРОМИЦЕТОВ.....	238
ДУНИЧ А.А., ТАРАН О.П., ДАНИЛОВА Е.И., МИЩЕНКО Л.Т.	
НОВОЕ ВИРУСНОЕ ЗАБОЛЕВАНИЕ РАСТЕНИЙ ТОМАТОВ.....	239
ДЬЯЧЕНКО О.В., ЧЕРЕВАТЕНКО А.М., ТАрЛАЧКОВ С.В., МАРИНИЧ Д.В., ШЕВЧУК Т.В.	
АНАЛИЗ ОСОБЕННОСТЕЙ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКОГО МЕТИЛИРОВАНИЯ МАРКЕРНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГЕНОМА ЧЕЛОВЕКА ПРИ ЛЕЙКОЗАХ.....	241
ДЬЯЧУК Т.И., АКИНИНА В.Н., ИТАЛЬЯНСКАЯ Ю.В., САФРОНОВА Н.Ф., ПОМИНОВ А.В., МЕДВЕДЕВА Л.П.	
КУЛЬТУРА ПЫЛЬНИКОВ У ЗЕРНОВЫХ ЗЛАКОВ: ВОЗМОЖНОСТИ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ МЕТОДА И ПРАКТИКА.....	243
ДЮЖИКОВА Н.А., САВЕНКО Ю.Н., БЕЛЯЕВ А.А., ВАЙДО А.И.	
МЕТИЛИРОВАНИЕ ПРОМОТОРА ГЕНА <i>GRIN1</i> У КРЫС ЛИНИЙ С РАЗЛИЧНЫМ УРОВНЕМ ВОЗБУДИМОСТИ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ В УСЛОВИЯХ ДЛИТЕЛЬНОГО ЭМОЦИОНАЛЬНО-БОЛЕВОГО СТРЕССОРНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ.....	245
ЕГОРОВА Д.О., ПЛОТНИКОВА Е.Г.	
БИОКОНВЕРСИЯ ПОЛИХЛОРИРОВАННЫХ БИФЕНИЛОВ АЭРОБНЫМИ БАКТЕРИАЛЬНЫМИ ШТАММАМИ.....	247
ЕГОРОВА З.Е., КОЛОМИЕЦ Н.Д.	
ПРИМЕНЕНИЕ АЛЬТЕРНАТИВНОГО МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО МЕТОДА ДЛЯ КОНТРОЛЯ ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ СРЕДЫ ПИЩЕВЫХ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ.....	249
ЕГОРОВА М.А., ХОРУНЖИЙ Г.Д.	
СВОЙСТВА ВЫЗВАННОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ ПЕРВИЧНОЙ СЛУХОВОЙ КОРЫ КАК ОСНОВА НЕЙРОНАЛЬНЫХ МЕХАНИЗМОВ КОРТИКАЛЬНОЙ ОБРАБОТКИ СЛУХОВОЙ ИНФОРМАЦИИ.....	251
ЕРГУНОВА О.Т.	
СПЕЦИФИКА МАРКЕТИНГОВОГО ПРОДВИЖЕНИЯ БИОРЕГИОНА НА ПРИМЕРЕ ЧУВАШСКОЙ РЕСПУБЛИКИ.....	253

ЕРЕМЕЕВА Н.И. ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ НАСЕЛЕНИЯ ПОЛУЖЕСТКОКРЫЛЫХ ПРОМЫШЛЕННОГО ГОРОДА.....	255
ЕРЕМЕЕВА Т.В., ВИНОГРАДОВА А.В. АККУМУЛЯЦИЯ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ Zn ²⁺ И Cd ²⁺ ШТАММОМ <i>CANDIDA UTILIS</i>	256
ЕРКИН Ф.И. ЭВОЛЮЦИЯ И АГРОБИОГЕОЦЕНОЗЫ В XXI ВЕКЕ.....	258
ЖАРДЕЦКИЙ С.С., ШУЛЬГА А.О., ХРАМЦОВА Е.А. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РИЗОСФЕРНЫХ БАКТЕРИЙ <i>PSEUDOMONAS</i> , СИНТЕЗИРУЮЩИХ АЦК-ДЕЗАМИНАЗУ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К СТРЕССОВЫМ ФАКТОРАМ СРЕДЫ	260
ЖАРНИКОВА Е.В., ШАЛБУЕВ Д.В. РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО СПОСОБА ПИКЕЛЕВАНИЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ ПРОДУКТОВ РАСТВОРЕНИЯ КОЛЛАГЕНА.....	262
ЖБАНОВ А.Е., ОСТРОУМОВ С.А. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕДИ И КАДМИЯ С БРИОФИТОЦИАНОБАКТЕРИАЛЬНЫМ СООБЩЕСТВОМ: ПОДХОД К НОВОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ ОЧИЩЕНИЯ ВОДЫ.....	265
ЖЕМЧУЖНИКОВ М.К., ЛУНИЧКИН А.М., КНЯЗЕВ А.Н. НАСЕКОМЫЕ (<i>ORTHOPTERA, GRYLLIDAE</i>) КАК МОДЕЛЬНЫЙ ОБЪЕКТ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ АГОНИСТИЧЕСКОГО ПОВЕДЕНИЯ ЖИВОТНЫХ.....	266
ЖИГАЧЕВА И.В., МИШАРИНА Т.А., ТЕРЕНИНА М.Б., КРИКУНОВА Н.И., ГЕНЕРОЗОВА И.П., ШУГАЕВ А.Г. НЕНАСЫЩЕННЫЕ ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ С ОЧЕНЬ ДЛИННОЙ ЦЕПЬЮ ПОВЫШАЮТ УСТОЙЧИВОСТЬ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА К НЕДОСТАТКУ ВЛАГИ.....	268
ЖОРИНА Ю.Ю., КУЗНЕЦОВА А.В. ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ В АНАЛИЗЕ ВИТАМИННЫХ ПРЕПАРАТОВ.....	270
ЖУРАВИН И.А., ВАСИЛЬЕВ Д.С., ВЛАСОВ Г.П., ДУБРОВСКАЯ Н.М., МАКОВА Н.З., НЕЕЛОВ И.М., ТУМАНОВА Н.Л., НАЛИВАЕВА Н.Н. ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТА БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЛИЗИНОВЫХ ДЕНДРИМЕРОВ НА НЕРВНУЮ ТКАНЬ И КЛЕТКИ НЕЙРОБЛАСТОМЫ.....	272
ЗАГОРСКАЯ А.А., СИДОРЧУК Ю.В., ДЕЙНЕКО Е.В. СОЗДАНИЕ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ С ВЫСОКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ СИНТЕЗА ГЕТЕРОЛОГИЧНОГО БЕЛКА В УСЛОВИЯХ СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ.....	274
ЗАРЫТОВА В.Ф., РЕПКОВА М.Н., ШАЦКАЯ Н.В., ПАВЛОВА А.С., АМИРХАНОВ Н.В., АМИРХАНОВ Р.В., ИСМАГИЛОВ З.Р., ШИКИНА Н. В., МАЗУРКОВА Н.А., БАЙБОРОДИН С.И., ЛЕВИНА А.С. ДОСТАВКА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ В КЛЕТКИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НЕОРГАНИЧЕСКИХ НАНОМАТЕРИАЛОВ.....	277
ЗАХАРЕНКО А.Л., САЛОМАТИНА О.В., ЛУЗИНА О.А., МАЙНАГАШЕВ И.Я., ВОЛЧО К.П., СУХАНОВА М.В., КУТУЗОВ М.М., ИЛЬИНА Е.С., ХОДЫРЕВА С.Н., ШРЕЙБЕР В., ХОМЕНКО Т.М., САЛАХУТДИНОВ Н.Ф., ЛАВРИК О.И. ФЕРМЕНТЫ РЕПАРАЦИИ ДНК КАК МИШЕНИ ДЛЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ.....	278
ЗАХАРЕНКО Н.А., ЯРЕМЧУК А.С., ШЕВЧЕНКО Л.В., ПОЛЯКОВСКИЙ В.М. ПРОЦЕССЫ БИОФЕРМЕНТАЦИИ ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ ПРИ ПЕРЕРАБОТКЕ ОТХОДОВ ЖИВОТНОВОДСТВА.....	280
ЗАХАРКИН Д.О., АТЫКЯН Н.А., РЕВИН В.В. ВЛИЯНИЕ СТЕПЕНИ ДИСПЕРГИРОВАНИЯ ЗЕРНОВОГО СЫРЬЯ И ТЕМПЕРАТУРЫ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА.....	282
ЗАХАРКИН Д.О., БАРАШКИН С.В., АТЫКЯН Н.А., РЕВИН В.В. ВЛИЯНИЕ СВЧ ОБРАБОТКИ МЕХАНОАКТИВИРОВАННОЙ ДРЕВЕСИНЫ СОСНЫ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОТЕКАНИЯ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА.....	284
ЗАХАРКИНА А.С., БУРОВА Ю.А., КОРОЛЕВ Д.С., БАБАКИНА Т.М. ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИЗАЦИИ СЕМЯН ПШЕНИЦЫ НА ИХ РОСТОВЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ.....	286
ЗАХАРЧЕНКО Н.С., РУКАВЦОВА Е.Б., ЛОКТЮШОВ Е.В. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ РАСТЕНИЙ, УСТОЙЧИВЫХ К ЗАБОЛЕВАНИЯМ.....	287
ЗЕЛЁНЫЙ Ю.М., ВИШНЕВСКАЯ Ю.А., БАЛЮТА А.А. МОДИФИКАЦИЯ МИТОГЕННЫХ СВОЙСТВ БЕЛКОВ ГРИБА <i>ASPERGILLUS NIGER</i> В ПРИСУТСТВИИ БИОЦИДОВ.....	289
ЗЕМКОВ Г.В., МАГЗАНОВА Д.К., КАНИЕВА Н.А. МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ФОРМЕННЫХ ЭЛЕМЕНТОВ КРОВИ РЫБ ПРИ ИНТЕНСИВНОМ ВСКАРМЛИВАНИИ С ДОБАВКАМИ БИОЛОГИЧЕСКИ - АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ (БАВ).....	291
ЗЕМЛЯНСКАЯ Е.В., ДЕГТЯРЕВ С.Х. ИЗУЧЕНИЕ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ 5mC-ЗАВИСИМОЙ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ДНК-ЭНДОНУКЛЕАЗЫ BISI.....	292

ЗЕМСКИЙ П.Ю. НОВЫЕ ТОКСИНЫ ИЗ ЯДОВ ЗМЕЙ СЕМЕЙСТВА ELAPIDAE В КАЧЕСТВЕ ЛИГАНДОВ СУС-ПЕТЕЛЬНЫХ РЕЦЕПТОРОВ.....	295
ЗЕМЧЕНКОВА О.В., ПОЗДНЯКОВА С.И., БАШАРИНА О.В., АРТЮХОВ В.Г. ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ Ca ²⁺ -АТФазы ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН УФ-ОБЛУЧЕННЫХ ЛИМФОЦИТОВ У ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ ПАНКРЕАТИТОМ.....	297
ЗОЛОТУХИН А.И., ЗАНИНА М.А., ШАПОВАЛОВА А.А. КОНЦЕПЦИЯ УСТОЙЧИВОГО РАЗВИТИЯ И СОХРАНЕНИЯ БИОРАЗНООБРАЗИЯ ПОЙМЕННЫХ ЛЕСОВ ПРИХОПЕРЬЯ.....	298
ЗУБАРЕВА К.Ю., КОНОШИНА С.Н., ПРУДНИКОВА Е.Г. ВЛИЯНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА ФОРМИРОВАНИЕ И РАЗВИТИЕ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ.....	301
ЗУБКОВ А.В., СВИРИДОВ В.В., КУЗЬМИНА Н.С. АУТОАНТИТЕЛА К ЛИНЕЙНЫМ И КОНФОРМАЦИОННЫМ ЭПИТОПАМ ПЕРОКСИДАЗЫ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ АУТОИММУННОМ ТИРЕОИДИТЕ И ДИФфуЗНОМ ТОКСИЧЕСКОМ ЗОБЕ.....	303
ЗЫРЯНОВА Ю.В. АДВЕНТИВНОЕ ПОЧКООБРАЗОВАНИЕ У JUNIPERUS SIBIRICA.....	304
ИВАНИЦКАЯ Л.Н., ЛЕДНОВА М.И., ПУСТОВАЯ О.В. МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА ДЛИТЕЛЬНОГО ЭЭГ МОНИТОГИНГА В ОБЛАСТИ НЕЙРОФИЗИОЛОГИИ.....	306
ИВАНОВА А.О. ВЛИЯНИЕ БИОУДОБРЕНИЯ «АЗОЛЕН» НА ПОВЫШЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ПШЕНИЦЫ К СТРЕСС-ФАКТОРАМ.....	308
ИВАНОВА В.П. К ВОПРОСУ ОБ ЭВОЛЮЦИИ МУЛЬТИДОМЕННЫХ БЕЛКОВ.....	309
ИВАНОВА К.Б. РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИИ GIARDIA LAMBLIA.....	311
ИВАНОВА Л.А., ГАСКАРОВА Е.Ф., ГОМАНКОВА А.И. НОВЫЙ ПРОДУЦЕНТ ЛИПАЗЫ ZYGOSACCHAROMYCES ROUXII БЛ-06.....	312
ИВАНОВА Л.А., ГЛАЗОВА А.А., РЕПНИК В.А., ШЕЛУДЬКО Ю.В., ЗДОРОВИЛО Н.В. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРОМЫШЛЕННЫХ И БЫТОВЫХ ОТХОДОВ В КАЧЕСТВЕ СЫРЬЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ГРИБНЫХ ЦЕЛЛЮЛАЗ.....	314
ИВАНОВА Л.А., УСТИНОВА Ю.В., БЕЛОВОЛОВА А.С., ПРИЩЕПО А.Ю. БИОТЕХНОЛОГИЯ ФЕРМЕНТА ГИСТИДИНДЕКАРБОКСИЛАЗЫ НА ОСНОВЕ НОВОГО ШТАММА BACILLUS LICHENIFORMIS.....	316
ИВАНОВА М.А., БУТВИЛОВСКИЙ В.Э., ДОЦЕНКО К.Э., КУХТА Е.А. ОБОСНОВАНИЕ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РАЗВИТИЯ ТОКСОПЛАЗМЕННОГО ЭНЦЕФАЛИТА ПУТЕМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРЕДИКТОРОВ РЕАКТИВАЦИИ T.GONDII В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ.....	318
ИЛЬИНА В.Н. К ВОПРОСУ О СИСТЕМАТИЧЕСКОМ ПОЛОЖЕНИИ СРЕДНЕВОЛЖСКИХ КОПЕЕЧНИКОВ.....	320
ИЛЮХИН С.А., НОВИКОВ В.Е. БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СЫВОРОТКИ КРОВИ ПРИ ОСТРОМ ВОСПАЛЕНИИ И ЕГО КОРРЕКЦИИ АНТИГИПОКСАНТАМИ.....	322
ИОНИЧЕВ Д.С., ГНЕЗДИЛОВА Л.А. ЛЕЧЕНИЕ БОЛЬНЫХ САЛЬМОНЕЛЛЕЗОМ ТЕЛЯТ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОБИОТИКА ЛАКТОБИФАДОЛ.....	324
КАБДЕНОВА А.Т., БЕПЕЕВА А.Е., МЫРЗАГУЖИНОВА Д.К. РОЛЬ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ В РЕШЕНИИ ПРОБЛЕМ ЭКОЛОГИИ.....	326
КАБЛОВ В.Ф., КОСТИН В.Е., СОКОЛОВА Н.А., ГАМАГА В.В., РОДИОНОВ С.Н. ИССЛЕДОВАНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА БИССУСА, ВЫДЕЛЯЕМОГО МОЛЛЮСКОМ DREISSENA POLYMORPHA.....	328
КАДЫРОВ Д.И. О МЕТОДАХ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОЙ УТИЛИЗАЦИИ ОТХОДОВ.....	330
КАКИМОВА Ж.Х., БЕПЕЕВА А.Е., КИМ А.Ю. ИССЛЕДОВАНИЕ КОЗЬЕГО МОЛОКА КАК СЫРЬЯ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА МЯГКИХ СЫРОВ.....	332
КАЛИНОВСКИЙ В.П., ТКАЧЕНКО Е.И., ЩЕРБАКОВ А.М., ГОЛОФЕЕВСКИЙ В.Ю., ШУМАКОВ А.Р., ГУЛЯЕВ А.В. ПОДХОДЫ К ПРИМЕНЕНИЮ НОВЫХ БИМЕДИЦИНСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ В ОНКОЛОГИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ.....	334
КАМАНИН С.С., АРЛЯПОВ В.А. ПЕЧАТНЫЕ ЭЛЕКТРОДЫ, МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ГЛЮКОЗОКСИДАЗОЙ ДЛЯ АНАЛИЗА БРОДИЛЬНЫХ СРЕД.....	336
КАМАНИНА О.А., СЫТНИКОВА Н.В., РОГОВА Т.В. ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭТАНОЛА В КОММЕРЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ С ПОМОЩЬЮ АМПЕРОМЕТРИЧЕСКОГО БИОСЕНСОРА.....	338
КАМЗОЛОВА С.В., ЛУНИНА Ю.Н., ЧИГЛИНЦЕВА М.Н., МОРГУНОВ И.Г. ПЕРСПЕКТИВЫ ПОЛУЧЕНИЯ ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДРОЖЖЕВЫХ ОРГАНИЗМОВ.....	340

