ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ КЛЕТКИ

ОРГАНИЗАЦИЯ И РЕГУЛЯЦИЯ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

ВЫПУСК 27

ВОРОНЕЖ
ООО ИПЦ “Научная Книга”
2025

УДК 577.3
ББК 28.07
О-64

Печатается по решению
Ученого совета медико-биологического факультета
Воронежского государственного университета

Научный редактор
профессор А.Т. Епринцев

О-64 Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов. - Вып. 27 / редкол.: А. Т. Епринцев [и др.]. - Воронеж : Издательско-полиграфический центр «Научная книга», 2025. - 264 с. - ISBN 978-5-4446-2064-9. Тест : непосредственный.

В данном выпуске сборника «Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов» представлены статьи по физико-химической биологии, биофизике, микробиологии. В публикациях содержатся интересные материалы по физиолого-биохимическим и молекулярным исследованиям живых систем. Значительная часть пердставленных в выпуске материалов посвящена изучению особенностей адаптивной реакции клеточного метаболизма к действию факторов различной природы. Результаты исследований получены с применением современных методов, таких как биоинформатика, геномика и протеомика. На наш взгляд, у большинства проведенных исследований хорошие перспективы дальнейшего развития по этим темам.

Статьи, представленные в этом выпуске, открывают перспективы к пониманию особенностей физико-химических проблем биологии. Материалы интересны для биохимиков, физиологов, микробиологов, биофизиков, а также студентов и аспирантов биологических специальностей.

УДК 577.3
ББК 28.07

ISBN 978-5-4446-2064-9

Введение

В 27 выпуске межрегионального научного сборника представлены статьи ученых, проводящих исследования в учебных и научных организациях Москвы, Орла, Воронежа, Ялты и других городов. Особенностями данного выпуска является большое количество статей, подготовленных с использованием современных методом биологии. Значительная доля работ выполнена молодыми авторами (научными сотрудниками, аспирантами, студентами) и направлена на выяснение молекулярно-биохимических механизмов адаптивной реакции клеточного метаболизма к воздействию абиотических факторов. Представленные в сборнике работы посвящены исследованию регуляции метаболических потоков клетки на энзиматическом, транскрипционном и эпигенетическом уровнях.

Авторский коллектив сборника представлен учеными из разных научных учреждений нашей страны и из-за рубежа:

- **Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва**
- **Орловский государственный университет им. И.С. Тургенева, Орел**
- **Воронежский государственный университет, Воронеж**
- **Всероссийский НИИ лесной генетики, селекции и биотехнологии, Воронеж**
- **Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж**
- **Воронежский государственный лесотехнический университет им. Г.Ф. Морозова, Воронеж**
- **Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко, Воронеж**
- **Воронежский государственный педагогический университет, Воронеж**
- **ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии, Воронеж**
- **ФГБУН Никитский ботанический сад – Национальный научный центр, Ялта**
- **ФГАОУ ВО Севастопольский государственный университет, Свастополь**

От имени редакции выражаем благодарность всем авторам, участвовавшим в издании 27 выпуска нашего сборника, посвященного памяти профессора А.А. Землянухина, и приглашаем всех к плодотворному сотрудничеству в будущем при подготовке 28 выпуска сборника.

УДК 581.14

НЕКОТОРЫЕ ИНВАРИАНТЫ ИЛИ БИОЛОГИЧЕСКИЕ КОНСТАНТЫ В ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ РАСТЕНИЙ

Будаговская Н.В.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
E-mail: *postnabu@mail.ru*

Исследовались быстрые ответные ростовые реакции листьев растений овса, ячменя, риса и стеблей гречихи на кратковременное засоление (NaCl), внесение блокатора кальциевых каналов верапамила и антиоксиданта амбиола в корневую зону растений с использованием высокочувствительного метода - лазерной интерференционной ауксанометрии. Отмечена двухфазная адаптивная восстановительная реакция растений – быстрая (мин) и медленная (ч). Обнаружены характерные временные интервалы (инварианты) в ответных реакциях листьев и стеблей исследуемых растений на действие указанных факторов. При измерении скорости роста листьев и водонагнетающей активности корней у экспериментальных растений зарегистрированы колебательные процессы с периодами колебаний около 1 ч и 1 мин. Рассматривается возможность использования понятия «биологические константы» к инвариантным значениям функциональной активности растений.

ВВЕДЕНИЕ

Высшие растения состоят из двух основных структурно-функциональных частей – надземной части и корней. Эти части функционально скоординированы в системе целого растения. Ранее мы обнаружили, что сооотношение структурных и функциональных параметров надземной части и корней представляет собой постоянную величину, которая может быть выражена гармонической пропорцией «золотое сечение» при нормальных условиях выращивания растений и при хорошей адаптации к стресс-факторам [1-3]. Значение «золотого сечения» в структурных и функциональных соотношениях надземной части и корней мы приняли за инвариантное и обозначили как «биологическая константа», понимая некоторую условность такого понятия. Биологические константы в отличие от физических и химических могут иметь некоторый диапазон значений с приближением к конкретному константному, их инвариантность относительна, так как биологические системы функционально динамичны. При нарушении динамической стабильности, например, в условиях сильного стресса биологические системы могут выходить за рамки нормальных параметров функциональной активности и тогда соотношение таких параметров будет отклоняться от «золотой пропорции». Как было отмечено в наших исследованиях, плохая адаптация растений к неблагоприятным факторам среды приводит к нарушению гармонической пропорции [1-3]. Это может иметь практическое значение для оценки стрессоустойчивости растений.

В данной работе основное внимание уделено временным характеристикам функциональной активности растений и выявлению инвариантных значений в этих процессах. Использование высокочувствительного метода - лазерной интерференционной ауксанометрии позволило исследовать быстрые (сек, мин) и более медленные (ч) ответные реакции надземной части на действующие на корневую систему стресс-факторы и биологически-активные вещества на целом растении.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Скорость изменения линейных размеров листьев и стеблей растений измеряли с помощью лазерного интерференционного ауксанометра ЛИНА-ЭМЗД (Россия) в непрерывном режиме в течение нескольких часов (время проведения эксперимента). Исследование быстрых ответных реакций растений (сек, мин, ч) на действующий стресс-фактор или биологические активные соединения проводили по разработанной ранее методике [3]. Растения выращивали в почве или песке в чашках Петри диаметром 5 см, поливали водопроводной водой. Во время эксперимента раствор NaCl (800 мМ) вносили порциями по 0,5 мл и 1 мл в корневую зону растений (водный раствор, песок или почву). Верапамил вносили в зону корней до конечной концентрации 1,5 мМ и 6 мМ, амбиол – 0,01 мМ. Эксперименты проводили при температуре 20–23^{o}C и влажности воздуха 60%.

Водонагнетающую активность корней оценивали по интенсивности экссудации, которую определяли по методу Anderson и House [4] с некоторыми модификациями на изолированных корнях (пятисантиметровая апикальная часть) 6-дневных проростков, помещенных в водопроводную воду. Измерения проводили с интервалом в 20 мин в течение нескольких часов при 30°С, применялось термостатирование. Биологическая повторность опытов шестикратная. На графиках представлены типичные результаты опытов на индивидуальных корнях.

Объектами исследования являлись растения овса сорта «Горизонт», ячменя сорта «Ауксиняй», риса сорта «Суксианген», гречихи сорта «Молва», кукурузы гибрида «Пионер».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Рис. 1-5 демонстрируют быстрые ответные реакции растений на внесение в корневую зону NaCl, блокатора кальциевых каналов верапамила и антиоксиданта амбиола. На рис. 1 показано изменение скорости роста 2-го листа растения овса после добавление NaCl в зону корней. Можно видеть, что после внесения NaCl в корневую зону, рост листа прекращается и отмечается сжатие его тканей (отрицательная область координат) вследствие оттока воды, вызванного повышением концентрации NaCl в наружной среде. Через 2,5 ч после добавления NaCl началось восстановление скорости роста листа и в течение 1 ч скорость роста листа достигла половины исходной (до внесения NaCl) скорости роста. Аналогичная двухфазная (быстрая – мин и более медленная – ч) ответная реакция на кратковременное засоление наблюдалась также в экспериментах с растеними ячменя: снижение скорости роста 2-го листа после внесения NaCl и через 2,5 ч начало восстановления, через 1 ч скорость роста вышла на стационарный уровень, равный половине начальной скорости (до добавления NaCl) (рис. 2). Временной интервал в 2,5 ч, по-видимому, необходим для реализации адаптивных процессов, связанных с биосинтезом *de novo* протекторных соединений, в частности, осмопротектора глицинбетаина, образующегося в растениях ячменя в условиях засоления [5]. Подтверждением этому могут быть эксперименты с растениями риса. У растений риса, неспособных к образованию глицинбетаина [6], не наблюдалось подобное растениям овса и ячменя адаптивное восстановление скорости роста листьев после внесения NaCl в зону корней. Растения риса проявляли более низкую солеустойчивость по сравнению с растениями овса и ячменя, рост листьев у них прекращался даже при более низких концентрациях NaCl в зоне корней, чем в экспериментах с растениями овса и ячменя [7]. Внесение экзогенного глицинбетаина в корневую зону растений риса повышало их устойчивость к засолению [7].

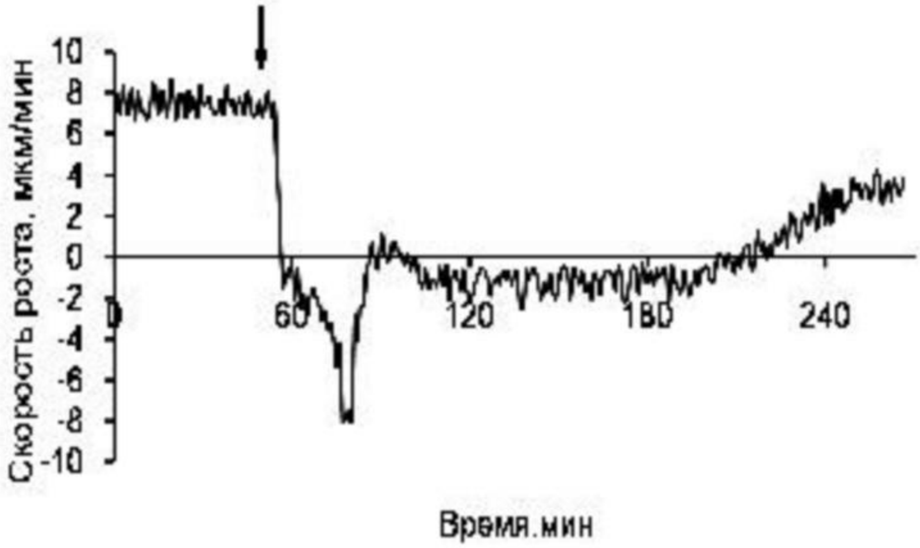


Рис. 1. Влияние NaCl (80 мМ) на скорость роста 2-го листа 21-дневного растения овса, ↓- момент добавления NaCl в корневую зону (водный раствор).

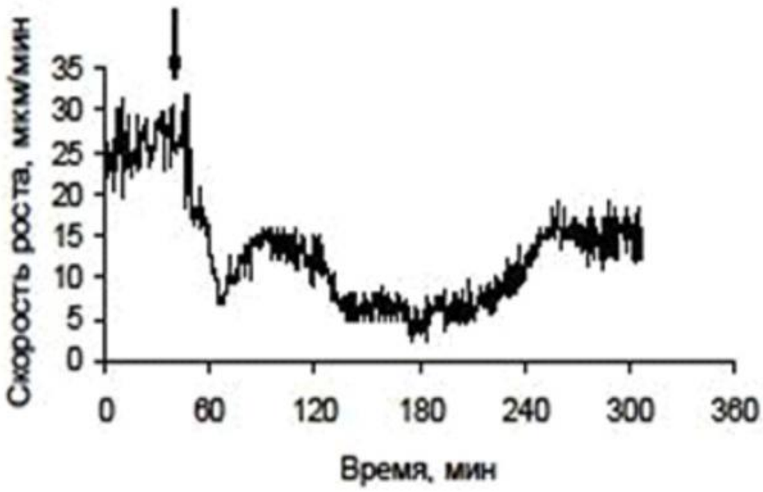


Рис. 2. Влияние NaCl (100 мМ) на скорость роста 2-го листа 12-дневного растения ячменя, - ↓ момент добавления NaCl в корневую зону (песок).

Другим примером восстановительных реакций растений могут быть результаты экспериментов по действию блокатора кальциевых каналов верапамила на скорость роста растений. На рис. 3 отражено изменение скорости роста 2-го листа растения риса после внесения верапамила в корневую зону. Скорость роста листа после добавления верапамила снизилась и восстановление ее началось через 3 ч. При более высоких концентрациях верапамила рост листьев растений риса прекращался и восстановление не наблюдалось.

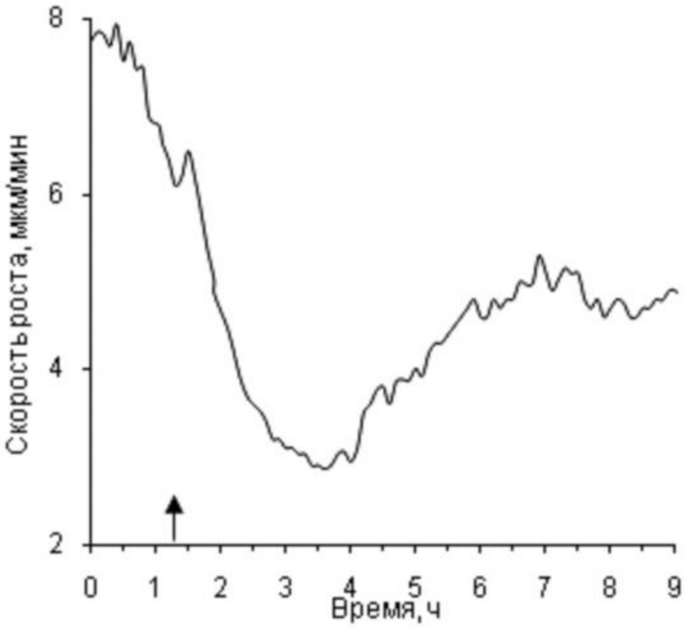


Рис. 3. Влияние верапамила (1,5 мМ) на скорость роста 2-го листа 20-дневного растения риса. ё⁚- момент внесения верапамила в корневую зону (песок).

У растений гречихи исследовали влияние верапамила на скорость роста стебля. Верапамил приводил к снижению скорости роста стебля, но через 2 ч начиналось увеличение скорости его роста, включались восстановительные процессы (рис. 4).

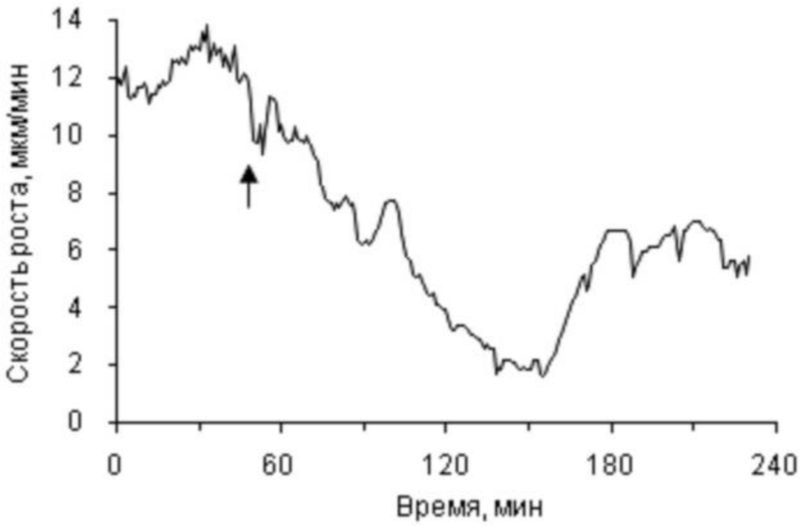


Рис. 4. Влияние верапамила (6 мМ) на скорость роста стебля 12-дневного растения гречихи. ё - момент внесения верапамила в корневую зону (песок).

На рис. 5 показано изменение скорости роста 2-го листа растения овса после добавления антиоксиданта амбиола в корневую зону. Отмечена двухфазная (быстрая – мин и медленная – ч) ответная реакция листа на внесение амбиола. Быстрая фаза увеличения линейных размеров листа может быть связана с гидродинамическим эффектом – усилением транспорта воды из корней в лист, вызванным амбиолом и, вследствие этого, повышением тургора тканей листа и их растяжением. Кроме того, возможно, амбиол непосредственно влияет на растяжимость тканей. Стимуляторы роста, изменяя ориентацию микротрубочек цитоскелета, делают оболочки клеток более растяжимыми [8]. Возможно, это происходит при действии на растения амбиола, что может приводить к быстрому увеличению линейных размеров листа. Более медленное увеличение скорости роста листа прослеживалось через 2 ч 50 мин после добавления амбиола. Медленная фаза увеличения скорости роста листа может быть индуцирована метаболическими изменениями, связанными с экспрессией генов и биосинтезами *de novo*, что способствует повышению скорости роста листа. Интервал времени около 3 ч от момента добавления амбиола до начала медленной фазы был необходим для таких изменений.

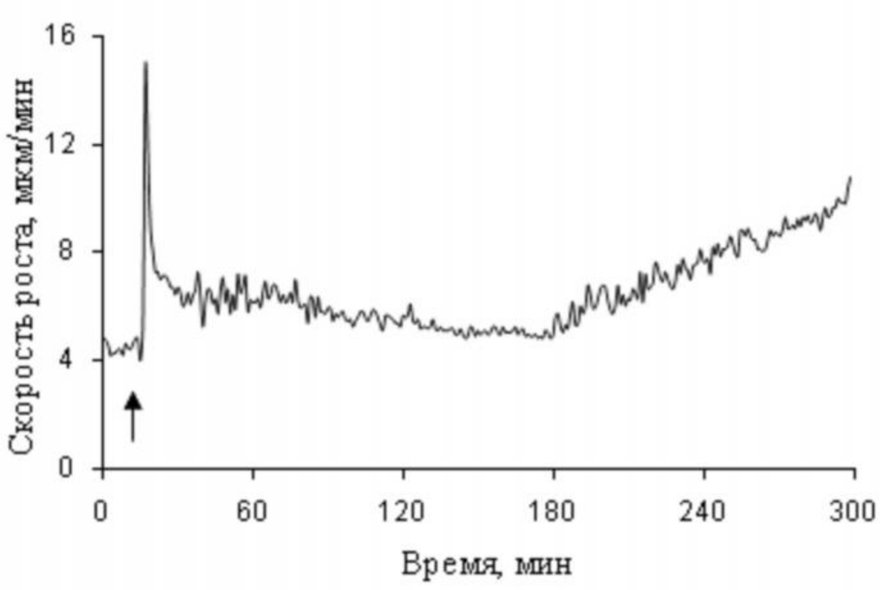


Рис. 5. Влияние амбиола (0,01 мМ) на скорость роста 2-го листа 9-дневного растения овса. ё፡- момент добавления амбиола в корневую зону (песок).

Повышение скорости роста листа в результате медленной фазы оказалось более значительным и устойчивым, чем при быстрой фазе, достигнутый уровень скорости роста сохранялся в последующие 4 дня, далее измерения не проводились. Двухфазная (быстрая – мин и медленная – ч) ответная реакция листьев на внесение амбиола в корневую зону показана также в наших экспериментах с растениями пшеницы и риса. При этом временной интервал от момента внесения амбиола до начала медленной восстановительной реакции составлял около 3 ч, как и для растений овса.

На основании представленных выше результатов экспериментов следует отметить, что восстановительный период скорости роста листьев и стеблей растений в ходе медленной фазы ответной реакции на действующие факторы разной природы (NaCl, блокатор кальциевых каналов, антиоксидант) начинается через 2-3 ч после внесения этих веществ в зону корней. По-видимому, это время требуется для развертывания адаптационных процессов, связанных с синтезами *de novo* протекторных и других соединений и метаболических перестроек для перехода на новый функциональный уровень. Этот временной интервал можно отнести к инвариантным значениям, так как он был отмечен у разных растений и при использовании разных действующих факторов.

Далее рассмотрим некоторые устойчивые параметры в таких динамических процессах как колебательные. На рис. 6 и 7 представлены графики изменения интенсивности экссудации корней кукурузы во времени, характеризующие пульсирующий характер водонагнетающей активности корней. Несмотря на то, что опыты проводились в разные дни и на корнях разных растений, полученные результаты схожи: процессы экссудации имеют колебательный характер, колебания хорошо выражены, имеют околочасовой период. Период колебаний транспорта воды в корнях можно считать определенным фиксированным значением, инвариантным.

Другие примеры инвариантности периодов колебаний функциональной активности растений представлены на рис. 8-11. При измерении скорости роста 3-го листа растения риса были зарегистрированы высокоамплитудные низкочастотные колебания с околочасовым периодом (рис. 8). Такие колебания были получены при последовательном добавлении воды и NaCl в корневую зону растения. Засоление вызвало отток воды из корня в наружное пространство и за этим последовал отток воды из листа и его сжатие (отрицательные значения на графике), так как уменьшилась водонагнетающая активность корня. Засоление снижает водонагнетающую активность корней [9]. Растение стремится сохранить водный статус листа и закрывает устьица. В системе корень – стебель - лист - устьичный аппарат могут возникнуть колебания водного потока при нарушении функциональной стабильности, вызванной добавлением NaCl в зону корней. В приведенном эксперименте высокоамплитудные колебания длились 2 часа, после постепенного затухания таких колебаний установилось динамическое равновесие и скорость роста листа приблизилась к исходной (до добавлении NaCl) скорости роста. В растении произошла адаптация к новым условиям – повышению концентрации NaCl.

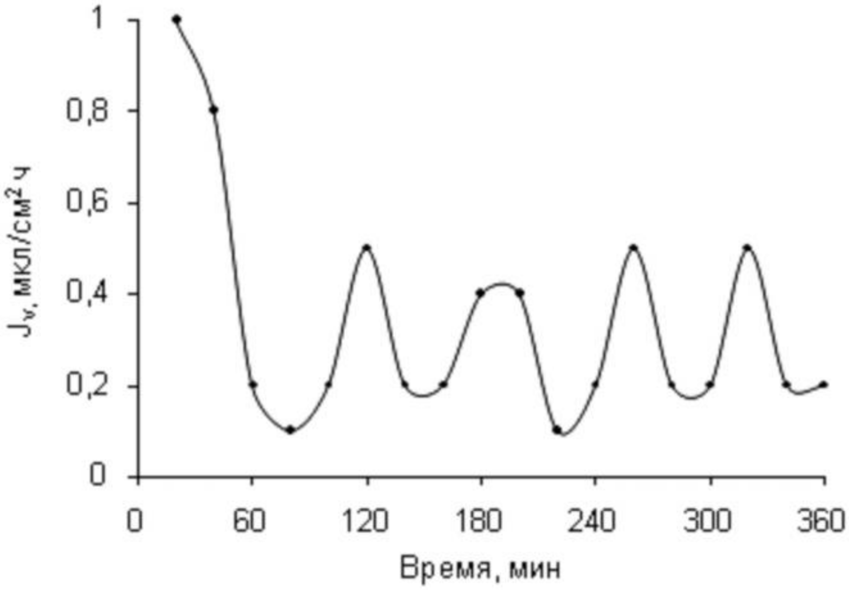


Рис. 6. Интенсивность экссудации корня растения кукурузы № 1.

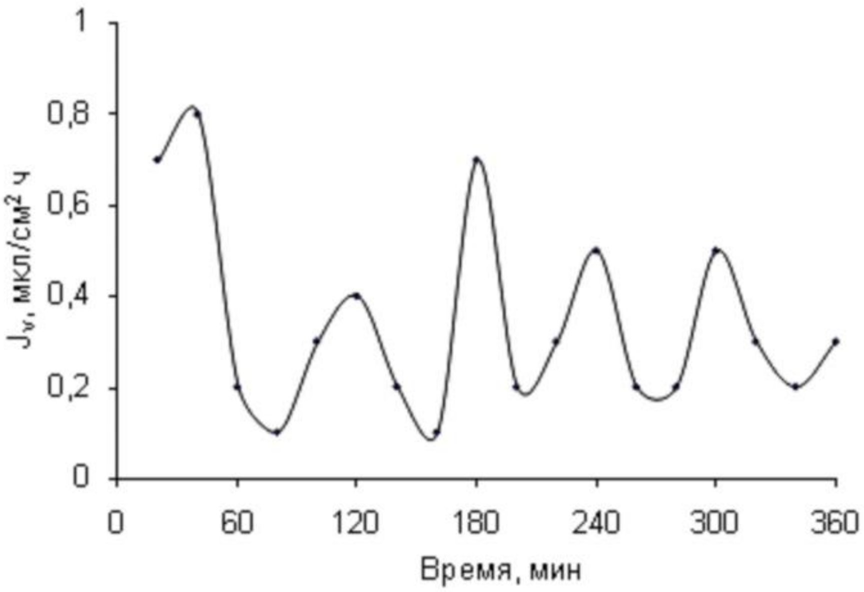


Рис. 7. Интенсивность экссудации корня растения кукурузы № 2.

Индуцированные внешними факторами высокоамплитудные низкочастотные затухающие колебания были отмечены также при измерении скорости роста 2-го листа ячменя (рис. 10). В данном случае они были вызваны добавлением NaCl в корневую зону и последующим отмыванием корней от раствора соли. Также, как и в предыдущем случае, они имели околочасовой период и также были затухающими, продлились 2 ч, как и колебания на рис. 8.

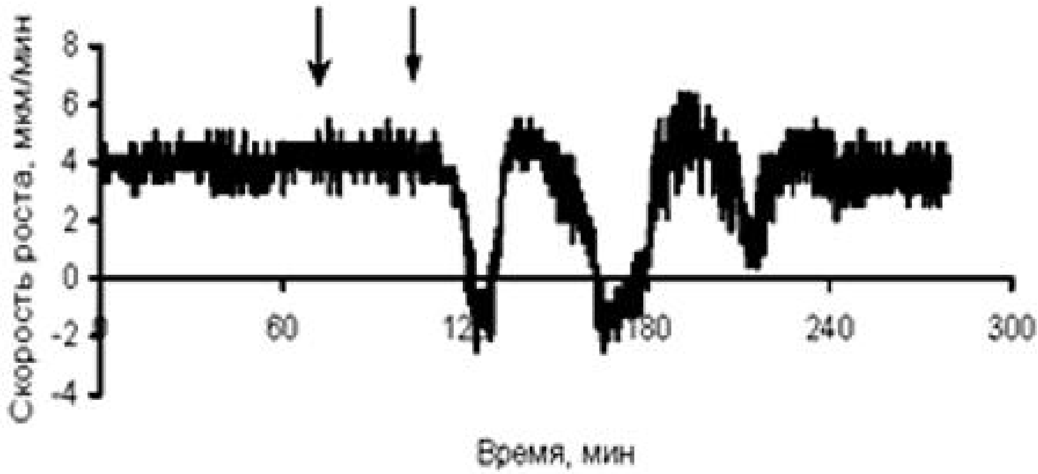


Рис. 8. Колебание скорости роста 3-го листа 16-дневного растения риса, ↓ – момент добавления 1 мл воды, ↓ – момент добавления NaCl (0,5 мл, 800 мМ) в корневую зону (почва).

Помимо высокоамплитудных колебаний с периодом около часа, при измерении скорости роста листьев отмечены низкоамплитудные высокочастотные колебания с периодом менее 1 мин (рис. 9 и 11). Такие колебания фиксируются постоянно при измерении скорости роста растений, они проявляются и при возникновении индуцированных колебаний с периодом около 1 ч.

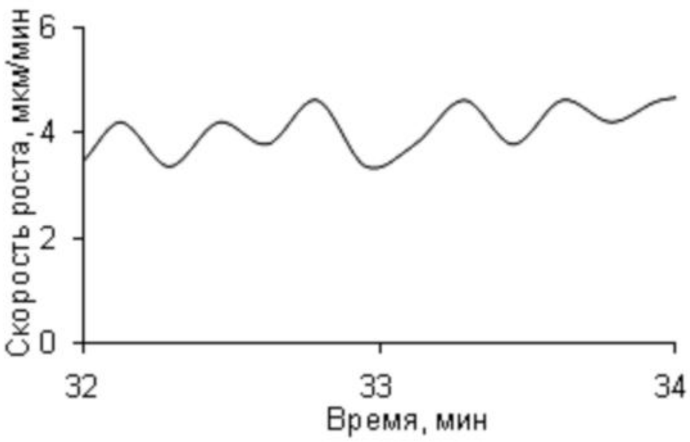


Рис. 9. Фрагмент рис.8.

Рост растяжением связан с транспортом воды в растении и колебания с периодом меньше 1 мин могут отражать транспорт воды на клеточном уровне, в то время как колебания с периодом около 1 ч могут быть связаны с транспортом воды на уровне целого растения (корень – стебель - листья).

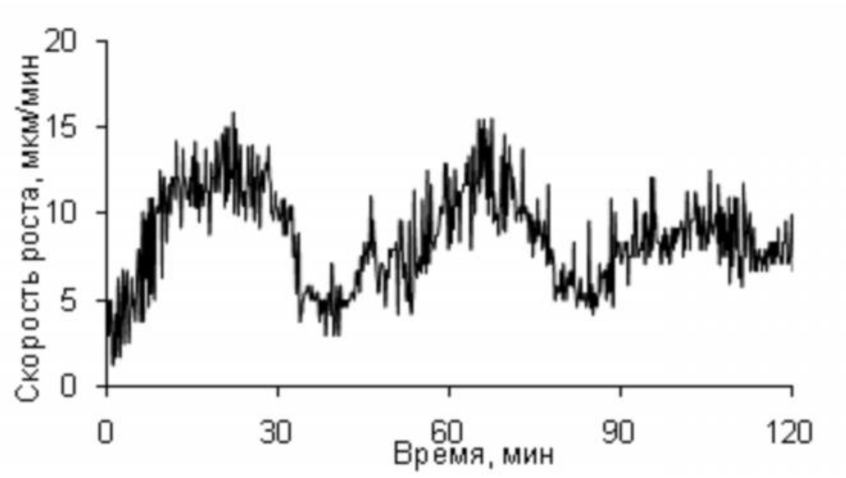


Рис. 10. Колебания скорости роста 2-го листа 15-дневного растения ячменя. Измерению скорости роста листа предшествовало двукратное добавление NaCl (1,0 мл, 800 мМ) в корневую зону (песок) с последующим отмыванием корней от NaCl.

Важно отметить, что низкоамплитудные высокочастотные колебания имеют подобные характеристики у разных растений: рис, ячмень (рис. 7 и 11) и гречиха [10], периоды таких колебаний близки и соответствуют значениям менее 1 мин. Это позволяет отнести их к инвариантным значениям.

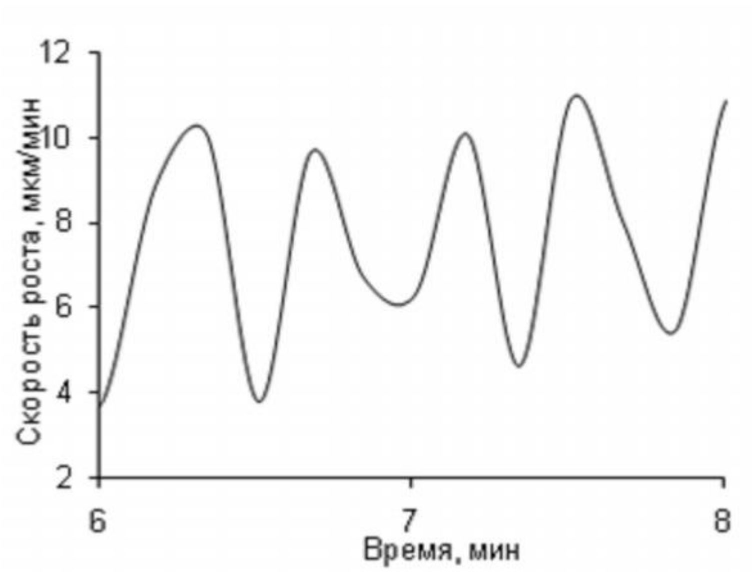


Рис. 11. Фрагмент рис.10.

Различия в амплитудах колебаний у растений риса и ячменя (рис. 9 и 11) могут быть объяснены разной степенью жесткости их тканей и, соответственно, различиями в их растяжимости. Рис относится к растениям-аккумуляторам кремния, клеточные стенки его армированы кремнием, утолщены, что повышает их прочность [11]. Однако это делает ткани риса менее эластичными в отличие от тканей ячменя, которые содержат меньше кремния.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании рассмотренных в данной работе динамических характеристик функциональной активности растений (овес, ячмень, рис, гречиха) были выделены некоторые временные инвариантные значения, типичные для всех опытных растений. При исследовании влияния факторов разной природы (NaCl, блокатор кальциевых каналов верапамил, антиоксидант амбиол), добавленных в корневую зону растений, на скорость роста растений были зарегистрированы быстрые (мин) и более медленные (ч) ответные реакции листьев и стеблей, связанные с быстрыми процессами (ионная и гидродинамическая регуляция) и медленными (адаптивная настройка метаболизма с участием синтезов *de novo* протекторных и других соединений). Временной интервал от момента внесения каждого из действующих факторов (NaCl, верапамил, амбиол) до начала повышения скорости роста листьев составлял 2-3 ч для всех исследуемых растений. В случае засоления и действия блокатора кальциевых каналов это был восстановительный адаптационный период после снижения скорости роста листьев и стеблей. В случае действия антиоксиданта такой временной интервал требовался для устойчивой стимуляции ростовых процессов, связанной с активацией экспрессии генов и синтезов *de novo* необходимых веществ. Быстрая и кратковременная стимуляция роста листьев происходила сразу после внесения антиоксиданта в зону корней.

Временной показатель 2-3 ч можно отнести к временным инвариантам. Этот временной интервал определяет реактивность растений в ответных реакциях на действие используемых экзогенных факторов.

Экспериментально зафиксированные колебательные процессы транспорта воды и роста листьев у всех исследованных растений имели основные периоды колебаний около 1 ч и 1 мин. Периоды колебательных процессов можно считать инвариантными, так как они типичны для разных растений. Помимо этого, время индуцированных колебаний от момента начала до затухания – 2 ч также можно отнести к инвариантным, оно было отмечено у разных растений.

Инвариантные значения функциональной активности растений выражают ее стабильность, несмотря на высокую динамичность отдельных процессов. Временная согласованность процессов и их пространственная упорядоченность создают условия для эффективной регуляции функциональной активности в системе целого растения. Функциональная стабильность растений обусловлена скоординированностью физиологических процессов на уровне разных подсистем (иерархическая соподчиненность). Временная организация процессов, включая согласование ритмов колебательных процессов (частот или периодов колебаний) обеспечивает динамическую устойчивость функциональной активности растительного организма и проявляется в существовании инвариантных значений или «биологических констант». Возможные отклонения от инвариантных значений могут свидетельствовать о плохой адаптации растений к стресс-факторам и это имеет диагностическое значение. Плохая адаптация растений к неблагоприятным условиям среды делает их нежизнеспособными. В связи с этим правомерно говорить о наличии инвариантных значений или «биологических констант» у здоровых растений, имеющих функциональную стабильность и высокую жизнеспособность. Биологические константы имеют свои особенности, они свойственны только живым организмам с их упорядоченной динамикой функциональной активности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Budagovskaya, N.V. “Golden section” in proportions of structural and functional parameters of photoautotrophic and heterotrophic organs and whole plant as an index of harmonic development //Plant Physiol. Biochem. – 1996 - sp. issue: SO4-2.
2. Budagovskaya, N.V. Golden section in structure-functional organization of plants //Biophotonics and Coherent Systems, L., Belousov, F-A., Pop, V., Voeikov, and R., van Wijk, (Eds.), Moscow University Press, Moscow, - 2000 - P. 67-74.
3. Budagovskaya, N.V., Interaction of plant shoots and roots: dynamics and stability //Biophotonics and Coherent Systems, Belousov L.V., Voeikov V.L., Martinuik V., (Eds.), Springer. - New-York, - 2007. - P. 213-223.

4. Anderson W.P., House C.R . A correlation between structure and function in the root *Zea mays* L. // J. Exp. Bot. 1967, vol. 18, p. 544-555.
5. Hattori T., Mitsuya S., Fujiwara T., Jagendorf A.T. , Takabe T. Tissue specificity of glycinebetaine synthesis in barley. //Plant Science – 2009 – V. 175 – P. 112-118.
6.. Rathinasabapathi R., Gage, D.A., Mackill, D.J., and Hanson, A.W. Cultivated and wild rice do not accumulate glycinebetaine due to deficiences in two biosynthetic steps. // Photosynth. Res. 1993. - V. 33, - P. 534–538.
7. Будаговская Н.В. Быстрые ответные реакции растений на засоление как диагностический показатель солеустойчивости // Актуальная биотехнология, - 2018. - № 3, - С. 217-219.
8. Васильев А.В. Сравнительная структурно-функциональная характеристика цитоскелета животных и высших растений // Журнал общей биологии. - 1996. - Т. 57, С. 293-325.
9. Будаговская Н.В. Колебательные процессы как динамический язык коммуникации и способ регуляции в целом растительном организме. // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: сб. науч. тр. - Воронеж: Центрально-Черноземное книжное изд-во. - 2024. - С. 4-15.
10. Будаговская Н.В. Изменение колебательного режима скорости роста и тургора растений гречихи после внесения хлористого натрия в корневую зону. //Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: сб. науч. тр. - Воронеж: Центрально-Черноземное книжное изд-во. - 2022. - С. 4-9.
11. Yoshida S. Fundamentals of rice crop science. // International Rice Research Institute, - Los Banos, Laguna, Philippines, - 1981. – 269 p.

ХЕМОЛИТОТРОФИЯ БАКТЕРИЙ *SPHAEROTILUS MOBILIS* FEOX-1 С УЧАСТИЕМ МАРГАНЦА

Алёмова А.С., Зеленин И.С., Конарева К.А., Новикова П.А., Грабович М.Ю.

Воронежский государственный университет, Воронеж

E-mail: *simacoffee@mail.ru*

Важную роль в биогеохимическом цикле марганца играют прокариоты, способные использовать реакции окисления и восстановления марганца в процессах своей жизнедеятельности. Впервые в ходе работы была показана способность бактерий *Sphaerotilus mobilis* Feox-1 к росту в присутствие марганца в качестве донора электронов. Изучена роль мультимедной оксидазы *mofA* в процессах окисления марганца.