КАМЫНИНА А.В., КОРОЕВ Д.О., ВОЛЬПИНА О.М., АБРАМОВ А.Ю. МЕХАНИЗМ ПРОТЕКТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ АНТИТЕЛ К СИНТЕТИЧЕСКИМ ФРАГМЕНТАМ АЛЬФА7-СУБЪЕДИНИЦЫ АЦЕТИЛХОЛИНОВОГО РЕЦЕПТОРА И ПРИОННОГО БЕЛКА ПРОТИВ БЕТА-АМИЛОИДНОЙ ТОКСИЧНОСТИ.....	342
КАРАБАНОВ Д.П., КОДУХОВА Ю.В. ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ ХРОМОСОМНОЙ ИНЖЕНЕРИИ В БОРЬБЕ С ЧУЖЕРОДНЫМИ ВИДАМИ РЫБ.....	344
КАРАМАН Ю.К. ИЗУЧЕНИЕ ХАРАКТЕРА БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ЛИПИДОВ ГЕПАТОПАНКРЕАСА КАМЧАТСКОГО КРАБА, СОДЕРЖАЩЕГО 1-О-АЛКИЛ-ДИАЦИЛГЛИЦЕРИДЫ И ω 3 ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫЕ ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ.....	346
КАРАНОВА М.К. РАЗРАБОТКА СПОСОБОВ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИИ В МАТЕРИАЛЕ МИКОПЛАЗМ РЕДКИХ ВИДОВ.....	347
КАРЛОВ П.М., ЯКОВЛЕВ Л.Ю. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ АНТИБИОТИКОВ В СУБСТАНЦИЯХ И БИОМАТЕРИАЛЕ.....	348
КАТИНА М.Н., ХАЯТОВА З.Г., РИЗВАНОВ А.А., ГАЙФУЛЛИНА Р.Ф. СПОСОБЫ МОДЕЛИРОВАНИЯ ИНФАРКТА МИОКАРДА У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ.....	351
КАЧАЕВ З.М., ВОРОБЬЕВА Н.Е., ШИДЛОВСКИЙ Ю.В. СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ НОВОГО ФАКТОРА, РЕГУЛИРУЮЩЕГО ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ.....	353
КИЛАДЗЕ А.Б. МАССОВАЯ ДОЛЯ СТЕКЛОВИДНОГО ТЕЛА ГЛАЗНОГО ЯБЛОКА АФРИКАНСКОГО СТРАУСА.....	354
КИЛАДЗЕ А.Б. НОМЕНКЛАТУРА ВТОРИЧНОЙ ПРОДУКЦИИ СТРАУСОВОДСТВА: РЕСУРСОСБЕРЕГАЮЩИЙ АСПЕКТ.....	355
КИМ Я.В., ГАСПАРЯН М.Э. ЭКСПРЕССИЯ И ОЧИСТКА МОНОМЕРА РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА ТРАНСФОРМИРУЮЩЕГО ФАКТОРА РОСТА-БЕТА1 (TGF- β 1) ЧЕЛОВЕКА В КЛЕТКАХ <i>ESCHERICHIA COLI</i>	357
КИРГИЗОВА С.Б. ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ПРЕПАРАТОВ ИНДУКТОРОВ ЭНДОГЕННОГО ИНТЕРФЕРОНА НА ФАКТОРЫ ПЕРСИСТЕНЦИИ <i>STARNYLOCoccus AUREUS</i>	359
КИРЯЕВА Н.А., ГРИГОРИАДИ А.С. БИОПРЕПАРАТ НА ОСНОВЕ АССОЦИАТИВНЫХ МИКРОМИЦЕТОВ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПОЧВЫ ПОД ПОСЕВАМИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР.....	361
КИСЕЛЕВА Е.П., МИХАЙЛОПУЛО К.И. МЕТОДИЧЕСКИЙ ПОДХОД К УСТАНОВЛЕНИЮ ЛОКАЛИЗАЦИИ УЧАСТКОВ СВЯЗЫВАНИЯ БИОПОЛИМЕРОВ НЕИЗВЕСТНОЙ ПРИРОДЫ В МОЛЕКУЛЕ ИММУНОГЛОБУЛИНА КЛАССА G.....	363
КНЯЗЕВА И.В., ОГУЛЯ А.П. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ВНУТРИ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ РОДА <i>LUPINUS</i>	365
КОДУХОВА Ю.В. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПРИРОДНЫХ ГИБРИДОВ ЛЕЩА <i>ABRAMIS BRAMA</i> (L.) И ПЛОТВЫ <i>RUTILUS RUTILUS</i> (L.) В РЫБИНСКОМ ВОДОХРАНИЛИЩЕ.....	368
КОЖУРО Ю.И., СЕМЕНЧИК Е.А., МАКСИМОВА Н.П. СОРТОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ СТРЕСС-РЕАКЦИИ РАСТЕНИЙ ЯЧМЕНЯ, ВЫЗЫВАЕМОЙ ВОЗБУДИТЕЛЕМ КОРНЕВОЙ ГНИЛИ ИЗ РОДА <i>FUSARIUM</i>	370
КОЗЛОВ Д.Г., МАЛАНИЧЕВА И.А., ЕФИМЕНКО Т.А., ЗЕНКОВА В.А., КАТРУХА Г.С., РЕЗНИКОВА М.И., БОРЩЕВСКАЯ Л.Н., ТАРАСОВА О.Д., СИНЕОКИЙ С.П., ЕФРЕМЕНКОВА О.В. НОВЫЕ АНТИБИОТИКИ, ОБРАЗУЕМЫЕ ШТАММАМИ <i>BACILLUS SUBTILIS</i>	372
КОЗЛОВ Е.Н. ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ БЕЛКОВ КАПСИДА ВИРУСА BgDNV.....	373
КОЗЯЕВА В.В., ДЗЮБА М.В. ИЗУЧЕНИЕ РАЗНООБРАЗИЯ МАГНИТОАКТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ РЕКИ АКСАЙ-КУРМОЯРСКИЙ И ОЗЕРА СЕЛИГЕР МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЭКОЛОГИИ.....	374
КОКШАРОВА О.А., ВАСЕТЕНКОВ А.Е. ЭВОЛЮЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ ДЕЛЕНИЯ ЦИАНОБАКТЕРИЙ.....	376
КОЛАЧЕВСКАЯ О.О., АЛЕКСЕЕВА В.В., ЛОМИН С.Н., СЕРГЕЕВА Л.И., БУРЬЯНОВ Я.И., РОМАНОВ Г.А. ИЗУЧЕНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК КЛУБНЕОБРАЗОВАНИЯ У ТРАНСФОРМАНТОВ КАРТОФЕЛЯ С ИЗМЕНЕННЫМ ГОРМОНАЛЬНЫМ СТАТУСОМ.....	378
КОЛЕСНИКОВА И.С., БАЖЕНОВА Б.А., БАДМАЕВА Т.М. ОРГАНОЛЕПТИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ВЕТЧИНЫ С ЛАМИФАРЭНОМ.....	380
КОЛЕСНИКОВА М.В., БЕЗЛЕР Н.В. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МИКРОМИЦЕТА-ЦЕЛЛЮЛОЗОЛИТИКА С ПОЧВЕННОЙ МИКРОФЛОРОЙ ПРИ РАЗЛОЖЕНИИ СОЛОМЫ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ.....	382

КОЛЕСНИКОВА Н.Н., КОРОЛЕВА А.В., ЛУКАНИНА Ю.К., ПАНТЮХОВ П.В., ПОПОВ А.А., ХВАТОВ А.В.	384
БИОРАЗРУШАЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИЭТИЛЕНА С ДРЕВЕСНОЙ МУКОЙ.....	
КОЛЕСОВА О.В.	386
ВЛИЯНИЕ НЕОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ НА РАСТВОРИМОСТЬ И УСТОЙЧИВОСТЬ ОЗОНА В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ.....	
КОЛОБОВА О.С., ВЕЛИШАЕВА Н.С., ШИЛОВ И.А.	388
ПРИМЕНЕНИЕ ТЕХНОЛОГИИ МИКРОСАТЕЛЛИТНОГО АНАЛИЗА В ГЕНОТИПИРОВАНИИ РАСТЕНИЙ РОДА <i>SOLANUM</i>	
КОМАРОВА Ю.В., ШАЛИМОВА О.А.	390
МОДИФИКАЦИЯ РАЦИОНОВ СВИНЕЙ С ЦЕЛЬЮ КОРРЕКЦИИ ФУНКЦИОНАЛЬНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МЯСА СВИНИНЫ С ПОРОКАМИ PSE.....	
КОМАРЬКОВ И.Ф., ШИДЛОВСКИЙ Ю.В.	391
ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ НОВОГО ФАКТОРА ТРАНСКРИПЦИИ В ОНТОГЕНЕЗЕ.....	
КОМИССАРОВА Л.Х., ФЕОФАНОВ В.С., КУЗНЕЦОВ А.А.	392
АДСОРБЦИЯ ГЕМОГЛОБИНА НА МИКРОЧАСТИЦАХ ФЕРРОКАРБОНА.....	
КОМРАТОВ А.В., САЯПИНА Л.В., АБДРАШИТОВА А.С., МАЛАХАЕВА А.Н., ОСИНА Н.А., ЩЕРБАКОВА С.А.	394
ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ «АМПЛИСЕНС» ДЛЯ ИНДИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО» ВРЕМЕНИ.....	
КОНДРАТЬЕВ М.Н., ЛАРИКОВА Ю.С., БУДАРИН С.Н.	396
БОРЩЕВИК СОСНОВСКОГО (<i>Heraclium sosnowskyi</i> MANDEN) И ПРОБЛЕМЫ АГРОБИОЦЕНОЗОВ.....	
КОНДРАТЬЕВ М.С., КАБАНОВ А.В., ЧЕРЕНКОВ Д.А., САМЧЕНКО А.А., КОМАРОВ В.М., ХЕЧИНАШВИЛИ Н.Н.	398
КОМПЬЮТЕРНОЕ ОБОСНОВАНИЕ АМИНОКИСЛОТНЫХ ЗАМЕН, ПОВЫШАЮЩИХ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ ЛИПАЗ.....	
КОНДРАТЬЕВ М.С., САМЧЕНКО А.А., КАБАНОВ А.В., КОМАРОВ В.М.	400
КРЕМНИЕВЫЕ АНАЛОГИ АМИНОКИСЛОТ: ОТ ФИЛОСОФИИ И ГИПОТЕЗ – К РАСЧЕТАМ БАЗЫ ДЛЯ АЛЬТЕРНАТИВНОЙ БИОХИМИИ.....	
КОНОН А.Д., ПИРОГ Т.П., ШЕВЧУК Т.А.	402
ИНТЕНСИФИКАЦИЯ СИНТЕЗА ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ <i>ACINETOBACTER CALCOACETICUS</i> ИМВ В-7241 НА НЕУГЛЕВОДНЫХ СУБСТРАТАХ.....	
КОНОН А.Д., СОФИЛКАНИЧ А.П., ПАРФЕНЮК С.А., ФИЛЮК И.В., ПИРОГ Т.П., ШЕВЧУК Т.А.	404
БИОДЕСТРУКЦИЯ КОМПЛЕКСНЫХ НЕФТЯНЫХ ЗАГРЯЗНЕНИЙ ВОДЫ И ПОЧВЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ <i>RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS</i> ИМВ АС-5017 И <i>ACINETOBACTER CALCOACETICUS</i> ИМВ В-7241....	
КОСТИНА Е.Е., ТКАЧЕНКО О.В., ЛОБАЧЕВ Ю.В.	406
ЭФФЕКТЫ ГЕНОВ КОРОТКОСТЕБЕЛЬНОСТИ ПШЕНИЦЫ И ПОДСОЛНЕЧНИКА НА КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ТКАНЕЙ IN VITRO.....	
КОРНЕЕВА М.М., СТАРКОВ А.А., ПОПОВ В.Н.	408
АНТИОКСИДАНТНАЯ ЗАЩИТА МИТОХОНДРИЙ ПРОТИВ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА.....	
КОРНЕВА Н.А., ДМИТРИЕВ В.Г.	410
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ УСТАНОВКИ ГАЗОВОГО (ОЗОНОВОГО) ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЯ ТРУБОПРОВОДОВ И ВОДОВОДОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕСТ-ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ.....	
КОРНЕВА Н.А., КЛЮЕВА Н.З., ПЕТРОВА Е.И., АЛЬДЕКЕЕВА А.С.	413
ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКА NAR-22 В ПОЧКАХ КРЫС СО СПОНТАННОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ (ЛИНИЯ SHR) В РАННЕМ ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ И ВЛИЯНИЕ НА НЕЕ УРОВНЯ ПОТРЕБЛЕНИЯ КАЛЬЦИЯ У РОДИТЕЛЬСКИХ ПОКОЛЕНИЙ.....	
КОРОБОВ В.В., ЖАРИКОВА Н.В., ЯСАКОВ Т.Р., АНИСИМОВА Л.Г., САГИТОВА А.И., ХАРИСОВА А.Р., ЖУРЕНКО Е.Ю., МАРКУШЕВА Т.В.	415
МИКРООРГАНИЗМЫ РОДОВ <i>AGROBACTERIUM</i> И <i>GLUCONOBACTER</i> КАК ОБЪЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИЙ ЗАЩИТЫ СРЕДЫ.....	
КОРОЛЕВА А.В., ЛУКАНИНА Ю.К., МОНАХОВА Т.В., ХВАТОВ А.В., ПОПОВ А.А.	416
ОКСО-БИОРАЗЛАЖЕНИЕ ПЛЕНОК НА ОСНОВЕ ПЭНП С ДОБАВЛЕНИЕМ ПРИРОДНЫХ И СИНТЕТИЧЕСКИХ ДОБАВОК.....	
КОСТАРЕВА О.С., ЛИН Ч., ТИН У.Ф., ТИЩЕНКО С.В., КАТАНАЕВ В.Л., ГАРБЕР М.Б.	418
ПОЛУЧЕНИЕ И КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ КОМПЛЕКСА G _α СУБЪЕДИНИЦЫ ГЕТЕРОТРИМЕРНОГО G-БЕЛКА С RGS-БЕЛКОМ CG5036 ИЗ ДРОЗОФИЛЫ.....	
КОСТИНА Н.В., НОВИКОВА Е.М., САЗЫКИНА М.А., ЧИСТЯКОВ В.А.	419
АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОБИОТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ <i>BACILLUSSUBTILIS</i>	
КОТЛОВ М.И., РЕВТОВИЧ С.В., МОРОЗОВА Е.А., АНУФРИЕВА Н.В., БЕЛЫЙ Ю.Ф., ДЕМИДКИНА Т.В.	421
МЕТИОНИН-ГАММА-ЛИАЗА ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ – ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ МИШЕНЬ ДЛЯ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ СРЕДСТВ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ.....	

КОЧКИН Д.В., ДЕМИДОВА Е.В., ТИТОВА М.В., НОСОВ А.М. ВЛИЯНИЕ СТЕПЕНИ ОЧИСТКИ САХАРОЗЫ НА НАКОПЛЕНИЕ ГИНЗЕНОЗИДОВ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК <i>PANAX JAPONICUS</i> VAR. <i>REPENS</i> ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ В АППАРАТУРЕ ПОЛУПРОМЫШЛЕННОГО ОБЪЕМА.....	422
КОЧКИН Д.В., НОСОВ А.М. ТРИТЕРПЕНОВЫЕ ГЛИКОЗИДЫ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ЯПОНСКОГО ЖЕНЬШЕНЯ <i>PANAX JAPONICUS</i> VAR. <i>REPENS</i>	424
КРАСНОВ М.С., ЯМСКОВА В.П., ЯМСКОВ И.А. БИОРЕГУЛЯТОРЫ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ ТКАНЕЙ ГЛАЗА ПОЗВОНОЧНЫХ.....	426
КРИВОШЕЕВ Д.М., КОЛЯЧКИНА С.В., МИХАЙЛОВ С.Н., ТАРАРОВ В.И., РОМАНОВ Г.А. N ⁶ -(БЕНЗИЛОКСИМЕТИЛ)АДЕНОЗИН - НОВОЕ СОЕДИНЕНИЕ С АНТИЦИТОКИНИНОВОЙ АКТИВНОСТЬЮ.....	428
КРУШИНСКИЙ А.Л., РЕУТОВ В.П., КУЗЕНКОВ В.С., КОШЕЛЕВ В.Б., СОРОКИНА Е.Г., САЛЫКИНА М.А., САМОСУДОВА Н.В., БАЙДЕР Л.М., КУРОПТЕВА З.В., МОЛДАЛИЕВ Ж.Т., ЕСИПОВ Д.С., ГРАНСТРЕМ О.К., СТЕРНАД А.И., ОХОТИН В.Е., СВИНОВ М.М., КОСИЦЫН Н.С., ПОЛЕТАЕВА И.И., КАМЕНСКИЙ А.А., ПИНЕЛИС В.Г. АНАЛИЗ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ ПЕПТИДНОГО ПРЕПАРАТА КОРТЕКСИНА НА РАЗВИТИЕ ГЕМОРРАГИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА У КРЫС ЛИНИИ КРУШИНСКОГО-МОЛОДКИНОЙ.....	430
КРЮЧКОВ М.В., ЕНИН Г.А., СЕРГЕЕВ А.В., ТИМЧЕНКО А.А., КАТАНАЕВ В.Л. НАНОСТРУКТУРА ПОВЕРХНОСТИ ГЛАЗА МУШЕК <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	432
КУДИН К.В., ПРОКОПКИНА Ю.О., ПРОКУЛЕВИЧ В.А. КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ ФРАГМЕНТА ГЕНА БЕЛКА КАПСИДА ЦВС-2 В КЛЕТКАХ <i>ESCHERICHIA COLI</i>	433
КУЗЕНКОВ В.С., РЕУТОВ В.П., КРУШИНСКИЙ А.Л. ВЛИЯНИЕ НИТРАТОВ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНУЮ ИШЕМИЮ МОЗГА, ВЫЗВАННУЮ ОККЛЮЗИЕЙ 2-Х СОННЫХ АРТЕРИЙ.....	435
КУЗИН А.И., КУЗНЕЦОВА Н.И., НИКОЛАЕНКО М.А., АЗИЗБЕКЯН Р.Р. ФУНГИЦИДНЫЕ СВОЙСТВА ШТАММА <i>BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS</i>	437
КУЗНЕЦОВ А.А., КОМИССАРОВА Л.Х., НЕЧИТАЙЛО Г.С., САМОЙЛОВ И.Б., ПОДОЙНИЦЫН С.Н., ШЛЯХТИН О.А., ПЫШНЫЙ М.Ф., ПЫШНАЯ С.В. ПРИМЕНЕНИЕ МАГНИТНЫХ МИКРОЧАСТИЦ ДЛЯ РЕШЕНИЯ ПРОБЛЕМ МЕДИЦИНЫ.....	439
КУЗНЕЦОВ О.Ю., САФОНОВА М.А., СОСНИНА А.Е. «ВЕДЬМИНО КОЛЬЦО» - ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ АНТАГОНИЗМА ГРИБОВ.....	442
КУЗНЕЦОВ О.Ю., САФОНОВА М.А., СОСНИНА А.Е. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЖИДКОЙ КУЛЬТУРЫ МИЦЕЛИЯ ВЫСШИХ ГРИБОВ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ЗЕРНОВОГО МИЦЕЛИЯ В ГРИБОВОДСТВЕ.....	444
КУЗНЕЦОВА А.В., МИРОНОВА К.С., ГЛЕБОВА Н.Н. ЖИДКИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ФОРМЫ НА ОСНОВЕ СТЕВИИ. ПОЛУЧЕНИЕ И АНАЛИЗ КАЧЕСТВА.....	446
КУЗНЕЦОВА Е.А., МОТЫЛЕВА С.М., АЛЕХИНА Ю.И., ПАРАМОНОВ И.Н. ЭЛЕМЕНТНЫЙ СОСТАВ И ЭПИДЕРМАЛЬНАЯ СТРУКТУРА ЗЕРНОВКИ.....	448
КУЗНЕЦОВА Е.А., ЧЕРЕПНИНА Л.В., КЛЕПОВ Р.Е. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ КОМПОНЕНТОВ КОМПЛЕКСА ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ФИТАЗЫ НА ПРОЦЕСС ГИДРОЛИЗА ФИТИНА ЗЕРНА ПШЕНИЦЫ.....	450
КУЗНЕЦОВА Н.И., АЗИЗБЕКЯН Р.Р. СОЗДАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ЗАЩИТЫ ВОДОЁМОВ ОТ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ.....	452
КУЗНЕЦОВА Т.Г., ГОЛУБЕВА И.Ю., ГОРБАЧЕВА М.В. КОГНИТИВНЫЕ СПОСОБНОСТИ ПРИМАТОВ.....	454
КУЛЕШОВА Ю.М., ФЕКЛИСТОВА И.Н. КОЛОНИЗАЦИЯ РАСТЕНИЙ БАКТЕРИЯМИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИ ЦЕННЫХ ШТАММОВ <i>PSEUDOMONAS PUTIDA</i> И <i>PSEUDOMONAS AURANTIACA</i>	456
КУЛИКОВА П.А., АРХИПОВА Л.В., КУЛИКОВ Д.А., СМИРНОВА Г.Н., КУРАНОВА А.В., РОГАТКИН Е.В., МАШКОВ А.Е., КУЛИКОВ А.В. КОРРЕКЦИЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ДЕФЕКТОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ АУТОЛОГИЧНЫХ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ И ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ ТКАНЕЙ.....	458
КУРАНОВА Л.К., ШВЕЙКИНА К.С., ВОЛЧЕНКО В.И. РАЗРАБОТКА ОПТИМАЛЬНОГО РЕЖИМА СТЕРИЛИЗАЦИИ НОВОГО ВИДА МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ КОНСЕРВОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ СПОР КУЛЬТУРЫ <i>CLOSTRIDIUM SPOROGENES</i> ШТ.25.....	461
КУРБАТОВА И.Н., ЦЕДИК В.В. ЭКОЛОГО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ВОДЫ ПРУДОВ ЗАГРЯЗНЕННЫХ СТОКОВЫМИ ВОДАМИ ЖИВОТНОВОДЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ.....	463
КУРОПТЕВА З.В., БАЙДЕР Л.М. ОКСИД АЗОТА И КЛЕТКИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ.....	464
КУРЧАЕВА Е.Е., ДРУЧИНИН А.С. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИФИДОБАКТЕРИЙ ДЛЯ ОБРАБОТКИ ВТОРИЧНОГО МЯСНОГО СЫРЬЯ В ТЕХНОЛОГИИ МЯСНЫХ ИЗДЕЛИЙ.....	466