ВВЕДЕНИЕ

Различные соединения марганца оказывают существенное влияние на здоровье человека и экосистемы. Комплексы Mn (III) и оксиды марганца (III, IV) являются одними из сильнейших окислителей на нашей планете, при определенных условиях конкурируя с кислородом, что придает им уникальную способность разлагать даже самые стойкие формы углерода и окислять токсичные вещества, а также органические и неорганические соединения. Изучение процессов круговорота Mn имеет широкие экологическое, геобиологическое, промышленное и медицинское значение. Важную роль в окислительно-восстановительных реакциях марганца играют прокариоты. Бактерии контролируют некоторые процессы круговорота марганца и образование оксидов марганца в разнообразных экосистемах, как естественных, так и искусственных [2]. Окисление марганца прокариотами может проходить при участии ферментов – мультимедных оксидаз, одной из которых является MofA у некоторых бактерий рода *Sphaerotilus*, предположительно использующих марганец в качестве донора электронов при литотрофном росте. Одним из доказательств литотрофии с участием марганца может быть доказательство сопряженности процесса окисления марганца (II) с функционированием ЭТЦ. В частности, ингибитором терминального участка дыхательной цепи бактерий может выступать азид натрия в определённой концентрации, при которой культура не погибает, однако интенсивность процессов окисления марганца (II) замедляется [1].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование. Объектом исследования служила бактерия из рода *Sphaerotilus* – *S. mobilis* Feox-1. Для культивирования использовали среду следующего минерального состава (г/л): пептон – 0,25; дрожжевой экстракт – 0,25; $MgSO_4*7H_2O$ – 0,1; $CaCl_2$ – 0,05; $MnSO_4*5H_2O$ – 0,05; вода дистиллированная – 1 л; стандартный набор витаминов 1 мл/л (B12, B1) и микроэлементов 1 мл/л [3]. Бактерии культивировали в флаконах под ватными пробками в течение 4 суток на жидкой питательной среде указанного состава при температуре 27^{o}C с 10 мМ раствором азида натрия и без его добавления. Также для определения влияния меди на скорость окисления марганца после автоклавирования в среду вносили раствор меди в разных концентрациях (мкМ) – 0,05; 0,1; 0,15. Добавление меди в больших концентрациях ингибировало рост клеток.

Анализ превращения марганца (II). Образование оксидов марганца (IV) определяли при помощи качественной реакции с бензидином. Изменение концентрации двухвалентного марганца определяли формальдоксимовым методом.

Биоинформатический анализ. Биоинформатический анализ проводили в программе BLAST. Первичное аннотирование генома проводили при помощи интернет-платформы RAST с использованием технологии подсистем (http://rast.nmpdr.org/).

Выделение суммарной РНК и синтез кДНК. Для экстрагирования РНК из собранных бактерий воспользовались набором ExtractRNA («Евроген», Россия) согласно протоколу фирмы-производителя. Наличие и качество полученной РНК определяли с помощью электрофореза в 1,5 % агарозном геле. Для определения РНК использовали набор Qubit® RNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США) на флюориметре Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, США). Постановку обратной транскрипции осуществляли с использованием реактивов M-MulV (SibEnzyme, Россия) и Eppendorf Mastercycler согласно протоколу фирмы-производителя на приборе «Eppendorf Mastercycler personal» [4].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

MofA – марганец-окисляющий белок, принадлежащий к семейству мультимедных оксидаз (EC 1.16.3.3). Фермент катализирует превращение двухвалентного марганца в четырехвалентный (либо напрямую, либо через образование промежуточного продукта Mn (III)), кодируется геном *mofA*.

У *S. mobilis* Feox-1 наличие этого гена ранее не было выявлено, однако биоинформатический анализ показал белок, гомологичный охарактеризованному ранее белку *S. discophora*.

Для подтверждения способности бактерий рода *Sphaerotilus* к окислению марганца было проведено измерение общего белка в четырехдневной культуре в конце экспоненциальной фазы роста. Было выявлено, что в хемолитогетеротрофных условиях прирост белка составил 20 мг/л в присутствие марганца и 15 мг/л в отсутствие марганца в среде. Во время роста культуры в среде происходило образование окислов Mn^{4+}. Химический контроль не показал подобных результатов, концентрация Mn (II) оставалась постоянной, что позволяет исключить возможность химического образования оксида марганца (IV).

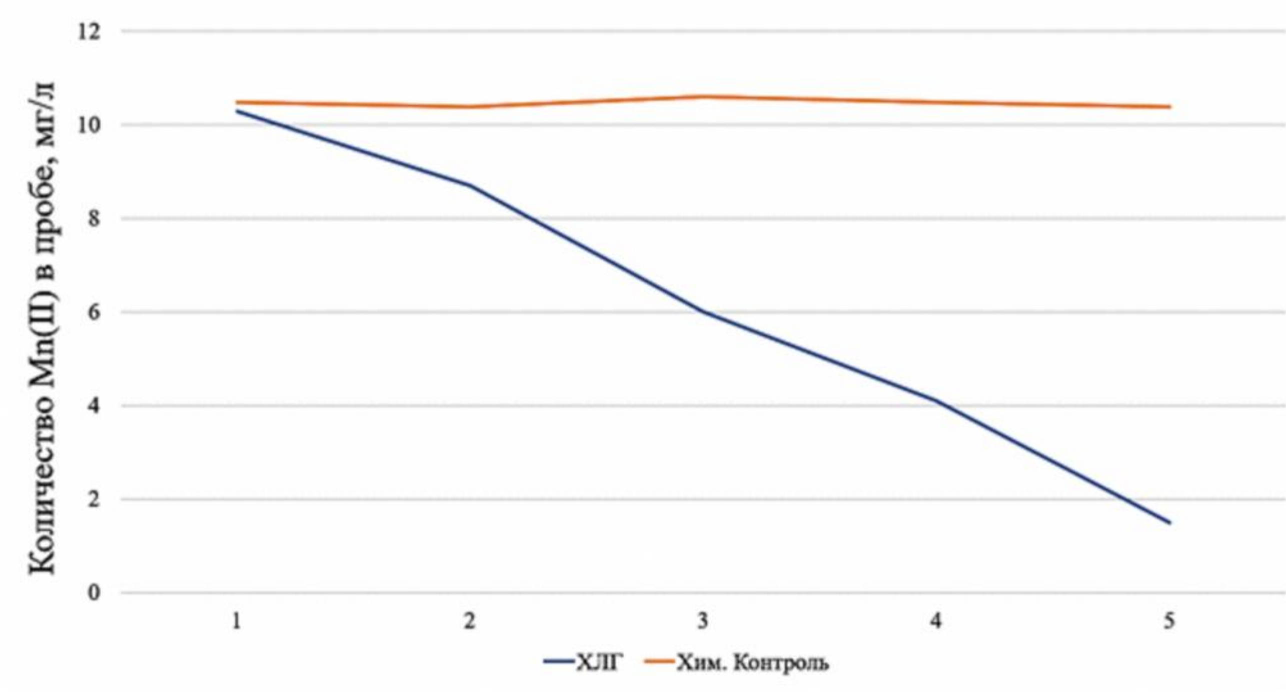


Рис. 1. Убыль Mn (II) при хемолитогетеротрофном у *S. mobilis* Feox-1. ХЛГ - хемолитогетеротрофный.

Для подтверждения способности *L. mobilis* Feox-1 к ферментативному окислению марганца изучали экспрессию гена *mofA* – мультимедной оксидазы, участвующей в данном процессе. Исследование динамики экспрессии показало, что на первые сутки после внесения бактерий в хемолитогетеротрофные условия экспрессия *mofA* резко возрастает; рост экспрессии продолжается до 72 часов культивирования, после чего на 4 сутки наблюдается значительное уменьшение относительного уровня транскриптов (рис. 2). По-видимому, падение экспрессии связано с уменьшением количества Mn (II) в пробе, что согласуется с данными количественного определения иона Mn^{2+}.

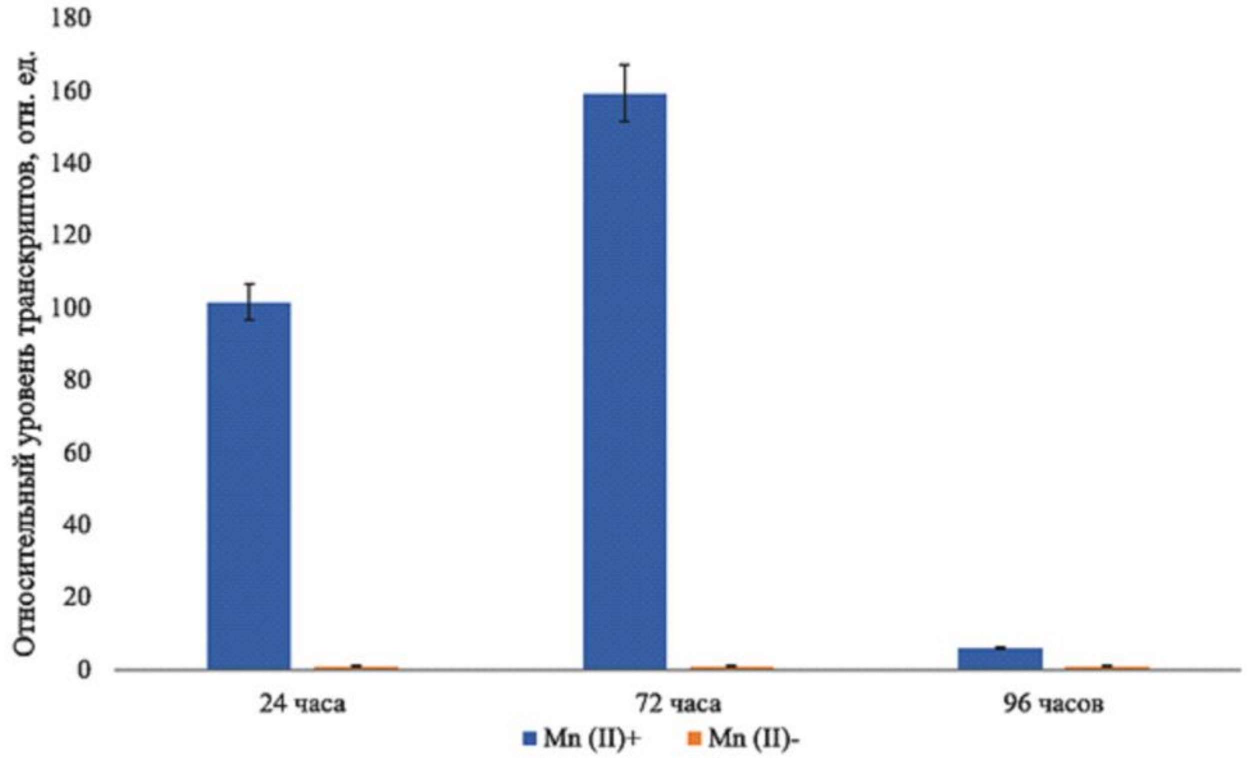


Рис. 2. Динамика экспрессии гена *mofA* в хемолитогетеротрофных условиях у *L. mobilis* Feox-1.

Так как окисление марганца катализируется мультимедными оксидазами (ферментами, в активном центре которых находятся атомы Cu (II)), в литературе высказывались предположения о влиянии меди на окисление марганца. Предположительно, медь должна оказывать стимулирующее влияние на активность марганецокисляющих белков. Для определения влияния меди на окисление марганца *L. mobilis* Feox-1 к питательной среде после автоклавирования добавляли медь для получения растворов разных концентраций. Определение белка в пробах с разной концентрацией меди не показало существенных различий в количестве бактериальных клеток.

Также было определено количественное окисление марганца. Показано, что при добавлении к культуре бактерий меди в концентрации 0,1 мкМ окисление марганца начиналось на более ранних этапах и шло с большей скоростью. При добавлении меди в концентрации 0,05 мкМ значительных изменений относительно контрольных условий замечено не было. Медь в концентрации 0,15 мкМ также вызывала более быстрое окисление марганца, однако добавление меди в подобной концентрации вызывало ухудшение роста культуры (рис. 3).

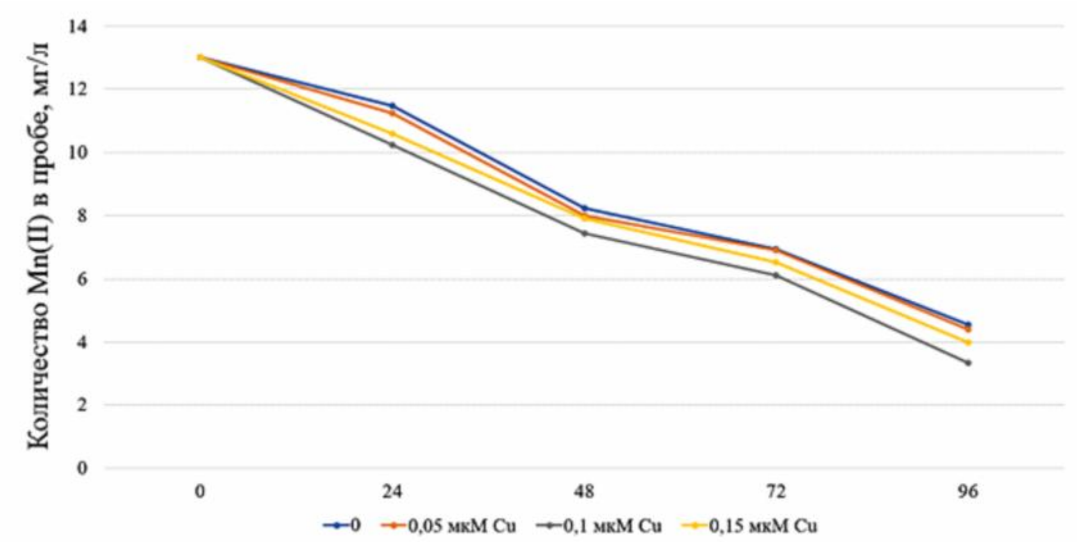


Рис. 3. Убыль Mn (II) при хемолитогетеротрофном росте в присутствии марганца и меди у *S. mobilis* Feox-1.

Исследование экспрессии генов оперона *mofA* также не показало существенных различий при добавлении меди в разных концентрациях (рис. 4). Определено, что при хемолитогетеротрофном росте в присутствие марганца в качестве донора электронов экспрессия *mofA* снижалась на 30% относительно контрольных услових, экспрессия *mofB* сначала возросла, а затем также снизилась на 30% относительно начальной концентрации. Изменение экспрессия *mofC* было наиболее значительным: при добавлении меди к среде в концентрации 0,05 и 0,1 мкМ экспрессия снизилась на 30%, а затем в концентрации 0,15 мкМ уменьшилась на 50% относительно начальной концентрации.

Проведенные исследования позволяют сделать вывод о независимости экспрессии мультимедных оксидаз от наличия или же отсутствия меди в питательной среде. Полученные данные об окислении марганца и экспрессии мультимедных оксидаз в присутствие меди в питательной среде согласуются с данными, полученными для другого представителя *Sphaerotilus – S. discophora* SS-1, что позволяет сделать вывод о невлиянии меди на экспрессию марганецокисляющих белков. Однако при определенных концентрациях Cu (II) наблюдалось более активное окислении марганца на начальных этапах роста культуры, что может свидетельствовать о влиянии меди на мультимедные оксидазы на посттрансляционном уровне.

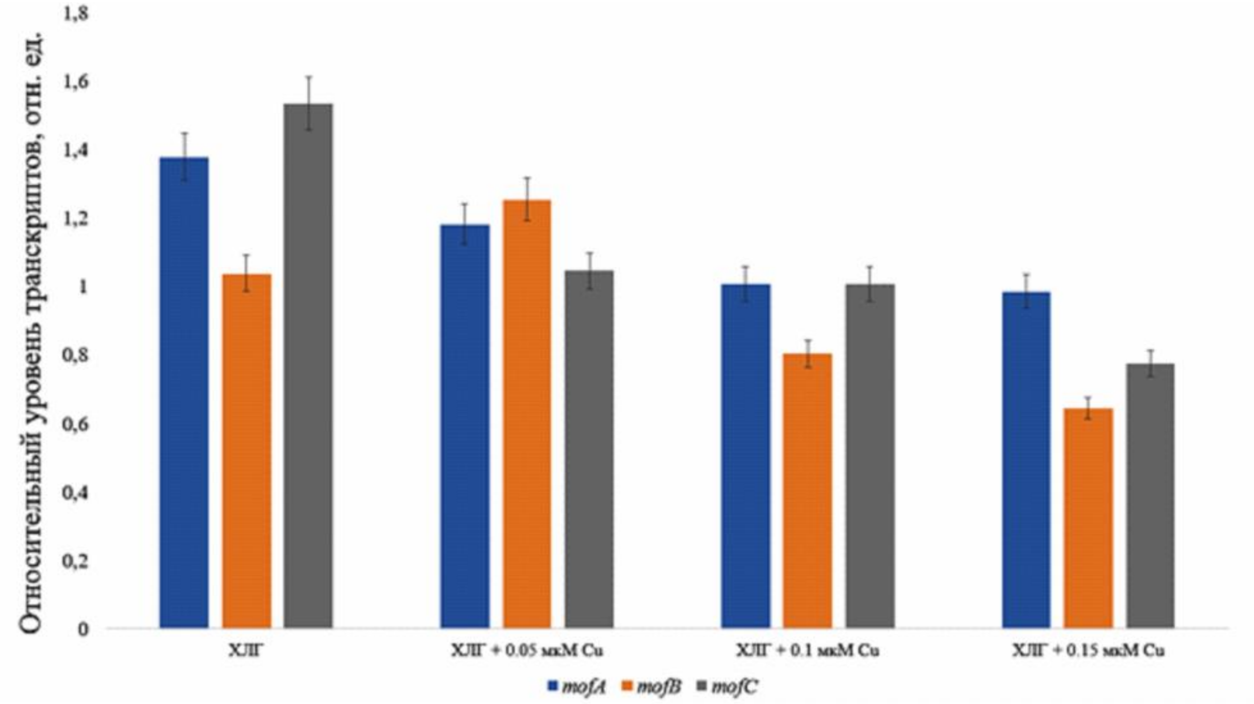


Рис. 4. Экспрессия генов оперона *mofA* у *L. mobilis* Feox-1 на 4 сутки культивирования. ХЛГ - хемолитогетеротрофный.

Азид натрия (NaN_3) – высокотоксичное соединение, действующее как ингибитор IV комплекса электронтранспортной цепи. При добавлении азида натрия к исследуемым микроорганизмом наблюдалось угнетение роста, а также угнетение процессов окисления марганца. Было проведено измерение прироста белка в культуре в конце экспоненциальной фазы роста. Показано, что при добавлении азида в среду после автоклавирования прирост белка составил 8 мг/л против 19 мг/л в условиях без азида. В ходе работы была исследована динамика окисления марганца в хемолитогетеротрофных условиях в присутствие марганца. При добавлении азида к культуре окисление марганца шло с более медленной скоростью и на 96 сутки останавливалось. В отсутствие азида окисление марганца шло более активно и продолжалось далее по прошествие 96 суток (рис. 5).

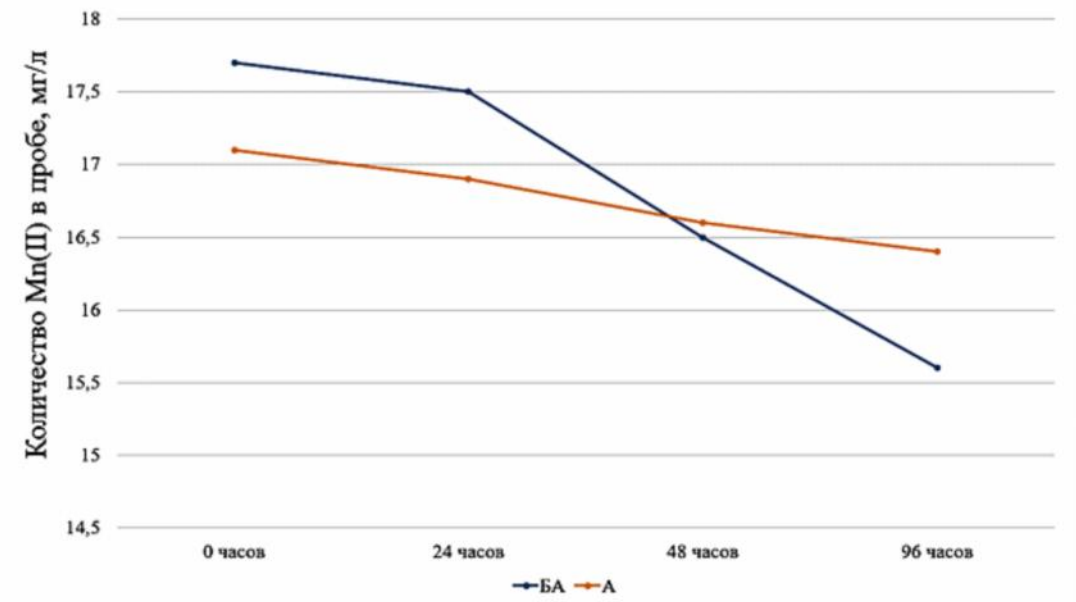


Рис. 5. Убыль Mn (II) при хемолитогетеротрофном росте в присутствие азида и в его отсутствие у *L. mobilis* Feox-1. А - в присутствии азида натрия. БА - без азида натрия.

Измерение экспрессии генов мультимедных окисдаз в модельном опыте (острый опыт – азид добавляли к культуре бактерий и инкубировали в течение часа) показало, что при отсутствии азида в среде экспрессия *mofA* возрастала в 14,2 раза по сравнению с уровнем экспрессии в условиях с азидом. Была изучена экспрессия генов оперона *mofA* – *mofB* и *mofC*. Наблюдалось полное подавление экспрессии *mofC* при обработке культуры бактерий азидом, что может быть связано с действием азида натрия на цитохромы. В отсутствие азида в среде относительный уровень транскриптов для *mofC* составил 8,1 (рис. 6).

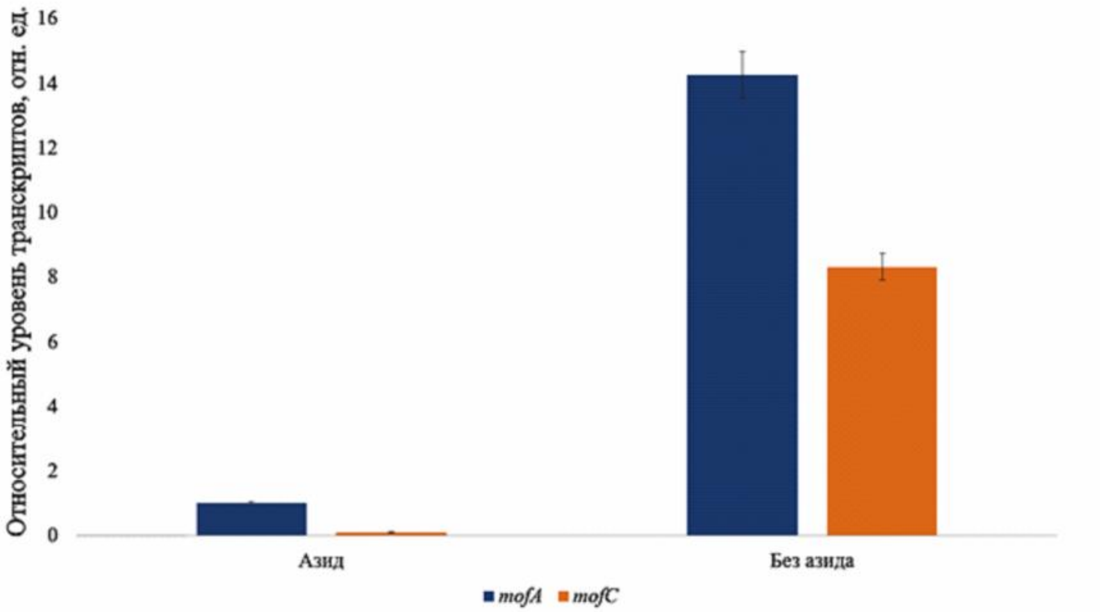


Рис. 6. Экспрессия генов в хемолитогетеротрофных условиях (острый опыт) *mofA*, *mofC* у *S. mobilis* Feox-1.

Таким образом, исходя из полученных результатов, можно сделать вывод, что NaN_3 ингибирует процесс окисления марганца, а также работу мультимедной оксидазы MofA и цитохрома с (MofC*)*, принимающего электроны от *MofA* при окислении марганца, что свидетельствует о сопряжении процесса окисления марганца с дыхательной цепью и использовании марганца бактериями *S. mobilis* в качестве донора электронов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баймухаметова Э. А. и др. Применение индуцированного мутагенеза для увеличения генетического полиморфизма хлопчатника //Биомика. – 2017. – Т. 9. – №. 4. – С. 370-379.
2. Hansel C. M. Manganese in marine microbiology //Advances in microbial physiology. – 2017. – Т. 70. – С. 37-83.
3. Okazaki M. et al. Partial purification and characterization of manganese-oxidizing factors of Pseudomonas fluorescens GB-1 //Applied and Environmental Microbiology. – 1997. – Т. 63. – №. 12. – С. 4793-4799.
4. Rudenko T. S. et al. Метилотрофия у Azospirillum thiophilum BV-S // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2018. – Т. 18. – №. 3. – С. 438-442.

ТРАНСГЕННЫЕ КЛЕТКИ И ИХ РОЛЬ В ИЗУЧЕНИИ ОБУЧАЕМОСТИ ЖИВОТНЫХ

Антоненко В.Е., Стародубцев К.А., Чугунов М.А., Кокина А.В.

Воронежский государственный университет, Воронеж

E-mail: *maximus.firefly@gmail.com*

В данной статье представлен обзор литературных данных, посвященных исследованию роли трансгенных клеток в обучаемости животных. Трансгенные технологии стали мощным инструментом в нейробиологии и когнитивной психологии, что открыло новые горизонты для изучения механизмов памяти и обучения. Рассматриваются основные виды трансгенных клеток, методы их создания, результаты ключевых экспериментов, а также перспективы применения трансгенных технологий в изучении обучаемости.

ВВЕДЕНИЕ

Обучаемость животных как комплексный феномен

Обучаемость животных представляет собой сложный феномен, включающий процессы восприятия, обработки информации, запоминания и воспроизведения. В 1990-е годы основными моделями исследовательских работ служили поведенческие тесты. Однако с появлением трансгенных технологий ученые получили возможность напрямую управлять молекулярными “ключами” памяти, такими как белки-посредники синаптической пластичности, рецепторы и факторы транскрипции [11].

История и методы трансгенеза

Разработка методов получения трансгенных животных и растений стала важным этапом в развитии современной биотехнологии. Первые трансгенные организмы были получены учеными из США в 1980 году, а в России первые публикации на эту тему появились в 1982 году [8]. Однако лишь спустя почти десять лет после создания данной технологии она стала широко использоваться как в научных, так и в промышленных целях.

Трансгенный организм представляет собой организм, который во всех отношениях подобен обычному, но содержит один или два новых гена (трансгены), несвойственных ему в природе. Метод трансгенеза включает введение чужеродных последовательностей ДНК в геном трансфицированных клеток и обеспечение их интеграции и передачи потомству. К практическим применениям трансгенеза в животноводстве относятся:

- повышение плодовитости и репродуктивных показателей;
- улучшение использования корма и темпов роста;
- улучшение состава мяса и молока;
- повышение устойчивости к заболеваниям [7].

Успех процесса трансгенеза подтверждается интеграцией гена устойчивости к антибиотикам и методами вестерн-блоттинга, Саузерн-блоттинга, ПЦР и ИФА. Существует 4 основных способа доставки чужеродной ДНК в клетки трансгенных животных (рис.1).

Рис. 1. Методы создания трансгенных животных [2].

Влияние трансгенных клеток на обучаемость

Трансгенные клетки оказывают влияние на обучаемость животных, демонстрируя разнообразные результаты. Например, трансгенные мыши, у которых были клонированы онкогены, а также мыши с нокаутированными генами, подавляющими опухоли, стали эффективными моделями для изучения рака у людей [10]. Были выведены сотни таких онкомышей, охватывающих широкий спектр видов рака, и они совершенствуются для большей репрезентативности.

Некоторые трансгенные мыши были модифицированы для увеличения роста и силы мышц за счет сверхэкспрессии инсулиноподобного фактора роста

I (IGF-I) в дифференцированных мышечных волокнах [10]. В других случаях изменение гена, участвующего в метаболизме глюкозы, привело к повышению физической активности, увеличению продолжительности жизни и улучшению аппетита без увеличения массы тела [1].

Примером трансгенных мышей, демонстрирующих выдающуюся выносливость, являются особи, способные преодолевать расстояние в шесть километров со скоростью 20 метров в минуту почти без остановки [9]. Исследования показывают, что обычные мыши прекращают бег на третхсотом метре, в то время как трансгенные особи показывают значительно лучшие результаты. В одном из экспериментов специализированный тренажер для бега был наклонен под углом 25 градусов, а скорость увеличивалась на два метра в минуту, каждую минуту. Контрольные особи (обычные мыши) выдерживали на тренажере до 19 минут, в то время как трансгенные мыши преодолевали дистанцию до 32 минут. При этом замеры показали, что обмен газов у трансгенных мышей происходил более эффективно, а уровень молочной кислоты в крови оставался почти неизменным, в отличие от обычных мышей [6].

Механизмы, способствующие выносливости

Трансгенные мыши являются более выносливыми в отличие от обычных мышей. Такой эффект может быть объяснен увеличением и “перенаправлением” экспрессии гена, отвечающего за фермент PEPCK-C (фосфоенолпируват-карбоксикиназу), который участвует в глюконеогенезе - синтезе глюкозы из неуглеводных соединений (рис. 2). В процессе исследований была создана линия мышей с измененным содержанием PEPCK-C, где участок гена, отвечающий за этот фермент, был связан с промотором гена актина скелетных мышц. Это привело к повышению концентрации PEPCK-C в скелетных мышцах до 1-3 единиц на грамм ткани (в контрольной группе - 0,08 единиц на грамм) [3].

При скрещивании трансгенных мышей удалось получить особей с концентрацией фермента до 9 единиц на грамм, что более чем в сто раз превышает уровень контрольной группы. В настоящее время таких особей существует около 500, и они демонстрируют повышенное содержание PEPCK-C и митохондрий, а также триглицеридов в мышечной ткани [5].

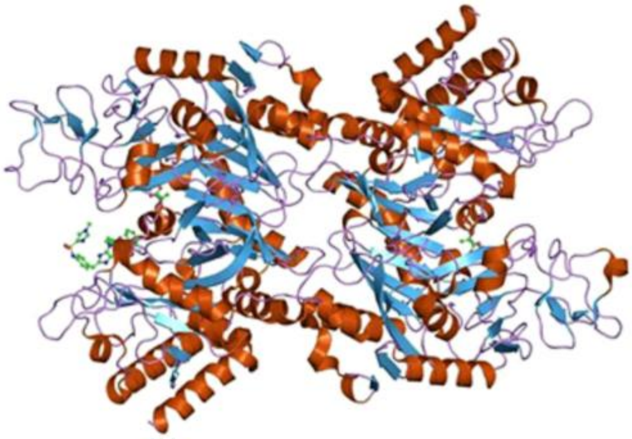


Рис. 2. Структура фосфоенолпируват-карбоксикиназы [4].

При высоких физических нагрузках такие мыши начинают использовать для получения энергии не глюкозу, а жирные кислоты, что позволяет им производить меньше молочной кислоты и демонстрировать выносливость. Более того, мыши с повышенным содержанием PEPCK-C хранят в пять раз больше триглицеридов в скелетных мышцах и имеют значительно меньшее количество триглицеридов в жировой ткани, несмотря на то что они потребляют на 60% больше пищи, чем контрольная группа. Концентрация лептина и инсулина в крови трансгенных мышей значительно ниже, чем у контрольных животных того же возраста, что также может способствовать увеличению продолжительности жизни.

Технология трансгенеза имеет огромный потенциал для будущих исследований в области нейробиологии и когнитивной психологии. Если будут решены социальные и этические проблемы, связанные с использованием трансгенных организмов, эта технология может стать ключом к дальнейшему пониманию механизмов обучаемости и памяти у животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Advances in transgenic technologies and their impact on animal husbandry / L. Zhou, H. Chen // – Animal Biotechnology. – 2021. – Vol. 32, No. 1. – P. 1–14. – DOI 10.1080/10495398.2020.1758466.
2. A review of transgenic animal techniques and their applications / W. M. E. Shakweer, A. Y. Krivoruchko, Sh. M. Dessouki, A. A. Khattab // Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. – 2023. – Vol. 21, No. 1. – P. 55. – DOI 10.1186/s43141-023-00502-z. – EDN CVIAQX.
3. Genetic modification of mice to study metabolic disorders / H. Wang, M. Zhang / / – Diabetes. – 2018. – Vol. 67, No. 7. – P. 1273–1283. – DOI 10.2337/db18-0040.

4. Mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK-M) is a pro-survival, endoplasmic reticulum (ER) stress response gene involved in tumor cell adaptation to nutrient availability / A. Mйndez–Lucas, P. Hугољљовб, L. Novellasdemunt [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 2014. – Vol. 289, No. 32. – P. 22090-22102. – DOI 10.1074/jbc.M114.566927. – EDN YCOTIG.
5. PEPCK-C and its role in muscle metabolism and exercise capacity / M. Parvin Hakimi, A. Koshy, M. Zubair // – American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. – 2019. – Vol. 317, No. 6. – P. E1054-E1064. – DOI 10.1152/ajpendo.00233.2019.
6. The role of PEPCK-C in energy metabolism and physical performance in transgenic mice / Y. Zhou, K. Chen // – American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. – 2020. – Vol. 129, No. 4. – P. 1243–1253. – DOI 10.1152/ajpendo.00436.2020.
7. The role of transgenic mice in understanding the mechanisms of learning and memory / T. J. Huang, Y. Liu // – Frontiers of Behavioral Neuroscience. – 2018. – Vol. 12. – P. 51. – DOI 10.3389/fnbeh.2018.00051.
8. Transgenic mice: a powerful tool for studying human diseases / T. Miyazaki, T. Saito // – Nature Reviews Genetics. – 2019. – Vol. 20. – P. 579–598. – DOI 10.1038/s41576–019–0102–0.
9. Transgenic models for studying the mechanisms of memory and learning / B. Li, Y. Wang // – Journal of Neurology Methods. – 2022. – Vol. 358. – Article 109157. – DOI 10.1016/j.jneumeth.2022.109157.
10. Transgenic mouse models for cancer research / Yu. Wang, Yu. Zhang // – Cancer Research. – 2016. – Vol. 76, No. 16. – P. 4672–4680. – DOI 10.1158/0008–5472.CAN-16–0726.
11. Transgenic technology in mice: application and future prospects / K. Tamura, M. Tada // – Molecular Genetics and Genomics. – 2020. – Vol. 295, No. 1. – P. 1–11. – DOI 10.1007/s00438–019–01634–7.

УДК 57.084.1

ЭФФЕКТ МИЛДРОНАТА И L-КАРНИТИНА НА ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ МЫШЕЙ

Бабенкова П.И.[1], Аджемян Д.С.[1], Грибовская В.А.[1], Садовникова И.С.[1], Калаев В.Н.[1,2], Гуреев А.П.[1]

[1] *Воронежский государственный университет, Воронеж*

[2] *Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж*

Работа посвящена оценке эффектов милдроната и L-карнитина на показатели теста распознавания новых объектов, использующегося для оценки памяти, обучаемости и исследовательского поведения у животных.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, пищевая добавка L-карнитин оказывает значительное влияние на метаболизм жирных кислот и энергетические процессы во многих органах и тканях. Кардиопротекторный препарат милдронат способен ингибировать фермент гамма-бутиробетаингидроксилазу, что вызывает снижение синтеза карнитина в организме. Кроме того, милдронат ингибирует специфические переносчики, что приводит к значительному снижению концентрации L-карнитина в тканях [1]. Милдронат сейчас также известен своими потенциальными нейропротекторными эффектами при различных неврологических расстройствах. Способность препарата ингибировать ß-окисление и активировать гликолиз способствует его нейропротекторным механизмам [2]. В свою очередь имеются данные о защитном действии L-карнитина для различных видов расстройств, поражающих периферическую и центральную нервную систему [3]. Так L-карнитин может улучшить качество жизни за счет усиления митохондриального дыхания, высвобождения нейротрансмиттеров и глобальных изменений экспрессии генов [4]. Важно рассмотреть потенциальное влияние милдроната и L-карнитина на исследовательское поведение, обучаемость, учитывая антогонистические отношение между действующими веществами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В эксперименте использовали двухмесячных самцов мышей линии C57Bl/6, полученных из филиала Научного центра биомедицинских технологий питомника “Столбовая” (Москва, Россия).

В начале эксперимента 32 самца мышей разделили на три группы. Первая группа (n=12) получала чистую питьевую воду ad libitum в течение четырех недель, вторая группа (n=10) получала вместе с питьевой водой препарат L-карнитин (Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA) (200 мг/кг в день) и третья группа (n=10) получала в составе питьевой воды препарат Милдронат (Grindex, Рига, Латвия) (200 мг/кг в день) на протяжении четырех недель. Поведение самцов по истечению 4 недель оценивалось при помощи теста распознавания объектов.

Оценка поведения осуществлялась согласно протоколу описанному Lueptow (2017). Рассчитывались показатели: e1 как общее время исследования во время обучения для двух одинаковых объектов; e2 как общее время исследования во время тестирования для знакомого объекта и нового объекта; d1 как время, потраченное на изучение нового объекта, минус время, потраченное на изучение знакомого объекта; d2 как время, потраченное на изучение нового объекта, минус время, потраченное на изучение знакомого объекта, деленное на общее время изучения. В качестве альтернативы рассчитывался индекс распознавания или предпочтения (d3). Это время, потраченное на изучение нового объекта, деленное на общее время.

Статистический анализ проводили с использованием программы Statistica 12. Результаты выражали как среднее значение ± стандартная ошибка среднего. Оценку статистической достоверности различий между группами осуществляли с помощью критерия Краскела-Уоллиса.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Значение d1 было на порядок ниже у самцов, получавших милдронат по сравнению с контролем ($p<0,05$), также наблюдалось значительное уменьшение показателя d2 в группе милдронат относительно группы L-карнитин ($p<0,05$). Индекс предпочтения в группе милдронат, был в 1,44 раза ниже, чем в группе, получавшей L-карнитин ($p<0,05$), а также в 1,36 раз меньше по сравнению с контролем. Достоверных различий между группами по показателям общего времени исследования предметов не было выявлено (рис. 1).

В норме мыши проявляют более высокий интерес к изучению нового объекта, что и отражают показатели данного метода оценки поведения. Ацетил-L-карнитин путем включения в образование нейротрансмиттеров может положительно влиять на обучение и память, что подтверждается результатами данного теста [3].

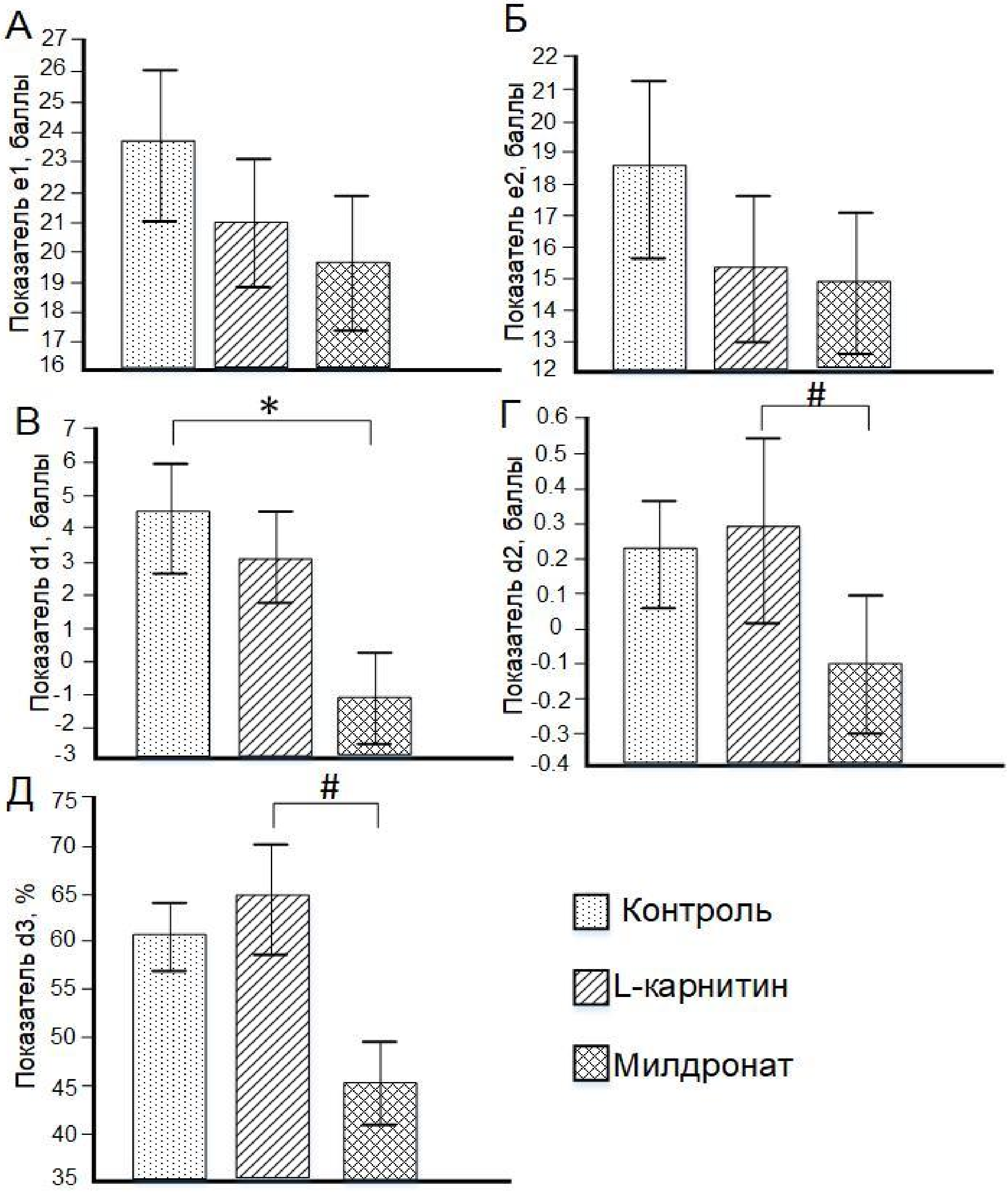


Рис. 1. Изменение показателей в тесте распознавания объектов: величины e1 (А), величины e2 (Б), величины d1 (В), величины d2 (Г), величины d3 (Д), где $p<0{,}05$ различия статистически значимы по сравнению с контролем (*), по сравнению с группой L-карнитин (#).

Однако прием милдроната способен переключать метаболизм на эффективное использование глюкозы, что также может является стрессовым фактором для организма, но данного источника энергии может быть недостаточно, так как мозг в условиях нагрузок использует ß-окисление как резервный источник питания. Милдронат, действуя как ингибитор синтеза L-карнитина, соответственно, может снижать уровень ацетилхолина, что также может негативно сказываться на параметрах теста. Ранее было отмечено, что при длительном приеме милдроната наблюдался дисбиоз и изменение поведения у самцов мышей [5].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, метаболическая модуляция играет ключевую роль в когнитивных функциях. В то время как L-карнитин поддерживает энергетические потребности мозга, милдронат, хотя и оказывает противоишемическое действие, тем самым привнося положительный эффект при нарушениях нервной системы, может изменять поведенческие характеристики за счет подавления карнитин-зависимых процессов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pharmacological effects of meldonium: Biochemical mechanisms and biomarkers of cardiometabolic activity/ M. Dambrova [et al.] // Pharmacol Res. – 2016. – Vol. 113. – P. 771-780.

2. Bellman V. Unlocking the Potential of Meldonium: From Performance Enhancement to Therapeutic Insights Psychoactives. – 2024. – Vol. 3. – P. 235-247.

3. Ferreira G.C. L-Carnitine and Acetyl-L-carnitine Roles and Neuroprotection in Developing Brain / G.C. Ferreira, M.C. McKenna // Neurochem Res. – 2017. – Vol. 42. – P. 1661-1675.

4. Neuroprotective Effects of Carnitine and Its Potential Application to Ameliorate Neurotoxicity / L.E. Latham [et al.] // Chem Res Toxicol. – 2021. – Vol. 34. – P. 1208-1222.

5. Long-term mildronate treatment increased Proteobacteria level in gut microbiome, and caused behavioral deviations and transcriptome change in liver, heart and brain of healthy mice / A.P. Gureev [et al.] // Toxicol Appl Pharmacol. – 2020. – Vol. 398. – P. 115031.

УДК 577.11

ВЛИЯНИЕ ФИТОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ФУМАРАТГИДРАТАЗЫ В ГЕПАТОЦИТАХ КРЫС В УСЛОВИЯХ АЛЛОКСАНОВОГО ДИАБЕТА

Бакарев М.Ю., Карев Д.П., Епринцев А.Т.

Воронежский государственный университет, Воронеж
E-mail: *bc366@bio.vsu.ru*

Повышение уровня глюкозы в крови при внутрибрюшинном введении 5% раствора аллоксана моногидрата способствует индукции экспериментального сахарного диабета у крыс. В условиях аллоксанового диабета наблюдается интенсификация функционирования энзима фумаратгидратазы, что подтверждается увеличением активности работы данного фермента. При этом было установлено, что количество изоформ исследуемого фермента не изменятся у всех экспериментальных групп. При использовании водного экстракта топинамбура наблюдается положительная динамика уровня активности ФГ до значений, характерных здоровой выборке животных.

ВВЕДЕНИЕ

Сахарный диабет – эндокринологическое расстройство, распространяющееся по всему миру с огромной скоростью из года в год. Это заболевание представляет угрозу здоровью и качеству жизни населения всех стран мира [1]. В связи с приобретением сахарным диабетом статуса неинфекционной пандемии, целью данной работы является исследование вопросов изменения метаболизма в условиях экспериментального сахарного диабета с использованием фитопротектора (в частности, влияние его на работу ключевого фермента цикла трикарбоновых кислот - фумаратгидратазы) [2]. Фитопротекторы – это вещества, содержащиеся и полученные из растительных организмов. Эти препараты не содержат ксенобиотиков, что создает очевидное преимущество перед синтетическими препаратами. Одним из представителей данной группы является топинамбур, так как его клубни обладают фитопротекторным действием. Так при попадании в желудок, под действием ферментов, он расщепляется до мономеров – молекул фруктозы. В условиях сахарного диабета, фруктоза может выступать заменителем глюкозы и усваиваться организмом, восполняя энергетические потери [3]. Также инулин способен влиять на инсулинозависимые клетки, повышая сродство их рецепторов к инсулину, в результате чего часть глюкозы попадает внутрь клеток, уровень глюкозы в крови снижается, а клетка получает основной энергетический субстрат.

Фумаратгидратаза (фумараза, ФГ, КФ 4.2.1.2) – фермент из класса лиаз, который катализирует обратимое присоединение воды к дианиону фумаровой кислоты с образованием малата - дианиона яблочной кислоты. Фумараза является высоко консервативным белком во всех организмах относительно его последовательности, структуры и ферментативной деятельности. Фермент фумараза является сходным белком во всех организмах, при рассмотрении его последовательности, структуры и функции. Этот фермент участвует в цикле Кребса в митохондриях. Цикл трикарбоновых кислот является неотъемлемой частью клеточного дыхания эукариот [2,4].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования служили самцы лабораторных крыс (*Rattus norvegicus* L.) линии Wistar массой 250-300 гр., выращенные в виварии при стандартном рационе. Индукцию диабета у исследуемых животных вызывали введением внутрибрюшинно 5% раствора моногидрата аллоксана из расчета 100 мг на кг веса животного в 0,9% растворе NaCI. Контрольные животные выращивались при обычном пищевом режиме, без введения аллоксана [5]**.** Водный экстракт топинамбура получали следующим способом: 5 г измельченных клубней земляной груши заливали 100 мл горячей воды. Настаивали в течение 12 часов, после выпаривали и получали лиофилизат. Опытной группе экстракт давали в концентрации 60 мг на 100 мл.

Для получения ткани печени опытных животных подвергали краниоцервикальной дислокации под эфирным наркозом. Определение уровня сахара в крови производили с помощью глюкометра “Сателлит плюс” (Россия). Выделение фермента производили путем гомогенизации печени в среде выделения (1:5). Измерение активности ФГ определяли по увеличению оптической плотности при 240 нм за 5 мин. Затем расчеты производили по следующей формуле:

$$E = \frac{\varepsilon \times \Delta D \times V_{общ}}{V_{вн} \times t_{мин}},$$

где E – общая активность фермента, мкмоль/мин; D – увеличение оптической плотности при 240 нм за 5 мин; $V_{общ}$ – общий объем раствора, мл; $V_{вн}$ – объем взятой на белок пробы, мл; $t_{мин}$ – время проведения эксперимента, мин; e – коэффициент молярной экстинкции.

Электрофоретический анализ проводили по методу Davis. Специфическое проявление этого фермента осуществляется косвенным методом с использованием малатдегидрогеназы в качестве вспомогательного фермента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Аллоксан является индуктором, способствующим стойкому и направленному развитию экспериментального сахарного диабета. При внутрибрюшинном его введении лабораторным крысам развивается диабет I типа [2,6]. Экспериментально было показано, что аллоксановые инъекции способствуют повышению содержания уровня глюкозы в крови. Измерение уровня сахара в крови проводилось в течение 22 дней с интервалом в один день. Средний уровень сахара в крови у крыс на третий день эксперимента после введения аллоксана достигал 22,6 мМ и в дальнейшем продолжал увеличиваться [7]. На 10 день эксперимента у группы крыс, принимавших экстракт топинамбура, происходило заметное снижение сахара в крови (рис.1).

Рис. 1. Динамика изменения уровня глюкозы в крови у крыс в норме, при аллоксановом диабете и при действии фитопротекторов.

Была определена активность фумаразы в клетках печени крыс, которые входят в различные экспериментальные группы. Полученные результаты приведены на рис.2.

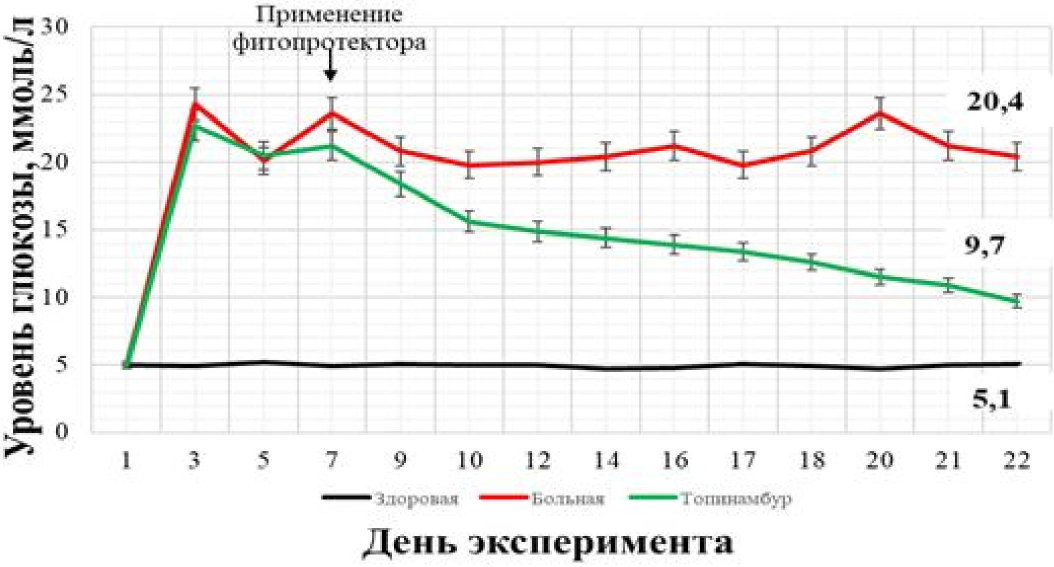


Рис. 2. Активность фумаратгидратазы в клетках печени в норме и при патологиях.

Установлено, что в группе здоровых животных показатели удельной активности фермента соответствуют значению 0,28 Е/г.с.м. Отмечается, что в условиях индуцированного диабета происходит повышение активности АГ до 0,59 Е/г.с.м, что в 2,1 раза выше показателей группы здоровых животных. Было определено, что пероральное введение водных экстрактов растений-фитопротекторов понижает значение активности фумаразы и приближает их к нормальным показателям.

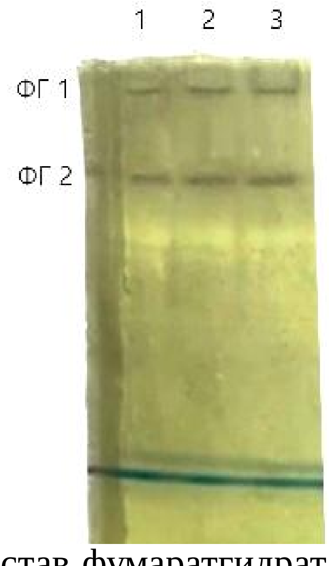


Рис. 3. Изоферментный состав фумаратгидратазы. 1 – здоровая группа крыс; 2 – группа крыс, больных диабетом; 3 – группа крыс, больных диабетом и принимающих перорально водный экстракт топинамбура.

Проведенные электрофоретические исследования с последующим окрашиванием геля тетразолиевым методом показали, что в печени животных всех экспериментальных групп фумаратгидратаза присутствует в виде двух форм (рис. 3). Таким образом, можно сказать, что введение фитопротекторов в условиях сахарного диабета не влияют на изоферментный состав фумаратгидратазы. Значения Rf для ФГ1 и ФГ2 составили 0,12 и 0,20, соответственно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования ферментативной активности фумаратгидратазы было установлено, что у группы крыс, страдающих диабетом и не получавших перорально фитопротекторов, наблюдается наибольшая удельная активность. Ферментативная активность в клетках печени больных крыс, получавших экстракт топинамбура, близка к показателю контрольной группы. В качестве контрольной группы выступали здоровые животные, не получавшие инъекций аллоксана и не употреблявшие в пищу растительные экстракты. Электрофоретические исследования, проведённые в полиакриламидном геле, показали, что количество изоформ у контрольных животных, больных диабетом и принимавших фитопротекторы, не изменяется, следовательно, дополнительных форм фермента не образуется.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балаболкин М. И. Сахарный диабет / М. И. Балаболкин. — М. : Медицина, 1994. — 383 с.
2. Епринцев А. Т. Экспрессия и регуляция ферментов глиоксилатного цикла / А. Т. Епринцев, В. Н. Попов, М. Ю. Шевченко. — Воронеж : Центрально-Черноземное книжное изд-во, 2005. — 224 с.
3. Бакумов П.А. Метаболические эффекты «астролина», (препарата на основе инулина) у больных сахарным диабетом 2-го типа / П.А. Бакумов, Ю.В. Козыренко // Вестник Волгоградского медицинского университета. – 2008. – № 4. – С. 17-18.
4. Гидранович В. И. Биохимия: учебное пособие. / В. И. Гидранович, А. В. Гидранович. — М. : Тетрасистемс, 2012. — 528 с.
5. Lenzen S. Alloxan : history and mechanism of action / S. Lenzen, U. Panten // Diabetologia. 1988a. — Vol. 31. — P. 337—342.
6. Михайличенко В. Ю. Патофизиологические особенности сердца у крыс с экспериментальным сахарным диабетом, осложненным инфарктом миокарда / В. Ю. Михайличенко, А. А. Пилипчук // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. — 2017. — Т. 7, № 1. — С. 27—37.
7. Уоткинс П. Дж. Сахарный диабет / П. Дж. Уоткинс. — М. : Бином. — 2-е изд., пер. с англ., 2006. — 134 с.

УДК 577.11

ВЛИЯНИЕ ХЛОРИДА КАЛИЯ НА КАТАЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ γ-ГИДРОКСИБУТИРАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ЛИСТЬЯХ КУКУРУЗЫ *IN VIVO*

Бородкина Д. Е., Анохина Г.Б., Епринцев А.Т.

Воронежский государственный университет, Воронеж

E-mail: *dasadragunova96129@gmail.com*

Полученные данные по динамике активности γ-гидроксибутиратдегидрогеназы (ГБДГ) из листьев кукурузы позволили оценить изменение функционирования исследуемого фермента при засолении хлоридом калия разной концентрации. Установлено, что максимальное увеличение каталитической активности ГБДГ отмечается уже спустя час инкубации проростков кукурузы в 150 мМ и 200 мМ растворах хлорида калия.

ВВЕДЕНИЕ

На протяжении уже долгого времени в биохимии большой интерес вызывает изучение механизмов регуляции процессов метаболизма, которые протекают в организмах различных уровней организации. Следует отметить, что особое место занимают проблемы исследования ферментативных систем. Роль и механизмы протекания ферментативных реакций, а также способы передачи и реализации генетической информации последующим поколениям занимают умы ученых уже не одно десятилетие [1].

Цикл трикарбоновых кислот занимает центральное положение в жизни растений. Одним из критических этапов ГАМК-шунта является реакция, катализируемая сукцинатсемиальдегиддегидрогеназой (ССАДГ, КФ 1.2.2.16). В условиях продолжительного дефицита кислорода данный энзим перестает функционировать, что приводит к возникновению ряда метаболических реакций [2]. Для детоксикации янтарного полуальдегида и обеспечения функционирования растительной клетки существует альтернативный путь, включающий фермент γ–гидроксибутиратдегидрогеназу - энзим класса оксидоредуктаз (ГБДГ, КФ 1.1.1.61), катализирующий реакцию превращения γ-гидроксибутирата до сукцинилового полуальдегида, при этом $НАД^+$ восстанавливается до НАДН [3].

Недостаточная изученность механизмов адаптивного ответа растительной клетки к действию различных стрессовых факторов, а также малый объем данных, посвященных роли ГБДГ в метаболизме растительной клетки делает достаточно интересным исследование функционирования ГБДГ в условиях засоления солями калия в листьях кукурузы.

Целью данной работы является изучение влияния солевого стресса, вызванного хлоридом калия на функционирование γ-гидроксибутиратдегидрогеназы в листьях кукурузы (*Zea mays* L.).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта были использованы 7-ми дневные проростки кукурузы (*Zea mays* L.) сорта Воронежская–76, выращенные гидропонно при десятичасовом световом дне в климатической камере “LabTech” (Корея) при интенсивности света 25 Вт/$м^2$ и температуре окружающей среды 25^{o}С.

Для индукции солевого стресса в эксперименте растения помещались в растворы хлорида калия различной концентрации на 24 часа. Для контрольной группы растений раствор соли заменялся на воду. Проростки кукурузы из контрольных и опытных групп были помещены в раствор без корневой системы.

Исследование включало отбор образцов до начала инкубации (нулевой образец), а также в различные временные точки после начала эксперимента: через час и спустя сутки.

Листья кукурузы гомогенезировали в среде выделения следующего состава: 50 мМ Tris–HCl буфер (pH 9.0), 0,3 мМ ДТТ, 3 мМ ЭДТА, 0,1 мМ $CaCl_2$ и 0,05% Tween 80, после чего гомогенат центрифугировался при 3000 об/мин в течении 5 минут. Полученный надосадок использовался для определения активности ГБДГ.

Активность γ-гидроксибутиратдегидрогеназы в зеленых листьях кукурузы определяли на спектрофотометре Evolution 260 Bio (Thermo Fisher Scientific, США) по скорости образования НАДН при длине волны 340 нм в реакционной среде, содержащей: 16 мМ гидроксибутирата натрия (Sigma Aldrich, США), 1 мМ НАД⁺, 100 мМ Tris–HCl буфер (pH 9.0). Запуск реакции осуществляли путём добавления ферментного препарата. В качестве контроля использовали среду спектрофотометрирования без добавления фермента.

Опыты проводили в 3-кратной повторности, аналитические определения для каждой пробы осуществляли в трех повторностях. Статистический анализ полученных данных проводился с использованием программы STATISTICA 12.0. Различия анализировали на статистическую значимость с использованием критерия Стьюдента. На графиках значения представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего (SEM). Представленные в работе различия статистически достоверны ($p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В рамках проведенных нами исследований по влиянию хлорида калия на каталитическую активность ГБДГ в листьях кукурузы нами было проанализировано изменение общей ферментативной активности ГБДГ в растворах хлорида калия различной концентрации (рис. 1).

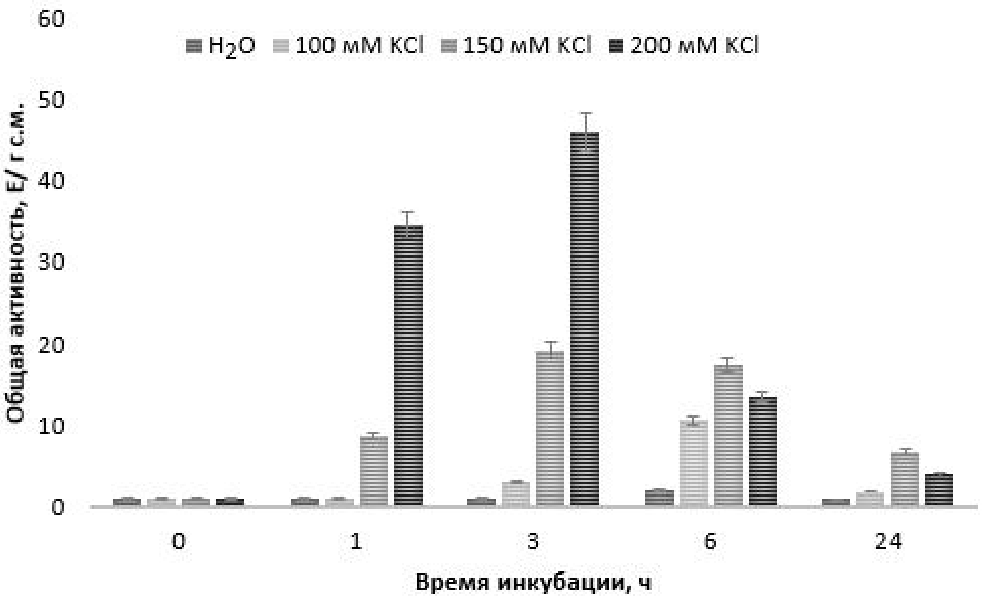


Рис. 1. Динамика изменения активности γ-гидроксибутиратдегидрогеназы при инкубации в 100мМ, 150мМ и 200мМ растворах KCl.

Выявлено, что инкубация проростков кукурузы в 100мМ растворе хлорида калия вызывала увеличение активности исследуемого фермента более чем в 10 раз к 6 часу солевого воздействия. Инкубация проростков в 150 мМ растворе хлорида натрия вызывала максимальный подъем (в 19 раз) каталитической активности γ-гидроксибутиратдегидрогеназы на третий час эксперимента. В то же время, в 200мМ растворе хлорида калия максимальное увеличение каталитической активности исследуемого энзима отмечалось также на 3 час эксперимента (рис. 1) – показатели активности ГБДГ выше контрольных в 46 раз. В контрольной группе растений активность ГБДГ оставалась на постоянном уровне в течении всего времени эксперимента (колебания незначительные).

Стоит отметить, что инкубация в 200 мМ растворе хлорида калия способствует быстрому и более интенсивному развитию адаптивного ответа со стороны ГБДГ, но при этом к 24 часу каталитическая активность существенно снижается. Снижение концентрации KCl в среде приводит к развитию не такого интенсивного, но более стабильного изменения активности исследуемого фермента.

Во всех экспериментальных группах спустя сутки засоления ферментативная активность ГБДГ снижалась, но при этом оставалась выше значений, отмеченных в контрольной группе растений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенное исследование показывает, что в условиях солевого стресса, вызванного хлоридом калия, ферментативная активность γ-гидроксибутиратдегидрогеназы увеличивается. При этом, концентрация хлорида калия оказывает существенное влияние на степень активации исследуемого фермента: чем выше концентрация хлорида калия, тем быстрее происходит активация ГБДГ-системы и тем выше максимальные показатели активности. Следовательно, этот энзим играет ключевую роль в адаптивном ответе клеточного метаболизма в ответ на засоление. Вероятно, γ–гидроксибутиратдегидрогеназа, в условиях действия повышенных концентраций хлорида калия активируется, тем самым осуществляя утилизацию янтарного полуальдегида, образующегося в ходе нарушения функционирования ГАМК-шунта.

Таким образом индукция ГБДГ защищает клетку от негативного действия альдегидов, которые могут накапливаться и вступать в реакцию с ДНК, окислять липиды мембран, модифицировать белки или влиять на транскрипцию генов, связанных со стрессом. Этот механизм, вероятно, помогает растениям избежать негативных последствий абиотического стресса и сохранять жизнеспособность.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тютерева Е. В. и др. Роль автофагии в стрессовых ответах растений //Съезд и конференция проведены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 18-04-20028 и № 18-04-20023) и ФАНО России. – 2018. – С. 343.

2. Ji J. et al. Roles of г-aminobutyric acid on salinity-responsive genes at transcriptomic level in poplar: Involving in abscisic acid and ethylene-signalling pathways //Planta. – 2018. – Т. 248. – С. 675-690.

3. Taxon E. S., Halbers L. P., Parsons S. M. Kinetics aspects of Gamma-hydroxybutyrate dehydrogenase //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics. – 2020. – Т. 1868. – №. 5. – С. 140376.

УДК 577.12

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЦИТОЗИНОВЫХ ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗ В ЩИТКАХ КУКУРУЗЫ ПРИ ПРОРАСТАНИИ СЕМЯН

Федорин Д.Н. Вершинина С.Г., Епринцев А.Т.

Воронежский государственный университет, Воронеж

E-mai: *sveta.v05@yandex.ru*

Метилирование ДНК – наиболее изученный механизм реализации эпигенетического кода и регуляции уровня экспрессии генов. Изучение активности ДНК-метилтрансфераз в щитках кукурузы при прорастании семян, показало изменение анализируемого показателя с достижением максимального значения на 4 день. По мере развития семени кукурузы происходит изменение интенсивности метилирования ДНК клеток кукурузы, что обусловлено снижением каталитической активности цитозиновых ДНК-метилтрансфераз.

ВВЕДЕНИЕ

Метилирование ДНК - важная модификация ДНК, которая играет роль в управлении геномом и в регуляции экспрессии генов в процессе развития. Метилирование осуществляется ДНК-метилтрансферазами, которые катализируют перенос метильной группы к основаниям внутри спирали ДНК. Растения содержат по меньшей мере три класса цитозинметилтрансфераз, которые различаются по структуре белка и функции. Семейство METI, гомологи метилтрансферазы Dnmt1 мыши, скорее всего, функционируют как поддерживающие метилтрансферазы, но также могут играть роль в метилировании *de novo*. Хромометилазы, которые являются уникальными для растений, могут преимущественно метилировать ДНК в гетерохроматин; остальной класс, имеющий сходство с метилтрансферазами Dnmt3 млекопитающих, являются предполагаемыми метилтрансферазами *de novo*. Различные классы метилтрансфераз могут проявлять различную активность в отношении цитозинов в различных контекстах последовательности. Хромометилазы могут предпочтительно метилировать цитозины в последовательностях CpNpG, в то время как метилтрансфераза MET арабидопсиса отдает предпочтение цитозинам в последовательностях CpG. Дополнительные белки, например DDM1, член семейства SNF2/ SWI2 белков, ремоделирующих хроматин, также необходимы для метилирования ДНК растений [3].

Разные типы метилирования ДНК влияют друг на друга. Так, наличие метилированного CG сайта увеличивает вероятность метилирования близлежащих сайтов CNG, а наличие метилированного CNG сайта увеличивает вероятность метилирования близлежащих сайтов CNN. У ноль-мутантов *met1* на фоне общего снижения уровня метилирования ДНК часто гиперметилированы промоторы некоторых генов по сайтам CNG и CNN. У комбинированных мутантов *met1-drm-1drm2* заметно увеличено метилирование CNG в структурной части многих генов, как бы отчасти «заменяя» исчезнувшее CpG метилирование [3].

Множество ДНК-метилтрансфераз и их генов у растений, по-видимому, имеет взаимный компенсаторный смысл, обеспечивая надежную модификацию генома при различных, в том числе и неблагоприятных, условиях внешней среды и при возможной инактивации отдельных элементов энзиматического эпигенетического контроля [3].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали щитки семян кукурузы (*Zea mays* L.) сорта Воронежская 76, выращенные гидропонным способом при температуре 25^{o}C в течение 10 дней.

Активность цитозиновых ДНК-метилтрансфераз определяли спектрофотометрическим методом в среде, содержащей: 10 мМ Трис-HCl, 50 мМ NaCl, 10 мМ $MgCl_2$, 1 мМ DTT, pH 7,9, 80 мкМ SAM, 40 нМ ДНК [15].

Об активности фермента судили по изменению оптической плотности среды фотометрирования при длине волны 256 нм по образовании S-аденозилгомоцистеина в ходе реакции [12].

Опыты проводили в 3-х кратной биологической повторности, аналитическое определение для каждой пробы – в трех повторностях. В таблицах и на рисунках приведены данные типичных опытов, где каждое значение есть среднее арифметическое. При математической обработке использовали статистический критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение активности цитозиновых ДНК-метилтрансфераз показало изменение анализируемого показателя в щитках кукурузы при прорастании семян. На начальных этапах развития семян наблюдается высокий уровень активности исследуемых ферментов с достижением максимального значения на 4 день. Величина каталитической активности цитозиновых ДНК-метилтрансфераз составляет 16,9 Е/г сырой массы (рис. 1). В дальнейшие дни прорастания семян наблюдается снижение данного показателя с достижением величины 4,0 Е/г сырой массы на 10 день прорастания семян. Соответственно, по мере развития семени кукурузы происходит изменение интенсивности метилирования ДНК клеток кукурузы.

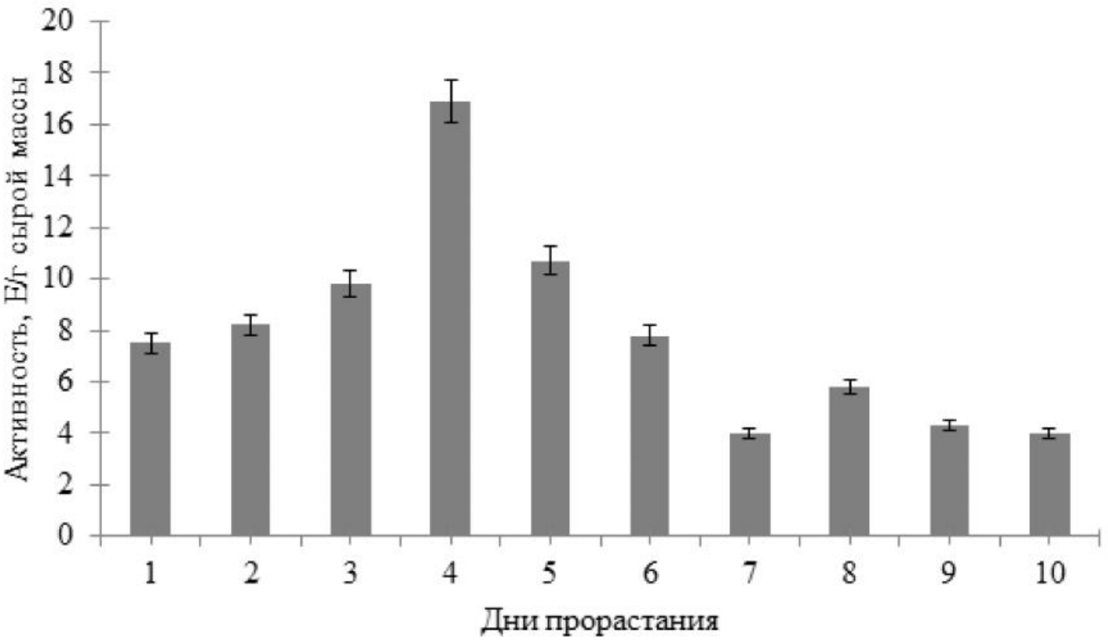


Рис. 1. Общая активность цитозиновых ДНК-метилтрансфераз в щитках при прорастании семян кукурузы.

Высокая активность ДНК-метилтрансфераз отражает их ключевую роль в инициации и поддержании процессов, необходимых для успешного прорастания и развития зародыша. Метилирование ДНК в щитке позволяет контролировать работу генов, использовать питательные вещества, приспосабливаться к окружающей среде и сохранять стабильность генома, что крайне важно для ранних этапов жизни растения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александрушкина Н.И., Ротаенко Е.П., Никифорова И.Д. и др. Двухэтапное метилирование генома пшеницы в культуре клеток и в проростке // Биохимия. 1991. Т. 56. С. 361–368.
2. Бочков Н. П. Клиническая генетика. М.: Гэотар.Мед, 2001.
3. Ванюшин Б.Ф. Метилирование ДНК у растений: механизмы и биологическая роль // Тимирязевские чтения/ Ред. В.В. Кузнецов. Ин-т физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. М.: Наука, 2009. Вып. 69. 77 с.
4. Ванюшин Б.Ф. Метилирование ДНК и эпигенетика // Генетика. 2006. Т. 42. С. 1–14.
5. Коваленко Т. Ф. Метилирование генома млекопитающих // Молекулярная медицина. 2010. № 6. С. 21–29.
6. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. - М.: Высш. шк., 1990. - 351с.
7. Льюин Б. Гены. М.: БИНОМ, 2012.
8. Эллис С. Д., Дженювейн Т., Рейнберг Д. Эпигенетика //М.: Техносфера. – 2010 – Т. 496.
9. Эпигенетика. Новая парадигма? // Публичная лекция Т. Д. Колесниковой, ИМКБ СО РАН, 2014.
10. Alexander Meissner, Jųrn Walter. Epigenetic Mechanisms in Cellular Reprogramming. 2015 244 p.
11. Antequera F., Bird A. CpG islands as genomic footprints of promoters that are associated with replication origins // Curr. Biol. – 1999. – V. 9. R661-R667.
12. A simplified characterization of S-adenosyl-l-methionine-consuming enzymes with 1-Step EZ-MTase: a universal and straightforward coupled-assay for in vitro and in vivo setting / E.S. Burgos [et al.] // Chem Sci. – 2017. – V. 8. – P. 6601-6612.
13. Bartee L., Malagnac F., Bender J. Arabidopsis cmt3 chromomethylase mutations block nonCG methylation and silencing of an endogenous gene // Genes Dev. 2001. V. 15. P. 1753–1758.
14. Callebaut I., Courvalin J.C., Mornon J.P. The BAH (bromoadjacent homology) domain: A link between DNA methylation, replication and transcriptional regulation // FEBS Lett. 1999. V. 446. P. 189–193.
15. Cokus S.J. Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning / S.J. Cokus [et al.] // Nature. – 2008. - V. 452. - P. 215–219.
16. Finnegan E.J., Plant DNA methyltransferases / E.J. Finnegan, K.A. Kovac // Plant Mol. Biol. - 2000. - V. 43. - P. 189–210.

УДК 577.12

РНК-ЗАВИСИМОЕ МЕТИЛИРОВАНИЕ, ОПОСРЕДОВАННОЕ МикроРНК

Власенко А.А., Хомутова А.Е.

Воронежский государственный университет, Воронеж

E-mail: *anna.khomutova2002@gmail.com*

РНК-зависимое метилирование ДНК (RdDM) является уникальным механизмом эпигенетической регуляции у растений. Ключевую роль в реализации данного пути играют малые некодирующие РНК. Довольно долгое время считалось, что микроРНК, особый класс малых некодирующих РНК, не оказывают особого влияния на функционирование системы RdDM, однако в настоящее время появляется всё больше данных, опровергающих данное утверждение. На сегодняшний день путь RdDM лучше всего охарактеризован у покрытосеменных растений, и в частности у модельного растения *Arabidopsis thaliana*. Однако консервативные компоненты пути RdDM и связанные с ними малые РНК также были обнаружены у других групп растений, таких как печёночные и листостебельные мхи.

Метилирование ДНК – один из ключевых процессов изменения экспрессии генов путем эпигенетической регуляции транскрипции [1]. Стратегия метилирования ДНК присутствует у многих эукариот, однако в растениях функционирует уникальный механизм – РНК-зависимое метилирование (RdDM) [2]. Данная система играет ключевую роль в глушении мобильных элементов, транспозонов (ТЭ), которыми очень богаты растительные геномы. Это происходит путем присоединения метильных групп к новым ТЭ и усиления метилирования ДНК уже существующих ТЭ, подавляя транспозиционные процессы и поддерживая стабильность генома [3].

Путь RdDM можно разделить на два основных процесса: производство малых РНК и рекрутирование механизмов метилирования ДНК этими малыми РНК. Эти два действия составляют RdDM, и в конечном итоге приводят к метилированию цитозинов ДНК в определенных локусах [4].

Малые РНК стали ключевыми игроками в регуляции метилирования ДНК (по различным остаткам цитозина в CG, CHG и CHH-мотивах) или модификации гистонов, тем самым контролируя транскрипционные сети в организмах [5]. В зависимости от структуры и биогенеза малые РНК классифицируются на малые интерферирующие РНК (siRNA), микроРНК (miRNA), piwi-интерферирующие РНК (piRNA). Долгое время считалось, что RdDM связано с действие siRNA, однако на сегодняшний день всё больше появляется данных, подтверждающих немалый вклад miRNA. MiRNA-направленное метилирование ДНК осуществляют не только «канонические» miRNA (20-22 нт), но и длинные miRNA, образующиеся из предшественников miRNA [6].

Ключевыми игроками пути RdDM являются Pol IV (РНК-полимераза 4), RDR2 (РНК-зависимая РНК-полимераза 2), DCL3 (Dicer-like 3) и AGO4 (Argonaute 4) [7]. Согласно каноническому пути RdDM продукция 24-нуклеотидных малых интерферирующих РНК (siRNA) зависит от Pol IV. Pol IV транскрибирует одноцепочечную РНК (ssRNA), которая преобразуется в двухцепочечную РНК (dsRNA) с помощью RDR2. Затем dsRNA разрезается белком DCL3, что приводит к образованию siRNA (siRNA 24 нт). Эти siRNA загружаются в белок AGO4, а AGO4 взаимодействует с RISC (комплекс РНК-индуцированный сайленсинга) и метилирует ДНК [8].

Стоит отметить, что посредством метилирования регулируется процессинг микроРНК. Первым шагом в биогенезе микроРНК является обработка первичных микроРНК (pri-miRNA) комплексом, состоящим из РНК-связывающего белка DGCR8 и РНКазы III типа DROSHA. В клетках млекопитающих обнаружено, что метилтрансфераза 3 (METTL3) метилирует pri-miRNA, помечая их m^6A для распознавания и обработки DGCR8. Было показано, что подавление экспрессии METTL3 уменьшило связывание DGCR8 с pri-miRNA и привело к глобальному снижению количества зрелых miRNA и одновременному накоплению непроцессированных pri-miRNA. Таким образом, метка m^6A действует как ключевая посттранскрипционная модификация, способствующая инициации биогенеза miRNA [9].

В исследовании роли miRNA в метилировании ДНК риса (*Oryza sativa*) были обнаружены десятки локусов miRNA, которые производят только 24 нт miRNA (длинные miRNA, или lmiRNAs). [10]. В *Arabidopsis thaliana* DCL3-зависимые 24 нт варианты многих «канонических» miRNA накапливаются в значительном меньшем количестве [11]. Также было показано, что некоторые lmiRNA могут направлять метилирование цитозинов ДНК в своих собственных локусах в цис-положении и в своих целевых генах в транс-положении, что иногда приводит к транскрипционному подавлению генов [10].