КХАТАБ З.С., САЗЫКИНА М.А., НОВИКОВА Е.М., САЗЫКИН И.С., КОСТИНА Н.В. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СВЕТЯЩИХСЯ БАКТЕРИЙ В СИСТЕМЕ МОНИТОРИНГА ЗАГРЯЗНЕНИЯ РОДНИКОВ РОСТОВА-НА- ДОНУ.....	468
ЛАВРЕНТЬЕВА Е.В., РАДНАГУРУЕВА А.А., БАНЗАРАКЦАЕВА Т.Г. АЛКАЛИ- И ТЕРМОСТАБИЛЬНЫЕ ПЕПТИДАЗЫ ПРОКАРИОТ БАЙКАЛЬСКОЙ РИФТОВОЙ ЗОНЫ.....	470
ЛАГУНОВА Н.Л., ПУНТУС И.Ф. БИОСЕНСОРНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ПСЕВДОМОНАД, СТИМУЛИРУЮЩИХ РОСТ РАСТЕНИЙ, К РЯДУ ТЕХНОГЕННЫХ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ.....	472
ЛАКТИОНОВА А.А. СИНЦИТИАЛЬНОЕ СЛИЯНИЕ И ФОРМИРОВАНИЕ ДВУЯДЕРНЫХ НЕРВНЫХ КЛЕТОК.....	474
ЛАМБЕРОВА М.Э., БУЯНОВА А.С., ЛАМБЕРОВА А.А., КОЧНЕВА Т.А. БИОСИНТЕЗ ШИКИМОВОЙ КИСЛОТЫ В КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЕ.....	475
ЛАТЫНИНА Т.И., ГАРАСЬКО Е.В. ПРОБЛЕМЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ И ПРОФИЛАКТИКИ ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИИ У ВОЕННОСЛУЖАЩИХ.....	477
ЛЕБЕДЕВ В.Г., МАТВЕЕВА С.В., ЧУПРИНА О.И., РОЗОВА Х.А., ШЕСТИБРАТОВ К.А. АНАЛИЗ ФЕНОТИПА И БИОБЕЗОПАСНОСТИ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ОСИНЫ И БЕРЕЗЫ С ГЕНОМ GS1.....	480
ЛЕБЕДЕВ В.Г., ФАСХИЕВ В.Н., САВЧИКОВА Е.В., ШЕСТИБРАТОВ К.А. ИНТЕГРАЦИЯ Т-ДНК С РАЗЛИЧНЫХ ВЕКТОРОВ ПРИ АГРОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ОСИНЫ.....	481
ЛЕБЕДЕВ В.Г., ШЕСТИБРАТОВ К.А. ПРИМЕНЕНИЕ СТИМУЛЯТОРОВ РОСТА В КУЛЬТУРЕ <i>IN VITRO</i> ЯСЕНЯ ОБЫКНОВЕННОГО.....	482
ЛЕБЕДЕВ В.Г., ШЕСТИБРАТОВ К.А. ВОПРОСЫ БИОБЕЗОПАСНОСТИ ТРАНСГЕННЫХ ДЕРЕВЬЕВ.....	483
ЛЕБЕДЕВА А.О., ВАЙНЕР О.Б., ЮНОШЕВ А.С., ЛАКТИОНОВ П.П. НОВЫЕ МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ЗАМЕСТИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ.....	484
ЛЕВАНОВА Н.А., ТУХВАТУЛИН А.И. МОДЕЛЬНАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ДОСТАВКИ БЕЛКОВЫХ ВЕЩЕСТВ.....	485
ЛЕЩЕНКО А.А., ПОГОРЕЛЬСКИЙ И.П., КОМОСКО Г.В., ЛАЗЫКИН А.Г., БАГИН С.В., ЛОГВИНОВ С.В. ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОРЕАКТОРА БИОК-022С ДЛЯ ВЫРАЩИВАНИЯ МИКРОБНЫХ КУЛЬТУР <i>ESCHERICHIA COLI</i> ШТАММА М-17.....	486
ЛИТВИНОВА И.И., ГЛАДКОВ Е.А. ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ КЛЕТОК ХРИЗАНТЕМЫ КИЛЕВАТОЙ И ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ МЕДИ В УСЛОВИЯХ <i>IN VITRO</i>	489
ЛИТВИНОВА И.И., ГЛАДКОВ Е.А., ДОЛГИХ Ю.И. РАЗРАБОТКА СХЕМЫ КЛЕТОЧНОЙ СЕЛЕКЦИИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ РАСТЕНИЙ ДЕКОРАТИВНОГО ЛЬНА ТОЛЕРАНТНЫХ К МЕДИ.....	490
ЛИТВИШКО В.С., РАХМЕДОВ Б.Ч. БИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ МИКРОКАПСУЛИРОВАННЫХ ФОРМ ПЕСТИЦИДОВ.....	491
ЛИЯСЬКИНА Е.В., НАЗАРКИНА М.И., РЕВИН В.В., ЛИЯСЬКИН Ю.К. АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ БИОТЕХНОЛОГИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ.....	493
ЛОБАНОВ А.В., ГРАДОВА М.А., КОБЗЕВ Г.И., СИНЬКО Г.В. ФОТОБИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ХЛОРОФИЛЛА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ АГРЕГАЦИИ И КООРДИНАЦИОННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ.....	494
ЛОБАНОВА Н.В., НУРБАКОВ А.А., ТРУСОВА И.Н., САУТКИНА Е.Н., ЕРМОЛИНА Л.В., КЛИШИН А.А., СЕРЕГИН Ю.А. ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЭУКАРИОТИЧЕСКОГО ПРОДУЦЕНТА РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРФЕРОНА-БЕТА-1а В ОДНОРАЗОВОМ БИОРЕАКТОРЕ.....	495
ЛУКАНИНА Ю.К., КОЛЕСНИКОВА Н.Н., КОРОЛЕВА А.В., ХВАТОВ А.В., ПОПОВ А.А. ОЦЕНКА СТЕПЕНИ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПОЧВЕННОЙ МИКРОБИОТЫ НА КОМПОЗИЦИИ ПОЛИПРОПИЛЕНОВ С ЦЕЛЛЮЛОЗОЙ.....	498
ЛУНИН С.В., КАТАЛЕВСКИЙ А.А. ПРОБЛЕМЫ КАЧЕСТВА ФИЛЬТРАЦИИ В СОВРЕМЕННОЙ БИОФАРМАЦЕВТИКЕ.....	499
ЛУНИНА Ю.Н., КАМЗОЛОВА С.В., МОРГУНОВ И.Г. БИОСИНТЕЗ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ ИЗ ГЛЮКОЗЫ У МУТАНТА <i>YARROWIA LIPOLYTICA</i> № 15 В УСЛОВИЯХ ПЕРИОДИЧЕСКОГО И НЕПРЕРЫВНОГО РЕЖИМА.....	501
ЛУНИЧКИН А.М., ЖЕМЧУЖНИКОВ М.К., КНЯЗЕВ А.Н. ИССЛЕДОВАНИЕ БАЗОВЫХ ПРИНЦИПОВ АКУСТИЧЕСКОЙ КОММУНИКАЦИИ НА МОДЕЛЬНЫХ ОБЪЕКТАХ – НАСЕКОМЫХ (<i>ORTHOPTERA, GRILLIDAE</i>).....	503
ЛЫСЕНКОВА Л.Н., КАТРУХА Г.С., ШАШКОВ А.С., КОРОЛЕВ А.М., ГАЛАТЕНКО О.А., ТЕРЕХОВА Л.П., СУМАРУКОВА И.Г., КОЗЛОВ Д.Г., МАКАРОВА М.О., ГЛАДКИХ Е.Г., ЕФРЕМЕНКОВА О.В. ОПИСАНИЕ АНТИБИОТИКА АКТИНОМИЦЕТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ, ЭФФЕКТИВНОГО В ОТНОШЕНИИ МЕТИЦИЛИН-РЕЗИСТЕНТНЫХ СТАФИЛОКОККОВ.....	505

ЛЮБАВИНА Н.А., ВАРВАРИНА Г.Н., МАКАРОВА Е.В., МЕНЬКОВ Н.В., МАЛЫШЕВА А.А., ПРЭСНЯКОВА Н.Б., НОВИКОВ В.В. ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО ОТВЕТА И МИКРОБИОЦЕНОЗА ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ СМЕШАННОГО ГЕНЕЗА.....	506
ЛЮШИНА Г.А., ОКТЯБРЬСКИЙ О.Н., СМЕРНОВА Г.В. ВЛИЯНИЕ ИОНОВ ЖЕЛЕЗА НА АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВОСТЬ БАКТЕРИЙ <i>E.coli</i>	509
МАГАДОВА М.Ю., ВОРОБЬЕВА Н.Е., КРАСНОВ А.Н. ИНСУЛЯТОРНЫЙ БЕЛОК D. MELANOGASTER SU(HW) РЕКРУТИРУЕТ КОМПЛЕКСЫ SAGA И ВРАНМА И СОЗДАЕТ УСЛОВИЯ ДЛЯ СВЯЗЫВАНИЯ БЕЛКОВ, УЗНАЮЩИХ УЧАСТКИ НАЧАЛА РЕПЛИКАЦИИ (ORC).....	511
МАГЗАНОВА Д.К., МУХАМБЕТАЛИЕВА А., КАНИЕВА Н.А., РАЗУМОВСКАЯ Р.Г. РЕЗУЛЬТАТЫ СРАВНИТЕЛЬНОГО АНАЛИЗА ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА КОРМА РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ С ДОБАВКАМИ И БЕЗ ДОБАВОК БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ.....	512
МАЖУЛИНА И.В., ШЕВЦОВ А.А. ПРИМЕНЕНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ В ТЕХНОЛОГИИ ХЛЕБОПЕКАРНОГО ПРОИЗВОДСТВА.....	513
МАЗАНКО М.С., ДЕНИСОВА Т.В., КОЛЕСНИКОВ С.И. ВЛИЯНИЕ ЗАГРЯЗНЕНИЯ СВИНЦОМ И ПЕРЕМЕННЫМ МАГНИТНЫМ ПОЛЕМ НА ПОЧВЕННЫЕ АКТИНОМИЦЕТЫ.....	516
МАКАРОВА Е.Л., КОВАЛЕВА Т.А., ХАУСТОВА Г.А. КОЛЛАГЕН РЫБ КАК НОСИТЕЛЬ ДЛЯ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ.....	518
МАКАРОВА Е.П. АГРОБИОТЕХНОЛОГИИ В ФОКУСЕ ФОРУМА АЗИАТСКО-ТИХООКЕАНСКОГО ЭКОНОМИЧЕСКОГО СОТРУДНИЧЕСТВА.....	519
МАКСИМЕНКО А.В., ВАБАЕВ А.В., ТУРАШЕВ А.Д. МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ФЕРМЕНТНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ И УГЛЕВОДНАЯ ОБОЛОЧКА СОСУДИСТОЙ СТЕНКИ КАК ФАКТОРЫ ЗАЩИТЫ ПРИ ОСТРЫХ ПОРАЖЕНИЯХ.....	522
МАКСИМЕНКОВА К.И., ЛОСЕНКОВА С.О., КИРЮШЕНКОВА С.В., КИРИЛЛОВ С.К. ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАЗВУКОВОЙ НИЗКОЧАСТОТНОЙ ОБРАБОТКИ НА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКУЮ СТАБИЛЬНОСТЬ ЛЕКАРСТВЕННОГО СИРОПА С ГИПОКСЕНОМ.....	524
МАКСИМОВА А.В., КУЗНЕЦОВА М.В. ТРАНСФОРМАЦИЯ ПРОИЗВОДНЫХ ПРОПИОНОВОЙ КИСЛОТЫ ПОЧВЕННЫМИ БАКТЕРИЯМИ.....	526
МАКСИМОВА Е.М., КОРЕПАНОВ А.П., КОРОБЕЙНИКОВА А.В., ГАРБЕР М.Б., ГОНГАДЗЕ Г.М. ИЗМЕНЕНИЯ В ПЕТЛЕ $\alpha 3$ - $\beta 4$ РИБОСОМНОГО БЕЛКА L5 ПРИВОДЯТ К СНИЖЕНИЮ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ РИБОСОМ.....	528
МАКСИМОВА С.Н., ГАФУРОВ Ю.М., ПОЛЕЩУК Д.В. ХИТОЗАН-НУКЛЕИНОВЫЙ ГИДРОЛИЗАТ КАК РЕГУЛЯТОР МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ.....	530
МАКСИМОВА Ю.Г. ГЕТЕРОГЕННЫЙ БИОКАТАЛИЗ: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ВОПРОСА.....	532
МАКСЮТОВ И.Ю. РАЗРАБОТКА СПОСОБОВ МОЛЕКУЛЯРНО ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ ПРОТИВОМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ НА ПРИМЕРЕ: СИНЕГНОЙНОЙ ПАЛОЧКИ (<i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>).....	534
МАМАЕВА М.Е., НОВИКОВ Д.В., ПРЭСНЯКОВА Н.Б., КОРОЛЕВА В.В., ФИЛАТОВА Е.Н. СЫВОРОТОЧНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАСТВОРИМОГО CD95 АНТИГЕНА У БОЛЬНЫХ ОПУХОЛЯМИ ТЕЛА И ШЕЙКИ МАТКИ.....	535
МАМЕДОВА Х.Р. БИОЛОГИЯ - НАУКА XXI ВЕКА, ЕГО ДОСТИЖЕНИЯ И ЗАДАЧИ.....	537
МАРЕТИНА М.А., ЖЕЛЕЗНЯКОВА Г.Ю., ЕГОРОВА А.А., КИСЕЛЕВ А.В. ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА ТЯЖЕСТЬ ТЕЧЕНИЯ СПИНАЛЬНОЙ МЫШЕЧНОЙ АТРОФИИ.....	540
МАРКОВА О.В., ГАРИПОВА С.Р. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АССОЦИАЦИИ ЭНДОФИТНЫХ БАКТЕРИЙ Ф4 С РАСТЕНИЯМИ <i>PHASEOLUS VULGARIS L.</i> В ЗАВИСИМОСТИ ОТ МЕТЕОРОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ.....	542
МАРЧЕНКО Н.Ю., СИКОРСКАЯ Е.В., МАРЧЕНКОВ В.В., СУРИН А.К., КОТОВА Н.В., СЕМИСОТНОВ Г.В. АФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ НА ОСНОВЕ ДЕНАТУРИРОВАННЫХ БЕЛКОВ КАК МЕТОД ОЧИСТКИ И ЭКСПРЕСС-АНАЛИЗА МОЛЕКУЛЯРНЫХ ШАПЕРОНОВ В КЛЕТОЧНЫХ ЭКСТРАКТАХ (ЛИЗАТАХ).....	543
МЕЩЕРЯКОВА Е.С., ШПИРНАЯ И.А., ЧУРАКОВА М.И., БАСЫРОВА А.М. АКТИВНОСТЬ ИНГИБИТОРОВ ЭКЗОГЕННЫХ ГИДРОЛАЗ В ПЛОДОВЫХ ТЕЛАХ ГРИБОВ КЛАССА BASIDIOMYCETES.....	545
МЕЩЕРЯКОВА Е.С., ШПИРНАЯ И.А., ЦВЕТКОВ В.О., БАСЫРОВА А.М. ПЛОДОВЫЕ ТЕЛА ВЫСШИХ ГРИБОВ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ИСТОЧНИК ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ.....	547
МАРТИРОСОВА Е.И., ПЛАЩИНА И.Г. ЭФФЕКТ МЕТИЛРЕЗОРЦИНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНОСТЬ ЛИЗОЦИМА.....	549
МАСАГУТОВА Н.Р., ТАМАРОВА Э.Р., МАВЗЮТОВ А.Р. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОБИОТЫ РОТОВОЙ ПОЛОСТИ ПРИ КАРИЕСЕ.....	552