Метилирование ДНК, направленное на малые РНК (RdDM), является ключевым регуляторным путем, который влияет на многочисленные признаки растений, изменяя экспрессию различных генов. Например, погружение в воду привело к количественным изменениям микроРНК miR2936 и miR398, но это не оказало сильного влияния на их предполагаемые целевые мРНК. Анализ мутантов, затронутых в различных ветвях РНК-сигнализации, выявил сопряжение сигнализации AGO1 с путем AGO4-зависимого РНК-направленного метилирования ДНК (RdDM). AGO4-зависимый RdDM подавляет экспрессию RPW8 4 (HR4) и изменяет его реакцию на погружение. Примечательно, что метилирование второго экзона HR4 не только было снижено в ago4-1, но и в растениях, сверхэкспрессирующих конститутивно стабильную версию кислородного сенсора, связанного с APETALA2 12 (RAP2.12), что указывает на сопряжение кислородной сигнализации с эпигенетической регуляцией экспрессии генов [12].

Метилирование ДНК и регуляция посредством микроРНК в настоящее время всё чаще рассматривают как единый блок клеточного ответа растительного организма. Например, при обработке микроспоровых культур капусты (*Brassica oleracea*) тепловым шоком было идентифицировано 508 дифференциально метилированных областей (DMR); 59,92% DMR коррелировали с транскриптами, а 39,43% локусов miRNA были связаны с уровнями метилирования. Важно отметить, что анализ сопряженности показал, что 31 дифференциально экспрессируемый ген (DEG) был нацелен на метилирование и miRNA, и был, в основном, вовлечен в реакцию активных форм кислорода (ROS) и сигнализацию абсцизовой кислоты (ABA), что указывает на то, что тепловой шок индуцировал метилирование ДНК, а miRNA регулировали реакции ROS и ABA при эмбриогенезе микроспор [13].

В настоящее время считается, что у растений большинство miRNA являются специфичными для семейства или вида. Это подразумевает, что большинство известных генов miRNA возникло относительно недавно в ходе эволюции. В отличие от высококонсервативных древних miRNA, молодые miRNA часто слабо экспрессируются, обрабатываются неточно, не имеют мишеней и демонстрируют закономерности нейтральной изменчивости. [14].

Многочисленные пути регуляции генов, опосредованные малыми РНК, включая микроРНК, часто связанные с RdDM, были охарактеризованы, в основном, у цветковых растений. Однако для сравнительных исследований регуляции генов наземных растений были изучены данные эпигенетические механизмы у печеночника *Marchantia polymorpha* и мха *Phsycomitrella patens*. *M. polymorpha* обладает механизмами регуляции посредством микроРНК и РНК-зависимого метилирования ДНК, аналогичными тем, которые встречаются у цветковых [15]. Интересно, что у *M. polymorpha* и *P. patens* 21 нт малые РНК преобладают над 24 нт малыми РНК в отличие от *Arabidopsis* [16], хотя, как говорилось выше, если сравнить *Arabidopsis* с *Oryza sativa* количество 24 нт микроРНК в *Arabidopsis* было значительно меньше [11]. Несмотря на малое количество 24 нт miRNAs, гены MpAGO4a, и MpAGO9, компоненты РНК-полимеразы IV-V и MpDCL3 были обнаружены в геноме печеночника, что указывает на существование механизма РНК-зависимого метилирования ДНК для эпигенетической регуляции геномной ДНК у *M. polymorpha*. Однако, в *M. polymorpha* только семь микроРНК (miR160, miR166, miR171, miR319/miR159, miR390, miR408 и miR529/miR156) совпадают с таковыми у других наземных растений. Шесть из семи консервативных микроРНК прямо или косвенно, нацелены на факторы транскрипции. В частности, miR160 и miR166 регулируют MpC3HDZ1 и MpARF3, что соответствует данным о их мишенях и в наземных растениях [15].

Система РНК-зависимого метилирования ДНК посредством микроРНК у растений, судя по всему, является древним эволюционным механизмом эпигенетической регуляции. Исходя из филогенетических исследований на различных растительных объектах, а также экспериментальных работах по изучению механизмов RdDM посредством малых некодирующих РНК, можно предположить, что ферментативная система РНК-зависимого метилирования ДНК появилась ещё в ранних растительных организмах и закрепилась эволюционно как эффективная система эпигенетической модификации, в то время как направляющая сила эволюции в ходе адаптации, малые РНК, относятся к более вариабельным молекулярным инструментам. Можно было образно представить, что микроРНК – это отмычки для опробирования новой адаптационной реакции, а ферментативная система RdDM – сила, проворачивающая ключ. Поэтому изучение механизмов эпигенетической регуляции, связанных с метилированием ДНК, в частности, у растений, более широко и содержательно возможно с применение комплексного подхода как со стороны системы метилирования ДНК, так и механизмов регуляции посредством микроРНК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ванюшин Б.Ф. Метилирование ДНК и эпигенетика / Б.Ф. Ванюшин // Генетика. – 2006. – Т. 42. – С. 1-14.
2. Regulation and function of DNA methylation in plants and animals / He X.J. [et al.] // Cell Res. – 2011. – V.21. – P.442-465.
3. Erdmann R.M. RNA-directed DNA Methylation / R.M. Erdmann, C.L. Picard // PloS Genetics. – 2020. – V. 16:e1009034.
4. Chinnusamy V. RNA-directed DNA methylation and demethylation in plants / Chinnusamy V., Zhu JK // Sci China C Life Sci. – 2009. – V.52. – P.331-343.
5. Holoch D. RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression / Holoch D, Moazed D // Nat Rev Genet. – 2015. – V.16. – P.71-84.
6. DNA Methylation in Plants by microRNAs / Teotia [et.al.] // Plant Epigenetics. RNA Technologies. – 2017. – V.13. – P.247-262.
7. Generation of a luciferase-based reporter for CHH and CG DNA methylation in Arabidopsis thaliana / Dinh T. [et al.] // Silence. – 2013. – V.4. – P.1–11.
8. Systematic genome-wide and expression analysis of RNA-directed DNA methylation pathway genes in grapes predicts their involvement in multiple biological processes / Xiang R [et.al.] // Front. Plant Sci. – 2022. – V13:e1089392.
9. N6-methyladenosine marks primary microRNAs for processing / Alarcon C. [et. al]. // Nature. – 2015. – V.519. – P.482-485.
10. DNA Methylation Mediated by a MicroRNA / Wu L [et al.] // Molecular Cell. – 2010. – V. 38. – P.465-475.
11. Evolution of Arabidopsis MIR genes generates novel microRNA classes / Vazquez F. [et al.] // Nucleic Acids Res. – 2008. – V.36. – P.6429-6438.
12. ARGONAUTE1 and ARGONAUTE4 Regulate Gene Expression and Hypoxia Tolerance / Loreti E [et al.] // Plant Physiol. – 2020. – V.82. –P. 287-300.
13. Global DNA Methylation and mRNA-miRNA Variations Activated by Heat Shock Boost Early Microspore Embryogenesis in Cabbage (Brassica oleracea) / Kong C. [et. al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2022. – V.23:5147.
14. Evolution and Functional Diversification of MIRNA Genes / Josh T. [et.al.] // The Plant Cell. – 2011. – V. 23. – P.431-442.
15. Identification of miRNAs and their targets in the liverwort Marchantia polymorpha by integrating RNA-Seq and degradome analyses / Lin PC [et. al.] // Plant and Cell Physiology. –2016. – V.57. – P.339–358.
16. Lin SS, Bowman JL. MicroRNAs in Marchantia polymorpha. /Lin SS, Bowman JL. // New Phytol. – 2018. – V.2. – P.409-416.

УДК 582.623.2:573.6

ВЛИЯНИЕ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ КЛОНОВ ИВЫ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Внукова Н.И.

ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии», г. Воронеж

E mail: *natalya.vnuckova@yandex.ru*

Исследовано влияние L-аргинина и абсцизовой кислоты в двух концентрациях на рост и развитие микроклонов различных видов ивы при депонировании в условиях *in vitro*. При добавлении абсцизовой кислоты в питательную среду отмечено негативное воздействие на морфогенез регенерантов. Добавление в питательную среду аргинина в концентрации 200 мг/л оказало положительный эффект на жизнеспособность клонов, что способствовало более высокой сохранности культур по сравнению с контролем.

ВВЕДЕНИЕ

Проблема эффективного хранения культур ивы в условиях *in vitro* решается разными методами. Наиболее часто микропобеги депонируют при низких положительных температурах (1-10°С), низкой интенсивности света, коротком фотопериоде. Помимо этого, в среду могут добавляться антиоксиданты и стресс-протекторы, защищающие клетки растений от низких температур и дефицита влаги. В этом случае интервал между пересадками удлиняется до 12 месяцев с дальнейшим возобновлением у 80-90% роста растений [1]. Беспересадочный период на безгормональных средах в условиях нормального роста для культур ивы *in vitro* в значительной степени зависит от генотипа и составляет от 2 до 4 месяцев. Увеличение периода субкультивирования возможно, например, при введении в питательную среду веществ, тормозящих рост растений, или замедляющих процесс некротизации тканей регенерантов. Одним из наиболее активных эндогенных ингибиторов ростовых процессов является абсцизовая кислота (АБК). АБК рассматривается как антистрессовый фактор [2, 3]. Установлено, что добавление в питательную среду АБК тормозит рост культуры *in vitro* [4, 5]. Амидная форма L-аргинина, являясь легко усвояемой для растений, стимулирует процесс клеточного деления и способствует лучшему корнеобразованию у многих растений [6].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследований служили клоны различных видов ивы: 1И – *Salix dasyclados* Wimm., 3И – *S. caspica* Pall., 5И – *S. purpurea* L., 6И – x *S. palustris* Host. и 7И – *S. viminalis* L. [7]. Базовой была питательная среда SWPM, культивирование микропобегов проводилось в стандартных биотехнологических условиях (температура 25±2°С, фотопериод 16 ч день/8 ч ночь, мощность освещения 2,0 клк). Хранение культур осуществляли в биологических пробирках объемом 50 мл, закрытых алюминиевыми колпачками. В питательную среду добавляли абсцизовую кислоту (АБК) в концентрациях 5 и 10 мг/л, L-аргинина – 100 и 200 мг/л. Контролем служили микрорастения на питательной среде без добавок.

Через 3 недели учитывали укореняемость микропобегов (%) от общего числа в каждом варианте, через 3 месяца измеряли высоту регенерантов, подсчитывали число междоузлий и сохранность. Жизнеспособность побегов по внешнему виду (наличие новых листьев, некрозы, усыхание и т.д.) так же оценивали через 4 и 6 месяцев.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В серии опытов в питательную среду добавляли аминокислоту аргинин, являющуюся источником азота в амидной форме, и абсцизовую кислоту – гормон, тормозящий рост и развитие растений. Уже на этапе ризогенеза четко были видны различия: в вариантах сред с АБК укореняемость побегов была самой низкой (30-80%), корни у микрорастений хоть и были довольно толстыми, но в тоже время короткими, неразвитыми (табл., рис. 1). Через три месяца после посадки у трех клонов из пяти выявлены достоверно значимые различия высоты побегов и числа междоузлий по сравнению с контролем (уменьшение в опытных вариантах). Так высота побегов ивы оказалась на опытной среде в 1,5-3,7 раза меньше, чем в контроле. Сохранность у клонов 1И, 6И и 7И не превышала 50%, причем на среде с концентрацией АБК 10 мг/л у всех клонов была самой низкой из всех испытанных вариантов (20-30%).

Таблица .

Морфометрическая характеристика микрорастений клонов ивы на различных по составу питательных средах

Клон	Питательная среда ½ WPM с добавлением		Укореняемость, %	Высота побегов, см[1]	Число междоузлий, шт[1]	Сохранность,%[1]
	Аргинин, мг/л	АБК, мг/л				
1И	-	-	100	4,6±0,42	4,3±0,50	100
	100	-	90	4,2±0,20	4,0±0,33	100
	200	-	100	3,4±0,33	3,6±0,29	100
	-	5	80	2,3±0,30[2]	3,0±0,38	50
	-	10	60	1,4±0,39[3]	1,5±0,51[3]	30
3И	-	-	100	4,4±0,32	7,1±0,62	100
	100	-	100	4,1±0,58	5,8±1,02	90
	200	-	100	3,7±0,19	6,9±0,57	100
	-	5	60	2,8±0,91	4,2±1,43[2]	60
	-	10	60	2,7±0,74	4,0±0,89[2]	30
5И	-	-	100	3,3±0,32	3,6±0,22	100
	100	-	100	3,8±0,30	4,2±0,33	100
	200	-	100	3,5±0,34	3,8±0,41	100
	-	5	80	1,0±0,21[3]	1,4±0,32[3]	70
	-	10	50	0,9±0,25[3]	1,0±0,09[3]	30
6И	-	-	100	4,7±0,30	7,7±0,44	100
	100	-	100	4,5±0,50	6,2±0,62	100
	200	-	100	3,3±0,43[2]	6,0±0,63	100
	-	5	70	3,0±0,42[3]	3,5±0,31[3]	40
	-	10	30	2,9±0,49[3]	3,3±0,51[3]	20
7И	-	-	100	4,2±0,43	5,7±0,78	100
	100	-	100	4,1±0,51	6,0±0,71	100
	200	-	100	4,4±0,57	6,1±0,47	100
	-	5	50	2,9±0,38	4,3±0,59	30
	-	10	50	2,7±0,70	4,0±0,64	20

Примечание. [1] - Высота побегов, число междоузлий и сохранность подсчитаны через 3 месяца после посадки

[2] - отличия от контроля значимы при $p<0,05$

[3] - отличия от контроля значимы при $p<0,001$

Эксперименты показали, что на среде с аргинином у всех генотипов укореняемость была высокой (90-100%), морфометрические параметры сопоставимы с контролем, сохранность культур через 3 месяца составляла 100%. Однако при дальнейших наблюдениях выяснилось, что у всех клонов на средах с 200 мг/л аминокислоты микрорастения дольше оставались зелеными, выживаемость через 4 месяца составляла 90 –100% против 70 –80% в контроле, рис 2.

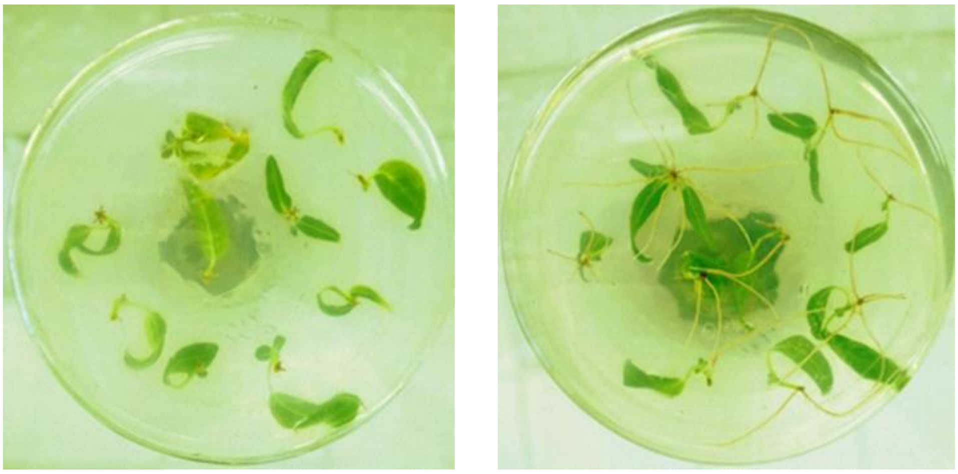


Рис. 1. Корни микрорастений ивы на среде SWPM через 2 недели после посадки: слева – при добавлении АБК, справа – в контроле.

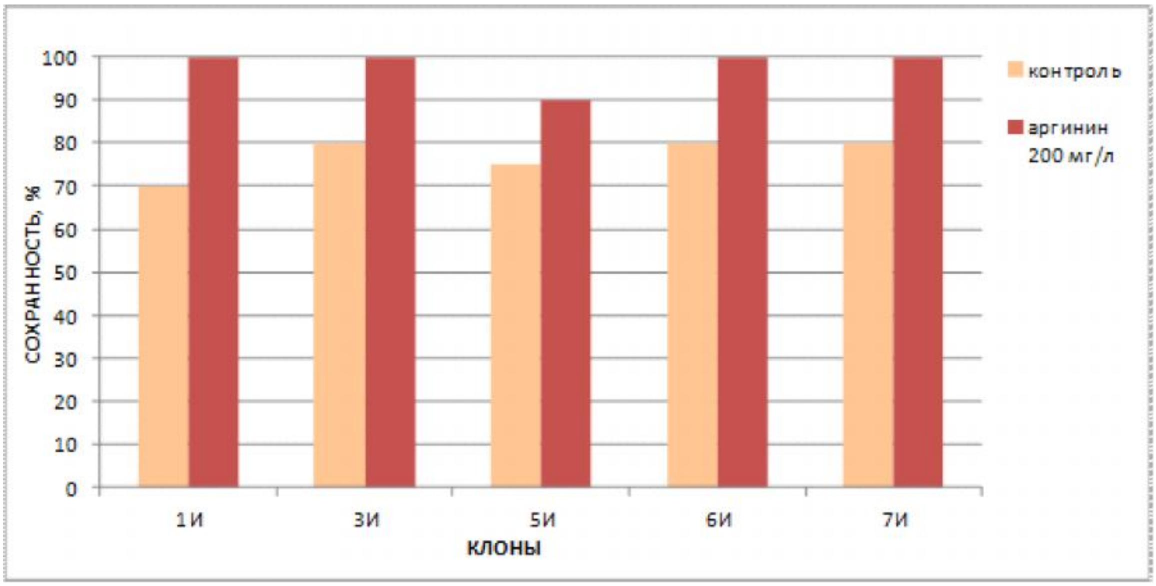


Рис. 2. Сохранность микрорастений клонов ивы через 4 месяца хранения в культуральной комнате

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом для всех клонов ивы добавление в среду абсцизовой кислоты (5-10 мг/л) сказалось негативно на процесс ризогенеза, побегообразования и сохранность. Применение аргинина в концентрации 200 мг/л для испытуемых клонов оказало положительное влияние на жизнеспособность микропобегов. После четырех месяцев и в контроле и на всех модификациях среды у растений начали активно развиваться процессы некротизации, усыхания (в том числе из-за уменьшения количества среды в сосудах), а через шесть месяцев большинство растений погибло, за исключением культур на среде с аргинином (200 мг/л): около 20% микрорастений ивы оставались жизнеспособными вплоть до 8-го месяца. Однако, при наличии соответствующего оборудования (холодильника–витрины), предпочтительнее способ хранения при пониженной температуре [1].

Исследование выполнено при использовании материалов биоресурсной научной коллекции ВНИИЛГИСбиотех «Коллекция in vitro клонов ценных генотипов лиственных древесных растений», УНУ № 569228.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Внукова Н. И. Сохранение ивы *in vitro* в условиях низкой температуры // «Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов». – Вып. 26, 2024. – С. 65-69.
2. Кефели В.И. Природные ингибиторы роста. // Физиология растений. – 1997. – Т. 44, № 3. – С. 471–480.
3. Четверикова Е.П. Роль абсцизовой кислоты в морозоустойчивости растений и криоконсервации культур in vitro // Физиология растений. – 1999. – Т. 46, № 5. – С. 823–929.
4. Vasudevan A., Selvaraj N., Ganapathi A., Kasthurirengan S., Ramesh Anbazhagan V. Glutamine: a suitable nitrogen source for enhanced shoot multiplication in Cucumis sativus L. // Biol. Plant. – 2004. – V 48. – P 125–128.
5. Gebhardt K. , Fruhwacht-Wilms U., Weisgerber H. Micropropagation and restricted-growth storage of adult oak genotypes // Ann. sci. for. – 1993. – Vol. 50, Suppl. 1. – P. 323–329
6. Jarret R.L., Gawel N. Abscisic acid-induced growth inhibition of sweet Potato (Ipomoea batatas L.) in vitro // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2004. – Vol. 24, № 1. – P. 13–18.
7. Машкина О.С., Табацкая Т.М., Горобец А.И., Шестибратов К.А. Метод клонального микроразмножения различных видов и гибридов ивы // Биотехнология. – 2010. – № 1. – С. 51– 59.

УДК 577.12

КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ микроРНК MIR159B В ЛИСТЬЯХ КУКУРУЗЫ ПРИ СОЛЕВОМ СТРЕССЕ

Волкова Ю.И., Федорин Д.Н.

Воронежский государственный университет, Воронеж
E-mail: *ulia.volk54@gmail.com*

Раскрывается влияние микроРНК на регуляцию ключевых генов, что может приводить к различным дефектам в развитии растений. Рассматривается воздействие miR159B на посттранскрипционные механизмы регуляции. Также исследуется оценка содержания микроРНК miR159b в листьях кукурузы при воздействии абиотического стресса, вызванного засолением.

ВВЕДЕНИЕ

МикроРНК представляют собой класс некодирующих молекул РНК, как важнейших регуляторов различных биологических процессов в растениях. МикроРНК играют важнейшую регуляторную роль ранней ответной реакции клетки на стрессовое воздействие [8]. Было показано, что дисфункция отдельных микроРНК и/или их способности должным образом регулировать свои мишени вызывает дефекты цветения и формирования рисунка листьев (miR159 и miR319), дефекты развития цветка и сроков (miR172), потерю полярности органов и измененное развитие сосудов (miR165/166), дефектное разделение органов и отклоняющееся количество цветочных органов (miR164), а также дефекты формы и симметрии семядолей и розеточных листьев, сниженная фертильность и неправильная экспрессия генов раннего ответа на ауксин (miR160) [2].

МикроРНК miR159B представляет собой одну из самых древних микроРНК в растениях [2]. Большинство видов растений содержат несколько членов этого семейства, которые кодируют идентичные или очень похожие изоформы, или “изомиры”, отличающиеся на один-несколько нуклеотидов. Например, кукуруза имеет 11 различных локусов MIR159, кодирующих четыре разные изоформы miR159. По большей части, изменение нуклеотидов происходит на концах микроРНК, в положениях, которые считаются менее важными для ее специфичности [6].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали листья кукурузы (Zea mays L.) сорта Воронежская 76, выращенные гидропонным способом при температуре 25°С в течение 10 дней.

Солевой стресс имитировали инкубированием растений с корнями в 150 мМ растворе NaCl; контрольные растения подвергались воздействию воды. Первый отбор образцов осуществляли непосредственно перед инкубацией, а следующие отборы проводились через 3, 6, 12 и 24 ч. воздействия.

Выделение суммарной РНК из растительных образцов осуществляли методом гуанидинтиоцианат-фенол-хлороформной экстракции. В качестве осадителя использовали LiCl.

Обратную транскрипцию мРНК проводили с использованием обратной транскриптазы M-MuLV (СибЭнзим, Россия) согласно инструкции производителя.

Для получения кДНК анализируемой микроРНК проводили обратную транскрипцию со специфическим разработанным зондом для miR159b. Параметры проведения обратной транскрипцию следующие: инкубация смеси при 16°C - 30 мин, 42°C - 30 мин, 85°C - 5 мин [1, 4].

Полимеразную цепную реакцию с генспецифичными праймерами проводили с помощью набора реактивов AmpliSence (Хеликон, Россия). Референсным геном выступал ген фактора элонгации *ef-1ά* [13]. Нуклеотидный состав праймеров mir: прямой 5’- ACCTGGCGTTTGGATTGAAG-3’, обратный 5’-GTGCAGGGTCCGAGGT-3’. Параметры амплификации были следующие: предварительная денатурация - 95°С 5 минут, цикл - 95°С - 30 сек., 58°С - 30 сек., 72°С - 30 сек. (детекция), финальная элонгация - 72°С - 10 минут.

Применяли программное обеспечение Opticon MonitorTM Software (Bio-Rad, США) для установления содержания miR159b на основе $2^{-\Delta\Delta Ct}$-метода [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка зонда типа «стебель-петля» для оценки количества miR159b методом полимеразной цепной реакции

1. Для количественного определения микроРНК применяется схема обратная транскрипция-ПЦР. Для этого создавался специфически организованный праймер по типу «стебель-петля», обеспечивающий формирование кДНК-матрицы для дальнейшей ПЦР [7]. Схема разработки зонда для количественной оценки miR_159b включает следующие этапы [4]:

1) Последовательность интересующей микроРНК

5’- UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUU-3’

Для увеличения размера ПЦР-продута, необходимого для его количественной оценки методом ПЦР в реальном времени использовали последовательность из 44 нуклеотидов, представляющую собой вариант «стебель-петля», 5’GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGA TACGAC-3’ с комплементом из шести 3’-нуклеотидов. Эта шести нуклеотидная последовательность представляет собой последовательность зрелой мРНК, что является праймером обратной транскрипции «стебель-петля» miR159b:

5’GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACA AGAGC-3’

2) Прямой праймер для ПЦР в реальном времени:

5’-ACCTGGCGTTTGGATTGAAG-3 ’

3)Обратный праймер для проведения ПЦР в реальном времени:

5’-CAG CAT AGG TCA CGT CCC A-3’

После добавления к базовому зонду из 44 нуклеотидов последовательности обратного праймера для ПЦР, к 3’-концу последовательности стебельной петли добавили 21-нуклеотидный комплемент микроРНК, что увеличило размер целевого продукта амплификации до 65 нуклеотидов. После этого добавили шесть 5’-концевых нуклеотидов прямого праймера для ПЦР-РВ к 5’-концу полученного ранее зонда. Результатом формирования специфического зонда для количественной оценки зрелой микроРНК miR159b с помощью ПЦР в реальном времени является 71-нуклеотидная кДНК второй цепи miR-H1, формируемая при проведении обратной транскрипции. Таким образом, разработанный зонд позволяет проводить количественную оценку miR159b в кукурузе в различных экспериментальных условиях.

Результаты ПЦР-анализа кДНК со специфическими праймерами к miR159b показали наличие одной полосы при электрофоретическом исследовании, что является результатом специфического связывания праймеров с матрицей (рис. 1).

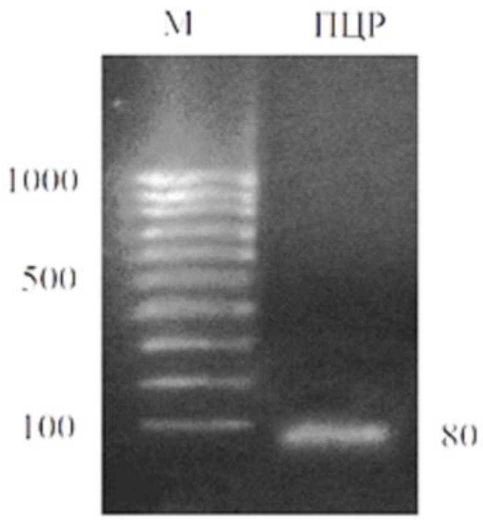


Рис. 1. Электрофореграмма ПЦР-продуктов со специфическими праймерами к miR159b. М – маркеры длин нуклеотидных последовательностей, ПЦР – продукт амплификации.

Размер полученных ПЦР-продуктов составил ~70 пн., что совпадает с теоретически рассчитанным размером на основе разработанного зонда для данной микроРНК. Таким образом, разработанный зонд позволяет проводить количественную оценку miR159b в кукурузе в различных экспериментальных условиях.

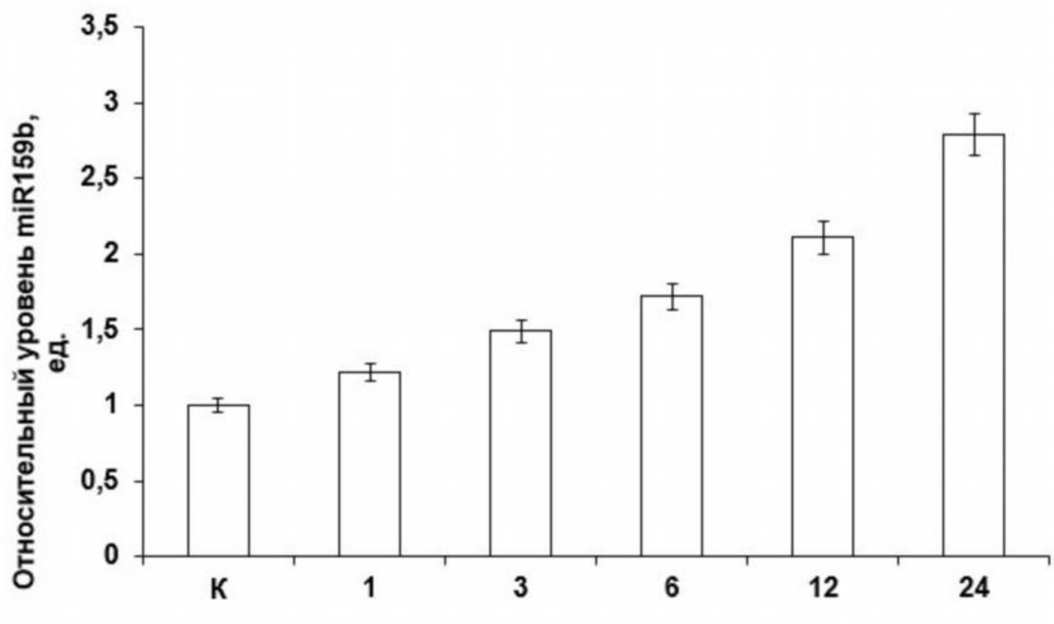


Рис. 2. Относительный уровень miR159b в листьях кукурузы при засолении.

После проведения эксперимента и анализа результатов выделения микроРНК и ПЦР в реальном времени, было выявлено, что при увеличении выдержки объекта в солевом растворе, увеличивается содержание miR159b в кукурузе (рис. 2). Следовательно, miR159b сильнее экспрессируется при абиотическом стрессе растения, что может говорить о защитной функции, увеличивая устойчивость растения. Засоление приводят к увеличению содержания зрелой miR159b относительно контрольного варианта, что указывает о ее солезависимой регуляции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования показали, что создание солевого стресса приводит к увеличению содержания зрелой miR159b в листьях кукурузы. К 24 часу экспозиции в 150мМ растворе хлорида натрия количество анализируемой микроРНК увеличилось в 2,79 раза. Следовательно, солевой стресс проявляется в накоплении miR159b в листьях кукурузы, что характеризует ее как солезавимую микроРНК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A Uniform System for the Annotation of Vertebrate microRNA Genes and the Evolution of the Human microRNAome / B. Fromm [et al.] // Annu. Rev. Genet. - 2015. - V. 23. - P. 213–242.
2. Axtell M.J., Antiquity of MicroRNAs and Their Targets in Land Plants / M.J. Axtell, D.P. Bartel // The Plant Cell. - 2005. - V. 17. - P. 1658–1673.
3. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress / N. Nicot [et al.] // J. of Exp. Bot. - 2005. - V.56. - P. 2907–2914.
4. Kramer M.F. STEM-LOOP RT-qPCR for miRNAS / M.F. Kramer // Curr Protoc Mol Biol. – 2011. - CHAPTER: Unit15.
5. Livak K.J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ДДCt method / K.J. Livak, T.D. Schmittgen // Methods. - 2001. - V.25. - P. 402–408.
6. MicroR159 regulation of most conserved targets in Arabidopsis has negligible phenotypic effects / R.S. Allen [et al.] // Silence. - 2010. - V. 1:18.
7. Realtime quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR / C. Chen [et al.] // Nucleic Acids Res. - 2005. - V. 33:e179
8. Small RNAs: The Essential Regulators in Plant Thermotolerance / Z-F. Zuo [et al.] // Front. Plant Sci. - 2021. - V. 12:726762.

УДК 591.1

ОБЛЕГЧЕНИЕ СИМПТОМОВ СИНДРОМА ЭНИГМЫ У *EUBLEPHARIS MACULARIUS*

Голикова А.С., Гатауллина М.О.

Воронежский государственный университет, Воронеж
E-mail: *golikovaanna617@gmail.com*

Синдром Энигмы у эублефаров — это довольно распространенное неврологическое расстройство. Энигма-синдром, или ЭС, не излечим и является результатом размножения двух эублефаров, при котором по крайней мере один родитель болеет или является носителем доминантного гена. Тяжесть Синдрома Энигмы может быть различной у каждого отдельного эублефара. В данной статье рассматриваются способы облегчения симптомов данного заболевания с целью улучшения жизнедеятельности больных особей.

ВВЕДЕНИЕ

Леопардовый геккон или пятнистый эублефар (*Eublepharis macularius*) - вид ящериц, проживающий на территории Пакистана и Туркменистана, являющийся популярным питомцем во всех странах мира благодаря своей привлекательной внешности и простоте в уходе. Опытные заводчки занимаются разведением самых разных окрасов эублефаров (морфами) [1].

Морфа - генетически обусловленная внешность (цвет чешуи, глаз, наличие узоров) ящерицы. Некоторые морфы несут в себе различные мутации, например, морфа *Lemon frost* нередко сопровождается злокачественными опухолями [4]. Зачастую заболевания являются маркером на ту или иную морфу, например, синдром Энигмы проявляется исключительно у морф *Enigma*.

Синдром энигмы - аутосомно-доминантное нарушение, неврологическое расстройство [3]. На данный момент заболевание неизлечимо. К симптомам относятся нарушение питания, нарушение координации, невнимательность, «наблюдение за звездами», вращение вокруг своей оси, перевороты на спину, судороги, клиническая смерть [2].

Целью исследования являлось облегчение симптомов данного заболевания, а также их возможное исчезновение.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В статье исследовались 4 группы домашних ящериц морфы Enigma snow весом 75 г и возрастом 3 года. Все животные ярко демонстрировали симптомы заболевания, в частности, нарушение кординации и «наблюдение за звездами» (запрокидывание головы, которое является маркером синдрома Энигмы) [2]. Животные были произвольно разделены на 4 группы: контрольная; ящерицы, переселенные в больший террариум; ящерицы, подвергавшиеся тактильному раздражению, а также группа, которая была переселена в больший террариум и подвергшаяся тактильному раздражению.

При этом, площадь террариума была увеличена с 600 см^2 до 2000 см^2. Для более быстрой реакции на появление человека и снижения негативной реакции 1-2 раза в день в период бодрствования исследуемая особь бралась на руки, высаживалась рядом с человеком и находилась так в течении 10-30 минут.

Исследовалось поведение всех групп животных, в частости, издавание звуков тревоги, координация, количество промахов по корму, агрессия и другие.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Особенность особей морфы Enigma, имеющих синдром, является их раздражимость, которая проявляется не сразу: если взять эублефара на руки и поглаживать, ему необходимо затратить около 2х минут на осознание произошедшего, затем появляется раздражение, попытки сбежать (с возможным самоповреждением). Особи без синдрома понимают это еще до того, как их поймают [3]. Но не смотря на повышенную агрессию, ящерицы с Энигмой практически не издают звуков, в отличие от здоровых особей, которые могут активно кричать при малейшем испуге [2].

Стоит отметить, что снижение симптомов действует кооперативно, т.е. при тактильном раздражении животного с маленькой площадью террариума (группа 2) прогресс был минимальным, а общение с ящерицей приводило к её агрессивному поведению. При отсутствии тактильного раздражения с увеличенным террариумом (группа 3) был прогресс, связанный с питанием: ящерицы перестали отказываться от еды, и попадали по ней с 2-3 раза, но они стали очень пугливыми, практически не выходили из укрытия, а после приёма пищи становились перевозбужденными: бегали по террариуму, забирались на укрытия, много кружились вокруг себя. У группы с большим террариумом и тактильным раздражением (группа 4) есть положительная динамика: “наблюдение за звёздами” и агрессия свелись к нулю, исчезли проблемы с питанием: ящерица перестала промахиваться по еде, отказываться от нее. Следовательно, пространство вокруг значительно влияет на координацию эуюлефара. Также обнаружено, что скорость «осознания» нового местоположения стала варьироваться от 10 секунд до 1 минуты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синдром Энигмы у леопардовых гекконов остается неизлечимым, но при должном уходе и внимании симптомы сводятся к минимуму, могут вовсе отсутвовать [2]. Одним из возможных методов облегчения состояния является увеличение площади террариума, в котором обитает животное, совместно с тактильным раздражением.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ахметьянова А.Р. и др. Сравнение условий содержания древесных и наземных видов гекконов на примере эублефара и реснитчатого бананоеда//Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2022. – №. 4 (96). – С. 233-238.
2. Маркевич К. А., Колосова О. В. Синдром энигмы у леопардовых гекконов // Ветеринария, зоотехния непродуктивных животных (материалы IV региональной научной конференции 29 ноября 2023 года, г. Красноярск) – 2023. – С. 66.
3. Васильев Д. Б. Ветеринарная герпетология: ящерицы. / Васильев Д.Б. - М.: Проект-Ф, 2005. - С. 77-81.
4. Ярофке Д. Рептилии и лечение. / Ярофке Д. - М.: Аквариум-Принт, 2005. - С. 128, 219, 293.

УДК 577.12

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПИРУВАТДЕГИДРОГЕНАЗНОГО КОМПЛЕКСА ПРИ СОЛЕВОМ СТРЕССЕ В ЛИСТЬЯХ КУКУРУЗЫ

Гомрани Саид Джамел-эддине, Чуйкова В.О., Федорин Д.Н., Епринцев А.Т.

Воронежский государственный университет, Воронеж

E-mail: *saiddjamel-eddine@yandex.ru*

Проведен анализ транскрипционной активности 2 генов пируватдегидрогеназного комплекса в условиях засоления: PDH, кодирующего пируватдегидрогеназу, и DLD, кодирующего дигидролипоилдегидрогеназу. Показано, что уровень экспрессии генов снизился до показателей ниже контрольных образцов кукурузы при действии 150мМ раствора хлорида натрия.

ВВЕДЕНИЕ

В меняющемся мире растения испытывают различные виды экологических стрессов (засоление, засуха, холод, наводнения, тяжелые металлы, озон, ультрафиолетовое излучение и т.д.), которые влияют на рост культур, урожайность и продуктивность [2]. Из факторов окружающей среды засоление является одним из самых серьезных абиотических стрессов, поскольку большинство злаковых растений чувствительны к нему. Засоление - это накопление солей (часто с преобладанием хлорида натрия (NaCl)) в почве и воде до уровня, который может оказать негативное воздействие на сельское хозяйство [7].

Очевидно, что солевой стресс отрицательно влияет на всхожесть семян, скорость фотосинтеза, физиологические и метаболические процессы выработки энергии, жизнеспособность самых разных культур, в том числе кукурузы, посредством ионного, осмотического и окислительного воздействия [6].

Для выработки энергии все организмы используют метаболические пути. Важным этапом в этом процессе является переход между гликолизом и циклом лимонной кислоты. Комплекс пируватдегидрогеназы (PDC) играет ключевую роль в данной стадии катаболизма, превращая пируват в ацетил-КоА. Продукт пируватдегидрогеназного комплекса вступает в цикл лимонной кислоты для дальнейшего производства энергии. Эта реакция необходима для поддержания клеточного дыхания и энергетического баланса [3].

Известно, что ПДК представляет собой мультиэнзимный комплекс, катализирующий окислительное декарбоксилирование пирувата с образованием ацетил-КоА и NADH. Преобразование происходит в ходе многоступенчатой последовательности реакций, катализируемых несколькими ферментами и коферментами. Растительные комплексы содержат три основных компонента: пируватдегидрогеназу (E1, КФ 1.2.4.1), дигидролипоилацетилтрансферазу (E2, КФ 2.3.1.12) и дигидролипоилдегидрогеназу (E3, КФ 1.8.1.4). Активные центры всех трёх ферментов находятся недалеко друг от друга. Их структурное расположение способствует прямой передаче промежуточных продуктов реакции, предотвращая их диффузию и потенциальную потерю. Коферментами комплекса являются тиаминпирофосфат, ФАД, КоА, НАД и липоевая кислота [4].

Размер и состав комплекса различается у разных организмов, что отражает адаптацию к метаболическим потребностям. В эукариотических клетках комплекс находится в матриксе митохондрий, связывая гликолиз и цикл лимонной кислоты. У бактерий PDC находятся в цитоплазме и имеют структурные различия, обусловленные метаболизмом прокариот. Несмотря на эти различия, архитектура, состоящая из множества ферментов, остаётся неизменной, что подчёркивает её эволюционное значение [5].

Анализ международной базы данных NCBI позволил обнаружить, что в настоящее время в геноме кукурузы обнаружено 3 гена, кодирующих ферменты пируватдегидрогеназного комплекса: PDH- пируватдегидрогеназу, DLAT-дигидролипоилацетилтрансферазу, DLD-дигидролипоилдегидрогеназу.

Несмотря на имеющиеся сведения о важной роли пируватдегидрогеназного комплекса в участии выработки энергии, данных о механизме работы генов растительной ПДК в условиях засоления в настоящий момент обнаружено не было. Целью данной работы являлось исследовать динамику экспрессии генов PDH, DLAT, DLD пируватдегидрогеназного комплекса в листьях кукурузы при действии солевого стресса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта для исследования были использованы листья 14-дневной кукурузы (*Zea mays* L.), которая была выращена гидропонным способом при 25°С, 12-часовом световом дне с интенсивностью света 25 Вт/м^2.

Постановка эксперимента по действию солевого стресса осуществлялась путём помещения растений из опытной группы в 150 мМ водный раствор хлорида натрия, и отбор образцов осуществляли через 1, 3, 6, 12, 24 часа от начала эксперимента. В качестве контрольной группы использовались растения, помещённые в воду на 24 часа.

Выделение суммарной РНК из растительных образцов осуществляли методом фенол-хлороформной экстракции. Специфическим соосадителем являлся 12М LiCl.

Реакцию обратной транскрипции осуществляли с использованием набора MMLV RT kit (ЗАО «Евроген») согласно рекомендациям производителя.

Подбор праймеров производился на основе нуклеотидных последовательностей, представленных в международной базе данных NCBI с помощью программы PrimerBlast (таблица 1).

Таблица 1.

Праймеры к генам пируватдегидрогеназного комплекса

Название		Последовательность нуклеотидов	Размер продукта, п.н.	Температура отжига, °С
PDH	Прямой	GCTGCCAACCTTGAGAGGAT	167	59
	Обратный	TCTTTCTGCAGCACGGACAT		
DLAT	Прямой	TGGGTGCTTCTCACCCATAG	192	62
	Обратный	TACACACATCCTTACCCACCT		
DLD	Прямой	CTTGGAACCCATGTGCAGGA	134	61
	Обратный	ACCGCAACTGGCTCATTCAT		

Экспрессию генов исследовали с помощью проведения ПЦР в реальном времени на приборе LightCycler96 («Roche», Швеция) с применением Taq-полимеразы (ЗАО «Евроген») согласно рекомендациям производителя. В качестве интеркалирующего красителя использовали SYBR Green I.

Количество матрицы контролировали с помощью параллельной амплификации фактора элонгации EF-1A с ген-специфичными праймерами. Относительный уровень экспрессии исследуемых генов рассчитывали с применением $2^{-\Delta\Delta Ct}$-метода.

Опыты проводили в 3-4-кратной повторности, аналитические определения для каждой пробы осуществляли в трех повторностях. Предварительная оценка характера распределения проводилась по асимметрии и эксцессу (Excel, Microsoft Office), а также с помощью критерия Колмогорова-Смирнова [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения экспрессии генов пируватдегидрогеназного комплекса использовали метод ПЦР в реальном времени.

В ходе исследования было установлено, что относительный уровень транскриптов гена PDH, кодирующего пируватдегидрогеназу (КФ 1.2.4.1), увеличился в 4 раза после 6 часов воздействия раствора 150мМ NaCl по сравнению с контрольной группой (рис. 1). С течением времени экспрессия гена уменьшилась до более низких значений относительно начальных показателей контрольных образцов, что говорит о его инактивации в результате длительного воздействия соли.

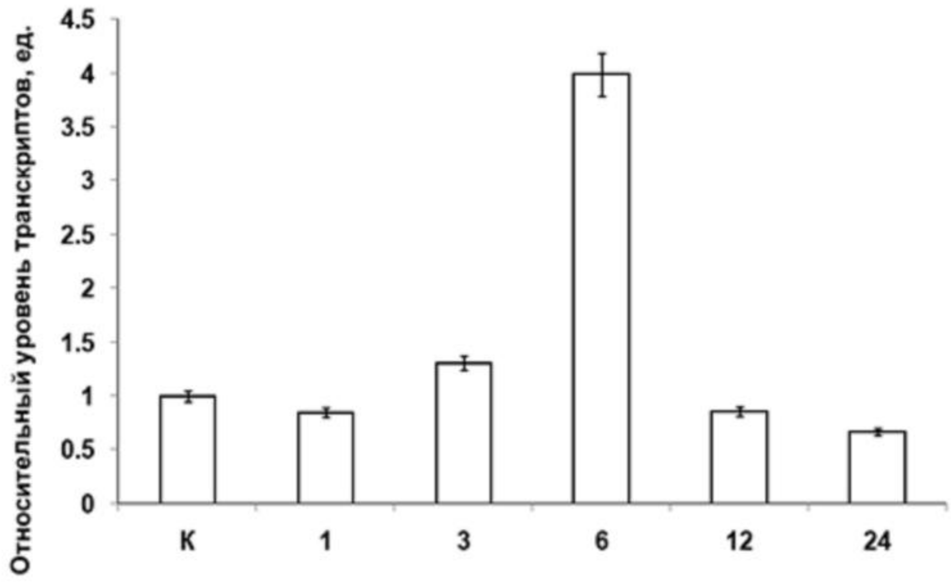


Рис. 1. Относительный уровень транскриптов гена PDH в листьях кукурузы в условиях солевого стресса.

Уровень экспрессии гена DLD, кодирующего дигидролипоилдегидрогеназу (Е3, КФ 1.8.1.4) – 3-го фермента пируватдегидрогеназного комплекса, в первый час эксперимента увеличился на 0,3 раза, что свидетельствует об адаптации фермента к кратковременному воздействию засоления. В последующие часы влияния 150мМ раствора NaCl наблюдается постепенное снижение экспрессии данного гена до уровня ниже контрольных значений на 0.4 раза (рис. 2).

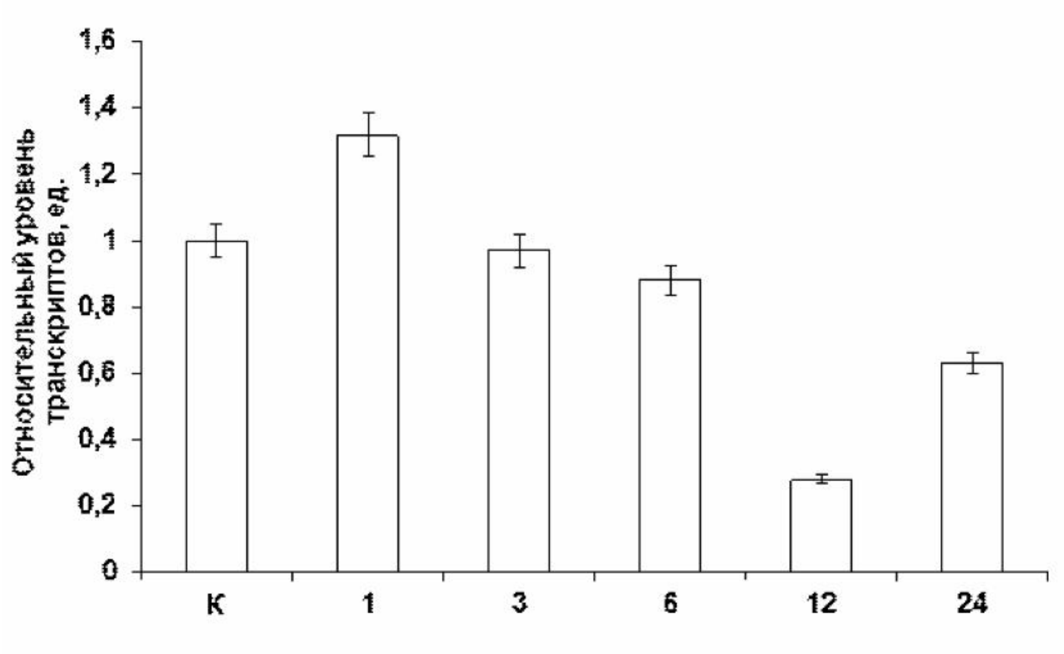


Рис.2. Относительный уровень транскриптов гена DLD в листьях кукурузы в условиях солевого стресса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, был проведен анализ транскрипционной активности 2 генов пируватдегидрогеназного комплекса в условиях засоления: PDH, кодирующего пируватдегидрогеназу, и DLD, кодирующего дигидролипоилдегидрогеназу. Результаты экспрессии гена DLAT, кодирующего дигидролипоилацетилтрансферазу, находятся на стадии исследования.

У растений, экспонирующихся в воде 24 ч, уровень мРНК генов PDH и DLD отличается по сравнению с образцами, которые подвергались воздействию солевого стресса. Относительный уровень транскриптов гена PDH в листьях кукурузы повысился спустя 6 часов влияния 150мМ раствора хлорида натрия в 4 раза по сравнению с контрольной группой. Уровень мРНК гена DLD увеличился на 0,32 раза спустя 1 час экспонирования образцов, на 6 час экспрессия уменьшилась. В обоих случаях эксперимента по действию раствора соли на 24 час произошло снижение показателей мРНК ниже контрольных значений. Это свидетельствует об изменении динамики экспрессии генов ПДК при засолении.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. - М.: Высш. шк., 1990. - 351с
2. Salt Stress Tolerance in Rice: Emerging Role of Exogenous Phytoprotectants / A.Rahman [et al.] // Advances in International Rice Research. — 2017. — DOI: 10.5772/67098.]
3. Role of the Pyruvate Dehydrogenase Complex in Metabolic Remodeling: Differential Pyruvate Dehydrogenase Complex Functions in Metabolism / S. Park [et al.] // Diabetes Metab. — 2018. — Vol. 42, № 4. — P. 270 — 281
4. Tovar-Mendez A. Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity in plant cells / A. Tovar-Mendez , J. A. Miernyk, D.D. Randall // European Journal of Biochemistry. — 2003. — Vol. 270, № 6. — P. 1043 — 1049
5. Structure of the native pyruvate dehydrogenase complex reveals the mechanism of substrate insertion / J. Skerlova [et al.] // Nat Commun. — 2021. — Vol. 12.
6. Mechanisms of Salt Tolerance and Molecular Breeding of Salt-Tolerant Ornamental Plants / J. Guo [et al.] // Front. Plant Sci. — 2022. — Doi: 10.3389/fpls.2022.854116.
7. Stavi I. Soil Salinity and Sodicity in Drylands : A Review of Causes, Effects, Monitoring, and Restoration Measures / I. Stavi, N. Thevs, S. Priori // Front. Environ. Sci. — 2021. — Doi: 10.3389/fenvs.2021.712831.

УДК 612.8

ЭЭГ: ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ КОНЦЕПЦИИ И НОВЫЕ ГОРИЗОНТЫ

Гонтарева В.А., Дружинина С.П., Гуляева С.И.

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Воронеж
E-mail: *druzhson@mail.ru*

Электроэнцефалография (ЭЭГ), как фундаментальный метод исследования в области нейронауки, играет важную роль в регистрации и изучении электрической активности мозга [1].

Со времени первой записи человеческой электроэнцефалограммы немецким психиатром и нейрофизиологом Гансом Бергером в 1929 году, ЭЭГ значительно эволюционировала, обогатившись техническими расширениями возможностей анализа данных.

Методика ЭЭГ оказалась незаменимым инструментом в диагностике, мониторинге и исследовании различных неврологических состояний, включая эпилепсию, расстройства сна и когнитивные нарушения, благодаря способности обеспечивать данные о работе нейронных сетей в реальном времени.

Основанные на принципах электрофизиологии мозга, фундаментальные концепции ЭЭГ подразумевают изучение активности мозговых нейронов, выражающейся через электрические потенциалы и ионные токи. Эта биоэлектрическая активность мозга отражает не только внутренние процессы обработки информации, но и функциональное состояние различных областей мозга в различные периоды активности или покоя [2].

Важным аспектом метода электроэнцефалографии (ЭЭГ) является регистрация электрических сигналов мозга, требующая тщательно спланированного и стандартизированного размещения электродов на поверхности кожи головы. Использование специализированных аппаратов и единых стандартов расположения электродов по системе 10-20, обеспечивает точность, воспроизводимость и сопоставимость результатов исследований. Эти стандарты создают необходимую основу для объективного научного анализа и позволяют использовать современные технологии усиления и цифровизации сигналов для высокоточной регистрации и анализа ЭЭГ данных, углубляя тем самым понимание нейрофизиологических процессов.

Тщательный анализ ЭЭГ-сигналов раскрывает волновые паттерны, такие как альфа-, бета-, дельта- и тета-ритмы, каждый из которых связан с определенными психическими и физиологическими состояниями. Например, альфа-ритмы преобладают во время покоя и расслабления при закрытых глазах, бета-ритмы характеризуют активную умственную деятельность, а дельта- и тета-ритмы часто выявляются в состоянии глубокого сна или могут свидетельствовать о неврологических расстройствах [3].

Методология, лежащая в основе ЭЭГ, включает четко определенные стандарты для проведения исследований: настройку оборудования, контролирование условий эксперимента и подготовку участников. Важные этапы также включают протоколы монтажа электродов и последующие процедуры обработки и анализа сигналов, охватывающие фильтрацию, исключение артефактов, спектральный анализ, определение источников активности и статистическую обработку данных. Преобразование аналоговых сигналов в цифровую форму и последующее использование сложных алгоритмов обработки изыскивают значимую информацию из электрической активности мозга, минимизируя влияние «шумов» [4].

Строгая методология ЭЭГ, направленная на обеспечение достоверности и точности результатов, является основой для сопоставления данных между различными исследованиями и лабораториями, что несомненно играет важную роль в нейронаучных исследованиях и понимании сложных процессов в мозге. Соблюдение установленных стандартов и процедур не только обеспечивает научную строгость, но и позволяет формулировать объективные и значимые выводы о функционировании мозга.

Электроэнцефалография играет важную роль в диагностике эпилепсии, благодаря способности выявлять эпилептиформную активность мозга, которая может не проявляться очевидно в клинической картине. Записи ЭЭГ, особенно в интериктальном периоде, могут обнаружить специфические “спайки” и “волны”, способствуя установлению диагноза и подбору лечения, включая определение чувствительности к антиэпилептическим препаратам.

Помимо эпилепсии, ЭЭГ активно используется в диагностике рассеянного склероза и других нейродегенеративных заболеваний, хотя здесь она выступает в роли вспомогательного инструмента наряду с МРТ. Отклонения в электрической активности мозга, которые могут быть обнаружены при этом, указывают на функциональные изменения, связанные с прогрессированием дегенеративных процессов.

Также ЭЭГ находит свое применение в исследованиях сна и его нарушений. В сочетании с полисомнографией, ЭЭГ способствует мониторингу стадий сна и идентификации патологических изменений во время сна, таких как сонное апноэ или нарколепсия, и нарушения, связанные с фазой REM-сна.

Мониторинг электроэнцефалографии (ЭЭГ) остается неоценимым диагностическим инструментом в неврологии, предоставляя важнейшие сведения о функциональном состоянии мозга и выявляя патологические изменения. Тем не менее, метод ЭЭГ требует внимательного рассмотрения анализа, который зависит от квалифицированности персонала, подчеркивая её роль как ключевого компонента в комплексном подходе к неврологической диагностике [5].

В последнее время применение ЭЭГ наблюдает расширение горизонтов заключенное не только в области клинической практики, но и в проведении когнитивных исследований, разработке интерфейсов мозг-компьютер (ИМК), и в изучении значимости ЭЭГ в контексте нейрореабилитации. В когнитивной науке ЭЭГ применяется для детального изучения мозговой активности, возникающей в результате когнитивных процессов, как например, внимание, память, мышление, давая возможность наблюдать за динамикой нейрональной активности в прямом времени.

Технологии, связанные с интерфейсами мозг-компьютер, используют ЭЭГ для преобразования мозговых сигналов в команды, управляющие компьютером или другими электронными устройствами. Такие системы становятся незаменимыми помощниками для людей с ограниченными физическими способностями, предоставляя им возможность управлять внешним миром с помощью мысленных команд.

В сфере нейрореабилитации электроэнцефалография (ЭЭГ) играет центральную роль, предоставляя ценные прогностические инструменты, позволяющие оценивать динамику ответа пациента на лечение. Эти средства позволяют не только настраивать индивидуализированные реабилитационные программы, но и ускорять процесс восстановления после неврологических травм и заболеваний. Использование ЭЭГ для мониторинга изменений в нейронной активности становится надежным маркером как функционального восстановления, так и нейронной пластичности. Это особенно актуально, учитывая, что мозговая активность может предоставить прямую обратную связь о прогрессе восстановления пациентов.

Кроме того, инновационные разработки в области ЭЭГ, включая портативные устройства, расширяют возможности нейромониторинга, выходя за рамки традиционных лабораторных условий. Такие портативные системы значительно упрощают процесс записи мозговой активности, делая его доступнее для пациентов с хроническими неврологическими заболеваниями.

Удобство использования и возможность непрерывной регистрации активности мозга в реальных жизненных условиях значительно повышают качество наблюдений, обеспечивая постоянную и объективную оценку нейрофизиологического состояния пациентов, что невозможно достичь в условиях стационарного исследования [6].

Применение алгоритмов машинного обучения радикально трансформирует анализ ЭЭГ, повышая эффективность выявления нейронных паттернов и обработки больших объемов данных, что делает возможным, к примеру, детектирование микрособытий мозговой активности, которые недоступны при традиционных подходах. Это значительно расширяет границы диагностики и изучения мозга, закладывая основу для более точного понимания различных патологий и нормальной нейродинамики.

Инновации в технологиях записи, такие как бесконтактная ЭЭГ, предоставляют новые методы, которые избавляют от необходимости физического контакта с кожей головы и связанных с этим неудобств, с подобными традиционными электродами. Это усовершенствование имеет потенциал упростить продолжительные процедуры мониторинга и сделать их более комфортабельными для пациентов, снижая риск инфекций и улучшая общее удобство исследований.

Тем не менее, бурный темп технологического прогресса в ЭЭГ сопровождается важными этическими и правовыми задачами. Приоритетной проблемой является конфиденциальность данных, которая подчеркивает критическую важность защиты личной информации пациентов в условиях повышенной угрозы неправомерного доступа или раскрытия данных. Защита медицинской информации и обеспечение ее конфиденциальности должны находиться в центре внимания всех участников медицинских исследований. Кроме того, этические соображения в области клинических исследований продолжают эволюционировать с расширением диапазона доступных технологий. Эти изменения требуют тщательной оценки этических аспектов исследований, включая справедливость, уважение к личной автономии и достоинству участников, которые сталкиваются с новыми рисками и возможностями в рамках применения высокотехнологичных устройств [1].

Таким образом, передовые инновации в объеме ЭЭГ прокладывают путь к значительным достижениям в понимании мозга и обещают новые практические приложения для улучшения здоровья и благополучия. Вместе с этим, они ставят перед наукой и обществом серьезные вызовы с точки зрения этики и права.

Следовательно, необходим сбалансированный подход к использованию и управлению данными, а также регулированию технологических инноваций с уважением к личным правам и безопасности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Андреенко А.С. Обзор методов математической обработки электроэнцефалограмм / А.С. Андреенко // Известия ТРТУ. – 2000. – № 4 (18). – С. 111-112.
2. Бахарев Б.В. Корреляционно-декрементный анализ энцефалограмм на основе моделирования биопотенциалов коры головного мозга / Б.В. Бахарев // Биофизика. – 2016. – Т. 61, № 4. – С. 793-798.
3. Методические рекомендации «Методика регистрации и формирование заключения по ЭЭГ». – Департамент здравоохранения г. Москвы, 2021.
4. Beniczky S., Schomer D.L. Electroencephalography: basic biophysical and technological aspects important for clinical applications / S. Beniczky, D.L. Schomer // Epileptic Disorders. – 2020. – Vol. 22, No. 6. – P. 697-715. DOI: 10.1684/epd.2020.1217.
5. Jasper H.H., Pertuiset B., Flanigin H. EEG and cortical electrograms in patients with temporal lobe seizures / H.H. Jasper, B. Pertuiset, H. Flanigin // Arch Neurol Psychiatry. – 1951. – Vol. 65. – P. 272-290.
6. Penfield W., Jasper H. Epilepsy and the Functional Anatomy of the Human Brain / W. Penfield, H. Jasper. – Boston: Little, Brown & Co, 1954.

УДК 577.12

ХАРАКТЕР РАСПРЕДЕЛЕНИЯ САЙТОВ МЕТИЛИРОВАНИЯ ЦИТОЗИНА В ПРОМОТОРЕ ГЕНА *CTS-ATP* АТФ-ЦИТРАТЛИАЗЫ КУКУРУЗЫ

Горячева А.В., Федорин Д.Н., Епринцев А.Т.

Воронежский государственный университет, Воронеж
E-mail: *alyona55567@gmail.com*

АТФ-цитратлиаза - цитозольный фермент, играющий важную роль в метаболизме растений и катализирующий АТФ-зависимое и КоА-зависимое расщепление цитрата с образованием оксалоацетата и ацетил-КоА. В нуклеотидной последовательности промотора гена cts-atp показано распределение симметричных и асимметричных сайтов, которые входят в общий статус метилирования промотора АТФ-цитратлиазы. Это играет важную роль в регуляции активности фермента путем подавления транскрипции промоторной области гена. Анализ метильного статуса промотора, в частности, соотношение симметричных и асимметричных сайтов, показал, что метилирование как эпигенетические механизм играет большую роль в регуляции экспрессии.

ВВЕДЕНИЕ

АТФ-цитратлиаза (АТФ-ЦЛ КФ 4.1.3.8) - является основным ферментом, отвечающим за синтез высокоэнергетического биосинтетического предшественника цитозольного ацетил-КоА и оксалоацетата из цитрата - метаболического продукта цикла Кребса и кофермента А (КоА) с одновременным гидролизом АТФ до АДФ и фосфата [2]. Продукт, ацетил-КоА - является жизненно важным строительным белком для эндогенного биосинтеза множества соединений в растительных клетках, необходимых для синтеза широкого спектра биомолекул, которые критичны для роста, развития, защиты и адаптации растений. То, как функционирует АТФ-ЦЛ, может регулироваться через эпигенетические модификации - метилирование ДНК, в частности, цитозина. Например, метилирование промоторной области гена будет приводить к его инактивации. Метилирование ДНК является значимой и наиболее изученной эпигенетической модификацией генома, играющей ключевую роль в регуляции экспрессии генов, развитии, поддержании стабильности генома, дифференцировке клеток и адаптации к окружающей среде [3].

Этот процесс позволяет подавлять определенные гены для их не одновременной работы в каждой клетке, в результате чего транскрипция будет невозможна, что приведет к тому, что биосинтез белка для этого определенного гена предотвращается. Метилирование ДНК — это химическая модификация ДНК, заключающаяся в присоединении метильной группы (-CH_3) к одному из нуклеотидных оснований, осуществляемое сайт-специфическими ферментами -цитозиновыми ДНК-метилтрансферазами [1]. Эта модификация чаще всего происходит по пятому атому углерода цитозина (5-mC), образуя 5-метилцитозин в симметричных и асимметричных последовательностях CG, CNG и CNN. Метилирование цитозина в ДНК растений может происходить в разных контекстах нуклеотидных последовательностей, что приводит к разделению на симметричные и асимметричные сайты метилирования. Различие заключается в ориентации метилированных цитозинов относительно центральной оси двойной спирали ДНК. Наиболее распространенный тип симметричного метилирования - CpG. В этом контексте цитозин метилируется в динуклеотидной последовательности 5’-CpG-3’. Поскольку эта последовательность палиндромна, метилирование цитозина на одной цепи ДНК часто сопровождается метилированием комплементарного цитозина на противоположной цепи. В сайте симметричного метилирования растений CpNpG - цитозин метилируется в последовательности, где N – любой нуклеотид, кроме цитозина. Симметрия обеспечивается тем, что комплементарные цитозины на противоположных цепях ДНК могут быть метилированы [4]. Асимметричный сайт метилирования представлен CpNpN - в этом контексте цитозин метилируется в последовательности, где N – любой нуклеотид, за исключением цитозина. Различные типы сайтов метилирования часто связаны с различными биологическими функциями: в растениях CpG метилирование часто ассоциируется с репрессией генов и может играть роль в развитии и дифференцировке. CpNpG важен для поддержания геномной стабильности, подавления транспозонов и регуляции экспрессии генов. CpNpN - этот асимметричный тип метилирования особенно важен у растений для защиты генома от транспозонов и регулирования экспрессии генов. Метилирование CpG-динуклеотидов наиболее часто наблюдается в специализированных областях генома, называемых CpG-островками. В то время как отдельные CpG-динуклеотиды вне островков могут подвергаться метилированию, этот процесс значительно менее распространен. CpG-островки часто ассоциированы с промоторными областями генов, при этом степень влияния на транскрипционную регуляцию коррелирует с близостью островка к сайту инициации транскрипции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовались листья кукурузы (Zea mays L.), выращенные гидропонным методом при 12-часовом световом дне, при температуре окружающей среды 25°С.

Выделение ДНК проводили методом фенол-хлороформной экстракции. В качестве специфического осадителя ДНК применяли 10M ацетат аммония. Для визуализации и анализа качества выделенной ДНК использовался электрофорез в 1 % агарозном геле.

Нуклеотидная последовательность промоторной области гена cts-atp была взята из базы данных NCBI. Очищенный и экстрагированный ампликон секвенировали в ЗАО «Евроген» на платформе Illumina NovaSeq6000.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение влияния распределения симметричных и асимметричных сайтов метилирования на транскрипцию генов, позволяет оценить и проанализировать их вклад в общий метильный статус промоторной области гена, обеспечивающий взаимодействие с факторами транскрипции, где гиперметилирование этой области может приводить к нарушению связывания транскрипционных факторов и РНК-полимеразы с нуклеотидной последовательностью и снижать экспрессию. Особую роль в организации взаимодействия РНК-полимеразы и промотора гена играют не только CG-динуклеотиды, но и сайты CNG и CNN. Чтобы определить метильный статус цитозинов в составе симметричных и асимметричных сайтов метилирования применяли бисульфитное секвенирование.

Исследование характера распределения симметричных и асимметричных сайтов в анализируемой последовательности промотора гена показало, что во всем представленном фрагменте количество симметричных CG сайтов равнялось 14, количество CNG сайтов -5, тогда как количество асимметричных сайтов было равно 7 (табл. 1). Симметричные сайты CG и CNG составляют величину метилирования промотора исследуемого гена на уровень больше, чем ассиметричные сайты. При этом среди симметричных сайтов наибольшее значение имеют CG, так как они определяют большую часть метилирования промотора гена АТФ-цитратлиазы в листьях кукурузы.

Таблица 1.

Распределение симметричных CG, CNG и асимметричных CNN сайтов в исследуемом фрагменте промотора гена *cts-atp*

Тип сайта метилирования цитозина	Количество в анализируемой последовательности
CG	14
CNG	5
CNN	7

Метилирование оказывает существенное влияние на регуляцию экспрессии генов, в частности, основным показателем является метилирование сайта инициации транскрипции (TSS). Метилирование таких симметричных сайтов, как CpG-динуклеотидов, CNG и асимметричных сайтов CNN в районе TSS связано с подавлением транскрипции гена, так как это препятствует связыванию транскрипционных факторов и РНК-полимеразы, необходимых для инициации транскрипции. В области TSS высокая плотность CG-динуклеотидов, что связано с тем, что эта область часто расположена в CpG-островках (табл. 2). Метилирование этой области является мощным механизмом регуляции экспрессии генов, так как метилированные CG-динуклеотиды могут препятствовать связываю транскрипционных факторов, необходимых для инициации транскрипции. На несколько порядков меньше количество асимметричных сайтов CNN - 2 и также количество симметричных сайтов CNG.

Таблица 2.

Распределение симметричных CG, CNG и асимметричных CNN сайтов в сайте инициации транскрипции (TSS) промотора гена *cts-atp*

Тип сайта метилирования цитозина	Количество в области TSS
CG	14
CNG	5
CNN	2

Из всего общего фрагмента все симметричные сайты были представлены в области сайта инициации транскрипции, тогда как асимметричные сайты находились вне ее.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Распределение симметричных и асимметричных сайтов метилирования в промоторе гена АТФ-цитратлиазы в листьях кукурузы показало, что в сайте инициации транскрипции больший вклад вносит симметричный сайт CG, так как TSS часто располагается в CpG-островках. В контексте общего распределения метильного статуса симметричных и асимметричных сайтов регулируется экспрессия гена, подавляя его активность через гиперметилирование участков промотора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Федорин Д. Н. Метилирование ДНК как способ регуляции экспрессии генов / Д. Н. Федорин, А. Т. Епринцев // Вестник ВГУ, серия: химия, биология, фармация. – 2022. – № 2. – С. 44-51
2. J.A. Watson et al. Tricarballylate and hydroxycitrate: substrate and inhibitor of ATP:citrate oxaloacetate lyase Arch. Biochem. Biophys. (1969)).
3. Lucibelli F. Plant DNA Methylation: An Epigenetic Mark in Development, Environmental Interactions, and Evolution / F. Lucibelli, M. S. Valoroso, S. Aceto // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23. – P. 8299.)
4. Cao X. Locus-specific control of asymmetric and CpNpG methylation by the DRM and CMT3 methyltransferase genes / X. Cao, S.E. Jacobsen // Proc Natl Acad Sci USA. – 2002. – V. 10, N. 99. – P. 16491-16498.

УДК: 581.13.04

ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИИ И 24-ЭПИБРАССИНОЛИДА НА СОДЕРЖАНИЕ ГЛИКОЗИДА РАСТЕНИЙ *Pisum sativum (L)*, В ОБРАЗОВАНИИ АГЛИКОНА КОТОРОГО УЧАСТВУЕТ ГАМК

Ершова А.Н., Чичиль Т.С.

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный педагогический университет», Воронеж

E-mail: *profershova@mail.ru*

Проведенные исследования показали, что при кратковременной гипоксии (3-6 час) содержание специфического 5-окси-2-пирролидон-β-глюкопиранозида и его агликона 5-окси-2-пирролидона растений гороха, предшественником которого является циклическая форма ГАМК, снижалось. Под влиянием 24-эпибрассинолида содержание агликона в проростках возрастало до 220%. Предполагается присутствие в клетках растений гороха активных ферментных систем, участвующих в циклизации ГАМК, активность которых регулируется фитогормонами, определяется присутствием АТФ и функционированием цикла Кребса подобно тканям животных.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из наиболее важных групп веществ вторичного происхождения являются гликозиды. В природных гликозидах О-гликозидная связь соединяет остатки моносахаров с неуглеводными компонентами (агликонами). Относительная легкость образования и расщепления гликозидных связей всех типов обеспечивает метаболическую подвижность соответствующих соединений в живой клетке и объясняет широкое распространение этой структурной единицы в живых системах [1]. В растениях гороха нами был обнаружен необычный, свойственный только этому представителю бобовых, путь метаболизма ГАМК, связанный с циклизацией ее углеродного скелета с образованием 5-окси-2-пирролидона, который гликозидировался до 5-окси-2-пирролидон-β-глюкопиранозида [2, 3]. По данным элементного анализа, ИК- и УФ-спектрам, температуре плавления, обнаруженный нами 5-окси-2-

пирролидон-β-глюкопиранозид совпадал с изосукцинимид-β-гликозидом (ИС-гликозидом [4]. Наличие циклических производных ГАМК в виде 2-пирролидона ранее отмечалось у ряда других растений. Так, циклическое производное в виде 4-гидроксипирролидона было обнаружено в карпофорах мухомора (*Amanita muscaria*), что подтверждает наличие соответствующих ферментов - циклаз - в клетках, не только животных, но и растений [4]. Установлено, что ГАМК играет важную метаболическую и даже сигнальную роль в растениях. Содержание ГАМК иногда на несколько порядков возрастает в клетках растений при неблагоприятных условиях среды [5], включая гипоксию. Показано, что фитогормоны кинетин и брассиностероиды повышают устойчивость растений к неблагоприятным условиям среды. Нами было установлено [5], что под влиянием фитогормонов отмечалось увеличение содержания свободных аминокислот, включая ГАМК. В связи с этим исследовали влияние фитогормона 24-эпибрассинолида (24-ЭБ) и условий кратковременной гипоксии на содержание ИС-гликозида в проростках гороха.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В опытах использовали 10-дневные проростки гороха сорта «Рамонский 77», выращенные в лабораторных условиях методом гидропоники при 12-часовом фотопериоде. В надземную часть проростков, отделенную от корней и семядолей, вводили с траспирационным током растворы фитогормона 24-ЭБ (10мг/л) в 0,1М Na-фосфатном буфере (pH 7,2) в течение 12 и 24 часов. В другой серии опытов проростки помещали на 3-6 ч в условия разных газовых сред: воздух (контроль), азот (гипоксия) и CO_2 (100%). Навеску растений (0,5–1,0 г) фиксировали этанолом (+60°С), экстрагировали спиртом. Спиртовой экстракт упаривали при +60°С, растворяли в 2мл 10%-ного изопропанола и проводили разделение методом тонкослойной хроматографии на пластинках “Silufol” (“Chemapol”, Чехия). Локализацию углеводов определяли по величине Rf и по свидетелям. Содержание ИС-гликозида и его агликона определяли по поглощению при 212 нм и 208 нм на СФ-56 (“ЛОМО”, Россия) [2,3], рассчитывали по калибровочным кривым и выражали в мг $г^{-1}$ сырой массы. Содержание этил–β–гликозида определяли по образующейся при гидролизе глюкозы глюкооксидазным методом [3].

Все опыты проводились в двух биологических и двух химических повторностях. В таблице представлены результаты в виде средних арифметических значений и их отклонений.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При помещении проростков гороха в условия кратковременной гипоксии и среды диоксида углерода, как показано в таблице 1, наблюдались значительные сдвиги в содержании ИС- гликозида и его агликона. После 3 -часовой экспозиции эти изменения были хорошо заметны у растений как в условиях гипоксии, так и в CO_2–среде. Содержание гликозида в клетках проростков гороха уменьшалось на 18-20%. Содержание агликона снижалось при дефиците кислорода на 20-26 %, а в CO_2-среде на 30-32% по отношению к аэрируемым растениям. Как известно [4], в гипоксических условиях в растениях накапливаются токсичные продукты обмена, включая этанол.

Таблица 1.

Влияние гипоксии и CO_2-среды на содержание ИС-гликозида в проростках гороха в течение 3 и 6 часов (мг $г^{-1}$ сырой массы, %)

Время, часы	Соединения	воздух	гипоксия	CO_2-среда
		мг · $г^{-1}$ сырой массы	мг · $г^{-1}$ сырой массы	мг · $г^{-1}$ сырой массы
3	ИС-гликозид	3,80±0,15 100%	3,00±0,15 80%	3,12±0,16 82%
	Агликон	2,56±0,07 100%	2,02±0,10 79%	1,87±0,07 73%
	Этил-β-гликозид	0,26±0,01 100%	0,17±0,01 65%	0,22±0,01 85%
6	ИС-гликозид	3,65±0,10 100%	2,85±0,07 78%	2,90±0,08 80%
	Агликон	2,41±0,02 100%	1,78±0,02 74%	1,65±0,08 68%
	Этил-β-гликозид	0,24±0,01 100%	0,23±0,01 96%	0,41±0,01 170%

Одним из механизмов его детоксикации в клетка является образование этил-β-гликозида. Донором глюкозы в синтезе этил-β-гликозида может выступать и ИС-гликозид [4]. Было показано, что CO_2-среда при кратковременном 6-часом воздействии увеличивала содержание этого соединения в клетках растений гороха почти в два раза, в условиях же обычной гипоксии этого не наблюдалось.

При действии фитогормона 24-ЭБ содержание ИС-гликозида в проростках гороха через 12 часов увеличивалось на 15%. Содержание агликона при этом снижалось на 18%, а эндогенной глюкозы почти на 20%. Однако через 24 часа содержание агликона возрастало до 220% по отношению к контрольным растениям.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что на содержание специфического ИС-гликозида растений гороха оказывают влияние как условия снабжения растений кислородом, так и обработка фитогормонами.

В условиях дефицита кислорода и CO_2-среды тормозилось образование агликона и самого ИС-гликозида даже при кратковременных 3-6 часовых экспозициях. Это свидетельствует о том, что процесс циклизации ГАМК с образованием 5-окси-2-пирролидона в клетках растений гороха зависит от работы цикла Кребса и снабжения АТФ, как это установлено для тканей животных [5]. В то же время при дефиците кислорода отмечалась активизация синтеза этил-β-гликозида, для которого ИС-гликозид является донором глюкозы в реакции гликозидирования, что позволяет нейтрализовать накопившийся при дефиците кислорода этанол.

На скорость метаболизации ГАМК по пути образования агликона ИС-гликозида влиял и фитогормон 24-ЭБ, который увеличивал содержание агликона в проростках гороха более чем в два раза. Это позволяет предположить присутствие в клетках растений гороха достаточно активных ферментных систем, участвующих в циклизации ГАМК с образованием пирролидоновой структуры, что ранее было установлено только для небольшого количества растений. В тканях млекопитающих образование циклической структуры типа 2-пирролидона изучено гораздо лучше, при этом показано и психотропное действие этого класса веществ. Полученные данные расширяют наше представление о путях метаболизации непротеиногенной аминокислоты ГАМК в растениях, а также указывают на важную роль вторичных метаболитов, включая гликозиды, в растениях. Изучение строения и роли различных гликозидов углубляют наши знания о многообразии химических компонентов растений и показывают необходимость их дальнейшего изучения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1 Hatcher C., Sommer U., Heaney L., Millett J. Metabolomic analysis reveals reliance on secondary plant metabolites to facilitate carnivory in the Cape sundew, Drosera capensis // Ann. Bot. 2021. V. 128. P. 301-308.

2 Zemlianukhin A.A., Ershova A.N. // Metabolism of Isosuccinimide-p-Glucoside in Pea Seedlings //Biochemie und Physiologie der Pflanzen. 1984. V. 179, N. 8, p. 679–684.

3 Ершова А.Н., Винокурова Н.В. Особенности пространственной структуры и содержание специфического гликозида Pisum sativum L. // Вестник ВГУ: Химия, Биология, Фармация. 2021. Т. 2. С. 27-33.

4 Liu T.-Y., Castelfranco P. The biosynthesis of ethyl-β-glucoside in extracts of pea seedlings // Plant Physiol. 1970. V. 45. P. 424.-426.