МАСАГУТОВА Н.Р., ТАМАРОВА Э.Р., МАВЗЮТОВ А.Р. РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ ПАРОДОНТИТЕ.....	553
МАСАЛОВ И.С., ЦВЕТКОВ Е.А., ЛОКШИНА Е.И., ВЕСЕЛКИН Н.П. МОДУЛЯЦИЯ СЕРОТОНИНОМ ПАРНО-ИМПУЛЬСНОЙ ФАСИЛИТАЦИИ СИНАПТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ ДОРСОЛАТЕРАЛЬНОЙ АМИГДАЛЫ КРЫСЫ.....	555
МАСЛЕННИКОВ П.В. СОДЕРЖАНИЕ АНТОЦИАНОВ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЯХ БОТАНИЧЕСКОГО САДА БФУ ИМ. И. КАНТА (Г. КАЛИНИНГРАД).....	556
МАРТЫНОВА Е.У., КАПЕЛИНСКАЯ Т.В., МУХА Д.В. ИЗУЧЕНИЕ БЕЛКОВОГО СОСТАВА КАПСИДА ДЕНСОВИРУСА РЫЖЕГО ТАРАКАНА <i>BLATTELLA GERMANICA</i>	558
МАТКОВСКАЯ М.В., МЕЗЕНОВА О.Я. ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ НОВЫХ БИОПРОДУКТОВ ИЗ ЧЕШУИ И ГОЛОВ РЫБ НА ЖЕЛАТИНОВОЙ ОСНОВЕ.....	560
МАТЫЧЕНКОВ В.В. НОВЫЕ АГРОБИОТЕХНОЛОГИИ И ВЕРТИКАЛЬНО ИНТЕГРИРОВАННАЯ ФЕРМА – КОНЦЕПЦИЯ, ТЕОРИЯ И ПРАКТИКА.....	562
МАТЫЧЕНКОВ В.В., МАТЫЧЕНКОВ И.В. АКТИВНЫЙ КРЕМНИЙ И ПОВЫШЕНИЕ ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ.....	564
МАЦ А.Н., ПЕТРОВСКИХ В.П., АФАНАСЬЕВА Т.М., НИКОЛАЕВА А.М. ИММУНОПЕПТИДНЫЕ БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ ИЗ ПЛАЗМЫ КРОВИ.....	566
МАЧАВАРИАНИ Н.Г., ГАЛАТЕНКО О.А., ТЕРЕХОВА Л.П. ВЫДЕЛЕНИЕ АКТИНОМИЦЕТОВ-ЭНДОФИТОВ, ОБРАЗУЮЩИХ АНТИБИОТИКИ, ИЗ ЛИСТЬЕВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ.....	567
МЕДВЕДЕВА Е.В., КАЛЕНИК Т.К. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ КИСЛОМОЛОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО РЕГИОНА.....	569
МЕДЖИДОВ М.М., АХМЕДОВ М.И. РАЗРАБОТКА КРОВЕЗАМЕНИТЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ ВОДЫ КАСПИЙСКОГО МОРЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОТЕХНОЛОГИИ.....	571
МИНАЙЧЕВА П.Р., НИКОЛАШИНА К.А., АЛФЕРОВ С.В. ПАРАМЕТРЫ РАБОТЫ БИОТОПЛИВНОГО ЭЛЕМЕНТА НА ОСНОВЕ ИММОБИЛИЗОВАННОГО БИОКАТАЛИЗАТОРА.....	573
МИТРАКОВА М.Е., ПОСТНИКОВА М.В. МАКУЛАТУРА – ВОЗМОЖНОЕ СЫРЬЕ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА БИОЭТАНОЛА.....	574
МИТРОШИН И.В., КРАВЧЕНКО О.В., НИКОНОВ С.В., ГАРБЕР М.Б. КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ И СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОЛНОРАЗМЕРНОГО РИБОМНОГО КОМПЛЕКСА P0-P1 ИЗ АРХЕИ <i>METHANOCOCCUS THERMOLITHOTROPICUS</i>	577
МИХАЙЛОВА Е.А., ШУБАКОВ А.А., ОВОДОВ Ю.С. РЕГУЛЯЦИЯ ПЕКТИНАМИ ОНТОГЕНЕЗА РАСТЕНИЙ.....	578
МИХАЙЛОВА Е.О., АХМАДИЕВА С.В., ХАБИБУЛЛИНА Л.И., ШУЛАЕВ М.В. ВЛИЯНИЕ МЕЛАФЕНА НА МИКРООРГАНИЗМЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ АКТИВНОГО ИЛА ОЧИСТНЫХ СООРУЖЕНИЙ.....	580
МИХАЙЛОВА И.Д., ЛУКАТКИН А.С. ИЗУЧЕНИЕ И ПОВЫШЕНИЕ МЕТАЛЛУСТОЙЧИВОСТИ ОВОЩНЫХ РАСТЕНИЙ В КУЛЬТУРЕ <i>IN VITRO</i>	581
МИХАЙЛОВА Р.В., СЕМАШКО Т.В. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГЛЮКОЗООКСИДАЗ <i>PENICILLIUM ADAMETZII</i> ЛФ F-2044.1 И <i>PENICILLIUM FUNICULOSUM</i> 46.1 С РАЗЛИЧНЫМИ РЕДОКС-МЕДИАТОРАМИ.....	582
МИХАЙЛОВА Ю.В. ПОЛОВОЙ СОСТАВ ПОПУЛЯЦИЙ СМОЛЁВКИ БЕССТЕБЕЛЬНОЙ (<i>SILENE ACAULIS</i> (L.) JACQ.) НА ЧУКОТСКОМ ПОЛУОСТРОВЕ.....	584
МИЩЕНКО И.А., ТАРАН О.П., ТАРАН С.В., МИЩЕНКО Л.Т. ЭКОНОМИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПОЛУЧЕНИЯ ОЗДОРОВЛЕННОГО СЕМЕННОГО МАТЕРИАЛА КАРТОФЕЛЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОДЕЛИРОВАННОЙ МИКРОГРАВИТАЦИИ.....	585
МИЯНОВИЧ О., ШАФИГУЛЛИНА А.К., РИЗВАНОВ А.А., КИЯСОВ А.П. ВЫДЕЛЕНИЕ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИОФИБРОБЛАСТОВ ПЕЧЕНИ КРЫС МЕТОДОМ ЭКСПЛАНТАЦИИ.....	587
МОЙСЕЮК И.В., ДЕРКАЧ К.В., ЧИСТЯКОВА О.В., СУХОВ И.Б., БОНДАРЕВА В.М., ШПАКОВ А.О. АДЕНИЛАТЦИКЛАЗНАЯ СИСТЕМА В МОЗГЕ КРЫС С ДЛИТЕЛЬНЫМ СТРЕПТОЗОТОЦИНОВЫМ ДИАБЕТОМ.....	590
МОЙСЕЮК И.В., ДЕРКАЧ К.В., ЧИСТЯКОВА О.В., ШПАКОВ А.О. ДЕФИЦИТ АНДРОГЕНОВ У САМЦОВ КРЫС С НЕОНАТАЛЬНОЙ МОДЕЛЬЮ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2-ГО ТИПА.....	591
МООР Н.А., САФРО М.Г. БАКТЕРИАЛЬНЫЕ И ЭУКАРИОТИЧЕСКИЕ ФЕНИЛАЛАНИЛ- τ РНК-СИНТЕТАЗЫ КАТАЛИЗИРУЮТ АМИНОАЦИЛИРОВАНИЕ τ РНК ^{CPhe} ПРИРОДНЫМИ ОКИСЛЕННЫМИ АМИНОКИСЛОТАМИ.....	592
МООР Н.А., САФРО М.Г. ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ФЕНИЛАЛАНИЛ- τ РНК-СИНТЕТАЗЫ В МИТОХОНДРИЯХ ЭУКАРИОТ.....	595

МОРЕВА Ж.Г., ВАСИЛЬЕВ М.М., САЩЕНКО В.П., ГАРАСЬКО Е.В., АЛЕНТЬЕВ А.Н. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВЛАГАЛИЩНЫХ ТРИХОМОНАД.....	597
МОРОЗ И.В., МИХАЙЛОВА Р.В. СТАБИЛИЗАЦИЯ МОРФОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПРОДУЦЕНТА КАТАЛАЗЫ – <i>PENICILLIUM PISCEUM</i> F-648 A3-2.....	599
МОРОЗОВА О.В., ИСАЕВА Е.И., КОЗЛОВА Ю.Н., БАХВАЛОВА В.Н., КОРОЛЁВА Л.С., СИЛЬНИКОВ В.Н. СРАВНЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ И ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ ИСКУССТВЕННЫХ РНК-А3.....	601
МОРОЗОВА Ю. А., АЛИМОВА Ф.К. ЦЕЛЛЮЛАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ИЗОЛЯТА РОДА <i>TRICHODERMA</i> ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА СПИРТОВОЙ БАРДЕ.....	603
МОКШИН Е.В., ПЕТРОВА Ю.Г., ЛУКАТКИН А.С. ИЗУЧЕНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ВОЗМОЖНОСТЕЙ <i>NARCISSUS HYBRIDUS</i> К МОРФОГЕНЕЗУ В КУЛЬТУРЕ <i>IN VITRO</i>	605
МОХОВ В.В., ФОМИЧЕВА Е.В. ИНОВАЦИОННЫЕ БИООРГАНИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ РАСТЕНИЕВОДСТВА.....	607
МУРОМЦЕВ А.Б., ЗАВОДЧИКОВА Р.А. ГОЛШТИНИЗАЦИЯ КАК МЕТОД ПОВЫШЕНИЯ МОЛОЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА.....	609
МУТТАР А.А., ФИНОГЕНОВ А.Ю., ФИНОГЕНОВА Е.Г., ПОТАПЧЕНКО А.А., ПОТАПОВИЧ М.И., ПРОКУЛЕВИЧ В.А. ПОЛУЧЕНИЕ ЛОШАДИНОГО РЕКОМБИНАНТНОГО α_2 -ИНТЕРФЕРОНА КАК ОСНОВА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ЛЕЧЕБНО- ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ ВЕТЕРИНАРНЫХ ПРЕПАРАТОВ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ.....	610
МУХАМЕДШИНА Я.О., ШАЙМАРДАНОВА Г.Ф., ЧЕЛЫШЕВ Ю.А. УСИЛЕНИЕ МИГРАЦИИ МИЕЛИНОБРАЗУЮЩИХ ШВАННОВСКИХ КЛЕТОК В ОБЛАСТЬ ТРАВМЫ СПИННОГО МОЗГА КРЫСЫ ПРИ ГЕННО-КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ.....	612
МУХАМЕТВАФИНА А.А., АХМЕТОВА А.Ш. ОСОБЕННОСТИ МОРФОГЕНЕЗА <i>STEMMACANTHA SERRATULOIDES</i> (GEORGI) M. DITTRICH. В КУЛЬТУРЕ <i>IN VITRO</i>	614
МУХАМЕТЗЯНОВА А.Д., МАРЕНОВА И.И., ШАРИПОВА М.Р. ВЛИЯНИЕ ИНАКТИВАЦИИ ГЕНА ФИТАЗЫ НА ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТЬ ШТАММА <i>BACILLUS SUBTILIS</i>	616
МУХАМЕТЗЯНОВА А.Д., МАРЕНОВА И.И., ШАРИПОВА М.Р. ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И СВОЙСТВА ФИТАТ-ГИДРОЛИЗУЮЩЕГО ФЕРМЕНТА <i>P. AGGLOMERANS</i>	618
МУЧКАЕВА И.А., ДАШИНМАЕВ Э.Б., ДАВЫДОВА Д.А., ТЕРСКИХ В.В., ВАСИЛЬЕВ А.В. ПОЛУЧЕНИЕ ИПСК ИЗ КЛЕТОК АМНИОТИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ ЧЕЛОВЕКА.....	619
МЫРЗАГУЖИНОВА Д.К., БЕПЕЕВА А.Е., КАБДЕНОВА А.Т. ЗНАЧЕНИЕ БИФИДОФЛОРЫ ДЛЯ ЗДОРОВЬЯ ЧЕЛОВЕКА.....	620
МЯСОЕДОВА В.В. СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА ТОПЛИВНЫХ БРИКЕТОВ И ПЕЛЛЕТ НА ОСНОВЕ ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗНОГО СЫРЬЯ.....	622
НАЗАРОВА А.А., ПОЛИЩУК С.Д. ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ЖИВОТНЫХ ПРИ ДОБАВЛЕНИИ В РАЦИОН НАНОЧАСТИЦ КОБАЛЬТА.....	623
НАЗАРОВА А.А., ПОЛИЩУК С.Д. БЕЗОПАСНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НАНОПОРОШКА МЕДИ В КОРМЛЕНИИ ЖИВОТНЫХ.....	625
НГУЕН ТХИ ЧАНГ АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНЫХ МАРКЕРОВ ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА С РАЗВИТИЕМ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА У ЛИЦ ПОЖИЛОГО И СТАРЧЕСКОГО ВОЗРАСТА РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ.....	626
НГУЕН ТХИ ЧАНГ, КОВАЛЕВА Н.С. РАЗРАБОТКА СПОСОБА ОЦЕНКИ РИСКА РАЗВИТИЯ ИНСУЛЬТА НА ОСНОВЕ ГЕНОМНЫХ МАРКЕРОВ.....	629
НЕГАНОВА М.Е., ПЕТРОВА Л.Н., ШЕВЦОВА Е.Ф., СЕРКОВ И.В., ПРОШИН А.Н. N-АРИЛ-(3-СЕЛЕНА-1-АЗАБИЦИКЛО[3.3.1]НОН-2-ИЛИДЕН)АМИНЫ – ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ НЕЙРОПРОТЕКТОРЫ.....	630
НЕЗГОВОРОВ Д.В. РАЗРАБОТКА ИММУНОФЕМНЕТНОЙ ТЕСТ СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К МЕЛАНОМЕ.....	631
НЕЧИТАЙЛО Г.С. ПРОВЕДЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ В УСЛОВИЯХ КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА НА ОРБИТАЛЬНЫХ СТАНЦИЯХ.....	633
НИГМАТУЛЛИНА Л.Р., МИРСАЯПОВА И.А., ИШМУХАМЕТОВА А.Н., БАЙМИЕВ А.Х., МАВЗЮТОВ А.Р. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОБИОТЫ, АССОЦИИРОВАННАЯ С ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ (ХОБЛ).....	635
НИКИТИН В.А. ОСОБЕННОСТИ РАБОТЫ С ЕДИНИЧНОЙ КЛЕТКОЙ.....	636
НОВИКОВА Е.М., САЗЫКИНА М.А., БУРАЕВА Е.А., КОСТИНА Н.В. ОЦЕНКА ЗАГРЯЗНЕНИЯ АТМОСФЕРНОГО ВОЗДУХА Г. РОСТОВА-НА-ДОНУ (2009 г.).....	637
НОВИКОВА К.И., ДУКОВА В.С., ДЬЯКОВ М.Ю. ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИСАХАРИДОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЛИЧИНОК ВОСКОВОЙ МОЛИ.....	639

НОВИЧЕНКО О.В. ИЗУЧЕНИЕ СТУДНЕОБРАЗУЮЩИХ СВОЙСТВ ПЕКТИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ И СПОСОБЫ ИХ ИЗВЛЕЧЕНИЯ ИЗ ВЫСШИХ ВОДНЫХ РАСТЕНИЙ ВОЛГО-КАСПИЙСКОГО БАССЕЙНА.....	641
НОВОЖИЛОВ А.В., КОРШАК О.В., ТАВРОВСКАЯ Т.В., МОРОЗОВ В.И. ВЛИЯНИЕ ОДНОКРАТНОГО ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО СТРЕССА НА ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЙ БАЛАНС КРОВИ КРЫС НА ФОНЕ ХРОНИЧЕСКОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ АНТИОКСИДАНТА КВЕРЦЕТИНА.....	643
НОВОСАДОВА Е.В., ГРИВЕННИКОВ И.А., БОБРЫШЕВА И.В., ГРИГОРЕНКО А.П., АНДРЕЕВА Л.А., РОГАЕВ Е.И., ТАРАНТУЛ В.З. ЛИНИЯ КЛЕТОК С МУТАНТНЫМ ГЕНОМ ПРЕСЕНИЛИНА 1 ЧЕЛОВЕКА КАК МОДЕЛЬНАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ПОИСКА И ТЕСТИРОВАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА.....	645
НОВОСЕЛОВА Н.Ю., САПРОНОВ Н.С., РЕЙХАРДТ Б.А. ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДНОГО ТАУРИНА НА СОДЕРЖАНИЕ ФОСФОЛИПИДОВ СИНАПТОСОМ ЛЕВОГО И ПРАВОГО ПОЛУШАРИЙ МОЗГА КРЫС В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ.....	647
ОБРУЧЕВА Н.В., ЛИТЯГИНА С.В., СИНЬКЕВИЧ И.А. ИЗУЧЕНИЕ БЕЛКОВ, ОТВЕТСТВЕННЫХ ЗА НАЧАЛО ПРОРАСТАНИЯ СЕМЯН.....	648
ОВЧИННИКОВА С.И., МИХНЮК О.В. ИЗУЧЕНИЕ ЛИПИДНОГО СОСТАВА МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ ФОРЕЛИ.....	650
ОГУЛЯ А.П., КНЯЗЕВА И.В. О СПЕЦИФИКЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОЛИМОРФИЗМА БЕЛКОВ СЕМЯН ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА <i>DIANTHUS L.</i>	651
ОРЛОВА И.Г., АТАМАНЧЕНКО М.П., ЛАПЕНКО М.А., ПИВОВАРОВА И.А. КУЛЬТУРА IN VITRO РАЗНЫХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ МЕСТНОЙ И ИНТРОДУЦИРОВАННОЙ ФЛОРЫ.....	653
ОРЛОВА Н.А., КОВНИР С.В., ВОРОБЬЕВ И.И., ГАБИБОВ А.Г., ВОРОБЬЕВ А.И. ВЫСОКОПРОДУКТИВНАЯ ЛИНИИ-ПРОДУЦЕНТ ФАКТОРА СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ VIII ЧЕЛОВЕКА НА ОСНОВЕ ВЕКТОРА С НЕТРАНСЛИРУЕМЫМИ ОБЛАСТЯМИ ГЕНА ФАКТОРА ЭЛОНГАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ 1 АЛЬФА КИТАЙСКОГО ХОМЯЧКА.....	655
ОСТРОУМОВ С.А., КОТЕЛЕВЦЕВ С.В., ГЛАЗЕР В.М., ГОРШКОВА О. М., ГРИЧУК Д.В., ДЕМИНА Л.Л., ЕРМАКОВ В.В., ЖБАНОВ А.Е., ЗАВГОРОДНЯЯ Ю.А., ЗУБКОВА Е.И., ЙОВАНОВИЧ Л., КАМНЕВ А.Н., ЛАЗАРЕВА Е.В., МАТОРИН Д.Н., МАККАТЧЕН С., ПАНИН М.С., ПОКЛОНОВ В.А., САДЧИКОВ А.П., СИЗОВ А.Д., СМУРОВ А.В., СОЛДАТОВ А.А., СОЛОМОНОВА Е.А., ТОДЕРАШ И.К., ТРОПИН И.В., ШЕЛЕЙКОВСКИЙ В.Л., ШЕСТАКОВА Т. В., ШПИГУН О.А. ХИМИКО-БИОТИЧЕСКИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В БИОСФЕРЕ С УЧАСТИЕМ ЗАГРЯЗНЯЮЩИХ ВЕЩЕСТВ, ВКЛЮЧАЯ МЕМБРАНОТРОПНЫЕ И ГЕНОТОКСИЧЕСКИЕ КСЕНОБИОТИКИ, А ТАКЖЕ НАНОМАТЕРИАЛЫ.....	657
ОСТРОУМОВ С.А. НОВОЕ В ИЗУЧЕНИИ ПРОБЛЕМ ЭКОЛОГИИ И БИОЛОГИЧЕСКИХ АСПЕКТОВ НАУК ОБ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ, ВКЛЮЧАЯ ВОПРОСЫ ЭКОБИОТЕХНОЛОГИИ.....	658
ПАВЛОВ В.Г. ПРОИЗВОДСТВО ТЕПЛА И ЭЛЕКТРОЭНЕРГИИ ИЗ ОРГАНИЧЕСКИХ ОТХОДОВ НА КРАЙНЕМ СЕВЕРЕ.....	661
ПАВЛОВА А.П., ПОСТНИКОВА М.В. ПРИМЕНЕНИЕ ЦЕЛЛЮЛОЗНОГО ДРЕВЕСНОГО СЫРЬЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЭТАНОЛА.....	663
ПАВЛОВА А.С., ЗАРЫТОВА В.Ф. КОНЬЮГАТЫ ТРИПЛЕКС-ФОРМИРУЮЩЕГО ОЛИГОНУКЛЕОТИДА С БЛЕОМИЦИНОМ ДЛЯ ПРЯМОГО РАСЩЕПЛЕНИЯ ДВУЦЕПОЧЕЧНОЙ ДНК.....	665
ПАВЛОВА В.А., НЕФЕДЬЕВА Е.Э., ЛЫСАК В.И. ВЛИЯНИЕ ИМПУЛЬСНОГО ДАВЛЕНИЯ НА СОСТОЯНИЕ БИОПОЛИМЕРОВ СЕМЯН.....	666
ПАВЛОВСКАЯ Н.Е., ГОРЬКОВА И.В., ГАГАРИНА И.Н., ГОРЬКОВ А.А., ПОЛЕХИН С.А., КОСТРОМИЧЕВА Е. В., ГАГАРИНА А.Ю. ИНДУЦИРОВАНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ГОРОХА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИМИ ПРЕПАРАТАМИ НА ОСНОВЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ.....	668
ПАВЛОВСКАЯ Н.Е., ГОРЬКОВА И.В., ГАГАРИНА И.Н., ГОРЬКОВ А.А., ПОЛЕХИН С.А., КОСТРОМИЧЕВА Е.В., ГАГАРИНА А.Ю. ФОРМИРОВАНИЕ СОСТАВА ИММУНОКОРРЕКТИРУЮЩИХ БИОПРЕПАРАТОВ.....	669
ПАВЛОВСКАЯ Н.Е., ЮШКОВА Е.И., БОТУЗ Н.И., КУЛЕШОВА Е.С. ПРИРОДНЫЕ СЫРЬЕВЫЕ РЕСУРСЫ ДЛЯ СОЗДАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПРЕПАРАТОВ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ.....	671
ПАНОВА А.А. ВЛИЯНИЕ ИНДИВИДУАЛЬНОГО ОПЫТА НА ЛОКОМОТОРНУЮ АКТИВНОСТЬ И ПОВЕДЕНИЕ УХАЖИВАНИЯ САМЦОВ ДРОЗОФИЛЫ.....	673
ПАНОВА Г.Г., ЧЕРНОУСОВ И.Н., ЖЕЛТОВ Ю.И., СУДАКОВ В.Л., КАНАШ Е.В., КАРМАНОВ И.В., АНИКИНА Л.М., УДАЛОВА О.Р., АЛЕКСАНДРОВ А.В. НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СОЗДАНИЯ АГРОБИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ КОМПЛЕКСОВ ПО КРУГЛОГОДИЧНОМУ РЕСУРСΟΣБЕРЕГАЮЩЕМУ ПРОИЗВОДСТВУ ВЫСОКОКАЧЕСТВЕННОЙ РАСТИТЕЛЬНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	675