5 Ершова А.Н., Чичиль Т.С. Влияние кинетина и эпибрассинолида на содержание ГАМК и свободных аминокислот, связанных с циклом Кребса, и колебание их уровня в растениях гороха разных сортов // Вестник ВГУ: Химия, Биология, Фармация. 2024. № 4. С.33-40.

УДК 577.218

ВЛИЯНИЕ ВЕРАПАМИЛА НА КАТАЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ГЛУТАМАТДЕКАРБОКСИЛАЗЫ КУКУРУЗЫ

Жихаренко А.Д., Москвина П.П., Анохина Г.Б., Епринцев А.Т.

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Воронеж

E-mail: *dowi2009@mail.ru*

Глутаматдекарбоксилаза (ГДК, КФ 4.1.1.15) – один из ферментов обходного пути цикла трикарбоновых кислот ГАМК-шунта, обеспечивающего адаптацию метаболизма растения к воздействию стрессовых условий. Выявлено, что инкубация проростков кукурузы в растворе верапамила приводит к снижению активности глутаматдекарбоксилазы, вероятно, ввиду блокировки кальциевых каналов, вызываемой данным соединением, что в свою очередь способствует нарушению передачи клеточных сигналов и формированию ответной реакции на различные факторы.

ВВЕДЕНИЕ

Глутаматдекарбоксилаза (ГДК, L-глутамат-1-декарбоксилаза, КФ 4.1.1.15, glutamatic acid decarboxylase) – один из основных ферментов ГАМК-шунта, метаболического пути, который протекает в обход двух реакций цикла Кребса и активируется при воздействии на растение различных стрессовых факторов [3]. ГДК была обнаружена в дрожжах, бактериях, тканях растений и животных. У последних данный фермент играет важную роль в функционировании нервной системы, так как и субстрат, и продукт реакции, катализирующей ГДК, являются важнейшими нейромедиаторами [3].

Известно, что работа некоторых энзимов тесно сопряжена с уровнем кальция в клетке, что обусловлено как структурными особенностями ферментной системы, так и участием кальция в кальций-кальмодулин-опосредованной системе передачи клеточных сигналов.

Кальций является важным структурным элементом, регулятором метаболических процессов, а также универсальным для живых систем сигнальным агентом-посредником, обеспечивающим взаимосвязь между мембранными рецепторами и экспрессией генов. Кроме того, ионы кальция, связываясь с фосфолипидами, стабилизируют липидные бислои и, таким образом, обеспечивают структурную целостность клеточных мембран.

В клетку кальций поступает через специализированные белки плазматической мембраны, так называемые катионные каналы, обычно состоящие из четырёх субъединиц (исключение – TPC1, имеющий две субъединицы) [5]. Кальциевые сигналы служат для кодирования внешних и внутренних стимулов, силы и продолжительности их воздействия, преобразуя информацию о стимулах в физиологический и генетический ответы [4].

В связи с этим, целью работы было исследование влияния верапамила – блокатора кальциевых каналов на каталитическую активность глутаматдегидрогеназы в проростках кукурузы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Модельным объектом нашего исследования являлись 10-12 дневные проростки кукурузы (*Zea mays* L., сорт Воронежская 76). Растения выращивали гидропонным способом при 25 °C, 12-часовом световом дне с интенсивностью света 25 Вт/м^2. Опытная группа растений инкубировалась в течение одного часа в темноте в 10^{-4} М растворе верапамила [1]. Растения из контрольной группы растений инкубировались в воде на протяжении всего эксперимента.

Выделение ГДК

Для экстракции ГДК листья кукурузы растирали в среде, содержащей 20 мМ ацетатного буфера (pH 4,8), 1,5 мМ ДДТ, 1,5 мМ ЭДТА, 0.1 мкМ пиридоксальфосфата. Центрифугировали 5 минут при скорости 3000 g [7].

Определение активности ГДК

Измерение активности глутаматдекарбоксилазы из листьев кукурузы осуществляли спектрофотометрически путем измерения оптической плотности раствора, содержащего 20 мМ ацетатный буфер (pH 4,8), 70 мкМ бромкрезола зеленого, 10 мМ пиридоксаль-5-фосфата, 2 мМ глутамата. Измерение проводили при длине волны 620 нм в течение 3 минут [7].

Статистическая обработка данных

Опыты проводили в 3-кратной повторности, аналитические определения для каждой пробы осуществляли в трех повторностях. Статистический анализ полученных данных проводился с использованием программы STATISTICA 12.0. Различия анализировали на статистическую значимость с использованием критерия Стьюдента. На графиках значения представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего (SEM). Представленные в работе различия статистически достоверны ($p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что различные стрессовые факторы оказывают значительное влияние на изменение активности глутаматдекарбоксилазы в листьях кукурузы [2]. В данной работе мы исследовали влияние верапамила на каталитическую активность глутаматдекарбоксилазы в проростках кукурузы.

Верапамил - первый представитель антагонистов кальция, впервые синтезированный в 1959 г, относится к группе фенилалкинаминов.

Данное соединение нарушает кальциевый гомеостаз в клетках листьев, о чём свидетельствует повышенный отток кальция из сегментов листьев [6].

Выявлено, что верапамил оказывает ингибирующее влияние на каталитическую активность ГДК (Рис. 1). На гистограмме видно, что растения, инкубировавшиеся в течение 1 часа в растворе верапамила, демонстрировали низкие значения ферментативной активности глутаматдекарбоксилазы - активность ГДК в 8 раз ниже, чем в образцах из контрольной группы растений.

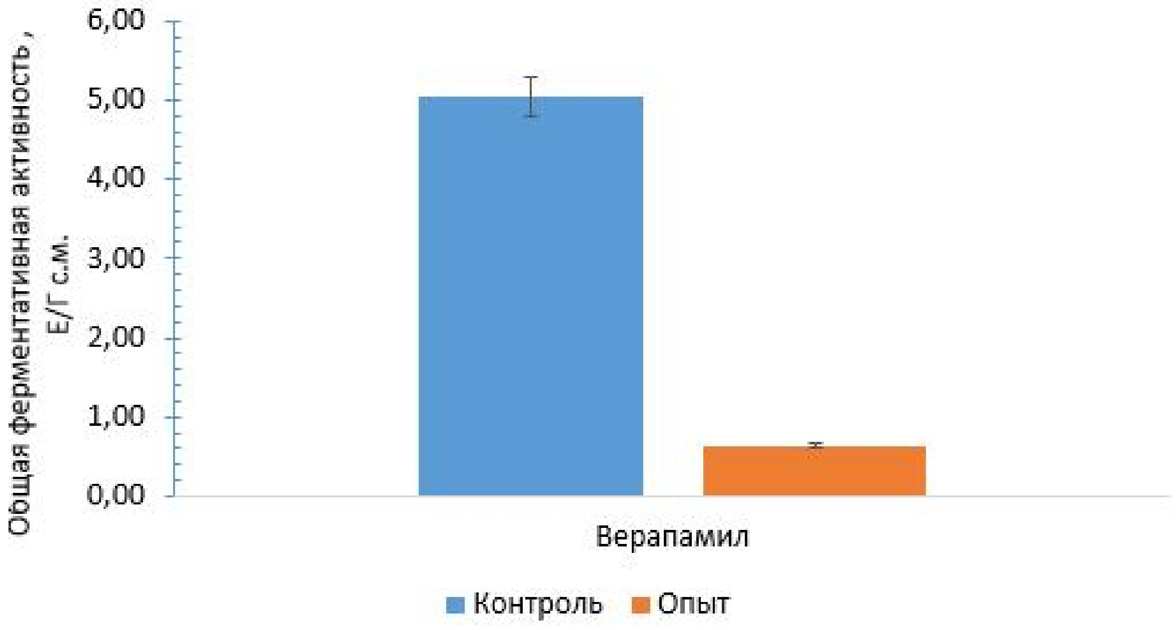


Рис. 1. Влияние верапамила на ферментативную активность глутаматкарбоксилазы в проростках кукурузы.

Таким образом, мы можем сделать вывод о том, что вызываемая верапамилом блокировка кальциевых каналов приводит к существенному снижению ГДК-активности в проростках кукурузы. Полученные данные указывают на кальций-зависимый характер функционирования глутаматдекарбоксилазы, что может быть связано со структурой фермента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе работы был проведен анализ влияния верапамила на активность глутаматдекарбоксилазы в проростках кукурузы.

Выявлено, что инкубация проростков кукурузы в растворе верапамила приводит к ингибированию активности глутаматдекарбоксилазы, что вероятно обусловлено блокирующим действием, которое данное оказывает на кальциевые каналы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Будаговская Н.В. Влияние блокатора кальциевых каналов на скорость роста растений//*Актуальная биотехнология*. - 2020. - №3. – с. 484.
2. Москвина П. П., Анохина Г. Б., Епринцев А. Т. Влияние низких концентраций кислорода на изменение уровня экспрессии гена *GAD1* глутаматдекарбоксилазы в листьях кукурузы. //Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2024. - №. 2.
3. Сухарева Б. С., Дарий Е. Л., Христофоров Р. Р. Глутаматдекарбоксилаза: структура и каталитические свойства //Успехи биологической химии. – 2001. – Т. 41. – С. 131-162.
4. Edel KH, Marchadier E, Brownlee C, Kudla J, Hetherington AM. The evolution of calcium-based signalling in plants. Current Biology. 2017;27(13):667–679. DOI: 10.1016/j.cub.2017.05.020.
5. Genes for calcium-permeable channels in the plasma membrane of plant root cells / P.J. White [et al.] // Biochim biophys acta. – 2002. – Vol. 1564. – P. 299–309.
6. Konagalla, S. V. et al. (2025) “The psychological impact on American healthcare workers during the COVID-19 pandemic: an initial scoping review,” Academia Mental Health and Well-Being. Academia.edu Journals, 2(1). doi: 10.20935/MHealthWellB7570.
7. Yu K. et al. A high-throughput colorimetric assay to measure the activity of glutamate decarboxylase //Enzyme and microbial technology. – 2-11. – T.49.- №. 3. – С. 272-276.

УДК 591.1

ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ КРЫС ПРИ РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ЗАВИСИМОСТИ

Зотова П.В., Селина В.Д., Макарова Ю.В., Гатауллина М.О.

Воронежский государственный университет, Воронеж

E-mail: *marina.gataullina@gmail.com*

Этиловый спирт при воздействии на организм млекопитающих – мощное наркотическое вещество, вызывающее развитие зависимости. Его употребление угнетает функционирование систем организма, способствует возникновению патологических изменений, что в конечном итоге приводит к смерти. Влияние этанола на поведенческие реакции отслежено на лабораторных крысах.

ВВЕДЕНИЕ

Крысы часто используются как модельный организм в исследованиях благодаря компактному мозгу, высокой воспроизводимости поведенческих реакций и хорошо изученной анатомии лимбической системы — ключевой области, связанной с эмоциями и мотивацией [1]. Их мозжечок, стриатум и префронтальная кора тесно связаны с двигательным контролем и реакциями на стресс, что делает их особенно подходящими для теста «Открытое поле» [2].

Хронические воздействия этанола вызывают у грызунов ряд поведенческих и физиологических изменений. Длительное потребление этанола вызывает тревожные реакции, гипоактивность и избегание открытого пространства [4], что отражает дисбаланс нейромедиаторных систем, включая ГАМК и дофамин [5]. В период абстиненции у животных наблюдаются симптомы тревожности, включая снижение времени, проведенного в центре поля, и увеличение периферической активности [3].

Целью данного исследования заключалась в изучении характеристик поведенческих реакций крыс на различных этапах развития хронической алкогольной зависимости.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проходили на базе кафедры физиологии человека и животных Воронежского государственного университета в течение 16 дней. В качестве экспериментального объекта были выбраны самцы нелинейных лабораторных крыс (Rattus norvegicus) весом около 380 г и возрастом 6 месяцев.

Животные содержались в условиях сбалансированного питания. Алкоголизацию опытной группы проводили 25% раствором этанола [7]. С 1-го по 5-й дни опыта это был единственный источник жидкости [8], далее животным дополнительно предлагали воду для предотвращения обезвоживания. Данная методика наиболее эффективна при формировании хронической алкогольной зависимости и обеспечивает потребление максимально возможных доз алкоголя, что позволяет развиться токсическому воздействию на организм животных [7].

Влияние алкоголя на поведение крыс отслеживалось при помощи теста «Открытое поле» (на 3, 5, 12, 15-е дни эксперимента), который является наиболее распространенным и информативным методом для оценки эмоционального состояния и уровня двигательной активности животных. Для этой цели грызунов по отдельности помещали в круглую арену размером 65 см, огороженной бортиком высотой 32 см. Пол камеры был разделен на 12 секторов, имеющих ширину 12 см. В полу арены имелись 7 отверстий диаметром 3 см, одно из них – в центральной зоне, несоприкасающейся с бортиками и диаметром 12 см. Животных помещали около бортика, позволяли свободно перемещаться. В течение 10 минут исследовалась горизонтальная и вертикальная двигательная активность, груминг, исследование отверстий, подсчитывалось количество дефекаций и мочеиспусканий [6]. Дополнительно исследовались динамические изменения веса у животных на начало, середину и конец опыта.

Статистическая обработка материала выполнена при помощи Microsoft Excel 2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе эксперимента были получены следующие результаты у двух групп крыс: контрольной и опытной (табл. 1). Движение в обеих группах грызуны начинали сразу после попадания в поле. Крысы из контрольной группы были относительно активны на протяжении всего времени исследования, не избегали открытого пространства, исследовательская деятельность грызунов росла.

Таблица 1.

Результаты теста «Открытое поле» в контрольной и опытной группах на 3, 5, 11, 15-е дни эксперимента (n=3, p<0,05)

Поведенческие показатели	**Контрольная группа**				**Опытная группа**			
	Дни эксперимента							
	3-й	*5-й*	*11-й*	*15-й*	*3-й*	*5-й*	*11-й*	*15-й*
Пересечение секторов	50	45	42	49	50	22	11	21
Выходы в центр поля	10	11	9	11	2	-	-	-
Количество стоек	8	7	6	6	6	2	-	-
Исследовательская деятельность	5	6	7	8	1	3	-	-
Груминг (количество раз)	3	2	2	3	2	9	1	1
Дефекация (количество экскрементов)	3	2	4	3	2	7	3	4
Уринация (количество раз)	1	-	1	1	1	-	-	-

В опытной группе на 3-й день наблюдается максимальная активность. На 5-й день крысы активны в первую минуту и в середине эксперимента, максимальное исследовательское поведение-регулярный груминг, свидетельствующий о нервозности подопытных. На 12-й день наблюдается спад активности. Перемещения только в 1-ую минуту эксперимента, как и на 15-й день. Данные показатели активности у животных опытной группы могут быть связаны с несколькими факторами:

1. Хроническое употребление алкоголя может вызывать угнетающее влияние на центральную нервную систему, что приводит к снижению активности и исследовательского поведения у крыс.

2. Алкоголь может негативно сказываться на когнитивных функциях, что может привести к снижению интереса к окружающей среде и уменьшению исследовательской активности.

3. Хронический алкогольный синдром может вызывать физическую истощенность и общую слабость, что отражается на активности. Крысы могут быть менее подвижными из-за общего ухудшения состояния здоровья.

4. Алкоголь может усиливать стресс и тревожность у крыс, что приводит к избегающему поведению. В открытой среде крысы могут чувствовать себя уязвимыми, поэтому предпочтут оставаться менее активными.

Во время проведения эксперимента проводился контроль веса экспериментальных животных. В норме вес крысы должен варьироваться около 380 г. На 3-й день эксперимента средний вес опытной группы животных составил: 330 г. На 12-й день эксперимента 320 г. На 15-й день вес животных составил - 300 г. Длительное употребление алкоголя может вызывать токсические эффекты на организм. Это может проявляться в виде ухудшения состояния здоровья, также приводящее к снижению веса. Вес контрольных животных существенно не изменялся.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате сравнительного анализа экспериментальных групп крыс, контрольной и опытной, подверженной хронической алкогольной зависимости, выявлено выраженное воздействие этанола на центральную нервную систему. Происходит угнетение нейронной активности, сопровождающееся развитием стрессового состояния. У животных опытной группы наблюдается избегание открытых пространств, что свидетельствует о формировании тревожных реакций, что сопровождается снижением уровня исследовательской активности. Метаболические нарушения проявляются в замедлении обменных процессов, что способствует накоплению токсичных веществ, снижению активности и ухудшению общего состояния организма, что подтверждается снижающейся динамикой изменения массы тела.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brown R.E., Wong A.A. (2007). The neuroanatomy of the mouse: a fine-scale model for behavioral neuroscience. Brain Research Bulletin, 75(5), 712–715.
2. Seibenhener M. L., Wooten M.C. (2015). Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. J Vis Exp, (96), e52434.
3. Spear L.P., Swartzwelder H.S. (2014). Relationship between ethanol-induced activity and anxiolysis in the open field test. Neuropharmacology, 85, 1–9.
4. Doremus-Fitzwater T. L. et al. (2022). Chronic alcohol alters anxiety-like responses in mice. Alcohol Clin Exp Res, 46(7), 1234–1245.
5. Kliethermes C. L. (2005). Anxiety-like behaviors after ethanol withdrawal in mice. Alcohol, 36(2), 83–90.
6. Буреш Я. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Я. Буреш, О. Бурешова, Д. П. Хьюстон. – Москва: Высшая школа, 1991. – 399.
7. Кашкин В. А. Моделирование алкогольного абстинентного синдрома у крыс / В.А. Кашкин // Лабораторные животные для научных исследований. – 2020. – №2. – С. 43-50.
8. Шабанов П. Д. Модуляция пептидами самостимуляции латерального гипоталамуса у крыс при хронической алкоголизации / П. Д. Шабанов, А. А. Лебедев, В. В. Русановский [и др.] // Экспериментальная наркология. – 2006. – № 3. – С. 36-41.

УДК 577.11

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ГЛЮКОКИНАЗЫ И ГЕКСОКИНАЗЫ В ПЕЧЕНИ КРЫС С АЛЛОКСАНОВЫМ ДИАБЕТОМ

КнязеваА.Г., Фатьянова К.И., Селиванова Н.В.

Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия
E-mail*: anastasiya.knyazeva.03@mail.ru*

Показано изменение активности гексо- и глюкокиназы в печени крыс с аллоксановым диабетом при пероральном приеме сульфата цинка. Установлено, что ионы цинка увеличивают активность исследуемых ферментов у животных с патологией. Можно предположить, что данный ион, обладая инсулиноподобным действием, снижает концентрацию глюкозы в крови и делает ее более доступной для клеток печени.

ВВЕДЕНИЕ

Сахарный диабет (СД) представляет собой глобальную медико-социальную угрозу для здоровья человека и общества в целом, темпы роста распространенности которой приобрели масштаб мировой эпидемии [1].

Широкая распространенность СД и многообразие патогенетических вариантов данного заболевания обусловливают актуальность поиска и разработки новых пероральных сахароснижающих препаратов [4]. К одной из перспективных белковых биомишеней для создания новых противодиабетических средств относится фермент гексокиназа (ГК, КФ 2.7.1.1) [6]. Различают четыре изофермента гексокиназы: три из них, обладающих групповой специфичностью, содержатся в различных органах и тканях, а 4-й изофермент – глюкокиназа обнаруживается только в печени. Глюкокиназа фосфорилирует только глюкозу при её высокой концентрации в крови, что обеспечивает быструю утилизацию этого моносахарида после приёма пищи. Глюкокиназа индуцируется инсулином и независима от концентрации глюкозо-6-фосфата [3].

Учитывая высокую распространенность СД и его осложнений, возникающих на фоне перестройки биохимических путей, а также тот факт, что Zn^{2+} важен для нескольких органических функций, которые нарушены у людей с диабетом, добавление этого питательного микроэлемента при сахарном диабете может оказать благоприятное влияние на гликемический контроль и работу ряда ферментных систем.

Таким образом, актуальность данной работы связана с углублением фундаментальных знаний о роли ионов цинка в патогенезе инсулинзависимого диабета. А именно, влияние цинка сульфата на активность и регуляцию гексо- и глюкокиназы в условиях экспериментальной модели инсулинзависимого диабета.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве экспериментального объекта были использованы самцы лабораторных крыс (*Rattus norvegicus* L. линии Wistar) в возрасте 12 недель и массой тела 150-200 г (n=12). Животные содержались в виварии при одинаковых, стандартных условиях (температура 25^0С, естественное освящение) и свободным доступом в течение дня к воде и корму.

Перед исследованием все крысы были произвольно разделены на 4 группы по 3 животных в каждой: «Норма» - крысы, которым внутрибрюшинно вводили 0,9% NaCl, «Диабет» - крысы, которым внутрибрюшинно, однократно вводился 5% раствор аллоксана (доза 100 мг/кг [11]); «Норма+Цинк» и «Диабет+Цинк» - здоровые крысы и животные с патологией, которые получали ежедневно сульфат цинка в виде БАДа «Цинкит» («Woerwag Pharma GmbH & Co. KG», Германия) ежедневно в течение месяца, групповым способом через автоматические ниппельные поилки, в дозе 36 мг/кг один раз в день.

Развитие патологии у крыс контролировалось уровнем гликемии. Забор крови осуществлялся ежедневно в течение месяца утром из хвостовой вены, натощак. Измерения проводили с помощью стандартного глюкооксидазного метода глюкометром Сателлит Плюс («ЭЛТА» Россия).

Для получения ткани печени крысы были подвержены декапитации под эфирным наркозом с последующей аутопсией. Вскрытие животных и извлечение органов проводили на 31 сутки от момента введения аллоксана согласно рекомендациям [2]. Забор биоматериала осуществлялся в течение часа с последующей отмывкой ледяным 0,9% NaCl.

Активность гексо- и глюкокиназы определяли по общей схеме, описанной в работе Walker & Rao,1964 [11], но с некоторыми изменениями. Гомогенаты готовили в среде, содержащей: KCl (0,15 мМ); ЭДТА (5 мМ); MgCl2 (5 мМ); β-меркаптоэтанол (10 мМ); Трис-HCl буфер pH 7,3. Фосфорилирование глюкозы оценивали путем связывания образующегося глюкозо-6-фосфата с $NADP^+$ в присутствии экзогенной глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в инкубационных смесях, содержащих: Трис-HCl буфер (50 мМ) pH 7,5; $MgCl_2$ (7,5 мМ); АТФ (5 мМ); $НАДФ^+$ (5 мМ); 2 Е глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы; глюкоза (100 мМ или 0,5 мМ).

Глюкокиназа рассчитывается исходя из разницы в показателях с 100 мМ- и 0,5 мМ-глюкозы, а гексокиназу – по разнице в концентрациях с 0,5 мМ-глюкозой в присутствии и в отсутствие АТФ [11]

Также проводились частые проверки без АТФ, но со 100 мМ глюкозой, чтобы убедиться, что ни одна из зарегистрированных активностей не была вызвана присутствием глюкозодегидрогеназы [fl-D-глюкозо-NAD(P) оксидоредуктазы, EC 1.1.1.47], которая также имеет высокий уровень Km для глюкозы и также снижает уровень $NADP^+$ [7], либо в препарате из печени крысы или в добавленной глюкозо-6-фосфатдегидрогеназе [12]

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате исследования активности глюкокиназы из ткани печени крыс были получены следующие данные. В группе «Норма» активность ПДК составила 15,72 Е\г сырой массы, в группе «Диабет» – 2,08 Е\г сырой массы, а в группе «Диабет+Цинк» – 4,04 Е\г сырой массы (рис. 1А). Активность комплекса в группе «Норма+Цинк» находилась на том же уровне, что и в контрольной группе, поэтому на рисунке на представлена. Было обнаружено, что при аллоксановой интоксикации активность глюкокиназы в гепатоцитах упала практически в 8 раз по сравнению с контрольной группой.

Причины подобного падения неясны и требуют детального выяснения, но можно предположить, что данный факт может быть связан со снижением содержания сахара в клетках из-за нарушения работы инсулин-зависимого транспортера глюкозы Глют-4.

Аналогичные результаты получены и для другой формы фермента – гексокиназы.

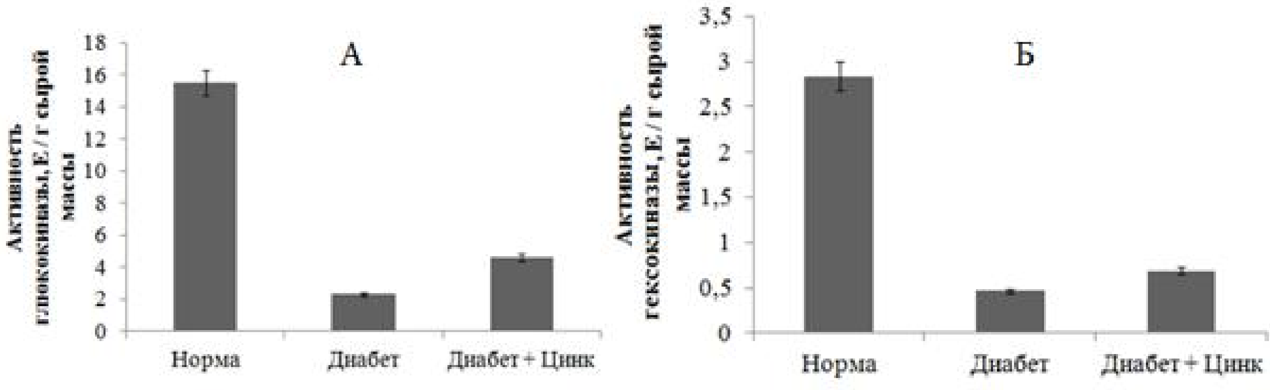


Рис. 1. Общая активность глюкокиназы (А) и гексокиназы (Б) из печени крыс. Норма – здоровые животные, Диабет – крысы с аллоксановым диабетом, Диабет + Цинк – крысы с патологией, получавшие сульфат цинка.

Анализ литературных данных показал, что ионы цинка имитируют ряд эффектов инсулина, в том числе стимулируют транспорт и окисление глюкозы. Дефицит цинка играет определенную роль во многих заболеваниях, таких как синдром мальабсорбции, серповидно-клеточная анемия, хронические заболевания печени и диабет. Ионы цинка участвуют в регуляции метаболизма глюкозы. В-первую очередь это осуществляется за счет синтеза, секреции и поддержание структуры молекулы инсулина [10].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, прием сульфата цинка животным с экспериментальным сахарным диабетом способствует восстановлению функциональной активности гексо- и глюкокиназ в клетках печени, что, вероятно, связано с частичным восстановлением гормонального баланса между инсулином и глюкагоном.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Консенсус совета экспертов Российской ассоциации эндокринологов по инициации и интенсификации сахароснижающей терапии у больных сахарным диабетом 2 типа. И. И. Дедов, М. В., Шестакова, А. С. Ахметов, М. Анциферов [и др.] //Сахарный диабет. – 2011. – №. 4.
2. Коптяева К.Е. Методика вскрытия и извлечения органов лабораторных животных (крысы). Лабораторные животные для научных исследований. – 2018. – № 2. – С. 71-92.

3. Механизмы транскрипционного контроля обмена глюкозы в печени. К.Ю. Кулебякин, Ж.А. Акопян, Т.Н. Кочегура, Д.Н. Пеньков [и др] // Сахарный диабет. – 2016. - 19(3). – с. 190-198.
4. Способ коррекции стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета у крыс с использованием лекарственного средства на основе амида гетероциклических кислот. М.В. Корокин, М.В. Покровский, Т.Г. Покровская, Л.В.Корокина [и др] // Патент на изобретение RU 2687979, 17.05.2019. Заявка № 2018109513 от 19.03.2018.
5. Cбrdenas, M. L. Evolution and regulatory role of the hexokinases / M. L. Cбrdenas, A. Cornish-Bowden; T. Ureta // Biochim. Biophys. Acta. -1998. - 1401 (3). – p. 242–264.
6. Leighton B. Small molecule glucokinase activators as novel anti-diabetic agents / Leighton B., Atkinson A., Coghlan M. P. – 2005.
7. Metzger, R. P. J. biol. Chem. / R. P. Metzger, S. S. Wilcox, A. N. Wick -1963. - 1769. – p. 239
8. Prediction and validation of the three-dimensional structure of glucokinase-1 from Phytophthora infestans. - 2021
9. Salas M. J. biol. Chem. / M. Salas, E. Vifiuela, A. Sols -1964. – 3535. – p. 238
10. Tang X. Zinc has an insulin-like effect on glucose transport mediated by phosphoinositol-3-kinase and Akt in 3T3-L1 fibroblasts and adipocytes. / X. Tang , N. F. Shay //J. Nutr. – 2001. – 131. -p. 1414-1420.
11. Walker D. G. Ab8tr. Proc. 6thint. Congr. Biochem., New York, -1964. p. 475.
12. Walker D. G. Department of Biochemistry, University of Birmingham / G. Walker, Holland Geraldine. - 1965.

УДК 577.325

ПРОЦЕССЫ ТЕРМОИНАКТИВАЦИИ И АГРЕГАЦИИ ФИЦИНА

Королева В.А.[1,2], Холявка М.Г.[1], Панкова С.М.[1,2], Артюхов В.Г.[1]

[1]Воронежский государственный университет
[2]Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко
E-mail: *koroleva_victoria@bk.ru*

Исследование особенностей поведения фицина в условиях повышенных температур имеет теоретическое и прикладное значение. В связи с этим целью данного исследования было детальное изучение процессов термической инактивации и агрегации фицина. Показано, что кривая инактивации демонстрирует одноступенчатый характер, который вызван быстрым снижением, а затем сохранением той же остаточной активности за счет стабилизации молекулярной структуры фермента. Термическая инактивация фицина сопровождается агрегацией белка.

ВВЕДЕНИЕ

Фицин (КФ 3.4.22.3) – цистеиновая протеаза, выделяемая из латекса растений рода *Ficus*. Фермент состоит из 222 аминокислотных остатков. Фицин известен своей противогрибковой активностью, способен разрушать биопленки *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis* и демонстрирует антипролиферативное действие на различные линии раковых клеток. Более того, при иммобилизации на хитозане фицин проявляет ранозаживляющие свойства. Фермент подвергается необратимой инактивации под действием сильных окислителей и иодоацетата, в то время как мягкие окислители и двухвалентные металлы могут ингибировать его, хотя и обратимо [1].

Подобно многим другим белкам [2], структура фицина претерпевает значительные изменения в ответ на внешние факторы, такие как температура. При повышении температуры происходит как обратимая потеря функциональной активности, которая имеет практическое значение, так и структурный распад (денатурация). Более того, температурная обработка может вызывать агрегацию молекул белка. Исследования показывают, что кинетика процесса термической агрегации белка регулируется соотношением скоростей разворачивания полипептидных цепей и их агрегации [3]. По этой причине исследование поведения фермента в водных средах при нагревании способствует фундаментальным теоретическим представлениям о кинетике поведения фермента и термодинамике процессов денатурации и агрегации. Учитывая, что медицинские технологии часто подразумевают высокотемпературную обработку, например, на этапе стерилизации конечного продукта, понимание «критических» температур для каждого компонента системы имеет решающее значение для разработки соответствующих технологических регламентов.

Целью данного исследования было изучение процессов термической инактивации и агрегации водного раствора фицина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служил фицин (Sigma Aldrich). В качестве субстрата выступал *N*-бензоил-DL-аргинин-*p*-нитроанилид (BAPNA) (Sigma Aldrich). Цистеин использовался в качестве стабилизирующего агента для протеазы.

Для определения доли инактивированных молекул раствор фермента подвергался инкубации при температурах 60, 70 и 80 °C в течение 10–60 минут, после чего следовало быстрое охлаждение и центрифугирование в течение 20 минут при 25 000 g с использованием центрифуги Jouan MR23i (Thermo Fisher Scientific, США). Затем измеряли каталитическую активность фицина. Непрогретый образец служил контролем. Доля инактивированных молекул (г_{in}) рассчитывалась как ($1–A/A_0$), где A и A_0 представляют собой каталитическую активность экспериментальных и контрольного образцов соответственно. Для сравнения определялась доля инактивированных молекул в растворе фицина, подвергшегося инкубации при температурах 60, 70 и 80°C в течение 10–60 минут с последующим измерением активности без предварительного центрифугирования.

Для определения доли агрегированных молекул раствор фермента инкубировали при температурах 60, 70 и 80°C в течение 10–60 минут, затем быстро охлаждали и центрифугировали в течение 20 минут при 25 000 g с использованием центрифуги Jouan MR23i (Thermo Fisher Scientific, США). Затем измеряли оптическую плотность супернатанта при 280 нм с использованием спектрофотометра Shimadzu UV-2401PC (Shimadzu Scientific Instruments, Киото, Япония). Ненагретый образец служил контролем. Доля агрегированных молекул (r_{agg}) рассчитывалась как ($1–D/D_0$), где D и D_0 представляют собой оптические плотности растворов экспериментальных и контрольного образцов соответственно.

Размеры молекул фицина и его агрегатов оценивали с помощью Nano Zetasizer ZS (Malvern Panalytical Ltd., Великобритания). Обратнорассеянный свет от He/Ne-лазера, излучающего на длине волны 632.8 нм с мощностью 4 мВт, улавливали под углом 173° в диапазоне температур 25–80°C.

Статистический анализ данных проводился с использованием программного пакета Stadia 8.0 Professional. Статистическую значимость различий между контрольными и экспериментальными значениями оценивали с помощью t-критерия Стьюдента (при $p<0,05$), учитывая, что все параметры имели нормальное распределение.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследования реакции фермента на термическое воздействие раствор фицина с концентрацией 1 мг/мл подвергали в течение различных временных интервалов до 60 минут воздействию температур 60, 70 и 80°C с последующим определением каталитической активности. Рисунок 1 иллюстрирует динамику процессов инактивации энзима.

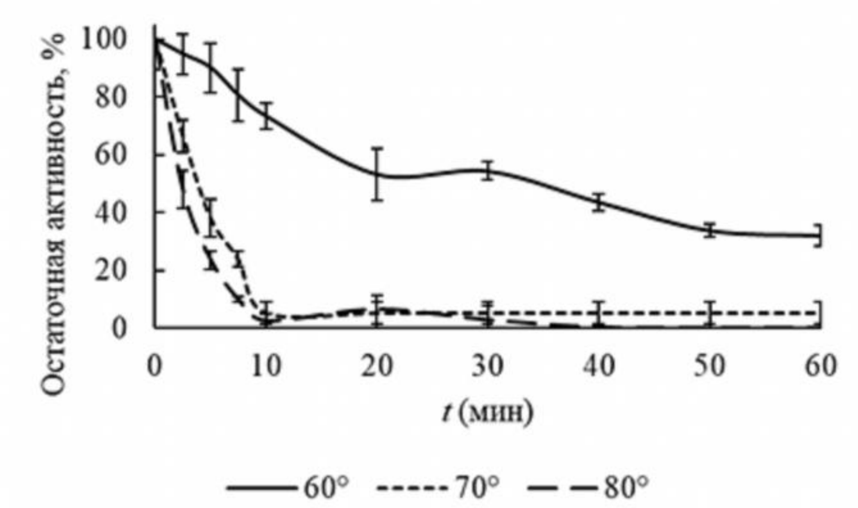


Рис. 1. Зависимость каталитической активности фицина от времени термической инактивации.

Примечательно, что кривые термической инактивации для фицина при 60, 70 и 80°С демонстрируют одностадийный тип инактивации и характеризуются быстрым снижением (время инкубации менее 10 минут) каталитической активности, а затем сохранением той же остаточной активности за счет стабилизации молекул фермента (время инкубации от 10 до 60 минут).

Фракция инактивированного фермента ($г_{in}$) была далее выявлена путем оценки интенсивности поглощения инактивированного раствора протеазы после центрифугирования при 25 000 g. Установлено, что агрегированные молекулы фермента могут сохранять остаточную активность. Примечательно, что значения $г_{in}$ фицина при 60°С, рассчитанные без центрифугирования, меньше, чем измеренные после центрифугирования. Однако при 70 и 80°С разница между долей фермента, инактивированного с удалением агрегированного белка центрифугированием и без него, незначительна (Табл. 1).

Таблица 1.

Доля инактивированных молекул ($г_{in}$) фицина в %

Температура, °С	γ_{in} без центрифугирования	γ_{in} с центрифугированием
60	68±4	78±3
70	95±9	100±9
80	99±8	100±9

В течение 1 часа инкубации раствора фицина при 60°С наблюдается снижение доли молекул нативного фермента (Табл. 2). Инкубация раствора фицина при 70°С показывает более выраженную агрегацию, в то время как при 80°С полная агрегация частиц в растворе фицина происходит в начале процесса инкубации. Далее мы сравнили значения агрегированной фракции белка, обозначенной как $г_{agg}$, полученные с помощью метода динамического рассеяния света (ДРС), со значениями $г_{agg}$, определенными методом спектрофотометрии. Результаты обобщены в таблице 2. Таким образом, установлено, что сначала происходят процессы инактивации молекул ферментов, а затем процессы их агрегации.

Таблица 2.

Доля агрегированных молекул ($г_{agg}$) фицина в %

Температура, °С	$\gamma_{agg,}$ метод ДРС	$\gamma_{agg,}$ метод спектрофотомерии
60	42±8	31±8
70	75±7	72±2
80	99±3	100±5

Термическая инактивация фицина сопровождается агрегацией его молекул. Частичная агрегация фермента начинается в течение первых нескольких минут инкубации, а с ростом температуры и продолжительности нагревания доля агрегатов в системе также увеличивается. Размеры как активных, так и неактивных форм близки по значениям, это означает, что существенного разворачивания молекул фицина после нагревания не выявляется: в основном происходят конформационные изменения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Термическая инактивация фицина сопровождается агрегацией иолекул белка. Процессы частичной агрегации фермента начинаются в течение первых нескольких минут инкубации, а с ростом температуры и продолжительности нагревания доля агрегатов в системе увеличивается.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baidamshina D.R., Trizna E.Y., Holyavka M.G., Bogachev M.I., Artyukhov V.G., Akhatova F.S., Rozhina E.V., Fakhrullin R.F., Kayumov A.R. Targeting microbial biofilms using Ficin, a nonspecific plant protease. Scientific Reports. 2017. 7(1).
2. Ol’shannikova S.S., Red’ko Y.A., Lavlinskaya M.S., Sorokin A.V., Holyavka M.G., Artyukhov V.G. Preparation of papain complexes with chitosan microparticles and evaluation of their stability using the enzyme activity level. Pharmaceutical Chemistry Journal. 2022. V. 55. No. 11. P. 1240-1244.
3. Li C., Wang K. Recent research and advances of material-based saturable absorber in mode-locked fiber laser. Optics & Laser Technology. 2021. V. 138. 106862.

УДК 579.62:577.2

ОСОБЕННОСТИ ПОДБОРА ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ К ГЕНАМ *BVRB_4g088410* АКОНИТАТГИДРАТАЗЫ И *BVRB_6g128670* СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ САХАНОЙ СВЕКЛЫ *BETA VULGARIS* L

Мажарина А.А., Сороколетова А.С., Селиванова Н.В.

Воронежский государственный университет, Воронеж

E-mail: *kir2202@yandex.ru*

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) является универсальным методом молекулярной биологии, позволяющим амплифицировать специфические участки ДНК с высокой точностью и чувствительностью. Выбор подходящих праймеров — ключевой этап в проведении ПЦР, так как именно от их характеристик зависит эффективность и специфичность реакции. В данной статье рассмотрены особенности подбора специфических праймеров для ПЦР к генам *BVRB_4g088410* и *BVRB_6g128670* сахарной свеклы *Beta vulgaris* L. Правильный выбор праймеров позволит получить достоверные данные и расширить понимание о функции генов ключевых ферментов ЦТК при солевом стрессе у сахарной свеклы.

ВВЕДЕНИЕ

Сахарная свекла (*Beta vulgaris* L.) является ценным сельскохозяйственным культурным растением, играющим важную роль в производстве сахара и других продуктов. В связи с этим, имеет место необходимость повышения устойчивости данной культуры к неблагоприятным условиям окружающей среды.

Аконитатгидратаза и сукцинатдегидрогеназа принимают участие в метаболизме растений, производстве энергии и образовании промежуточных продуктов обмена веществ, необходимых для различных клеточных процессов. Эти ферменты могут быть связаны с устойчивостью растений к различным стрессовым факторам, таким как засуха, засоление, холодовой стресс. Исследование их генов может помочь выявить механизмы, которые обеспечивают адаптацию сахарной свёклы к неблагоприятным условиям [1,2].

Аконитатгидратаза (КФ 4.2.1.3) играет ключевую роль в процессах, относящихся к дыхательному метаболизму, в частности, в цикле трикарбоновых кислот. Фермент катализирует первую реакцию цикла по преобразованию цитрата в изоцитрат через промежуточное соединение – цис-аконитат. [1]. Данные метаболиты имеют важное значение не только в энергетическом обмене клетки, но и в организации конструктивного метаболизма. Кроме того, аконитатгидратаза участвует в глиоксилатном цикле, в ходе которого у растений образуются трикарбоновые кислоты, а также моно- и олигосахариды.

Сукцинатдегидрогеназа (КФ 1.3.99.1) представляет собой ферментативный комплекс, который служит связующим звеном между циклом трикарбоновых кислот и электрон-транспортной цепью [2]. СДГ катализирует процесс окисления сукцината до фумарата с использованием флавинадениндинуклеотида (ФАД) в качестве кофермента, также является частью комплекса II дыхательной цепи, где осуществляет перенос двух протонов на убихинон.

Понимание генетической структуры и функций данных ферментов может помочь в изучении метаболических путей сахарной свёклы. В связи с этим целью данной работы являлся подбор праймеров к генам BVRB_4g088410 и BVRB_6g128670, кодирующим АГ и субъединицу А СДГ, сахарной свеклы *Beta vulgaris* L., и определение температуры их плавления и размер ампликона.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения анализа использовались нуклеотидные последовательности генов *B.vulgaris* L., взятые из международной базы данных NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/).

Специфические праймеры подбирали с использованием нуклеотидных последовательностей сахарной свеклы с помощью программы Primer-BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/).

Полученные с помощью программы праймеры, проверяли на специфичность с использованием компьютерной программы BLAST online (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

Расчет вторичной структуры праймеров и их термодинамической стабильности был проведен с помощью Oligo calculators (https://

www.thermofisher.com/ru/ru/home/life-science/oligonucleotides-primers-probes-genes/oligos-tools-utilities.html).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Праймеры являются очень важным компонентом ПЦР, так как именно от них в значительной степени зависит специфичность амплификации. Для обеспечения максимальной специфичности ПЦР необходимо, чтобы праймеры были полностью комплементарны местам отжига и не допускали неполного спаривания своих последовательностей с матрицей ДНК или РНК [3]. Важно учитывать длину праймера, температуру отжига, а также последовательность нуклеотидов.

Анализ и поиск нуклеотидных последовательностей генов *BVRB_4g088410* и *BVRB_6g128670* сахарной свёклы проводили в базе данных GeneBank.

При подборе праймеров использовали программу Primer-BLAST. В результате были получены несколько пар праймеров к каждому гену. С помощью программы BLAST online полученные олигонуклеотиды проверяли на специфичность.

По результатам проверки были выбраны праймеры, которые показали 100% специфичность к *Beta vulgaris* L. Не было установлено существенной гомологии с нуклеотидными последовательностями генов каких-либо бактерий или эукариот.

Далее провели анализ на наличие/отсутсвие сшивок и других вторичных структур, помощью программы Oligo calculators.

Характеристика выбранных праймеров представлена в таблице.

Таблица 1.

Основные характеристики специфических праймеров на гены *BVRB_4g088410* и *BVRB_6g128670 Beta vulgaris* L.

Ген	Последовательность		T плавления	GC, %	Размер продукта
BVRB_6g128670	f	5’- acattgcacagattccgctc -3’	58,91	50,00	256
	r	5’- ccataaaacgctcaccctcg-3’	58,99	55,00	
BVRB_4g088410	f	5’- atcccatttaagcctgctcg -3’	58.03	50.00	206
	r	5’- tccatattcgcctgaactgc -3’	58.05	50.00	

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подобраны специфические праймеры к генам *BVRB_4g088410* и *BVRB_6g128670*, кодирующим АГ и СДГА в геноме сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.). Определены температуры их плавления, что может помочь в дальнейшем определении температур отжига данных олигонуклеотидов на матрице.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Черкасских М. В. Функционирование аконитатгидратазы в листьях кукурузы в стрессовых условиях / М. В. Черкасских и др.//Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2020. – №. 1. – С. 35-41.
2. Магомедова К. М. Современные представления о структуре и механизмах функционирования сукцинатдегидрогеназы / К.М. Магомедова [и др.] // Международный студенческий научный вестник. – 2020. - № 3. – С. 146.
3. Гарафутдинов Р. Р. Разнообразие праймеров для ПЦР и принципы их подбора / Гарафутдинов Р. Р. и др. //Биомика. – 2019. – Т. 11. – №. 1. – С. 23-70.

УДК 579.62

АНАЛИЗ СОСТАВА ФИЛУМОВ БАКТЕРИЙ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ У ПОРОСЯТ ПРИ ПОТРЕБЛЕНИИ ПРОБИОТИКА НА ОСНОВЕ *BACILLUS SUBTILIS*

Мандрыкина О.И.[1], Михайлов Е.В.[3], Кривоносова Д.С.[1], Плютина О.А. [1], Сыромятников М.Ю.[1,2]

[1] Воронежский государственный университет, Воронеж

[2] Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж

[3] Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии, Воронеж

E-mail: *mihan.vrn@mail.ru*

Выявлено, что филум *Firmicutes* присутствует в содержимом кишечника 14-дневных и 30-дневных поросят. Относительное содержание данного филума было одинаковым как в контрольной группе, так и в группе поросят, в корм которым добавляли пробиотик на основе *Bacillus subtilis*. При этом у 30-дневных поросят контрольной группы отмечено повышение относительного содержания *Firmicutes* в 1,4 раза по сравнению с 14-дневными поросятами. В то же время у 30-дневных поросят, потреблявших пробиотик на основе *Bacillus subtilis*, отмечено снижение относительного содержания филума Bacteroidetes в 1,7 раза по сравнению с 14-дневными поросятами. Не было выявлено достоверных различий в относительном содержании этого филума у контрольной группы и группы поросят, потреблявших пробиотическую бактерию.

ВВЕДЕНИЕ

Микробиота кишечника играет ключевую роль в поддержании физиологического гомеостаза у животных, включая свиней. Она участвует в процессах пищеварения, синтезе витаминов, модуляции иммунной системы и защите от патогенов. В нормальных условиях кишечник поросят населяют лактобациллы, бифидобактерии, энтеробактерии и клостридии, формируя сложное симбиотическое сообщество [1]. Однако в период воспалительных процессов, особенно в раннем постнатальном периоде, состав и функции кишечной микробиоты существенно изменяются, что может приводить к снижению продуктивности, ухудшению усвояемости кормов и ослаблению иммунной защиты [2]. С 2006 года, после запрета антибиотиков в качестве стимуляторов роста в странах Европейского союза, особое внимание уделяется альтернативным методам поддержания здоровья кишечника. Одним из наиболее перспективных направлений является использование пробиотических препаратов на основе *Bacillus subtilis*, обладающих антагонистической активностью по отношению к патогенам, способностью к синтезу ферментов и стимуляции местного иммунитета [3]. Эти бактерии устойчивы к воздействию желчи и кислой среды желудка, способны образовывать споры и сохраняться в неблагоприятных условиях, что делает их удобными для применения в животноводстве [4]. Особый интерес представляет изучение действия *Bacillus subtilis* в условиях воспаления кишечника, когда наблюдается нарушение микробного равновесия. Применение таких препаратов может способствовать восстановлению микробиологического баланса, снижению выраженности воспаления и улучшению общесоматического состояния поросят [5].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили образцы содержимого кишечника поросят разных возрастов (14 суток и 30 суток) при классическом кормлении и кормлении с добавлением пробиотика Бацелл-М (Биотехагро, Россия). Выделение ДНК осуществляли комплектом реагентов ПРОБА-ГС (ДНК-технология, Россия). После окончания выделения проверяли наличие продукта при помощи электрофореза в 2% агарозном геле. ПЦР-анализ проводили на приборе «Bio-Rad CFX96TM Real-Time System» с добавлением красителя SYBR Green. В пробирке объёмом 0,2 мл смешивались следующие компоненты: деионизированная вода - 14 мкл; ДНК-матрица - 1 мкл; прямой праймер - 0,5 мкл; обратный праймер - 0,5 мкл; 5X qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) реакционная смесь - 4 мкл. Был использован следующий температурный цикл: первоначальный прогрев при 95°C - 2 мин; 39 циклов вида: денатурация при 95°C в течение 30 сек; отжиг праймеров при 51°C в течение 30 сек; элонгация цепи при 72°C в течение 45 сек; инкубирование смеси при 72°C в течение 5 мин. Для анализа микробиома использовали праймеры согласно Yun-Wen Yang, 2015.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Был проведен анализ бактериальных филумов с помощью ПЦР в реальном времени. На рисунке 1 показана относительная обильность бактерий *Firmicutes*.

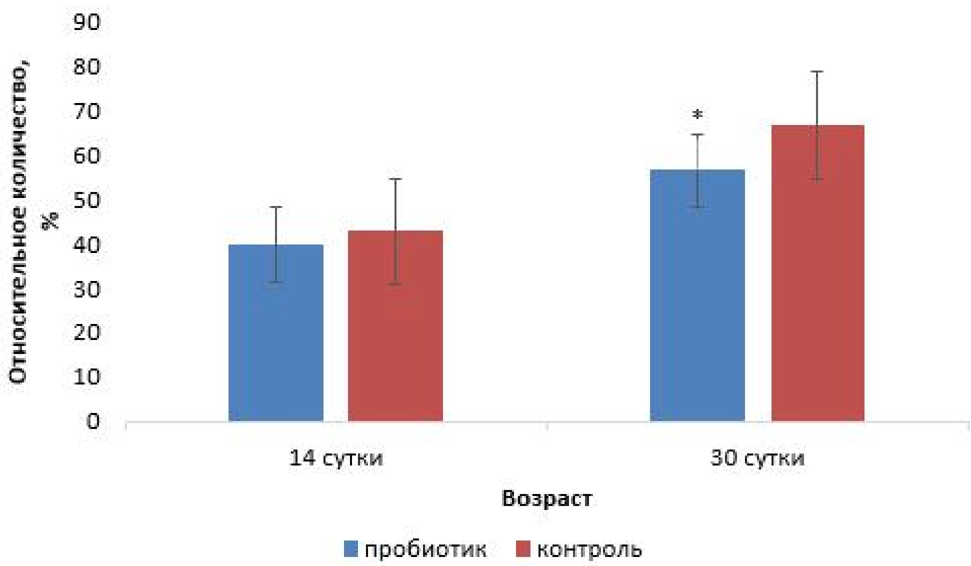


Рис. 1. Относительная обильность бактерий Firmicutes. * - различия с поросятами возраста 14 суток статистически достоверны (p<0,05).

Относительное содержание филума Firmicutes было одинаковым как в контрольной группе, так и в группе поросят, в корм которым добавляли пробиотик на основе *Bacillus subtilis*. *Firmicutes* – филум бактерий, большинство из которых имеют грамположительную структуру клеточной стенки. Фирмикуты являются самым разнообразным и многочисленным отделом микробиома желудочно-кишечного тракта. Желудочно-кишечные Firmicutes распределены по четырём классам: Bacilli, Clostridia, Erysipelotrichi и Negativicutes.

На рисунке 2 показана относительная обильность бактерий филума Bacteroidetes. У 30-дневных поросят, потреблявших пробиотик на основе *Bacillus subtilis*, отмечено снижение относительного содержания филума Bacteroidetes в 1,7 раза по сравнению с 14-дневными поросятами. Не было выявлено достоверных различий в относительном содержании этого филума у контрольной группы и группы поросят, потреблявших пробиотическую бактерию.

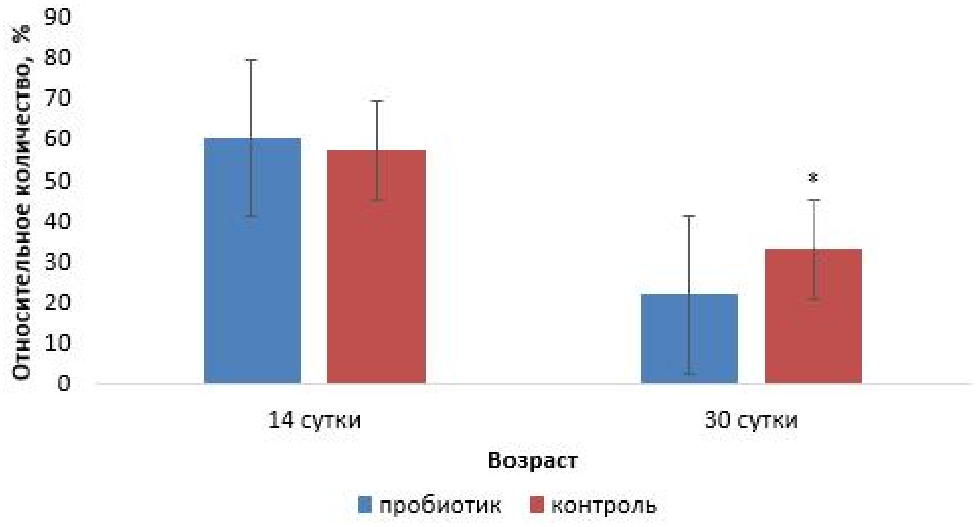


Рис. 2. Относительная обильность бактерий Bacteroidetes. * - различия с поросятами возраста 14 суток статистически достоверное ($p<0{,}05$).

Некоторые представители Bacteroidetes могут быть условно-патогенными микроорганизмами, многие являются симбиотическими видами, высоко приспособленными к работе желудочно-кишечного тракта.

Для филумов Saccharibacteria, Verrucomicrobia и Deferribacteres не было выявлено статистически значимых различий между исследуемыми группами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Добавление пробиотика в корм поросятам не вызвало значительных изменений в относительном содержании основных филумов бактерий кишечной микробиоты. В то же время отмечены статистически значимые различия в относительном содержании двух филумов бактерий Bacteroidetes и Firmicutes у поросят различных возрастов. У 30-дневных поросят контрольной группы отмечено повышение относительного содержания Firmicutes в 1,4 раза по сравнению с 14-дневными поросятами, а у 30-дневных поросят, потреблявших пробиотик на основе *Bacillus subtilis*, отмечено снижение относительного содержания филума Bacteroidetes в 1,7 раза по сравнению с 14-дневными поросятами. В целом не было отмечено негативного влияния пробиотика на основе *Bacillus subtilis* на микробиоту кишечника поросят.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жукова Н.Г., Мельников В.В. Микробиота кишечника у свиней: состав, функции и факторы влияния // Ветеринария. – 2020. – № 8. – С. 21–26

2. Лебедева Л.И. Роль кишечной микрофлоры в иммунной защите организма животных // Аграрная наука. – 2019. – № 3. – С. 17–20.

3. Гаврилова О.С., Ермаков Д.В. Использование пробиотиков на основе *Bacillus subtilis* в свиноводстве // Журнал прикладной биотехнологии. – 2021. – Т. 7, № 2. – С. 45–50.

4. Панченко В.Ю. Пробиотики и их значение в кормлении поросят // Свиноводство. – 2018. – № 6. – С. 33–36.

5. Чистякова Т.А., Сорокина Е.А. Влияние пробиотических бактерий на микробиоту кишечника при воспалении // Биотехнология. – 2022. – Т. 38, № 4. – С. 65–72.

УДК 582.475,4:631.671,3

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СЕМЕННОГО ПОТОМСТВА КОНТРАСТНЫХ ПО ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТИ ДЕРЕВЬЕВ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ В РАЗНЫЕ ПО ПОГОДНЫМ УСЛОВИЯМ ГОДЫ

Машкина[1,2] О.С., Панова[1] Е.Ю., Кузнецова[1] Н.Ф.

[1] *Всероссийский НИИ лесной генетики, селекции и биотехнологии, Воронеж*

[2] *Воронежский государственный университет, Воронеж*

E-mail: *mashkinaos@mail.ru*

Представлены данные сравнительного цитогенетического анализа семенного потомства контрастных по засухоустойчивости деревьев сорта сосны обыкновенной ‘Острогожская’ в оптимальные (2008, 2011, 2015) и засушливые (2007, 2010, 2012, 2014) годы. В годы засух (особенно в 2010 и 2012 гг.) отмечается повышение уровня и расширение спектра патологий митоза, доли клеток с микроядрами, значения которых были достоверно выше у потомства группы чувствительных деревьев, по сравнению с устойчивыми. Повышение цитогенетической изменчивости, преобладание в спектре патологий хромосомных перестроек может способствовать расширению диапазона нормы реакции семенного потомства, его адаптации к гидротермическому стрессу.

ВВЕДЕНИЕ

В XXI веке глобальное изменение климата в мире по данным Всемирной метеорологической организации перешло в фазу быстрого потепления. Так, за последние 15 лет в лесостепной зоне Центрально-Черноземного района его темпы ускорились в 1,7 раз, сократилось количество осадков, отмечено снижение уровня грунтовых вод, увеличение числа, повторяемости и напряженности засух [1, 2]. Засуха на юге зоны видового оптимума ареала сосны обыкновенной является основным типом погодного стресса. В этих условиях генотипы растений с повышенным уровнем засухоустойчивости становятся все более востребованными, а исследования по адаптивной селекции – актуальными, особенно для лесных древесных растений, характеризующихся длительным онтогенезом.

Сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.) является одной из основных лесообразующих пород европейской части России, имеющая высокую хозяйственную ценность, обладающая генетической гетерогенностью и экологической пластичностью [3, 4]. Ее относят к засухоустойчивым породам, однако степень толерантности сосны к засухе ограничена и во многом определяется генотипическими особенностями деревьев [5].

Известно, что генеративная сфера древесных растений характеризуется высокой чувствительностью к засухе [6], от состояния которой зависит качество образующихся семян и семенного потомства. Поэтому актуальны исследования по отбору засухоустойчивых генотипов сосны, перспективных для использования в качестве продуцентов семян для лесного хозяйства. Одним из информативных методов оценки состояния и степени нарушения генетического материала растений является цитогенетический анализ [7, 8]. К наиболее чувствительным показателям цитогенетического мониторинга, объективно отражающим состояние генетического аппарата, относят частоту и спектр патологий митоза, частоту встречаемости клеток с микроядрами [7-11].

В Острогожском районе Воронежской области нами было выделено насаждение сосны обыкновенной, сочетающее засухоустойчивость с оптимальной вегетативной и повышенной семенной продуктивностью, высоким качеством семян в оптимальные и засушливые годы по сравнению с другими местными популяциями ЦЧР [11, 12]. Ему была присвоена селекционная категория – засухоустойчивый сорт сосны ‘Острогожская’ (патент на селекционное достижение № 9187 от 21.07.2017, авторы Н. Ф. Кузнецова, О. С. Машкина). Показано, что засухоустойчивость данного сорта-популяции связана с повышенной долей в насаждении (в два раза по сравнению с региональной нормой) засухоустойчивых форм [11, 12]. Сорт является модельным объектом изучения природы засухоустойчивости и источником сортовых семян.

Цель настоящих исследований – цитогенетическое изучение семенного потомства контрастных по засухоустойчивости деревьев сосны обыкновенной сорта-популяции ‘Острогожская’ для оценки стабильности генома в разные по погодным условиям годы (оптимальные и засушливые).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали семенное потомство от свободного опыления одних и тех же 6-ти фенотипически нормальных деревьев сосны обыкновенной, отобранных Н.Ф. Кузнецовой на модельном объекте «Острогожск». По реакции генеративной сферы на погодный стресс данные деревья разбиты на две группы – устойчивые (№№ 3, 8, 12) и чувствительные (№№ 1, 6, 9). В группе чувствительных деревьев в сильную засуху 2007 года наблюдалось существенное снижение уровня полнозернистости семян и среднего числа семян в шишке, а в группе устойчивых деревьев – неблагоприятные условия практически не отразились на их урожайности.

Цитогенетические исследования проведены в течение 7 лет. Из них 2008, 2011, 2015 гг. по погодным условиям были близки к региональной норме (оптимальные), 2007, 2010, 2012, 2014 гг. – засушливые. Летняя засуха 2010 года по продолжительности и напряженности соответствовала уровню экологической катастрофы [2]. Погодный стресс во время весенних засух 2007 и 2012 гг. по срокам пришелся на наиболее чувствительные стадии репродуктивного цикла сосны. Поэтому реакция генеративной сферы сосны на засуху 2012 года была более выражена по сравнению с летней засухой 2010 года. [14]. В 2014 году наблюдалась слабая ранняя и сильная поздняя осенняя засуха, оказавшая негативное воздействие на вегетативную сферу сосны [14].

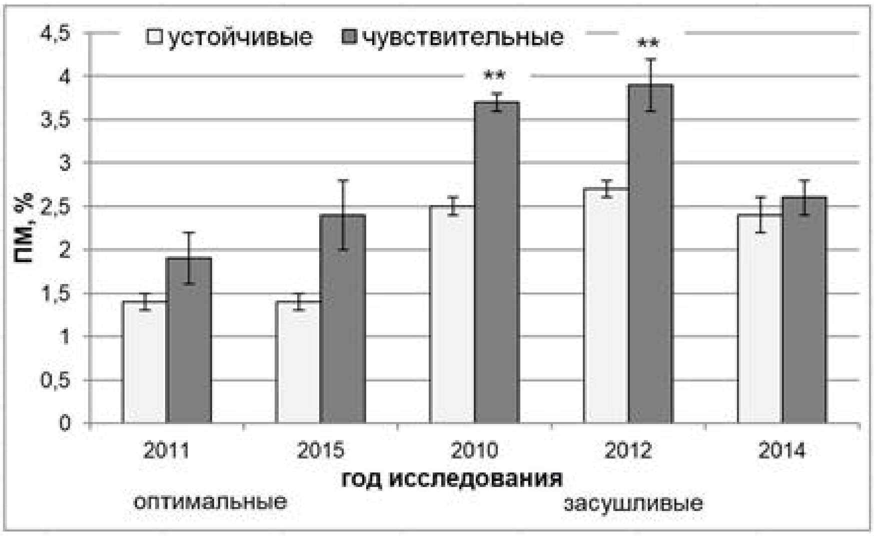
Проростки семян с длиной корешков 0,5–1 см фиксировали в утренние часы (8–10 часов по зимнему времени) в спиртово-уксусной смеси (3:1). Давленые препараты изготавливали по методике Л.А. Топильской и др. [15] в нашей модификации. Анализ препаратов проводили на микроскопе Микмед 6 при увеличении 40 × 1.5 × 10. Просматривали не менее 10 корешков проростков для каждого дерева. Анализировали не менее 100 делящихся клеток корневой меристемы с каждого препарата по следующим параметрам: частота и спектр (типы) патологий митоза (ПМ, %), частота встречаемости клеток с микроядрами (%). Частоту ПМ вычисляли как отношение числа клеток с патологиями в мета–, ана– и телофазе митоза к общему числу просмотренных делящихся клеток (на тех же стадиях), в %. Спектр ПМ митозов представлен как процентное отношение каждого вида патологий к общему числу патологических митозов.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета статистических программ «Stadia». Сравнение выборок осуществляли с помощью t – критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как известно, по частоте встречаемости нарушений митоза можно судить об интенсивности мутационного процесса в клеточных популяциях организма (поскольку патологический митоз может стать источником геномных мутаций и хромосомных аберраций), по спектру нарушений – о степени повреждения генетического материала, т.е. совместимости/несовместимости с жизнью возникающих повреждений [16, 17]. Рядом исследователей установлено, что в средней полосе России для сосны обыкновенной уровень частоты ПМ в норме не должен превышать 5%, хотя внутрипопуляционная изменчивость деревьев может быть достаточно высокой [17, 18].

Аналогичные результаты по показателю частоты ПМ получены и в наших исследованиях для семенных потомств групп устойчивых и чувствительных деревьев в оптимальные и засушливые годы (рис. 1).

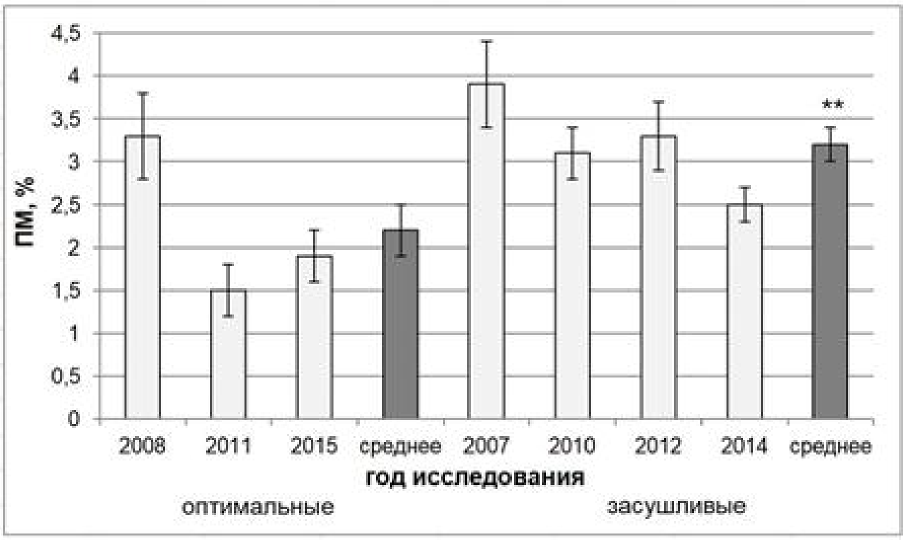


Разница между группой устойчивых и чувствительных деревьев достоверна при **p<0,01

Рис. 1. Частота ПМ в семенном потомстве контрастных по устойчивости к засухе деревьев сосны обыкновенной в засушливые и оптимальные годы.

Превышение по частоте ПМ отмечено лишь в год ранней весенней засухи 2012 г. у потомства дерева №6 из чувствительной группы – 5,1%, против 3,9 ± 0,3% среднего значения данной группы. Тем не менее, в засушливые годы (2010 и 2012 гг.) частота ПМ у деревьев чувствительной группы была в 1,5 раза выше по сравнению с группой устойчивых деревьев, тогда как в оптимальные годы статистически достоверной разницы между группами не отмечено (рис. 1).

Если рассматривать средние значения частоты ПМ по анализируемым годам (рис. 2), то наименьшее количество ПМ выявлено для семенного потомства урожая 2011 года – 1,5±0,3%, а самое высокое (3,9±0,5%) – для урожая 2007 года. Причем, общее среднее значение частоты ПМ засушливых лет достоверно выше по сравнению с оптимальными годами, что свидетельствует о негативном влиянии засух на генетический материал исследуемых образцов.



Разница между средними значениями деревьев в оптимальные и засушливые годы достоверна при **p<0,01

Рис. 2. Средние значения частоты ПМ в семенном потомстве деревьев сосны обыкновенной в контрастные по погодным условиям годы.

Присутствие микроядер в клетке свидетельствует о наличии нерепарированных повреждений хромосомного материала, что может привести к цитогенетической нестабильности клеточных популяций [7, 8, 11, 19].

В группе чувствительных деревьев (№№ 1, 6, 9) в годы сильных засух (2010, 2012 гг.) доля клеток с микроядрами увеличилась в 2–5 раз по сравнению с оптимальным по погодным условиям 2011 годом и составила соответственно 0,05–0,1% и 0,02–0,05% (рис. 3). В группе устойчивых деревьев (№№ 3, 8, 12) в эти же годы отмечался более низкий уровень микроядер в клетках (0,03–0,06%). В год, соответствующий региональной норме микроядра не были выявлены в потомстве деревьев № 3 и № 8. Эти данные также подтверждают негативное воздействие засух на состояние генеративной сферы исследуемых деревьев.

Различия между изученными группами растений проявились и по спектру нарушений митоза. За все годы исследований было обнаружено 9 типов ПМ: 1 – отставание хромосом в метакинезе; 2 – обособление хромосом и групп хромосом в метафазе; 3 – фрагменты хромосом в метафазе и анафазе; 4 – отставание в анафазе; 5 – забегание хромосом в анафазе и мета-анафазе; 6 – неравноценное расхождение хромосом в анафазе; 7 – мосты в анафазе и телофазе; 8 – сложные нарушения (мост + фрагменты хромосом + обособление группы хромосом в анафазе, мост + обособление части хроматина + микроядро в ана–телофазе и др.); 9 – кольца в мета-, ана-, мета-анафазе.

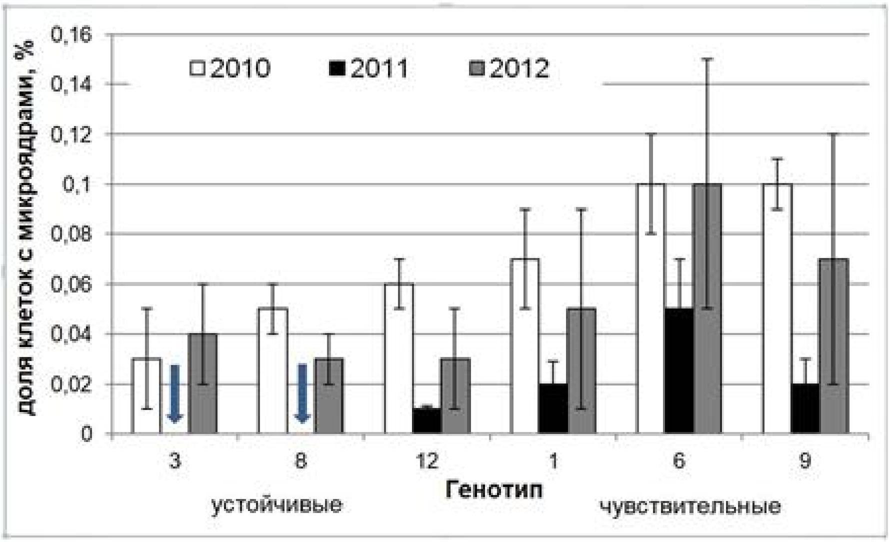


Рис. 3. Доля клеток с микроядрами в семенном потомстве контрастных по устойчивости к засухе деревьев сосны обыкновенной в оптимальный (2011) и засушливые (2010 и 2012) годы.

Все типы нарушений митоза были условно разделены на три группы: структурные (хромосомные – тип 3, 7, 9), геномные (тип 1, 2, 4, 5, 6), сложные (множественные – тип 8). Первые связаны с хромосомными перестройками и свидетельствуют о повышении уровня мутационного процесса, цитогенетической нестабильности [20, 21]. Геномные нарушения, как правило, приводят к изменению числа хромосом, в том числе, к анеуплоидии [11].

На рисунке 4 приведены данные 5-летнего цитогенетического анализа семенного потомства по спектру ПМ.

В годы засух (2010, 2012 и 2014 гг.) отмечено расширение спектра ПМ. Так, в оптимальном 2011 году в потомстве исследованных деревьев выявлено 2–4 типа ПМ, тогда как в засушливые годы их количество повысилось до 6–9. В большинстве случаев преобладали структурные нарушения, повышение уровня которых, как правило, наблюдалось на следующий год после засухи. Так, в потомстве 2010 года уровень структурных нарушений был самым низким – 32,2 %, тогда как в оптимальном 2011 году – значение данного показателя увеличилось в 2,5 раза (83,4 %). В два других засушливых года также преобладали хромосомные аберрации: 2012 г. – 70,5 %, 2014 г. – 72,3 %, а в 2015 г. отмечено снижение уровня данного показателя – 65,6 %.

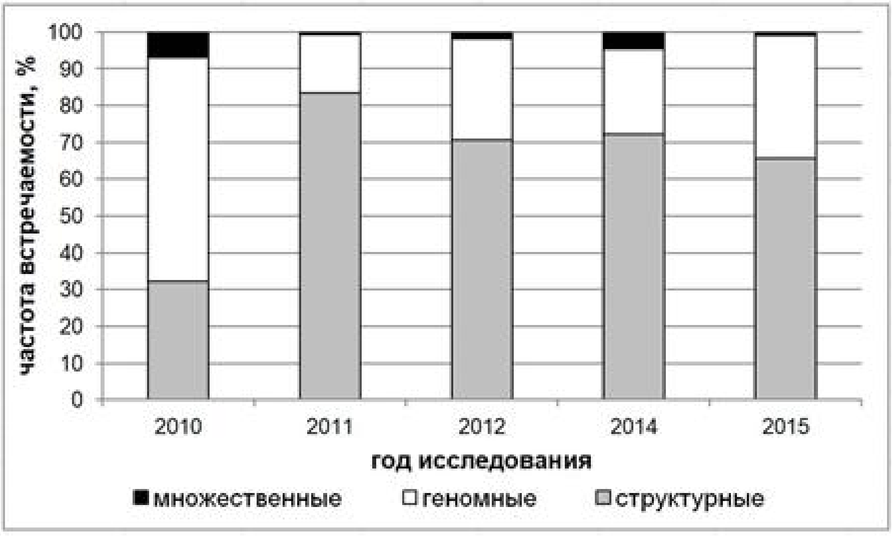


Рис. 4. Спектр патологий митоза в семенном потомстве сосны обыкновенной в оптимальные (2011, 2015) и засушливые (2010, 2012, 2014) годы.

Среди структурных нарушений преобладали мосты на стадиях анафазы и телофазы митоза. Их появление может привести к перераспределению генетического материала между хромосомами, что, по мнению ряда авторов [21–23] может стать дополнительным резервом изменчивости, способствующим увеличению диапазона нормы реакции организма (в нашем случае – семенного потомства) и их адаптации к неблагоприятным условиям среды.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнительный цитогенетический анализ семенного потомства контрастных по засухоустойчивости (устойчивых и чувствительных, выделенных по реакции двух признаков семенной продуктивности на сильную засуху 2007 года) деревьев сорта сосны обыкновенной ‘Острогожская’ в оптимальные (близкие по погодным условиям к региональной норме – 2008, 2011, 2015) и засушливые (2007, 2010, 2012, 2014) годы показал следующее.

1. У контрастных по засухоустойчивости групп растений в засуху отмечено повышение цитогенетической изменчивости, проявляющейся в увеличении частоты и расширении спектра патологий митоза, доли клеток с микроядрами. Однако, в группе чувствительных деревьев (№№ 1, 6, 9) значения этих показателей были достоверно выше, по сравнению с группой устойчивых (№№ 3, 8, 12). Наиболее высокая степень повреждения генетического материала семенного потомства чувствительных деревьев была отмечена во время двух самых сильных по напряженности засух – летней 2010 года и ранней весенней 2012 года. В группе устойчивых деревьев реакция на погодный стресс засушливых лет менее выражена и практически не отразилась на их урожайности и цитогенетической стабильности потомства.

2. Среди встречающихся патологий митоза преобладали мосты в анафазе и телофазе митоза – структурные хромосомные нарушения, которые могут привести к перераспределению генетического материала между хромосомами, способствовать увеличению диапазона нормы реакции семенного потомства, и, возможно, их адаптации к более теплому и сухому климату засушливых лет.

3. Проведенные исследования свидетельствует о целесообразности комплексного использования двух признаков семенной продуктивности деревьев (полнозернистость и число семян на шишку) и цитогенетического анализа семенного потомства (частоты и спектра патологий митоза, доли клеток с микроядрами) для оценки состояния генеративной сферы деревьев, выделения среди них наиболее засухоустойчивых форм и устойчивых популяций сосны.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Виноградова В.В. Волны тепла на Европейской территории России в начале XXI века // Известия РАН. Серия географическая. – 2014. – № 1. С. 47–55.
2. Кузнецова Н. Ф. Изменение климата и его влияние на жизненное состояние лесостепных популяций сосны обыкновенной Русской равнины // Лесохозяйственная информация. – 2023. – № 2. – С. 27–42.
3. Миркин Б.М., Наумова Л.Г., Соломещ А.И. Современная наука о растительности. М.:Логос, 2001. – 262 с.
4. Чернодубов А.И., Смогунова О.А. Сосна обыкновенная в различных экологических условиях юга России // Экология Центрального Черноземья Российской Федерации. Липецк, 1998. – С. 65–68.
5. Аминева Е.Ю., Гуреев А.П., Табацкая Т.М., Машкина О.С., Попов В.Н. Генотипическая изменчивость *Pinus sylvestris* L. по признаку засухоустойчивости // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2019. – Т. 23, №1. – С. 15–23.
6. Свинцова В.С., Кузнецова Н.Ф., Пардаева Е.Ю. Влияние засухи на генеративную сферу и жизнеспособность пыльцы сосны обыкновенной // Лесоведение. – 2014. – № 3. – С. 49–57.

7. Буторина А.К., Калаев В.Н. Анализ чувствительности различных критериев цитогенетического мониторинга // Экология. – 2000. – № 3. – С. 206–210.
8. Муратова Е.Н., Седельникова Т.С., Горячкина О.В., Пименов А.В. Кариологические и цитогенетические исследования хвойных в экстремальных условиях произрастания // Сибирский экологический журнал. – 2023. – Т. 30, № 5. – С. 591–602.
9. Калашник Н.А. Оценка чувствительности цитогенетических методов при мониторинговых исследованиях состояния хвойных насаждений // Известия Самарского научного центра РАН. – 2011. – Т. 13, № 5–2. – С. 179–183.
10. Пардаева Е.Ю., Машкина О.С., Кузнецова Н.Ф. Состояние генеративной сферы сосны обыкновенной как биоиндикатора устойчивости лесов на территории Центрально-Черноземного района в связи с глобальными изменениями климата // Труды Санкт-Петербургского научно-исследовательского института лесного хозяйства. – 2013. – № 2. – С. 16–21.
11. Pardayeva E.Y., Mashkina O.S., Popov V.N. State of *Pinus sylvestris* L. generative sphere according to cytogenetic analysis in changing climate conditions on the territory of Voronezh oblast // Contemporary Problems of Ecology. – 2017. – Vol. 10, № 3. – С. 271–276.
12. Кузнецова Н.Ф. Оценка селекционного материала и сортоиспытание засухоустойчивого сорта сосна Острогожская // Труды КубГАУ. – 2020. – № 85. – С. 104–109.
13. Кузнецова Н.Ф. Взаимодействие генотип-среда и селекция *Pinus sylvestris* L. на засухо- и стрессоустойчивость // Труды КубГАУ. – 2021. – № 91. – С. 181–186.
14. Кузнецова Н.Ф. Развитие неспецифической и специфической реакций у *Pinus sylvestris* L. на популяционном уровне в стрессовом градиенте засушливых лет // Экология. – 2015. – №5. – С. 332–338.
15. Топильская Л.А., Лучникова С.А., Чувашина Н.П. Изучение соматических и мейотических хромосом смородины на ацетогематоксилиновых давленых препаратах // Бюл. ЦГЛ им. И.В. Мичурина. – 1975. – Вып. 22. – С. 107–114.
16. Алов И.А. Патология митоза // Вестник АН СССР. – 1965. – № 11. – С. 58–66.
17. Цитогенетический мониторинг аутохтонных лесов Усманского и Хреновского боров / А.К. Буторина [и др.] // Известия РАН: Серия биологическая. – 2007. – № 4. – С. 508–512.
18. Федорков А.Л. Изменчивости адаптивных признаков хвойных в условиях стресса на севере Европы: автореф. дис. …д-ра биол. наук. М., 2011. 40 с.
19. Ильинских Н.Н., Ильинских И.Н., Некрасов В.Н. Использование микроядерного теста в скрининге и мониторинге мутагенов // Цитология и генетика. – 1988. – Т. 22, № 1. – С. 67–72.
20. Муратова Е.Н., Седельникова Т.С. Геномные и хромосомные мутации у сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в экстремальных условиях произрастания // Хвойные бореальной зоны. – 2004. – Вып. 2. – С. 128–140.
21. Седельникова Т.С., Пименов А.В. Изменчивость числа хромосом и хромосомные перестройки у *Pinus sylvestris* (*Pinaceae*) в засушливых условиях Нижнего Поволжья и Южной Сибири // Ботанический журнал. – 2021. – Т. 106, № 4. – С. 353–362
22. Акопян Э.М. Влияние различных типов ионизирующих излучений на возникновение хромосомных аберраций у гороха. I. Пострадиационное восстановление // Генетика. – 1967. – Т. 3, № 5. – С. 45–51.
23. Симаков Е.А. О пострадиационном восстановлении цитогенетических повреждений в проростках семян разных форм картофеля // Радиобиология. – 1983. – Т. 23, № 5. – С. 703–706.