ПАНОВА Г.Г., ПОНОМАРЕВА Л.В., СТЕПАНОВА О.А., ЦВЕТКОВА Н.П., АНИКИНА Л.М. ПРИЕМЫ ЭКОЛОГИЧЕСКИ АДАПТИВНОЙ РЕМЕДИАЦИИ ЗАГРЯЗНЕННЫХ ТОКСИКАНТАМИ ЗЕМЕЛЬ.....	677
ПАНТЮХОВ П.В., ЛИХАЧЕВ А.Н., ТЕРТЫШНАЯ Ю.В., ПОПОВ А.А. КОМПОЗИЦИОННЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИ РАЗРУШАЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ. ОСОБЕННОСТИ ВЫБОРА НАПОЛНИТЕЛЕЙ.....	679
ПАРАМОНОВА Н.Ю., ФИРИЧЕНКОВА С.В. АНАЛИЗ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЕНТЕРОБАКТЕРИЙ К АНТИБИОТИКАМ.....	681
ПАРИСЕНКОВА О.В., КОШЕЛЕВА Ю.С., ШАЛИМОВА О.А. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ПИЩЕВОЙ ДОБАВКИ ИЗ ЖМЫХОВ ЦИТРУСОВЫХ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА МЯСНЫХ ПАШТЕТОВ.....	683
ПАХОМОВ Ю.Д., БЛИНКОВА Л.П., СТОЯНОВА Л.Г., АЛЬТШУЛЕР М.Л., ШМЫГАЛЕВА Т.П., НИКИФОРОВА О.В. АНТИБИОТИКИ И НЕКУЛЬТИВИРУЕМЫЕ ФОРМЫ БАКТЕРИЙ.....	685
ПЕРЕТОЛЧИН Д.В., РОГОЖИН В.В. МЕХАНИЗМ РЕАКЦИИ СОВМЕСТНОГО ПЕРОКСИДАЗНОГО ОКИСЛЕНИЯ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА И ФЕРРОЦИАНИДА КАЛИЯ.....	686
ПЕРК А.А. ГУМИНОВЫЕ ПРЕПАРАТЫ МЕРЗЛОТНЫХ САПРОПЕЛЕЙ ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ ЗЕЛЕНОГО ГИДРОПОННОГО КОРМА.....	689
ПЕТЕНКОВА А.А., КОВАЛЕНКО Р.И., ЮСУПОВА Э.Р. ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ТКАНЕВЫХ СИСТЕМ РЕГУЛЯЦИИ СИНТЕЗА ОКСИДА АЗОТА В ПРАВОМ И ЛЕВОМ ЖЕЛУДОЧКАХ СЕРДЦА.....	691
ПЕТРОВ К.А., ПЕРК А.А., ЧЕПАЛОВ В.А. ОСОБЕННОСТИ ЖИРНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА КРИОКОРМОВ, ПОЛУЧЕННЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕСУРСОВ ЕСТЕСТВЕННОГО ХОЛОДА В УСЛОВИЯХ ЯКУТИИ.....	693
ПЕТРОВА И.В., ФАРХУТДИНОВ Р.Р., КАТАЕВ В.А. ИЗУЧЕНИЕ СПЕКТРА АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ УРАЦИЛА IN VITRO.....	695
ПЕХТАШЕВА Е.Л., МАСТАЛЫГИНА Е.Е., ЛУСИНЯН И.В. ПРИМЕНЕНИЕ ОСНОВНЫХ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КЛЕЙКОСТИ ХЛОПКОВОГО ВОЛОКНА И СОПОСТАВЛЕНИЕ ИХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	697
ПИВНЕНКО Т.Н., КОВАЛЕВ Н.Н., МИРОШНИЧЕНКО О.В., ШУТИКОВА А.Л., МЕЛЬНИКОВ В.И. АМИНОКИСЛОТЫ ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ: БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И ПРИМЕНЕНИЕ.....	698
ПИКУЛЕНКО М.М. ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ ПО ПАРАМЕТРАМ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ РАСТЕНИЯ.....	701
ПИСКУРЕВА В.А., ЯКОВЛЕВА И.В. СВЕКЛОВИЧНЫЙ ЖОМ КАК ОСНОВНОЙ ИСТОЧНИК ПЕКТИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ В ОРЛОВСКОЙ ОБЛАСТИ.....	703
ПЛЕХАНОВА А.С., ЕГОРОВА М.А. ИССЛЕДОВАНИЕ АКУСТИЧЕСКОЙ КОММУНИКАЦИИ ДОМОВОЙ МЫШИ (MUS MUSCULUS).....	705
ПЛОТНИКОВА Н.П., КАЗАКОВ Д.А., БОРОВКОВА И.С., ВОЛЬХИН В.В. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНЫХ В ОТНОШЕНИИ МАССОПЕРЕНОСА КИСЛОРОДА СВОЙСТВ ДИСПЕРСНОЙ ТВЕРДОЙ ФАЗЫ.....	707
ПЛЫНСКАЯ Ж.А., ВЕЛИЧКО Н.А. ЕРНЕДРА MONOSPERMA - ПРОДУЦЕНТ ЭКЗОМЕТАБОЛИТОВ.....	709
ПОВАРНИЦЫНА Т.В., МЕЛЬНИК Т.Н., ГЛУХОВ А.С., МЕЛЬНИК Б.С. ИССЛЕДОВАНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ МУТАНТНЫХ ФОРМ GFP.....	710
ПОГОРЕЛЬСКИЙ И.П., ФРОЛОВ Г.А., ЛЕЩЕНКО А.А., ЛАЗЫКИН А.Г., ЛОГВИНОВ С.В. БИОЛОГИЧЕСКАЯ НАПРАВЛЕННОСТЬ ДЕЙСТВИЯ КЛАСТЕРОВ И НАНОРАЗМЕРНЫХ ЧАСТИЦ МЕТАЛЛОВ.....	711
ПОДЧЕРНЯЕВА Р.Я., СУЕТИНА И.А., ГУЩИНА Е.А., ЛОПАТИНА О.А., ОСТРОУМОВ С.А. ПРИМЕНЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ БИОТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И ОЦЕНКИ ТОКСИЧНОСТИ НАНОМАТЕРИАЛОВ.....	713
ПОДЧЕРНЯЕВА Р.Я., СУЕТИНА И.А., ЛОПАТИНА О.А., ДЖОНСОН М.Е., ТАЙСОН ДЖ.Ф., ШИН Б., ОСТРОУМОВ С.А. ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДОВ МЕДИ И ДРУГИХ МЕТАЛЛОВ С БИОЛОГИЧЕСКИМИ ОБЪЕКТАМИ.....	715
ПОЗДИНА С.Ю., ПУНТУС И.Ф., ДЕЛЕГАН Я.А. ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫЕ СВОЙСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ ДЕСТРУКТОРОВ НЕФТЕПРОДУКТОВ.....	717
ПОЗДНЯКОВА Н.В., ЖУРИНА М.В., ПЛАКУНОВ В.К., ЭЛЬ-РЕГИСТАН Г.И. ПОДАВЛЕНИЕ ФОРМИРОВАНИЯ МИКРОБНЫХ БИОПЛЕНК, БИОМЕДИЦИНСКИЙ АСПЕКТ.....	720
ПОЗДЫШЕВА Т.И., ГРЕТЧЕНКО Г.А., ГАРАСЬКО Е.В., МОРЕВ С.И. САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ПИЩЕВОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ.....	722
ПОКЛОНОВ В.А., КОТЕЛЕВЦЕВ С.В., ШЕСТАКОВА Т.В., ШЕЛЕЙКОВСКИЙ В.Л., ОСТРОУМОВ С.А. ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ С ВОДНЫМИ РАСТЕНИЯМИ.....	723

ПОЛИКАРПОВА А.В., СОЛОВЬЕВА В.В. СПЛАЙСОСОМО-ЗАВИСИМЫЙ ТРАНС-СПЛАЙСИНГ НЕБУЛИНА.....	725
ПОЛИЩУК С.Д., НАЗАРОВА А.А. ТОКСИЧНОЕ ДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЦИНКА НА СЕМЕНА И ПРОРОСТКИ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР.....	726
ПОЛИЩУК С.Д., НАЗАРОВА А.А. ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И ПРОДУКТИВНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ РАСТЕНИЙ ПОДСОЛНЕЧНИКА ПРИ ОБРАБОТКЕ СЕМЯН НАНОПОРОШКАМИ КОБАЛЬТА И СМЕСИ КОБАЛЬТА И ЖЕЛЕЗА.....	728
ПОНОМАРЕВ А.П., ГАРАСЬКО Е.В., УРУСОВА Н.А. АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ НАНОБИОТЕХНОЛОГИЙ, СВЯЗАННЫЕ С КАЛЬЦИНИРУЮЩИМИ БИОАГЕНТАМИ.....	729
ПОПКОВ П.Н., ПУШКАРЁВ С.А., КУЧИН И.С., ДУБАСОВ А.Ю., СТАСЮК А.А., ФРАНЦЕВА А.С. МЕТОДОЛОГИЯ ОЦЕНКИ НООТРОПНОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТА GINKGO BILOBA.....	732
ПОПОВ А.А. БИОРАЗЛАГАЕМЫЕ ПОЛИМЕРНЫЕ МАТЕРИАЛЫ. ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ.....	734
ПОПОВ А.Л. ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ЦЕРИЯ, СИНТЕЗИРОВАННЫХ В ОБОЛОЧКЕ ЦИТРАТНЫХ ИОНОВ, НА КУЛЬТУРЕ ПЕРВИЧНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ МЫШИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЙ АРГОНОВОЙ ПЛАЗМЫ.....	734
ПОПОВА А.А., ЛИПАСОВА В.А., ХМЕЛЬ И.А., КОКШАРОВА О.А. БИОЛОГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ЛЕТУЧИХ ВЕЩЕСТВ ПОЧВЕННЫХ БАКТЕРИЙ.....	736
ПРАЗДНОВА Е.В., ЧИСТЯКОВ В.А., ГУТНИКОВА Л.В., САЗЫКИНА М.А., САЗЫКИН И.С. СУПЕРОКСИДУСТРАНЯЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНОГО ПЛАСТОХИНОНА – 10-(6'-ПЛАСТОХИНОНИЛ) ДЕЦИЛТРИФЕНИЛ ФОСФОНИЯ (SKQ1).....	737
ПРОНКИН П.Г., ТАТИКОЛОВ А.С. ОКСАКАРБОЦИАНИНОВЫЕ КРАСИТЕЛИ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ СПЕКТРАЛЬНО-ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ЗОНДЫ ДЛЯ ДНК.....	738
ПРУДНИКОВ П.С. ИДЕНТИФИКАЦИЯ УСТОЙЧИВОСТИ ГЕНОТИПОВ ЯБЛОНИ К МОНИЛИОЗУ НА ОСНОВЕ ИСКУССТВЕННОГО ЗАРАЖЕНИЯ И ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ.....	740
ПРУДНИКОВА Е.Г., ПРУДНИКОВ П.С. ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ ФИТОГОРМОНОВ НА ПРОДУКТИВНОСТЬ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР.....	743
ПРЯДЕХИНА Е.В., ЛАПШИН П.В., ЮРЬЕВА Н.О., ЗАГОСКИНА Н.В. РАСТЕНИЯ КАРТОФЕЛЯ, ТРАНСФОРМИРОВАННЫЕ ГЕНОМ Δ12-АЦИЛ-ЛИПИДНОЙ ДЕСАТУРАЗЫ ЦИАНОБАКТЕРИИ SYNECHOCYSTIS SP.....	745
ПУТИНЦЕВА О.В., АРТЮХОВ В.Г., ВДОВИНА В.А., ЯНЦ М.А. ВЛИЯНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО α _{2b} -ИНТЕРФЕРОНА НА ЭКСПРЕССИЮ CD21 МОЛЕКУЛЯРНОГО КОМПОНЕНТА В- КЛЕТОЧНОГО РЕЦЕПТОРА ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА.....	746
ПУЧКОВА Л.И., АФОНИНА В.С., АНДРЕЕВА И.С. ПОИСК БАКТЕРИЙ - ПРОДУЦЕНТОВ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ НУКЛЕАЗ.....	748
ПУШКАРЁВ С.А., ПОПКОВ П.Н., ДУБАСОВ А.Ю., СТАСЮК А.А., ФРАНЦЕВА А.С., ЧЕРНОВА И.Г., РЯБИНИН В.Е. О ПОЛУЧЕНИИ КУЛЬТУРЫ ГЕПАТОЦИТОВ, ПРИГОДНОЙ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В СИСТЕМЕ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОЙ ДЕТОКСИКАЦИИ КРОВИ «БИОИСКУССТВЕННАЯ ПЕЧЕНЬ».....	750
ПЫШНЫЙ М.Ф., КУЗНЕЦОВ А.А., ПЫШНАЯ С.В. УЛЬТРАЗВУКОВАЯ ВИЗУАЛИЗАЦИЯ МАГНИТНЫХ МИКРООБЪЕКТОВ В МЯГКИХ ТКАНЯХ.....	753
РАДНАГУРУЕВА А.А., ЛАВРЕНТЬЕВА Е.В., БАНЗАРАКЦАЕВА Т.Г., ДУНАЕВСКИЙ Я.Е., НАМСАРАЕВ Б.Б. ПЕПТИДАЗЫ АЛКАЛИФИЛЬНЫХ ТЕРМОТОЛЕРАНТНЫХ БАКТЕРИЙ ТЕРМАЛЬНЫХ ИСТОЧНИКОВ ЗАБАЙКАЛЬЯ.....	755
РАЛДУГИНА Г.Н., МАРЕАЙ М.М., ШУМКОВА Г.А., ГОМАА А.М., БУРМИСТРОВА Н.А., РАДИОНОВ Н.В. ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ РАПСА (<i>Brassica napus</i> L.), ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ ГЕН ТРАНСФАКТОРНОГО БЕЛКА РИСА OSMUVA, ОТЛИЧАЮТСЯ ПОВЫШЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ДЕЙСТВИЮ СОЛЕЙ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ И К ДЕЙСТВИЮ ПОНИЖЕННЫХ ТЕМПЕРАТУР.....	757
РАМАЗАНОВ Р.Р., ЩЁГОЛЕВ Б.Ф., КАСЬЯНЕНКО Н.А. ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ОЦЕНКИ ПРОЦЕССОВ АКВАТАЦИИ КООРДИНАЦИОННЫХ СОЕДИНЕНИЙ ПЛАТИНЫ(II) И ПАЛЛАДИЯ(II).....	759
РАХМАТУЛЛИНА Д.Ф., ОГОРОДНИКОВА Т.И., АЛЯБЬЕВ А.Ю., ПОНОМАРЕВА А.А., АНДРЕЕВА И.Н., КАРИМОВА Ф.Г. ДЕЙСТВИЕ АЗЕЛАЙНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ОБМЕН И УЛЬТРАСТРУКТУРУ КЛЕТОК ПШЕНИЦЫ.....	761
РЕПКОВА М.Н., ЛЕВИНА А.С., ПАВЛОВА А.С., ШАЦКАЯ Н.В., ШИКИНА Н.В., ИСМАГИЛОВ З.Р., БАЙБОРОДИН С.И., ЗАРЫТОВА В.Ф. НАНОРАЗМЕРНАЯ СИСТЕМА ДОСТАВКИ АНТИБИОТИКОВ РЯДА БЛЕОМИЦИНА В КЛЕТКИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ.....	763

РЕПКОВА М.Н., ЛЕВИНА А.С., ИСМАГИЛОВ З.Р., ШИКИНА Н.В., МАЗУРКОВА Н.А., ЗАРЫТОВА В.Ф.	
ПРОТИВОВИРУСНЫЕ СВОЙСТВА НАНОКОМПОЗИТОВ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ТИТАНА, СОДЕРЖАЩИХ АНТИСМЫСЛОВЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ.....	765
РЕПКОВА М.Н., ЛЕВИНА А.С., ИСМАГИЛОВ З.Р., ШИКИНА Н.В., НЕТЕСОВА Н.А., ЕВДОКИМОВ А.А., МАЗУРКОВА Н.А., ЗАГРЕБЕЛЬНЫЙ С.Н., ЗАРЫТОВА В.Ф.	
ПРОТИВОВИРУСНЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ ДЕЗОКСИРИБОЗИМОВ И НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ТИТАНА.....	767
РИНЧИНОВ А.С., ДАНИЛОВА Т.Е., ЦЫРЕНОВ В.Ж.	
ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТИРОВАННОГО НАПИТКА ИЗ RHEUMUNDULATUM L.....	768
РОГАТКИН Д.А., АБАЕВА Л.Ф., ПЕТРИЦКАЯ Е.Н., РУСАНОВА Е.В.	
К ВОПРОСУ О ВЛИЯНИИ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА И НЕКОТОРЫХ МЕДИЦИНСКИХ ПРЕПАРАТОВ СЕРЕБРА НА РОСТ МИКРООРГАНИЗМОВ.....	770
РОГАЧЕВА О.Н., ЩЕГОЛЕВ Б.Ф., СТЕФАНОВ В.Е., МИХАЙЛОВ Г.В., САВВАТЕЕВА-ПОПОВА Е.В.	
ПОСТРОЕНИЕ МОДЕЛИ КОНФОРМАЦИОННОГО ПЕРЕХОДА А-ДОМЕНА РЕГУЛЯТОРНОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ ПРОТЕИНКИНАЗЫ A 1α.....	772
РОГОЖИН В.В.	
ПЕРОКСИДАЗА КАК ГЕНЕРАТОР ВОДЫ В ЗЕРНОВКАХ ПШЕНИЦЫ.....	774
РОГОЖИН Ю.В., РОГОЖИН В.В.	
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОНО-, ДИ- И ТРИКОМПОНЕНТНЫЕ РАСТВОРЫ ДЛЯ КОНСЕРВАЦИИ ЗЕЛЕННОЙ МАССЫ.....	777
РОГОЖИНА Т.В.	
ГЛИЦЕРИН КАК ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЙ КОНСЕРВАНТ БИОГЕННЫХ ТКАНЕЙ.....	779
РОГОЖИНА Т.В., РОГОЖИН В.В.	
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЕРОКСИДАЗЫ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ.....	781
РОДИОНОВ Ю.В.	
ВЛИЯНИЕ НОВОКАИНА НА СОКРАТИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ТРАХЕИ И БРОНХОВ КРЫСЫ И МОРСКОЙ СВИНКИ.....	783
РОМАНОВА И. В., ПЕТРОВСКАЯ Л.Е., ШИНГАРОВА Л.Н., ДОЛГИХ Д.А.	
ПОЛУЧЕНИЕ И АНАЛИЗ КОМБИНАТОРНОЙ БИБЛИОТЕКИ ВАРИАНТОВ ДОМЕНА ФИБРОНЕКТИНА.....	784
РОМАНОВА М.А., МУРЛАЕВА Е.В., ДОЛОТКАЗИНА А.В., АТЫКЯН Н.А., РЕВИН В.В.	
ИЗУЧЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ДРОЖЖЕЙ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА СРЕДЕ С ПОВЫШЕННЫМ ОСМОТИЧЕСКИМ ДАВЛЕНИЕМ.....	786
РУКАВЦОВА Е.Б., ПУЧКО Е.Н., РУДЕНКО Н.В., БУРЬЯНОВ Я.И.	
ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОГЕННОСТИ ПОВЕРХНОСТНОГО АНТИГЕНА ВИРУСА ГЕПАТИТА В, СИНТЕЗИРУЕМОГО БЕЗМАРКЕРНЫМИ ТРАНСГЕННЫМИ РАСТЕНИЯМИ.....	787
РУКАВЦОВА Е.Б., ЛАЗАРЕВА Н.В., БУРЬЯНОВ Я.И.	
ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ С ГЕНОМ СТИЛЬБЕНСИНТАЗЫ ВИНОГРАДА.....	789
РУПОШЕВ А.Р.	
АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ БИОЛОГИЧЕСКОГО СОРТОВЕДЕНИЯ РАСТЕНИЙ.....	790
РЫБНИКОВА Е.И., КОВАЛЕВ Н.Н.	
БАКТЕРИОСТАТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭКСТРАКТА ИЗ КУКУМАРИИ ЯПОНСКОЙ.....	792
РЯБОВА Н.А., МАРЧЕНКОВ В.В., МАРЧЕНКОВА С.Ю., КОТОВА Н.В., СЕЛИВАНОВА О.М., СЕМИСОТНОВ Г.В.	
САМООРГАНИЗАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО ШАПЕРОНА GroEL/ES <i>IN VITRO</i>	794
РЯЗАНЦЕВА И.Н., АНДРЕЕВА И.Н., ОГОРОДНИКОВА Т.И.	
БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ПИГМЕНТЫ – ПЕРСПЕКТИВНЫЕ КРАСИТЕЛИ ПОЛИОЛЕФИНОВ.....	795
РОЗЕНФЕЛЬД М.А., ЛЕОНОВА В.Б., БЫЧКОВА А.В., КОВАРСКИЙ А.Л.	
ВЛИЯНИЕ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ФИБРИНОГЕНА.....	797
САЖИНА Н.Н., МИСИН В.М.	
КОНТРОЛЬ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ АЛКОГОЛЬНЫХ НАПИТКОВ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ.....	798
САЗЫКИН И.С., САЗЫКИНА М.А.	
КОМЕТАБОЛИЗМ СМОЛО-АСФАЛЬТЕНОВОЙ ФРАКЦИИ НЕФТИ НЕКОТОРЫМИ ШТАММАМИ НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ПРИСУТСТВИИ ГЕКСАДЕКАНА.....	801
САЗЫКИН И.С., САЗЫКИНА М.А.	
ОКИСЛЕНИЕ СМОЛО-АСФАЛЬТЕНОВОЙ ФРАКЦИИ НЕФТИ И ГЕКСАДЕКАНА ПЕРОКСИДАЗОЙ ХРЕНА.....	803
САЗЫКИНА М.А., НОВИКОВА Е.М., САЗЫКИН И.С.	
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НОВОГО ВИДА БИОЛЮМИНЕСЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ.....	804
САЗЫКИНА М.А., ЧУГУНОВА Е.А., САЗЫКИН И.С., ГИБАДУЛЛИНА Э.М., БУРИЛОВ А.Р.	
ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРИ ПОМОЩИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ LUX-БИОСЕНСОРОВ.....	806

САЛОВА А.В., ЛЕОНТЬЕВА Е.А., МОЖЕНОК Т.П., КОРНИЛОВА Е.С., КРОЛЕНКО С.А., БЕЛЯЕВА Т.Н.	
АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ПРИМЕНЕНИЯ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ.....	807
САЛОВАРОВА В.П., ЮРИНОВА Г.В., ПРИСТАВКА А.А., БЕРСЕНЕВА О.А.	
ИССЛЕДОВАНИЕ НАНОРАЗМЕРНЫХ СТРУКТУР, УЧАСТВУЮЩИХ В ФОРМИРОВАНИИ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ.....	809
САМКОВ А.А., ВОЛЧЕНКО Н.Н., ХУДОКОРМОВ А.А., КАРАСЕВ С.Г., ОТРОШКО Д.Н., АФАНАСЬЕВА Ю.В., САМКОВА С.М., БАТИНА Е.В., КАРАСЕВА Э.В.	
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ КОМПЛЕКС В СТРУКТУРЕ БИЗНЕС-ИНКУБАТОРА КУБАНСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА.....	811
САМОЙЛОВ И.Б., КУЗНЕЦОВ А.А.	
НОВАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ПЕРЕРАБОТКИ БИОМАСС И АНТРОПОГЕННЫХ УГЛЕВОДОРОДСОЖЕРЖАЩИХ ОТХОДОВ В БИОТОПЛИВО И ХИМИКАТЫ.....	813
САНДАНОВ А.А., ЦЫРЕНОВ В.Ж., ОСТРОВСКИЙ Д.Н.	
О РОЛИ АДЕНИЛАТКИНАЗЫ В SALVAGE СИНТЕЗЕ NAD КОРИНЕФОРМНЫМИ БАКТЕРИЯМИ.....	814
САФОНОВА М.А., КУЗНЕЦОВ О.Ю.	
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОМПЛЕКСА АУТОШТАММОВ БИФИДОБАКТЕРИЙ И ЛАКТОБАЦИЛЛ В КОРРЕКЦИИ ДИЗБАКТЕРИОЗОВ.....	817
САХАРЧУК Т.Н., ПОЛИКСЕНОВА В.Д., ПРАДУН О.М., КАРПИНЧИК Е.В., ТАРАСЕВИЧ В.А.	
ГУАНИДИНСОДЕРЖАЩИЕ ПРЕПАРАТЫ: ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЛЯ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ.....	818
СВЕТЛАКОВА Т.Н., БОРОНИКОВА С.В., БОБОШИНА И.В.	
ДЕТЕКЦИИ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ЗАМЕН (SNP) В ГЕНАХ БИОСИНТЕЗА ЛИГНИНА <i>POPULUS TREMULA</i> L. КАК МОДЕЛЬНАЯ СИСТЕМА МОЛЕКУЛЯРНОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ДЛЯ ОТБОРА ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ ПЛАНТАЦИОННОГО ВЫРАЩИВАНИЯ ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ.....	820
СВЕНСКАЯ Ю.И., СЕВЕРЮХИНА А.Н., БОКОВА Д.А.	
НЕТКАНЫЙ КОМПОЗИТНЫЙ МАТЕРИАЛ ИЗ НАНОВОЛОКОН ХИТОЗАНА И МИКРОКАПСУЛ КАРБОНАТА КАЛЬЦИЯ ДЛЯ КОНТРОЛИРУЕМОЙ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ.....	822
СЕМАШКО Т.В., МИХАЙЛОВА Р.В., ДЕМЕШКО О.Д., УРЕЦКИЙ В.Г., АЛЕХНО В.В., МИХАЛЕНКО Е.В.	
СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БИОСЕНСОРОВ «ГЛЮКОСЕН», ИЗГОТОВЛЕННЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ <i>PENICILLIUM FUNICULOSUM</i> И РАЗЛИЧНЫХ БУФЕРНЫХ СИСТЕМ.....	823
СЕМЕНОВА Е.Ф., ШПИЧКА А.И., МОИСЕЕВА И.Я.	
К ОБОСНОВАНИЮ РАЗРАБОТКИ БИОТЕХНОЛОГИИ ЭРЕМОТЕЦЕВОГО ЭФИРНОГО МАСЛА.....	825
СЕРБА Е.М., РИМАРЕВА Л.В., РАЧКОВ К.В.	
ИНТЕНСИФИКАЦИЯ ПРОЦЕССОВ ПРОРАСТАНИЯ СЕМЯН С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОТХОДОВ ФЕРМЕНТНОГО ПРОИЗВОДСТВА.....	828
СЕРЕБРЯКОВА Л.А., ТЕКУТЬЕВА Л.А., НЕКРАСОВ А.Е.	
ИССЛЕДОВАНИЕ ПОТРЕБИТЕЛЬСКИХ СВОЙСТВ АГРОТЕКСТИЛЬНЫХ НЕТКАНЫХ МАТЕРИАЛОВ ИЗ ВТОРИЧНОГО СЫРЬЯ.....	830
СЕРКОВ И.В., БЕЗУГЛОВ В.В.	
ГИБРИДНЫЕ ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ, СОДЕРЖАЩИЕ ДОНОРЫ ОКСИДА АЗОТА.....	832
СЕРЧЕНЯ Т.С., ЛАВСКАЯ А.С., НЕЧЕСОВА Т.А., СВИРИДОВ О.В.	
АНАЛИТИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОКОЛИЧЕСТВ АЛЬБУМИНА В МОЧЕ ЧЕЛОВЕКА.....	834
СИДОРЧУК Ю.В., ЗАГОРСКАЯ А.А., УВАРОВА Е.А., ДЕЙНЕКО Е.В.	
ВНЕЯДЕРНЫЕ ГЕНОМЫ РАСТЕНИЙ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ СИСТЕМЫ ЭКСПРЕССИИ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ.....	836
СИЗЕНЁВА Е.С., ЩЕННИКОВА А.В., СКРЯБИН К.Г., ШУЛЬГА О.А.	
ГОМЕОЗИСНЫЕ MADS-БЕЛКИ - ГОМОЛОГИ AGAMOUS, ИЗ РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА <i>ASTERACEAE</i> , ИХ РОЛЬ В МОРФОГЕНЕЗЕ РАСТЕНИЙ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ.....	838
СИМОНЕНКО Е.А., ШАЛИМОВА О.А.	
РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ПЛОДОВЫХ НАПОЛНИТЕЛЕЙ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ БЫСТРОПРИГОТОВЛИВАЕМЫХ ПРОДУКТОВ.....	840
СИМОНОВИЧ Е.И., ШИМАНСКАЯ Е.И.	
ПРИМЕНЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ АКТИВИЗАТОРОВ ПОЧВЕННОГО ПЛОДОРОДИЯ, КАК ОДИН ИЗ СПОСОБОВ ЭКОЛОГИЗАЦИИ ЗЕМЛЕДЕЛИЯ НА ЧЕРНОЗЕМАХ ОБЫКНОВЕННЫХ В УСЛОВИЯХ РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ.....	842
СИНЕВА О.Н., ФИЛИПОВА С.Н., СУРГУЧЕВА Н.А., ЕРМАКОВА Е.В., КИСЕЛЕВ М.А., ГАЛАТЕНКО О.А., ТЕРЕХОВА Л.П., ЗАБЕЛИН А.В., ГАЛЬЧЕНКО В.Ф.	
ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ АКТИНОБАКТЕРИЙ.....	844
СИРОТКИН А.С.	
СОВРЕМЕННЫЕ ЭКОБИОТЕХНОЛОГИИ ОЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД.....	845
СИПАЙЛОВА О.Ю., ЛЕБЕДЕВ С.В., НЕСТЕРОВ Д.В.	
МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ СЕЛЕЗЕНКИ КРЫС НА ФОНЕ ВВЕДЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ ЖЕЛЕЗА.....	847

СКЛАДНЕВ Д.А. ПОЛЯРНЫЕ ЛИПИДЫ МЕМБРАН, БИОЛОГИЧЕСКАЯ ЭВОЛЮЦИЯ И ВОЗНИКНОВЕНИЕ АНИБИОТИКОВ.....	849
СКОБЛИКОВ Н.Э., ЗИМИН А.А. ПЛАЗМИДНЫЙ ПРОФИЛЬ ИЗОЛЯТОВ E. COLI КИШЕЧНОГО МИКРОБИОЦЕНОЗА СВИНЕЙ В ОНТОГЕНЕЗЕ.....	851
СЛИВКИН А.И., ЛАПЕНКО В.Л., ПОПОВ В.Н., КОРНИЕНКО С.В., БЕЛЕНОВА А.С. РАЗРАБОТКА ПОЛИМЕРНЫХ КОМПЛЕКСОВ ГИДРАЗИДА ИЗОНИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ, ОБЛАДАЮЩИХ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫМ ДЕЙСТВИЕМ.....	853
СМИРНОВ А.А., ПУТЛЯЕВ Е.В., ЛАЗАРЕВА Е.А. НОВЫЙ ВИРУСНЫЙ ВЕКТОР ДЛЯ ПРОДУКЦИИ БЕЛКОВ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ В РАСТЕНИИ.....	855
СМИРНОВ А.К. ИЗБИРАЕМЫЕ И ЛЕТАЛЬНЫЕ ТЕМПЕРАТУРЫ МОЛОДИ ОКУНЯ (<i>PERCA FLUVIATILIS</i> L.) В ТЕЧЕНИЕ ПЕРВОГО МЕСЯЦА ЖИЗНИ.....	856
СМИРНОВА Т.А. ЗАВИСИМОСТЬ АМПЛИТУДНЫХ ОТНОШЕНИЙ СПЕКТРАЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ ГЛАСНЫХ ОТ ЧАСТОТЫ ОСНОВНОГО ТОНА.....	858
СМОЛЕНСКИЙ И.В. НЕЙРОГОРМОНАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ ФОРМИРОВАНИЯ ПОСТСТРЕССОРНЫХ РАССТРОЙСТВ У ПРЕНАТАЛЬНО СТРЕССИРОВАННЫХ САМЦОВ КРЫС.....	860
СМЕРТИНА Е.С., ФЕДЯНИНА Л.Н., ЛЯХ В.А. ВЛИЯНИЕ ПОБОЧНЫХ ПРОДУКТОВ ПЕРЕРАБОТКИ БУРЫХ ВОДОРОСЛЕЙ НА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ХЛЕБОПЕКАРНЫХ ДРОЖЖЕЙ.....	862
СОВГИР Н.В., ГОЛЕНЧЕНКО С.Г., ПОТАПОВИЧ М.И., ПРОКУЛЕВИЧ В.А. ЭКСПРЕССИЯ ГИБРИДНЫХ АНТИМИКРОБНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В КЛЕТКАХ <i>ESCHERICHIA COLI</i>	864
СОВКОВА И.В. НОВАЯ ГРУППА ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ ЛЕГИОНЕЛЛ.....	866
СОКОЛЕНКО Г.Г. ПОЛУЧЕНИЕ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ СИНБИОТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ БИОТРАНСФОРМАЦИЕЙ ОКАРЫ.....	868
СОКОЛОВ А.Ю., БАРАНОВ Б.А. РАЗРАБОТКА МЕТОДОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НОВЫХ СЫРЬЕВЫХ ИСТОЧНИКОВ В ПИЩЕВОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ.....	870
СОКОЛОВ Л.В. ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИИ ПТИЦ С ПОМОЩЬЮ СОВРЕМЕННОЙ ТЕЛЕМЕТРИИ.....	872
СОКОЛОВА А.В., ЗЕНИН В.В., КАМИНСКАЯ Е.В., МИХАЙЛОВ В.М. СТРУКТУРА НЕЙРОМЫШЕЧНЫХ СОЕДИНЕНИЙ МУТАНТНЫХ МЫШЕЙ MDX ПОСЛЕ ОБЩЕЙ И МЕСТНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ СИНГЕННЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ДИКОГО ТИПА.....	874
СОКОЛОВА В.А., ЧЕРНУХИН В.А., ГОНЧАР Д.А., КИЛЁВА Е.В., ГОЛИКОВА Л.Н., ДЕДКОВ В.С., МИХНЕНКОВА Н.А., ДЕГТЯРЁВ С.Х. НОВАЯ МЕТИЛЗАВИСИМАЯ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ДНК ЭНДОНУКЛЕАЗА MteI РАСЩЕПЛЯЕТ НУКЛЕОТИДНУЮ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ 5'-G(5mC)G(5mC)NG(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)GN(5mC)G(5mC)G-5'.....	876
СОКОЛОВА О.В., РОГОЖИН В.В. РОЛЬ КОМПОНЕНТОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В ПРОРАСТАНИИ ЗЕРНОВОК ПШЕНИЦЫ.....	878
СОЛОВЬЕВА А.И., ВЫСОЦКАЯ О.Н. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ RAPD, ISSR И REMAP МЕТОДОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА РАСТЕНИЙ ЗЕМЛЯНИКИ, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ <i>IN VITRO</i>	880
СОЛОВЬЕВА В.В., РИЗВАНОВ А.А. ЭНДОГЕННЫЙ УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ СОСУДИСТОГО ЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА В КУЛЬТУРЕ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЗАЧАТКОВ ТРЕТЬИХ МОЛЯРОВ ЧЕЛОВЕКА.....	881
СОЛОДОВНИКОВ В.В. МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МИОКАРДА КРЫС В УСЛОВИЯХ ЭМОЦИОНАЛЬНО-БОЛЕВОГО СТРЕССА.....	883
СОЛОМОНОВА Е.А., ОСТРОУМОВ С.А. ВЫЯВЛЕНИЕ ДИАПАЗОНА УСТОЙЧИВОСТИ МАКРОФИТОВ К ЗАГРЯЗНЯЮЩИМ ВЕЩЕСТВАМ КАК ЭЛЕМЕНТ ЭКОБИОТЕХНОЛОГИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФИТОРЕМЕДИАЦИИ.....	884
СОЛОХИНА И.Ю. СКРИНИНГ ГЕНОТИПОВ ОВСА ПОСЕВНОГО НА СОДЕРЖАНИЕ АВЕНАЦИНА.....	886
СОРОКИНА А.Ю., ДУБИНИНА Г.А. РАЗНООБРАЗИЕ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ЛИТОТРОФНЫХ ЖЕЛЕЗОБАКТЕРИЙ И ИХ РАСПРОСТРАНЕНИЕ В ЖЕЛЕЗИСТЫХ ИСТОЧНИКАХ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗИСА.....	888
СОРОКИНА Е.В., АХМАТОВА Н.К., АХМАТОВ Э.А., ХОМЕНКОВ В.Г. ВЛИЯНИЕ ИММУНОТЕРАПИИ ПРЕПАРАТОМ ИММУНОВАК-ВП-4 НА ДИНАМИКУ ЭКСПРЕССИИ TLRs У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ КРАПИВНИЦЕЙ И ПЕРСИСТИРУЮЩЕЙ ГЕРПЕСВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ.....	890
СОРОКИНА Е.В., АХМАТОВА Н.К., АХМАТОВ Э.А. ДИНАМИКА ЭКСПРЕССИИ TLRs У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ КРАПИВНИЦЕЙ С СОПУТСТВУЮЩЕЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ В ХОДЕ ПРОВЕДЕНИЯ ИММУНОТЕРАПИИ ПРЕПАРАТАМИ ИММУНОВАК-ВП-4 И КАГОЦЕЛ.....	891

СОРОКИНА Е.В., МАЖУЛЬ М.М., ЮДИНА Т.П., ДАНИЛОВ В.С. ОЦЕНКА ИСТИННОЙ ТОКСИЧНОСТИ ИОНОВ СЕРЕБРА С ПОМОЩЬЮ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО МЕТОДА НА РЕКОМБИНАНТНОМ ШТАММЕ <i>ESCHERICHIA COLI</i>	892
СТАРСТИНА И.Г., ПОЛИКАРПОВА А.В., СОЛОВЬЕВА В.В., РИЗВАНОВ А.А. ПРИМЕНЕНИЕ ТРАНС-СПЛАЙСИНГА В ТЕРАПИИ ДИСФЕРЛИНОПАТИИ.....	894
СТЕКЛОВ М.Ю., ТАРАРОВ В.И., РОМАНОВ Г.А., МИХАЙЛОВ С.Н. СИНТЕЗ АЗИДОПРОИЗВОДНЫХ ЦИТОКИНИНА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ФОТОАФИННОЙ МОДИФИКАЦИИ.....	896
СТЕПАНОВ А.Е. БИОФАРМАЦЕВТИКА В ДИАГНОСТИКЕ И ТЕРАПИИ РЕДКИХ («ОРФАННЫХ») ЗАБОЛЕВАНИЙ.....	897
СТИГАЙЛО И.Н., ЕГОРОВА З.Е. ПОДБОР КОМПЛЕКСНОЙ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ МАЦЕРАЦИИ ОВОЩНОГО СЫРЬЯ В ПРОИЗВОДСТВЕ СОКОВ ПРЯМОГО ОТЖИМА.....	898
СТРЕЛКОВА И.Ю., БЕЗЛЕПКИН В.Г. РАЗРАБОТКА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И МОНИТОРИНГА ОНКОПАТОЛОГИИ.....	900
СУВОРОВА Е.Е. ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ БОРА, ЖЕЛЕЗА И МЕДИ В ПИТАНИИ РОЗ И УСТОЙЧИВОСТИ К ФИТОПАТОГЕНАМ В УСЛОВИЯХ ЗАЩИЩЕННОГО ГРУНТА.....	902
СУДОРГИНА П.В., САУЛЬСКАЯ Н.Б. НИТРЕРГИЧЕСКАЯ СИСТЕМА ПРИЛЕЖАЩЕГО ЯДРА (N. ACCUMBENS) УЧАСТВУЕТ В ПЕРЕДАЧЕ ВЛИЯНИЙ СТРАХА НА ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЕ ПОВЕДЕНИЕ.....	904
СУЛЬТИМОВА Н.Б., ЛЕВИН П.П. СРАВНЕНИЕ КИНЕТИКИ ОБРАЗОВАНИЯ И ГИБЕЛИ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ ПРОДУКТОВ ПРИ ФОТОЛИЗЕ НАБУМЕТОНА И НАПРОКСЕНА В МИЦЕЛЛЯРНЫХ И БЕЛКОВЫХ ВОДНЫХ СРЕДАХ.....	906
СУЛЬТИМОВА Н.Б., ЛОБАНОВ А.В., ЛЕВИН П.П., РАЗИНА В.С., КОМИССАРОВ Г.Г., МУЗАФАРОВ А.М. ИССЛЕДОВАНИЕ ТРИПЛЕТНЫХ СОСТОЯНИЙ ФТАЛОЦИАНИНОВ НА ПОВЕРХНОСТИ НАНОКРЕМНЕЗЕМА И ГИДРОФИЛЬНЫХ ПОЛИМЕРОВ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ МЕТОДОМ ЛАЗЕРНОГО ФОТОЛИЗА.....	908
СУПОТНИЦКИЙ М.В. ВИЧ/СПИД-ПАНДЕМИЯ КАК ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ ПРОБЛЕМА ЭВОЛЮЦИОННОЙ БИОЛОГИИ.....	910
СУПОТНИЦКИЙ М.В., БОНДАРЕВ В.П. БЕЗОПАСНОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ВАКЦИН СТАВИТ НОВЫЕ ЗАДАЧИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ.....	912
СУРМА С.В., СТЕФАНОВ В.Е., ЩЕГОЛЕВ Б.Ф. МАГНИТОВАКУУМНАЯ БИОЛОГИЯ.....	913
СУХОУ И.Б., ЧИСТЯКОВА О.В., ШИПИЛОВ В.Н., БОНДАРЕВА В.М., ШПАКОВ А.О. ИНСУЛИН И СЕРТОНИН ПРИ ИНТРАНАЗАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ УСТРАНЯЮТ ДЕФИЦИТ ДОЛГОВРЕМЕННОЙ ПАМЯТИ У КРЫС С НЕОНАТАЛЬНЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ.....	916
СЮЙ СЫЦЗИН ОСОБЕННОСТИ ПРОВОДИМОСТИ СЕРДЦА ПРИ РЕАЛИЗАЦИИ НЫРЯТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ У ЧЕЛОВЕКА.....	918
ТАРАСКЕВИЧ М.Р., КУДРЯШОВ В.К., РЕДИКУЛЬЦЕВ Ю.В., ГОЛИЧЕНКОВ В.С., ЗИНОВЬЕВ М.А., БЕЗРУЧКО В.В., СИЗОВ А.Н., УГРАЙЦКИЙ А.А., ШЕВЕЛЕВ Д.А., ШИРШИКОВ Н.В., ЧЕРЕМУХИН В.В. ЭНЕРГОЭФФЕКТИВНОЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОРУДОВАНИЕ НА ОСНОВЕ БИОРЕАКТОРОВ СО СТЕКАЮЩИМИ ПЛЕНКАМИ ДЛЯ ЖИДКОФАЗНЫХ И СОВМЕЩЕННЫХ ПРОЦЕССОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ.....	920
ТАРЛАЧКОВ С.В., ДЬЯЧЕНКО О.В., МАРИНИЧ Д.В., РУДЕНКО Н.В., ШЕВЧУК Т.В., БУРЬЯНОВ Я.И. НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ РАКА.....	922
ТАРТАКОВСКАЯ Д.И. ДРОЖЖЕВАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ТОКСИНА LGT1 <i>L. PNEUMOPHILA</i> И МЕХАНИЗМОВ ТРАНСЛЯЦИИ ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ КЛЕТКИ.....	923
ТАТАРКИН И.В., ДЕМИН Д. В., СЕВОСТЬЯНОВ С.М. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ И СПОСОБОВ УТИЛИЗАЦИИ ОСАДКОВ СТОЧНЫХ ВОД, АДАПТИРОВАННЫХ К РЕАЛЬНЫМ УСЛОВИЯМ МОСКОВСКОЙ И АСТРАХАНСКОЙ ОБЛАСТЕЙ.....	925
ТАТИКОЛОВ А.С., АКИМКИН Т.М., ПРОНКИН П.Г., ПАНОВА И.Г., ШВЕДОВА Л.А., ИЩЕНКО А.А., ЯРМОЛЮК С.М. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЦИАНИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ В КАЧЕСТВЕ ЗОНДОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОМАКРОМОЛЕКУЛ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ.....	927
ТЕПЛЯКОВА Т.В., КОСОГОВА Т.А. ОСОБЕННОСТИ ОТБОРА В КУЛЬТУРУ ЭФФЕКТИВНЫХ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ ШТАММОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ГРИБОВ ИЗ МЕСТООБИТАНИЙ ЮГА ЗАПАДНОЙ СИБИРИ.....	929
ТЕРТЫШНАЯ Ю.В., ПАНТЮХОВ П.В., ШИБРЯЕВА Л.С., ПОПОВ А.А. ИССЛЕДОВАНИЕ ТОНКИХ ПЛЕНОК НА ОСНОВЕ БИОПОЛИМЕРА – ПОЛИ-3-ГИДРОКСИБУТИРАТА.....	931

ТИМОШЕНКО Т.Е. ИЗМЕНЕНИЕ ОБЪЕМА И ФОРМЫ ЖИВЫХ ЭРИТРОЦИТОВ КРЫС ПОД ВЛИЯНИЕМ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ.....	932
ТИМЧЕНКО Л.Д., ГОРЯЙНОВА Е.Г. ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА «БИОРЕГЕНЕРИН-ГЕЛЬ» НА ИНТЕНСИВНОСТЬ РЕГЕНЕРАЦИИ КОЖИ ПРИ РЕЗАННОЙ РАНЕ И ТЕРМИЧЕСКОМ ОЖОГЕ У ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС СТОКА WISTAR	934
ТИХОНОВА Л.А., БЕЛОУШКО Е.Е., КОСЕНКО Е.А., КАМИНСКИЙ Ю.Г. НОВАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ ДЛЯ ДЕТОКСИКАЦИИ АММИАКА.....	936
ТИХОНОВА О.В., ВАСИЛЬЕВА Б.Ф., ЗЕНКОВА В.А., КАТРУХА Г.С., РЕЗНИКОВА М.И., КОРОЛЕВ А.М., ДЬЯКОВ М.Ю., БИЛАНЕНКО Е.Н., КАМЗОЛКИНА О.В., ЕФРЕМЕНКОВА О.В. ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ СВОЙСТВ АСКОМИЦЕТНОГО ГРИБА <i>XYLARIA ACUTA</i>	938
ТКАЧЕНКО О.В., ЛОБАЧЕВ Ю.В., ВСЕЕВА Н.В., МАТОРА Л.Ю., БУРЫГИН Г.Л., ЩЕГОЛЕВ С.Ю. ИЗУЧЕНИЕ РАСТИТЕЛЬНО-МИКРОБНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ КАК НАПРАВЛЕНИЕ АГРОБИОТЕХНОЛОГИИ.....	939
ТРЕТЬЯКОВА И.Н., БАЖИНА Е.В., ИВАНИЦКАЯ А.С., ВОРОШИЛОВА Е.В., ПАК М.Э., ШУВАЕВ Д.Н. БИОТЕХНОЛОГИЯ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ ХВОЙНЫХ, ПРОИЗРАСТАЮЩИХ В СИБИРИ ЧЕРЕЗ СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ.....	940
ТРОШИНА Е.М., ЩЕКУТЬЕВ Г.А. ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ВЫЗВАННЫХ ПОТЕНЦИАЛОВ В ПРОЦЕССЕ ВОССТАНОВЛЕНИЯ БОЛЬНЫХ С НЕЙРОТРАВМОЙ.....	942
ТРУНОВА Л.А., БОЙКО Л.Я., БЕХМЕТЬЕВ Р.Д. ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ ПРЕСТАРТЕРНЫХ КОМБИКОРМОВ ДЛЯ ПОРОСЯТ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРОБИОТИКА СУБТИЛИС.....	944
ТРУС Е.Н., ЕГОРОВА З.Е. ВИДОВАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БАЦИЛЛЯРНОЙ МИКРОБИОТЫ МЯСОРАСТИТЕЛЬНЫХ КОНСЕРВОВ ДЛЯ ДЕТСКОГО ПИТАНИЯ.....	946
ТУХБАТОВА Р.И., ФАТТАХОВА А.Н., АЛИМОВА Ф.К. ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ <i>TRICHODERMA HARZIANUM</i> ИЗ ПОГРЕБЕННЫХ ПОЧВ.....	948
УВАРОВА Е.А., ЗАГОРСКАЯ А.А., БЕЛАВИН П.А., НОСАРЕВА О.В., ТАТЬКОВ С.И., КАКИМЖАНОВА А.А., ДЕЙНЕКО Е.В. АНАЛИЗ ИММУНОГЕННОСТИ ТРАНСГЕННОРЬ МОРКОВИ, ПРОДУЦИРУЮЩЕЙ АНТИГЕНА rESAT6 ИЛИ rCFP10 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ПРИ ОРАЛЬНОЙ ИММУНИЗАЦИИ МЫШЕЙ.....	950
УЛАХАНОВА Д.П., ЖАРИКОВА Г.Г., ЛЕОНОВА И.Б. НАПРАВЛЕНИЯ РАЗВИТИЯ ПИЩЕВОЙ МИКРОБИОЛОГИИ В ЛАБОРАТОРИИ МИКРОБИОЛОГИИ РОССИЙСКОГО ЭКОНОМИЧЕСКОГО УНИВЕРСИТЕТА ИМЕНИ Г.В. ПЛЕХАНОВА.....	952
УСТИНОВА А.А., РЯБИНИН В.Е. СОСТОЯНИЕ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ И ПРОБЛЕМА ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИИ НА ВОСТОЧНО-УРАЛЬСКОМ РАДИОАКТИВНОМ СЛЕДЕ.....	954
УШАКОВА Н.А., АБРАМОВ В.М., ХЛЕБНИКОВ В.С., КУЗНЕЦОВ Б.Б., СЕМЕНОВ А.М., МЕЛЬНИКОВ В.Г. СВОЙСТВА БИОПЛЕНКИ <i>Lactobacillus plantarum</i> , ПОЛУЧЕННОЙ МЕТОДОМ ТВЕРДОФАЗНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ.....	956
УШАКОВА Н.А., АБРАМОВ В.М., ХЛЕБНИКОВ В.С., МЕЛЬНИКОВ В.Г. ПОЛУЧЕНИЕ МЕТОДОМ ТВЕРДОФАЗНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БИОПЛЕНКИ <i>Lactobacillus plantarum</i> 8-RA-3 И ЕЕ СВОЙСТВА.....	957
ФАДЕЕВА Е.О. ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ МИКРОСТРУКТУРЫ КОНТУРНОГО ПЕРА В КОНТЕКСТЕ ПРОБЛЕМЫ ТАКСОНОМИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПТИЦ В ЦЕЛЯХ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ.....	960
ФАРХУТДИНОВ Р.Р. ОКСИДАТИВНЫЙ СТРЕСС, СПОСОБЫ ВЫЯВЛЕНИЯ И КОРРЕКЦИИ.....	961
ФАТЕЕВА Е.В., МОКШИН Е.В., ЕМЕЛЬЯНОВА И.С., ЛУКАТКИН А.С. ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ МИНЕРАЛЬНОЙ ОСНОВЫ СРЕДЫ И ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ПОБЕГООБРАЗОВАНИЕ <i>CYMBIDIUM HYBRIDS</i> В КУЛЬТУРЕ <i>IN VITRO</i>	963
ФЕДОРЕНКО Б.Н. АДАПТАЦИЯ БИОТЕХНИКИ К НАНОМОЛЕКУЛЯРНЫМ БИОМЕМБРАННЫМ ТЕХНОЛОГИЯМ.....	965
ФЕДОРОВА М.С., БАХИРЕВА О.И. ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ОЧИСТКИ ПРИРОДНЫХ ВОД ОТ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ И СТРОНЦИЯ.....	968
ФЕДОТОВА В.Ю., ИСЛАМОВ Р.Р., РИЗВАНОВ А.А. СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ НА ОСНОВЕ АДЕНОВИРУСА ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ НЕЙРОНАЛЬНОЙ МОЛЕКУЛЫ КЛЕТОЧНОЙ АДГЕЗИИ NSAM.....	970

ФЕКЛИСТОВА И.Н., БЕЛЯЕВ С.А. ВЛИЯНИЕ ФЕНАЗИН-1,6-ДИКАРБОКСИЛАТА, СИНТЕЗИРУЕМОГО БАКТЕРИЯМИ <i>P. CHLORORAPHIS</i> КМБУ РНЗ 139, НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ГЛИОМЫ ЧЕЛОВЕКА U-251 MG.....	972
ФЕКЛИСТОВА И.Н., КУЛЕШОВА Ю.М., МАКСИМОВА Н.П. ИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ МЕТАБОЛИТОВ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ РОСТСТИМУЛИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ БИОПРЕПАРАТА СТИМУЛ.....	973
ФИЛИППОВА Е.И., БАРДАШЕВА А.В., ДУРЫМАНОВ А.Г., ТЕПЛЯКОВА Т.В. ГЕМАГГЛЮТИНИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ВОДНЫХ ЭКСТРАКТОВ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ.....	975
ФИЛИППОВА Л.В., БЫКОВА А.А., БЫСТРОВА Е.Ю., НОЗДРАЧЕВ А.Д. РОЛЬ ЭКСПРЕССИИ TLR4 В НЕЙРОНАХ ЭНТЕРАЛЬНОЙ ЧАСТИ МЕТАСИМПАТИЧЕСКОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ КРЫСЫ.....	977
ФРОЛКОВА К.С. ЭНАНТИОСЕЛЕКТИВНАЯ МИКРОБНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ АМИДОВ АРОМАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ.....	979
ХАЗЕЕВА Г.Д., МИРСАЯПОВА И.А. РАЗРАБОТКА ВЫСОКОТЕХНОЛОГИЧНЫХ СПОСОБОВ ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ ВНЕБОЛЬНИЧНЫХ ПНЕВМОНИЙ (ВП).....	981
ХАЛИНА Е.В., ВАРАКИН Е.А., ТУПИН П.А., РУДАКОВА В.А., ЧУХЧИН Д.Г., НОВОЖИЛОВ Е.В. ИЗУЧЕНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ СТОЧНЫХ ВОД ЦЕЛЛЮЛОЗНО-БУМАЖНОГО ПРОИЗВОДСТВА НА ФЕРМЕНТАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ ОЧИСТНЫХ СООРУЖЕНИЙ.....	983
ХАЛТУРИН М.Б. ЭКСПРЕСС КЛАССИФИКАЦИЯ ВОДОЕМОВ КОМПЛЕКСНОГО НАЗНАЧЕНИЯ.....	985
ХАМАШКЕЕВА М.Т., БУБЕЕВ А.Т., ЦЫРЕНОВ В.Ж. СКРИНИНГ ЭФФЕКТИВНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ ЦЕЛЛЮЛАЗ.....	986
ХАХАЛЕВА А.С., СОКОЛОВА Г.Ф. ИЗУЧЕНИЕ ЗАЛЕЖНЫХ ЗЕМЕЛЬ ДЛЯ ВВОДА В СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЙ ОБОРОТ.....	988
ХАЦАЕВА Р.М. РАЗВИТИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ АДАПТАЦИЙ ЖЕЛУДКА САЙГАКА В ПРЕНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ.....	991
ХАШИМОВА З.С., КАХАРОВА К.А., КУЗНЕЦОВА Н.Н. РОЛЬ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР В ИССЛЕДОВАНИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ.....	992
ХОРИН А.Н., НАЗАРЕНКО Л.В. НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ШКОЛЬНОГО ЭКОЛОГИЧЕСКОГО ОБРАЗОВАНИЯ.....	994
ХОЛЯВКА М.Г., КОВАЛЕВА Т.А., ВОЛКОВА С.А., ХРУПИНА Е.А., АРТЮХОВ В.Г. ПОЛУЧЕНИЕ ФРУКТОЗЫ ИЗ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОКАТАЛИЗАТОРА НА ОСНОВЕ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ИНУЛИНАЗЫ.....	996
ХОМУТОВ С.М., ШУТОВ А.А., БИРИХ К., ДОНОВА М.В. ГИДРОКСИЛИРОВАНИЕ ДЕГИДРОЭПИАНДРОСТЕРОНА БАКТЕРИАЛЬНЫМИ ЛАККАЗАМИ.....	998
ХИСАМОВА А.И., ЮГИНА Н.А., МИХАЙЛОВА Е.О., ШУЛАЕВ М.В. АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ГУМИНОВОГО ПРЕПАРАТА НА РОСТ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВХОДЯЩИХ В СОСТАВ МИКРОФЛОРЫ АКТИВНОГО ИЛА.....	1000
ХОХЛОВА И.Ю., ЖДАНОВА О.С., ЧУБИК М.В. ИССЛЕДОВАНИЕ ПИОЦИАНИНА В КАЧЕСТВЕ ПЕРСПЕКТИВНОЙ АНТИБИОТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ.....	1001
ХОХОЛОВ Ю.А., ОЗЕРЕЦКОВСКИЙ Н.А., НИКИТИНА Т.Н., СНЕГИРЕВА И.И., ЗАТОЛОЧИНА К.Э., АЛЕКСИНА С.Г. ОСТИТЫ У ДЕТЕЙ ПОСЛЕ ВАКЦИНАЦИИ ПРОТИВ ТУБЕРКУЛЕЗА, ПРОБЛЕМА И ПУТИ ЕЕ РЕШЕНИЯ.....	1003
ХРАМЕЕВА Н.П. АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА ПИЩЕВЫХ НАПИТКОВ.....	1004
ЦВЕТКОВ Е.А., МАСАЛОВ И.С., ЛОКШИНА Е.И., ВЕСЕЛКИН Н.П. РОЛЬ СЕРОТОНИНА (5-НТ) В МОДУЛЯЦИИ СИНАПТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРОЕКЦИОННЫХ НЕЙРОНОВ ДОРСОЛАТЕРАЛЬНОГО ЯДРА АМИГДАЛЫ (ДЛА) КРЫСЫ.....	1006
ЦИРКУНОВА Ж.Ф., МИХАЙЛОВА Р.В., ШАХНОВИЧ Е.В., ЛОБАНОВ А.Г. ВЛИЯНИЕ ЭТАНОЛА НА БИОСИНТЕЗ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ <i>PENICILLIUM ADAMETZII</i> ЛФ F-2044.1 И <i>P. VARIANS</i> F-102.....	1007
ЧАБАН Н.Г., БУКИН В.И., СТЕПАНОВ А.Е., РАПОПОРТ Л.М., ЦАРИЧЕНКО Д.Г. НОВЫЕ ПОДХОДЫ К СОЗДАНИЮ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ УРОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ.....	1009
ЧЕПИСЮК Н.В. ДВУХКОМПОНЕНТНАЯ СИСТЕМА ВЕКТОРНОЙ ИНТЕГРАЦИИ ДЛЯ КЛОНИРОВАНИЯ В КЛЕТКАХ <i>VACILLUS SUBTILIS</i>	1010
ЧЕРЕВАТЕНКО А.М., ДЬЯЧЕНКО О.В., ТАРЛАЧКОВ С.В., ШЕВЧУК Т.В., ЗАХАРЧЕНКО Н.С., БУРЬЯНОВ Я.И. ТРАНСГЕН-ИНДУЦИРОВАННАЯ АКТИВАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРОГРАММ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К АБИОТИЧЕСКИМ И БИОТИЧЕСКИМ СТРЕССАМ.....	1012
ЧЕРЕВАТЕНКО А.М., ТАРЛАЧКОВ С.В., РУДЕНКО Н.В., ДЬЯЧЕНКО О.В., ШЕВЧУК Т.В. ГЕТЕРОЛОГИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА РАСТИТЕЛЬНОЙ ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ В ЖИВОТНЫХ КЛЕТКАХ.....	1013

ЧЕРЕНКОВ И.А., СЕРГЕЕВ В.Г. БИОСЕНСОР ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ «РЕСПИРАТОРНОГО ВЗРЫВА» ПРИ ФАГОЦИТОЗЕ.....	1015
ЧЕРЕНКОВА Е.Е., ИСЛАМОВ Р.Р., РИЗВАНОВ А.А. МУЛЬТИЦИСТРОННЫЕ ВЕКТОРА ДЛЯ ГЕННОЙ И ГЕННО-КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА.....	1017
ЧЕРЁМИН А.М., КЛОТОВ Б., ИГОНИНА О.Н., ЗАХАРОВА М.В., ШАРИПОВА М.Р. СИСТЕМА ЭКСПРЕССИИ ГЕНА СУБТИЛИЗИНОПОДОБНОЙ ПРОТЕИНАЗЫ <i>BACILLUS PUMILUS</i>	1019
ЧЕРНОВ А.С. ОПИОИДНАЯ И НЕОПИОИДНАЯ РЕЦЕПЦИЯ β -ЭНДОРФИНА В РАННЕМ РАЗВИТИИ ЭМБРИОНОВ МЫШИ В УСЛОВИЯХ <i>IN VITRO</i>	1020
ЧИГЛИНЦЕВА М.Н., КАМЗОЛОВА С.В., МОРГУНОВ И.Г. БИОСИНТЕЗ α -КЕТОГЛУТАРОВОЙ КИСЛОТЫ ИЗ РАПСОВОГО МАСЛА.....	1022
ЧИКУРОВА Е.А., БАСКИНА С.Л. ДЕМОНСТРАЦИЯ АГРЕССИИ И ПОДЧИНЕНИЯ У ТЕЛЯТ КОСТРОМСКОЙ ПОРОДЫ ВО ВРЕМЯ ХЕНДЛИНГА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВОЗРАСТА.....	1023
ЧУБИК М.В., ЧУБИК М.П., ОСИПОВА Н.А. ПЕРСПЕКТИВЫ СОЗДАНИЯ НОВОГО СОРБЕНТНОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ ОЧИСТКИ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ ОТ РАДИОАКТИВНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ.....	1025
ЧУГУНОВ А.О., КОНДРАТЬЕВ М.С., ПРУДЧЕНКО И.А., СУХАНОВА Т.В. ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ СТРУКТУРЫ ДЕЛЬТА-СОН ИНДУЦИРУЮЩЕГО ПЕПТИДА ПРИ РАЗЛИЧНОЙ ИОННОЙ СИЛЕ РАСТВОРА МАТЕМАТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ.....	1027
ЧУПОВ В.С. НЕКОТОРЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ (БИОПОЛИТОЛОГИЧЕСКИЕ) ПРЕДПОСЫЛКИ ФОРМИРОВАНИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ ИДЕИ.....	1029
ЧУПЫРКИНА А.А., ШАМОНОВ Н.А., ЛОБАНОВА Н.В., ФИЛИППОВА Е.А., САУТКИНА Е.Н. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ОЧИСТКИ ИНТЕРФЕРОНА БЕТА-1a ИЗ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ КЛЕТОК СНО.....	1032
ЧУРИЛОВ Г.И., ПОЛИЩУК С.Д., НАЗАРОВА А.А. ОСОБЕННОСТИ МИНЕРАЛЬНОГО ОБМЕНА РАСТЕНИЙ КУКУРУЗЫ В ПРОЦЕССЕ ОНТОГЕНЕЗА ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С НАНОЧАСТИЦАМИ МЕДИ.....	1033
ЧУРИЛОВ Г.И., ПОЛИЩУК С.Д., НАЗАРОВА А.А. АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ РАСТЕНИЙ ПРИ ОБРАБОТКЕ СЕМЯН ТОКСИЧНЫМИ КОНЦЕНТРАЦИЯМИ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК.....	1035
ЧХЕНКЕЛИ В.А., ГОРЯЕВА Н.А. ПРИМЕНЕНИЕ ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ГРИБА – КСИЛОТРОФА РОДА <i>TRAMETES</i> ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ У ЦЫПЛЯТ.....	1037
ЧХЕНКЕЛИ В.А., КАРПОВА Е.А. КОНСТРУИРОВАНИЕ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА ОСНОВЕ ГИДРОЛИЗАТА БИОМАССЫ ГРИБА – ПРОДУЦЕНТА <i>TRAMETES PUBESCENS</i> (<i>SHUMACH.FR.</i>) <i>PILAT</i>	1039
ШАГИМАРДАНОВА Е.И., МАЛИКОВА А.З., ЗАХАРОВ И.С., ГУСЕВ О.А., ОКУДА Т., ШАРИПОВА М.Р. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКРОБНЫХ СИМБИОНТОВ ХИРОНОМИДЫ <i>POLIPEDILUM VANDERPLANKI</i>	1042
ШАМОЛИНА И.И., БЕЛОВА Н.В. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ РАЗРАБОТКИ В ТЕКСТИЛЬНОЙ ОТРАСЛИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ.....	1043
ШАПОШНИКОВ А.В., ШИДЛОВСКИЙ Ю.В. SAYP – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ ФАКТОР ТРАНСКРИПЦИИ ВЫСШИХ ЭУКАРИОТ.....	1045
ШАРАВИН Д.Ю., КОВАЛЕВСКАЯ Н.П. ВЛИЯНИЕ НА РАЗВИТИЕ ПШЕНИЦЫ ФИТОГОРМОНОВ, СИНТЕЗИРУЕМЫХ ГАЛОФИЛЬНЫМИ АЗОТФИКСИРУЮЩИМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ.....	1046
ШАХОВА К.А., КОТЕЛЬНИКОВА Т.В., БАБАЕВ А.А., КОНТОРЩИКОВА Е.Ю., НОВИКОВ Д.В., КАРАУЛОВ А.В., БАРЫШНИКОВ А.Ю., НОВИКОВ В.В. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ ПРОФИЛЬ ПРОТЕОМА КРОВИ ОНКОГИНЕКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ.....	1048
ШЕВЧЕНКО Г.В. ВОЗМОЖНОЕ УЧАСТИЕ ЦИАНОБАКТЕРИЙ В ФОРМИРОВАНИИ ГОРМОНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ РАСТЕНИЙ.....	1050
ШЕСТАКОВА Н.Н., ТИХОНОВ Д.Б., БЕЛИНСКАЯ Д.А., БАРЫГИН О.И., НАГАЕВА Э.И., ВАНЧАКОВА Н.П. СОЗДАНИЕ КОМПЛЕКСНОЙ ПРОТИВОЗУДНОЙ И ПРОТИВОБОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ ДЛЯ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ, ПОЛУЧАЮЩИХ ХРОНИЧЕСКИЙ ГЕМОДИАЛИЗ.....	1052
ШИПИЦИНА А.К., ЧЕРАНЁВА Л.Г. ВЛИЯНИЕ ТИОБАКТЕРИЙ НА ПРОЦЕССЫ ВЫЩЕЛАЧИВАНИЯ В ТЕХНОЛОГИИ УТИЛИЗАЦИИ ЦИНК-МАРГАНЦЕВЫХ ЭЛЕМЕНТОВ ПИТАНИЯ.....	1054
ШИРОКОВ А.В., ЛАСТОЧКИНА О.В., ИЛЬЯСОВА Е.Ю., ПУСЕНКОВА Л.И. ВЫДЕЛЕННЫ НОВЫЕ ШТАММЫ БАКТЕРИЙ, ОКАЗЫВАЮЩИХ СТИМУЛИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ НА РОСТ И РАЗВИТИЕ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ.....	1056

ШКУРАТОВ П.П., ОВЧИННИКОВА С.И. СОВРЕМЕННЫЕ СПОСОБЫ ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЯ КРИЛЕВОЙ МУКИ.....	1058
ШКУРАТОВА Е.Б., МУХИН В.А. ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА АКТИВНОСТЬ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫХ ПРОТЕИНАЗ МОРСКИХ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ БАРЕНЦЕВА МОРЯ.....	1059
ШЛЯХОТКО Е.А., САПУНОВА Л.И. ВЫДЕЛЕНИЕ И СВОЙСТВА ФИТАЗ, ПРОДУЦИРУЕМЫХ ШТАММАМИ Ф-12 И Ф-99 <i>BACILLUS SPECIES</i>	1061
ШПАК А.Б. ИНФОРМАЦИОННО-ИЗМЕРИТЕЛЬНАЯ СИСТЕМА ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ЭКСТРАКЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ.....	1063
ШПАКОВА Е.А., ДЕРКАЧ К.В., ШПАКОВ А.О. ДЕЙСТВИЕ ПЕПТИДА, СООТВЕТСТВУЮЩЕГО ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ 612-627 РЕЦЕПТОРА ТИРЕОТРОПНОГО ГОРМОНА, НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ В ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЕ КРЫС.....	1065
ШЛОТГАУЭР А.А., ГЛУЩЕНКО О.Ю., ПОЛЯКОВ Н.Э., ЛЁШИНА Т.В. ГЛИЦИРРИЗИНОВАЯ КИСЛОТА – ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ.....	1067
ШУБАКОВ А.А., МИХАЙЛОВА Е.А. ОБЩАЯ ХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВОДО- И ЩЕЛОЧЕРАСТВОРИМЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ ГРИБА <i>ASPERGILLUS NIGER</i>	1069
ШУБИНА А.Н., ЕГОРОВА А.А., КИСЕЛЕВ А.В. ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕПТИДНЫХ НОСИТЕЛЕЙ ДЛЯ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В КЛЕТКИ ЭНДОМЕТРИИ И ЭНДОТЕЛИИ.....	1070
ШУЛЬЦ Е.В., ФАРБЕРОВА Е.А. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ЭДТА НА РОСТ И РАЗВИТИЕ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ.....	1072
ШУТОВА В.В., ЛЫЧАГИНА Н.Г., АКСЕНОВА В.Ю., КОТИНА Е.А. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕЛАССЫ В СОСТАВЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ИНОКУЛЯТА ПРОДУЦЕНТА ДЕКСТРАНА.....	1074
ЭЛЬКОНИН Л.А., НОСОВА О.Н., ИТАЛЬЯНСКАЯ Ю.В. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ СОРГО: РЕАЛЬНАЯ ВОЗМОЖНОСТЬ УЛУЧШЕНИЯ ПИТАТЕЛЬНОЙ ЦЕННОСТИ ЗЕРНА ВАЖНЕЙШЕЙ ЗАСУХОУСТОЙЧИВОЙ КУЛЬТУРЫ.....	1076
ЮГИНА Н.А., ХИСАМОВА А.И., АХМАДИЕВА С.В., МИХАЙЛОВА Е.О., ШУЛАЕВ М.В. ВЛИЯНИЕ ГУМИНОВОГО ПРЕПАРАТА НА РОСТ МИКРООРГАНИЗМОВ В ПРОЦЕССЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ОЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД.....	1078
ЮДИНА Н.Ю., АРЛЯПОВ В.А. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ И СОСТАВА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ПРОБ НА РАБОТУ БПК-БИОСЕНСОРА НА ОСНОВЕ ДРОЖЖЕЙ <i>DEBARYOMYCES HANSENI</i> ИММОБИЛИЗОВАННЫХ В МОДИФИЦИРОВАННЫЙ ПОЛИВИНИЛОВЫЙ СПИРТ.....	1079
ЯКУШЕВ А.В. НАВОЗНЫЕ ЧЕРВИ – РЕГУЛЯТОРЫ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ БАКТЕРИЙ В ВЕРМИКОМПОСТАХ.....	1081
ЯСАКОВ Т.Р., ЖАРИКОВА Н.В., КОРОБОВ В.В., ЖУРЕНКО Е.Ю., АНИСИМОВА Л.Г., МАРКУШЕВА Т.В. ПЛАЗМИДЫ ДЕГРАДАЦИИ ХЛОРАРОМАТИЧЕСКИХ КИСЛОТ ДЛЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ.....	1083
АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ	1085

Электронное научное издание
Материалы Международной конференции
БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА

24 мая 2012 г.,
г. Москва
Российский экономический университет
им. Г.В. Плеханова

Редактор *Р.Г. Васильев*

Подготовка оригинал – макета:
АНО "Информационно-аналитический центр медико-социальных проблем"
Компьютерная верстка:
АНО "Информационно-аналитический центр медико-социальных проблем"

Издательство ООО "МАКС Пресс"
Лицензия ИД N 00510 от 01.12.99 г.

119992, ГСП-2, Москва, Ленинские горы, МГУ им. М.В. Ломоносова,
2-й учебный корпус, 527 к.
Тел. 8-495-939-3890, 8-495-939-3891. Тел./Факс 8-495-939-3891