УДК 57.577.3

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ РЕСВЕРАТРОЛА И ЦИКЛОАСТРАГЕНОЛА С БИОМЕМБРАНАМИ И ИХ КОМПОНЕНТАМИ

Наквасина М.А., Артюхов В.Г., Шилова Е.В.

Воронежский госуниверситет, Воронеж

E-mail: *nakvasina_ma@mail.ru*

С использованием флуоресцентного зонда 1-анилинонафталин-8-сульфоната исследована возможность взаимодействия биогенных соединений – ресвератрола и циклоастрагенола – с эритроцитарными мембранами и липосомами, приготовленными из фосфатидилхолина и холестерина.

ВВЕДЕНИЕ

Ресвератрол и циклоастрагенол (ЦА) – перспективные биогенные соединения, проявляющие противовоспалительное, антивозрастное, противоопухолевое, кардио- и нейропротективное, иммуномодулирующее действие [1-5]. Нами обнаружено цитопротекторное действие этих агентов по отношению к лимфоцитам человека в условиях воздействия УФ-света (254 нм, 1510 Дж/м^2) и пероксида водорода (10^{-5} моль/л) [6-8]. Защитные эффекты ресвератрола и ЦА могут быть опосредованы сигнальными молекулами и транскрипционными факторами (сиртуинами, киназами, p53 и др.), связаны с их антиоксидантными свойствами, взаимодействием с ДНК и компонентами плазматических мембран. В то же время представления о локализации ресвератрола и ЦА в липидных бислоях противоречивы и требуют детализации и уточнения. Установлено [9], что встраивание ресвератрола в липидные мембраны сопровождается повышением их текучести и проницаемости; его молекулы могут накапливаться в области гидрофильных головок мембранных липидов и образовывать водородные связи между гидроксильными группами молекул полифенола и гидрофильными группами липидов.

В этой связи нами проведены модельные исследования, направленные на выявление возможности взаимодействия ресвератрола и циклоастрагенола с эритроцитарными мембранами и липосомами, приготовленными из фосфатидилхолина (ФХ) и холестерина (ХЛ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эритроциты выделяли из крови доноров путем центрифугирования при 1500 об/мин в течение 15 мин с последующим трехкратным отмыванием клеток в физиологическом растворе (0,9 % раствор натрия хлорида) в тех же условиях. Эритроциты подвергали гипоосмотическому гемолизу, мембраны осаждали путем центрифугирования гемолизата при 13500 об/мин с последующим трехкратным отмыванием.

Раствор лецитина (фосфатидилхолина) в этиловом спирте (1%) испаряли в роторном испарителе IKA RV10 control, при температуре водяной бани 60°C, в результате на стенке испарительной колбы получали пленку липидов. Затем добавляли 0,01 моль/л натрий-фосфатный буфер (pH=7,4) в объёме, равном объёму раствора лецитина в этиловом спирте, перемешивали в течение 1 мин. Далее липосомы подвергали воздействию ультразвука. Облучение проводили на ультразвуковом дезинтеграторе Qsonica Sonicators в течение 15 мин (20кГц, 10 секундный импульс с перерывом 3 сек).

Флуоресцентные характеристики зонда 1-анилинонафталин-8-сульфоната (АНС) в комплексе с нативными и модифицированными эритроцитарными мембранами и липосомами исследовали на спектрофлуорофотометре Shimadzu RF1501. Флуоресценцию АНС возбуждали при длине волны 362 нм. Спектр флуоресценции АНС регистрировали в диапазоне длин волн 300-600 нм. Использовали раствор АНС (1 мг/мл), приготовленный на изотоническом растворе хлорида натрия. Затем добавляли 0,1 мл полученного раствора к 2,8 мл образца, содержащего нативные или модифицированные эритроцитарные мембранами и липосомы, и инкубировали 20 мин. Далее регистрировали спектры флуоресценции АНС в комплексе со исследуемыми образцами.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Нами исследованы люминесцентные характеристики «мембранного» флуоресцентного зонда – 1-анилинонафталин-8-сульфоната (АНС) – в комплексе с эритроцитарными мембранами и липосомами разного состава, модифицированными ресвератролом и циклоастрагенолом в концентрации 0,1 моль/л (табл. 1, 2).

Таблица 1.

Люминесцентные характеристики флуоресцентного зонда АНС в комплексе с эритроцитарными мембранами, модифицированными ресвератролом и циклоастрагенолом

Исследуемый образец	Люминесцентные характеристики зонда	
	λ_{max} флуоресценции, нм	Интенсивность флуоресценции в максимуме, отн. ед.
Интактные мембраны	478	11,7±0,8
Мембраны + ресвератрол	484	14,7±2,5
Мембраны + ЦА	484	13,6±2,6

После добавления к эритроцитарным мембранам ресвератрола и циклоастрагенола наблюдался сдвиг максимума флуоресценции зонда в более длинноволновую область (табл. 1) по сравнению с таковым для контрольного образца (нативные мембраны). Эти данные указывают на изменение полярности окружения хромофорных групп зонда в мембране на более гидрофильное в присутствии биогенных соединений. Изменения интенсивности флуоресценции зонда в максимуме не зарегистрированы, значит, зарядовое состояние мембран в присутствии исследуемых соединений не меняется.

В табл. 2 представлены результаты исследования люминесцентных характеристик АНС в комплексе с липосомами разного состава, модифицированными ресвератролом и циклоастрагенолом.

После добавления к липосомам из ФХ ресвератрола и ЦА незначительно меняется положение $л_{max}$ флуоресценции АНС, но наблюдается статистически значимое по сравнению с контролем (липосомы из ФХ без модификаторов) снижение интенсивности флуоресценции в максимуме, наиболее выраженное для ЦА. По-видимому, после взаимодействия ЦА и ресвератрола с поверхностью липосом уменьшается количество доступных участков для связывания зонда.

После добавления к липосомам из ФХ и ХЛ ресвератрола и ЦА зарегистрированы сдвиг максимума флуоресценции АНС в сторону более коротких длин волн и незначительное повышение интенсивности флуоресценции в максимуме по сравнению с таковыми для контрольного образца (липосомы из ФХ и ХЛ без модификаторов).

Таблица 2.

Люминесцентные характеристики флуоресцентного зонда АНС в комплексе с липосомами разного состава, модифицированными ресвератролом и циклоастрагенолом

Исследуемый образец	Люминесцентные характеристики зонда	
	λ_{max} флуоресценции, нм	Интенсивность флуорсеценции в максимуме, отн. ед.
Липосомы из ФХ	479	234±5
Липосомы из ФХ + ресвератрол	481	188±12
Липосомы из ФХ + ЦА	477-478	84±6
Липосомы из ФХ и ХЛ	484	65±8
Липосомы из ФХ и ХЛ + ресвератрол	480-481	79±6
Липосомы из ФХ и ХЛ + ЦА	476	84±3
Водный раствор ресвератрола	503	11±2
Водный раствор ЦА	500	9±1

Следовательно, введение холестерина в состав липосомальных мембран изменяет флуоресцентные характеристики АНС по сравнению с таковыми для липосом без холестерина в присутствии модификаторов: ресвератрола и циклоастрагенола. Полученные результаты указывают на возможность взаимодействия ресвератрола и циклоастрагенола с холестерином. Полагают [10], что ресвератрол, взаимодействуя с гидрофобными хвостами фосфолипидов, локализуется в неполярной зоне мембраны (в области рафтов), защищая ее от пероксидного окисления липидов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ресвератрол и циклоастрагенол взаимодействуют с эритроцитарными мембранами и липосомами, приготовленными из фосфатидилхолина, фосфатидилхолина и холестерина, что сопровождается изменениями степени гидрофобности мембранных структур. Модификация этими соединениями структурного состояния липидных компонентов мембран, в том числе, участвующих в образовании рафтов, может влиять на стабильность плазматических мембран в условиях стресс-индуцированной клеточной гибели. Полученные результаты необходимо учитывать при исследовании цитопротекторного и цитотоксического действия биогенных соединений на структурно-функциональное состояние клеток крови человека.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2023-2025 годы, проект №FZGU-2023-0009.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yu W., Fu Y.-C., Wang W. Cellular and molecular effects of resveratrol in health and disease // Journal of Cellular Biochemistry. 2012. V. 113. N 3. P. 752-759.
2. Park E.-J., Pezzuto J.M. The pharmacology of resveratrol in animals and humans // Biochimica et Biophysica Acta (BBA). 2015. V. 1852. Iss. 6. P.1071-1113.
3. Shaito A., Posadino A.M., Younes N., Nasan H., Halabi S., Alhababi D., Al-Mohannadi A., Abdel-Rahman V., Eid A.H., Nasrallah G.K., Pintus G. Potential adverse effects of resveratrol: a literature review // International Sciences. 2020. V. 21. N 6. P.20.84.
4. Yu Y., Zhou L., Yang Y., Liu Y. Cycloastragenol: an exciting novel candidate for age-associated diseases // Experimental and therapeutic medicine. 2018. V 16. N 3. P. 2175-2182.
5. He M., Wang R., Che H., Wang H., Yang K., Zhang G., Jinchun Y., Wang J. A comprehensive review of cycloastragenol: biological activity, mechanism of action and structural modifications // European journal of Medicinal Chemistry Reports. 2022. V. 5. P. 100060.
6. Наквасина М.А., Артюхов В.Г., Чурсанова Е.Н., Мячина О.В., Корпусова Е.И., Деенкова А.Ю., Шестых В.А. Цитопротекторное и антиоксидантное действие ресвератрола на лимфоциты человека, модифицированные пероксидом водорода и УФ-светом // Биофизика. 2024. Т. 69, № 6. С. 1185-1194.
7. Наквасина М.А., Чурсанова Е.Н., Корпусова Е.И., Деенкова А.Ю., Шестых В.А. Фотопротекторное действие циклоастрагенола на лимфоциты человека // Сборник тезисов докладов Третьего Международного симпозиума “Химия для биологии, медицины, экологии и сельского хозяйства”. Санкт-Петербург, 2024. С. 203-204.
8. Корпусова Е.И., Сараджи Н.Г., Наквасина М.А. Исследование процессов клеточной гибели лимфоцитов человека в присутствии ресвератрола и циклоастрагенола // Сборник тезисов 28-ой Пущинской школы-конференции молодых ученых с международным участием «Биология - наука XXI века». Пущино, 21-24 апреля 2025 г. С. 193.
9. Plachta L., Mach M., Kowalska M., Wydro P. The effect of trans-resveratrol on the physicochemical properties of lipid membranes with different cholesterol content // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomemranes. 2024. V. 1866. Iss. 1. P. 184212.
10. Neves A.R., Nunes C., Reis S. Resveratrol induces ordered domains formation in biomembranes: Implicationfor its pleiotropic action // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomemranes. 2016. V. 1858. Iss. 1. P. 12-18.

АНАЛИЗ ФОТОИНДУЦИРОВАННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ КИСЛОРОДТРАНСПОРТНОЙ ФУНКЦИИ ГЕМОГЛОБИНА ЧЕЛОВЕКА В ПРИСУТСТВИИ ГЛУТАТИОНА

Небольсина А.А., Артюхов В.Г., Пукасева А.А., Колтаков И.А.

Воронежский государственный университет, Воронеж

Гемоглобин — ключевой транспортный белок эритроцитов крови человека, отвечающий за транспорт кислорода от легких в ткани. Его способность обратимо связывать и высвобождать кислород обеспечивается за счет наличия простетической группы – гема, содержащего в своем составе двухвалентные ионы железа Fe^{2+}, непосредственно участвующие в процессе оксигенации/дезоксигенации. Однако сложная регуляция этого процесса и его зависимость от структурной целостности гемовой группы и конформационных изменений в пространственной структуре белка, делают механизм транспорта кислорода особенно уязвимым и чувствительным к уровню оксидативного стресса в организме человека [1, 2].

Переход живых организмов к эксплуатации кислородного метаболизма на заре эволюции, вызванный его существенно большей эффективностью в получении энергии для поддержания процессов жизнедеятельности, сделал их чрезвычайно чувствительными для продуктов неполного восстановления кислорода до воды – активных кислородных метаболитов, которые стали образовываться не только в результате естественных фотохимических процессов, вызванных достигающим поверхности Земли УФ-излучением, но и в процессе получения энергии клетками. Это потребовало привлечения защитных систем для борьбы с агрессивными метаболитами, которые должны были обладать высокой эффективностью утилизации токсичных молекул, высокой мобильностью и проникающей способностью в клетки. Наличие такой антиоксидантной защиты стало обязательным атрибутом каждой эукариотической клетки. Однако ее реализация как на ферментативном уровне (каталаза, пероксидаза, супероксиддисмутаза), так и на низкомолекулярном уровне – α-токоферол, аскорбиновая кислота, β-каротин, глутатион, ликопин и полифенолы – с достаточной долей вероятности позволяет нормально функционировать только клеткам, обладающим способностью нормально восполнять запасы этих жизненно важных молекул [3].

Лишение эритроцитов человека ядер нанесло непоправимый ущерб ферментативному звену антиоксидантной защиты, поскольку клетка может располагать только тем запасом антиоксидантных ферментов, которые они смогли синтезировать до момента редукции ядра и деградации соответствующих копий мРНК. Это переводит основные транспортные клетки в зависимость от низко молекулярных неферментных антиоксидантов, изучение механизмов использования и эффективности транспорта которых делает проводимые исследования особенно актуальными.

В качестве объекта исследования нами был выбран важный внутриклеточный антиоксидант и регулятор биологических процессов – глутатион [4], который не только играет важную роль в защите от свободнорадикальных повреждений, но и может выступать как переносчик важнейших регуляторных соединений – нитрозо-групп.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве модельного объекта для проведения исследования нами были использованы водный раствор гемоглобина, стабилизированный в 100 ммоль/л натрий-фосфатным буфером (pH 7.4) для исключения проявления эффекта Вериго –Бора [5, 6].

Для получения S-нитрозоглутатиона к водному раствору восстановленного глутатиона (GSH) добавляли раствор нитрита натрия ($NaNO_2$) в молярном соотношении 1:1. Полученную смесь реагентов инкубировали 20 мин. при комнатной температуре. Концентрацию S-нитрозоглутатиона определяли по величине оптической плотности при 335 нм (ε = 774 л/моль·см) [7]. Раствор S-нитрозоглутатиона добавляли к раствору оксигемоглобина человека ($1.0\cdot10^{-5}$ моль/л) до конечной концентрации $1.0\cdot10^{-4}$ моль/л для достижения соотношения исследуемых молекул 1:10.

Растворы оксигемоглобина и суспензий эритроцитов в объеме 2 мл облучали светом ртутно-кварцевой лампы типа ДРТ-400 в термостатируемой кювете при температуре 20 ^{o}С на расстоянии 0,23 м от оси лампы при постоянном перемешивании магнитной мешалкой. Интегральный поток УФ-излучения выделяли с помощью светофильтра УФС-1 с полосой пропускания

240-390 нм. Нами была выбрана доза облучения терапевтического диапазона 151 Дж/м2, что соответствовало времени экспозиции 1 мин.

Регистрацию кривых диссоциации проводили по стандартной методике [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ кривых диссоциации нативного оксигемоглобина человека показал, что функция насыщения гембелка кислородом подчиняется классической S-образной зависимости. При этом нативные образцы HbO_2 характеризовались величиной давления полунасыщения P_{50} = 21,57 ± 0,78 мм рт. ст. и константой Хилла a = 2,36 ± 0,35. Содержание оксигенированного гемоглобина при парциальном давлении кислорода 40 мм рт. ст. (Y_{40}) составило 84,35 ± 0,98 %, а при 100 мм рт. ст. – 97,13 ± 0,87 %, артериально-венозная разность содержания HbO_2 (АВР) была равна 12,32 ± 0,78 % (Таблица 1).

Таблица 1.

Параметры динамики насыщения кислородом гемоглобина человека, модифицированного GSNO до и после УФ-облучения

Условия опытов / P_{O2}, мм рт. ст.	HbO_2	HbO_2 +УФ	Hb-GSNO (1:10)	Hb-GSNO (1:10) + УФ
0	0	0	0	0
3,19	2,56 ± 0,97	4,94 ± 1,42 *	1,33 ± 0,84	3,24 ± 1,15
7,98	7,68 ± 2,36	12,07 ± 3,22 *	4,17 ± 0,91 *	8,81 ± 1,73 **
15,96	22,42 ± 3,93	55,71 ± 3,47 *	17,63 ± 0,25 *	27,16 ± 0,58 **
23,94	62,50 ± 3,45	78,63 ± 2,89 *	68,31 ± 0,93*	69,4 ± 0,64 **
31,92	81,90 ± 2,39	88,80 ± 1,72 *	78,67 ± 0,69	85,59 ± 1,33 **
63,84	93,98 ± 0,81	96,04 ± 0,39 *	92,12 ± 0,95	96,13 ± 0,82
95,76	97,61 ± 0,43	98,04 ± 0,36	96,53 ± 0,32	97,47 ± 0,39
159,6	100	100	100	100

Обозначения: * Отличия от нативного оксигемоглобина статистически достоверны (P<0,05), ** Отличия от фотомодифицированного оксигемоглобина статистически достоверны (P<0,05).

Введение в раствор гемоглобина S - нитрозоглутатиона в концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л приводило к статистически достоверному повышению величины Y_{40} до 88,53 ± 0,62 %, что способствовало снижению АВР до 8,92 ± 0,61 %. Это свидетельствовало о том, что модифицированный гем-белок хуже отдает кислород в капиллярах в процессе газообмена. При этом показатели Р50, б и Y100 в этом варианте исследования не претерпели статистически значимых изменений относительно контроля.

Облучение растворов гемоглобина в присутствии S - нитрозоглутатиона ($1 \cdot 10^{-4}$ моль/л) в дозе 151 Дж/м^2 привело к увеличению сродства гембелка к лиганду, о чем свидетельствует снижение параметра P_{50} (до 19,35 ± 0,83 мм рт. ст) относительно необлученных образцов. При этом константа Хилла, Y_{40}, Y_{100} и АВР не изменились по сравнению с показателями исследуемого комплекса до воздействия УФ-света и составили 2,35 ± 0,31, 89,33 ± 0,78 %, 98,87 ± 0,36 % и 9,96 ± 0,58 % соответственно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнив показатели кислородсвязывающей способности образцов оксигемоглобина, модифицированных УФ-светом в присутствии нитрозоглутатиона в молярном соотношении компонентов 1:10, мы обнаружили, что подвергшийся воздействию физиологической дозы УФ-света гемоглобин, проявляет меньшее сродство к лиганду, приближаясь по своим параметрам к интактным образцам.

Исследование функциональных характеристик оксигемоглобина в присутствии S-нитрозоглутатиона позволило установить, что связывание гемоглобина с указанным модификатором приводило к усилению гем-гемовых взаимодействий, вследствие которых могут возникать стерические препятствия, отражающиеся на снижении сродства к кислороду на начальных этапах сатурации. Однако в области физиологически значимых величин парциального давления кислорода интенсивность присоединения лиганда заметно возрастала и оказывалась выше контрольных значений.

Таким образом, S-нитрозоглутатион играет ключевую роль в поддержании кислородтранспортной функции гемоглобина, что имеет значимые последствия для медицины и биохимических процессов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Артюхов В.Г. Гемопротеиды: закономерности фотохимических превращений в условиях различного микроокружения / В.Г. Артюхов. – Воронеж : Изд–во Воронеж. ун-та, 1995. – 280 с.

2. Артюхов В.Г. Олигомерные белки: структурно-функциональные модификации и роль субъединичных контактов / В.Г. Артюхов, О.В. Башарина, Г.А. Вашанов, М.А. Наквасина, О.В. Путинцева. – Воронеж : Изд-во ВГУ, 1997. – 281 с.

3. Кения М.В. Роль низкомолекулярных антиоксидантов при окислительном стрессе / М.В. Кения, А.И. Лукаш, Е.П. Гуськов // Успехи современной биологии. 1993. – Т. 113 №4. – С. 456-470.

4. Anggard E. Nitric oxide: mediator, murderer and medicine / E. Anggard // Lancet. – 1994. – Vol.343. – P. 1199–1206.

5. Verigo B. F. Zur Frage ьber die Wirkung des Sauerstoff auf die Kohlensдureausscheidung in den Lungen / B. F. Verigo // Archiv fьr die gesammte Physiologie des Menschen und der Thiere – 1892. – № 51. – С. 321-361.

6. Bohr Chr. Concerning a Biologically Important Relationship — The Influence of the Carbon Dioxide Content of Blood on its Oxygen Binding / Chr. Bohr, K. Hasselbalch, A. Krogh. // Skand. Arch. Physiol. – 1904. – № 16. – С. 401-412.

7. Ванин А.Ф. Роль ионов железа и цистеина в образовании и распаде S-нитрозоцистеина и S-нитрозоглутатиона / А.Ф. Ванин // Биохимия. – 1995. – Т. 60, вып. 1. – С. 593-602.

8. Артюхов В.Г. Модификация структурно-функциональных свойств гемоглобина человека, индуцированная нитроглицерином, в условиях различного кислородного режима / В.Г. Артюхов, Е. А. Калаева, О.В. Путинцева, А.И. Полюбезьева // Биомедицинская химия. - 2016. - Т. 62. -N 3. - С. 251-258.

УДК 577.151.6

ВЛИЯНИЕ СОЛЕВОГО СТРЕССА НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ДНК-[N6-АДЕНИН]-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ В ЛИСТЬЯХ ПШЕНИЦЫ

Новосельцева Д.П., Бабичева Н.А., Бородин А.С., Федорин Д.Н.

Воронежский государственный университет, Воронеж
E-mail: *daryagosudarya@gmail.com*

Солевой стресс вызывает активацию фермента ДНК-[N6-аденин]-метилтрансферазы (Dam), что приводит к изменению метильного статуса промоторов генов, связанных с реакцией на солевой стресс у растений. Увеличение активности Dam ведет к изменениям в уровне метилирования ДНК, что, в свою очередь, может оказать влияние на регуляцию экспрессии генов, ответственных за синтез ферментов, участвующих в адаптации к неблагоприятным условиям. Эти молекулярные изменения могут играть ключевую роль в механизмах, позволяющих растениям справляться с солевым стрессом, и открывают перспективы для дальнейшего изучения сложных взаимодействий между экологическими стрессами и генетической регуляцией.

ВВЕДЕНИЕ

Засоление представляет собой один из абиотических стрессов, которому могут быть подвержены растительные организмы [3]. Несмотря на ограниченное количество исследований, касающихся влияния NaCl на жизнедеятельность растений, очевидно, что солевой стресс может оказывать значительное влияние на растение как на организменном, так и на клеточном уровне [4,5,6,7,8].

Согласно исследованиям, изменение метильного статуса ДНК растений может быть связано с воздействием различных стрессоров [9]. Основное внимание в исследованиях уделялось метилированию по цитозину [10,11]. Как сообщается, метилирование цитозина чаще всего приводит к сайленсингу гена [12]. Однако, в ряде случаев показано, что метилирование не всегда действует как механизм репрессии гена и, что гиперметилирование промоторов и энхансеров может способствовать транскрипции генов in vivo и in vitro [13]. В свою очередь, метилирование аденина, особенно у растений, остается малоизученным.

ДНК-метилтрансферазы — группа ферментов, катализирующих метилирование нуклеотидных остатков в составе ДНК. Активность метилтрансфераз, заключающаяся в переносе метильной группы с кофактора (лиганда) на азотистое основание в составе ДНК, ведет к изменению свойств ДНК, при этом может изменяться активность соответствующих генов, а также пространственная структура нуклеиновой кислоты (конформация) [14].

ДНК-аденинметилаза (Dam) — фермент, который добавляет метильную группу к аденину в последовательности 5'-GATC-3' [15]. Dam играет важную роль в регуляции транскрипции и репликации ДНК [16]. У *E. coli* последовательности GATC по большей части метилированы, что способствует транскрипции. Например, изменение фазы Pap-пилей (пиелонефрит-ассоциированные пили, P-пили), у уропатогенной *E. coli* контролируется Dam посредством метилирования двух участков GATC после промотора *pap* гена [17]. Было показано, что выключение гена *dam* в *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* приводит к нарушению регуляции уровня белка лейкотоксина, а также к снижению способности микроорганизма проникать в эпителиальные клетки [18].

Также ген *dam* был идентифицирован у некоторых диких и культурных растений [19]. Таким образом, цель исследования заключалась в изучении активности фермента ДНК-[N6-аденин]-метилтрансферазы в листьях пшеницы, подверженной солевому стрессу. Объектом исследования выбраны проростки пшеницы, поскольку этот вид растений занимает значительное место в сельском хозяйстве Российской Федерации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовались листья 14-дневной пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Воронежская-76. Пшеница была выращена гидропонным методом при температуре 25^{o} C.

Солевой стресс моделировали путем помещения проростков, с предварительно удаленной корневой системой, в 150 мМ солевой раствор NaCl. Образцы для исследования отбирали через 1, 3, 6, 9, 12 и 24 часа. Контрольная группа не подвергалась солевому стрессу.

Для определения активности Dam в листьях пшеницы использовался спектрофотометрический метод измерения оптической плотности раствора при 256 нм для Dam в течение 3 мин [1]. За единицу ферментативной активности принимали количество фермента, образующего 1 микромоль продукта за 1 мин при 25°C.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Эксперимент, направленный на изучение активности фермента Dam в условиях стресса, позволил выявить следующие закономерности. По результатам измерений стало ясно, что уровень активности фермента плавно повышался с начала эксперимента и достигал пика на 6-й час инкубации. Этот факт отражен на графике (рис. 1) и согласуется с данными, полученными при анализе электрофореза в агарозном геле [2]. С течением времени активность фермента постепенно снижалась, однако оставалась выше исходного уровня. Это наблюдение говорит о заметном влиянии типа контроля метильного статуса ДНК на исследуемую величину.

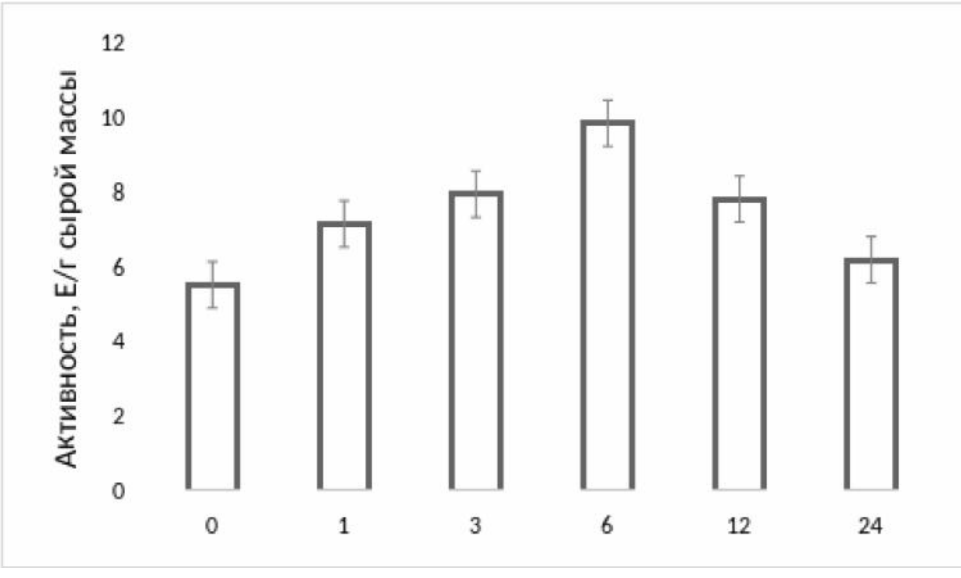


Рис. 1. Активность Dam в листьях пшеницы при солевом стрессе. На горизонтальной оси время инкубации в 150 мМ растворе NaCl.

Важно отметить, что повышение уровня активности фермента Dam в условиях стресса, может указывать на активное метилирование ДНК, что в свою очередь может приводить к изменениям в клеточном ответе на стресс. Также стоит отметить, что величина активности фермента Dam хоть и снизилась с течением времени, но оставалась выше контрольного уровня, что важно для преодоления физиологических последствий, вызванных стрессом.

Согласно нашим прошлым исследованиям, экспрессия генов ферментов вторичного метаболизма (таких как дегидрогеназа янтарного полуальдегида и глиоксилатредуктаза) может регулироваться, в том числе, посредством изменения метильного статуса генов [2]. Своей максимальной активности данные ферменты также достигали на 6 час инкубации в солевом растворе, что коррелирует с данными по активности Dam. Это может говорить о немалой роли Dam в механизмах защиты растений от солевого стресса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Повышенный уровень активности фермента Dam при солевом стрессе может быть связан с индукцией активного метилирования ДНК, что в свою очередь, может оказывать влияние на клеточный ответ при стрессовых условиях. Наблюдаемое сохранение высокого уровня активности фермента Dam на протяжении всего времени инкубации в растворе NaCl говорит о продолжающемся влиянии факторов стресса на клеточный уровень, что подчеркивает важность долгосрочного эффекта стресса на клеточные процессы.

В целом, полученные данные об активности фермента Dam при солевом стрессе открывают новые перспективы для изучения клеточной регуляции и механизмов адаптации к негативным воздействиям.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Землянухин А.А. Большой практикум по физиологии растений / Землянухин А. А., Землянухин Л.А. // Учеб. пособие. Воронеж: Изд-во Воронежского университета. – 1996.
2. Влияние засоления на функционирование ферментов метаболизма полуальдегида янтарной кислоты в клетках пшеницы / Н.А. Бабичева, Д.П. Новосельцева, Д.Н. Федорин, А.Т. Епринцев // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: Межрегиональный сборник научных работ. Том Выпуск 25. – Воронеж: Центрально-Черноземное книжное издательство, 2023. – С. 43-48.
3. Abiotic stress responses in plants / Zhang H. [et al.] // Nature Reviews Genetics. – 2022. – Т. 23. – №. 2. – Р. 104-119.
4. Datir S. Effect of NaCl-induced salinity stress on growth, osmolytes and enzyme activities in wheat genotypes / Datir S., Singh N., Joshi I. // Bulletin of environmental contamination and toxicology. – 2020. – Т. 104. – Р. 351-357.

5. Hajiyeva I. Effect of High Salt Stress on Germination and Growth of Some Varieties of Common Beet / Hajiyeva I. // Бюллетень науки и практики. – 2024. – Т. 10. – №. 5. – P. 188-195.
6. Effect of salt stress on growth, physiological and biochemical parameters and activities of antioxidative enzymes of rice cultivars / Talubaghi M. J. [et al.] // Cereal Research Communications. – 2023. – Т. 51. – №. 2. – P. 403-411.
7. Li W. Effect of environmental salt stress on plants and the molecular mechanism of salt stress tolerance / Li W., Li Q. // Int. J. Environ. Sci. Nat. Res. – 2017. – Т. 7. – №. 3. – P. 555714.
8. Maize (Zea mays L.) responses to salt stress in terms of root anatomy, respiration and antioxidative enzyme activity / Hu D. [et al.] // BMC plant biology. – 2022. – Т. 22. – №. 1. – P. 602.
9. DNA methylation in plant responses and adaption to abiotic stresses / Sun M. [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Т. 23. – №. 13. – P. 6910.
10. DNA cytosine methylation dynamics and functional roles in horticultural crops / Liu P. [et al.] // Horticulture Research. – 2023. – Т. 10. – №. 10. – P. uhad170.
11. Vanyushin B. F. DNA methylation in plants / Vanyushin B. F. // DNA methylation: basic mechanisms. – 2006. – P. 67-122.
12. Chomet P. S. Cytosine methylation in gene-silencing mechanisms / Chomet P. S. // Current opinion in cell biology. – 1991. – Т. 3. – №. 3. – P. 438-443.
13. Angeloni A. Enhancer DNA methylation: implications for gene regulation / Angeloni A., Bogdanovic O. // Essays in biochemistry. – 2019. – Т. 63. – №. 6. – P. 707-715.
14. DNA methylation and DNA methyltransferases / Edwards J. R. [et al.] // Epigenetics & chromatin. – 2017. – Т. 10. – P. 1-10.
15. Vanyushin B. F. Adenine methylation in eukaryotic DNA / Vanyushin B. F. // Molecular Biology. – 2005. – Т. 39. – P. 473-481.
16. Same modification, different location: The mythical role of N 6-adenine methylation in plant genomes / Jimйnez-Ramнrez I. A. [et al.] // Planta. – 2022. – Т. 256. – №. 1. – P. 9.
17. A methylation-directed, synthetic pap switch based on self-complementary regulatory DNA reconstituted in an all E. coli cell-free expression system / Worst E. G. [et al.] // ACS Synthetic Biology. – 2021. – Т. 10. – №. 10. – P. 2725-2739.
18. Inactivation of DNA adenine methyltransferase alters virulence factors in Actinobacillus actinomycetemcomitans / Wu H. [et al.] // Oral microbiology and immunology. – 2006. – Т. 21. – №. 4. – P. 238-244.
19. Vanyushin B. F. DNA methylation in higher plants: past, present and future / Vanyushin B. F., Ashapkin V. V. // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms. – 2011. – Т. 1809. – №. 8. – P. 360-368.

УДК 581.132.1:58.032:674.031.632.264

ОСОБЕННОСТИ НАКОПЛЕНИЯ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ В ЛИСТЬЯХ ВИДОВ РОДА *QUERCUS* L. НА ЮЖНОМ БЕРЕГУ КРЫМА

Палий И.Н., Палий А.Е.

ФГБУН «Никитский ботанический сад – Национальный научный центр»,
г. Ялта, Россия
E-mail: *runastep@yandex.ru*

Изучено изменение суммарного содержания хлорофиллов a и b в листьях *Quercus pubescens* Wild. и *Q. petraea* (Matt.) Liebl., произрастающих в естественных условиях Южного берега Крыма. Максимальное накопление фотосинтетических пигментов у *Q. pubescens* приходится на середину лета (июль), а у *Q. petraea* зависит от погодных условий конкретного вегетационного периода. Установлено, что в относительно теплый и влажный летний период 2022 г. содержание хлорофиллов в листьях растений *Q. pubescens*, и *Q. petraea*, произрастающих на высоте 350 м над уровнем моря изменялось более интенсивно, чем у растений в прибрежной полосе. Показано, что при наступлении засухи содержание фотосинтетических пигментов снижается.

ВВЕДЕНИЕ

В связи с ускорением глобального потепления и возрастанием антропогенной нагрузки на лесные массивы и рекреационные зоны, в наши дни проблеме устойчивости и адаптации растений к действию абиотических стрессоров уделяют особое внимание во всем мире. Климатические вариации изменяют сроки, степень тяжести стрессов и нарушений во многих экосистемах. Влияние засухи на состояние растений затрагивает все аспекты их жизнедеятельности и препятствует реализации потенциальной продуктивности. Актуальность этой проблемы в последние десятилетия значительно возросла в ряде южных регионов вследствие дефицита водных ресурсов и усиления процессов аридизации, вызывающих у растений температурный и водный стресс [1, 2]. На этом фоне отмечается ухудшение состояния природных и искусственных популяций видов *Quercus*, что создает ряд трудностей для лесоразведения и сохранения существующих насаждений [3, 4].

Известно, что фотосинтетические пигменты образуют комплексы с белками, встроенными в мембраны хлоропластов, а содержание хлорофиллов в тканях листа изменяется при действии различных факторов окружающей среды и может служить характеристикой адаптационного потенциала фотосинтетического аппарата растения [5]. Внешние условия более всего влияют на количественные характеристики пигментов, чем на их качественный состав. Ранее было показано, что содержание хлорофиллов в единице площади листа характеризует адаптацию растений к климатическим условиям района произрастания, а содержание и соотношение пигментов в единице массы листа – приспособление к меняющимся условиям конкретного вегетационного периода [6, 7].

Цель исследований заключалась в выявлении особенностей накопления хлорофиллов a и b в течение вегетации в листьях двух видов рода *Quercus* L., произрастающих в условиях Южного берега Крыма на разной высоте над уровнем моря.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являлись листья *Quercus pubescens* Wild., произрастающего в естественных условиях южного макросклона Главной гряды Крымских гор (окрестности пгт Никита, г. Ялта, Республика Крым) на высоте 40 м и 350 м над уровнем моря (над у. м.), а также *Q. petraea* (Matt.) Liebl. – на высоте 30 м и 350 м над у. м.

Для исследования динамики накопления хлорофиллов растительные образцы отбирали ежемесячно с мая по сентябрь в 2022-2024 гг. Содержание хлорофиллов a и b определяли на спектрофотометре Unico 2100 по методике В.Ф. Гавриленко с соавт. [8].

Показатели погодных условий за 2022-2024 гг. приведены по данным Агрометеостанции «Никитский сад». Эксперименты проводили в 3-кратной повторности. Для статистической обработки полученных данных использовали программное приложение MS Excel 2007. На рисунках представлены средние значения определений и их стандартные ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В течение вегетационных сезонов 2022-2024 гг. определено суммарное содержание хлорофиллов a и b в листьях *Quercus pubescens* и *Q. petraea*.

Теплый период 2022 г. характеризовался засушливой погодой с чередованием волн холода и тепла, отличался пониженным температурным режимом в мае, прохладной дождливой погодой в третьей декаде июня и теплой, продолжительной и засушливой осенью. Установлено, что в листьях *Q. pubescens* максимальное накопление хлорофиллов a и b происходило в середине лета (рис. 1). У растений, произрастающих на высоте 350 м над у. м. содержание фотосинтетических пигментов изменялось более выраженно. В листьях *Q. petraea* на высоте 30 м над у.м. максимальное содержание пигментов приходилось на начало вегетации и затем оно постепенно снижалось. У растений этого вида на высоте 350 м над у. м. накопление хлорофиллов было стабильно высоким (2,5-2,6 мг/г в пересчете на сухой вес) в летние месяцы (июль-август), а в мае и сентябре – существенно ниже летних значений (2,1 мг/г и 1,6 мг/г соответственно).

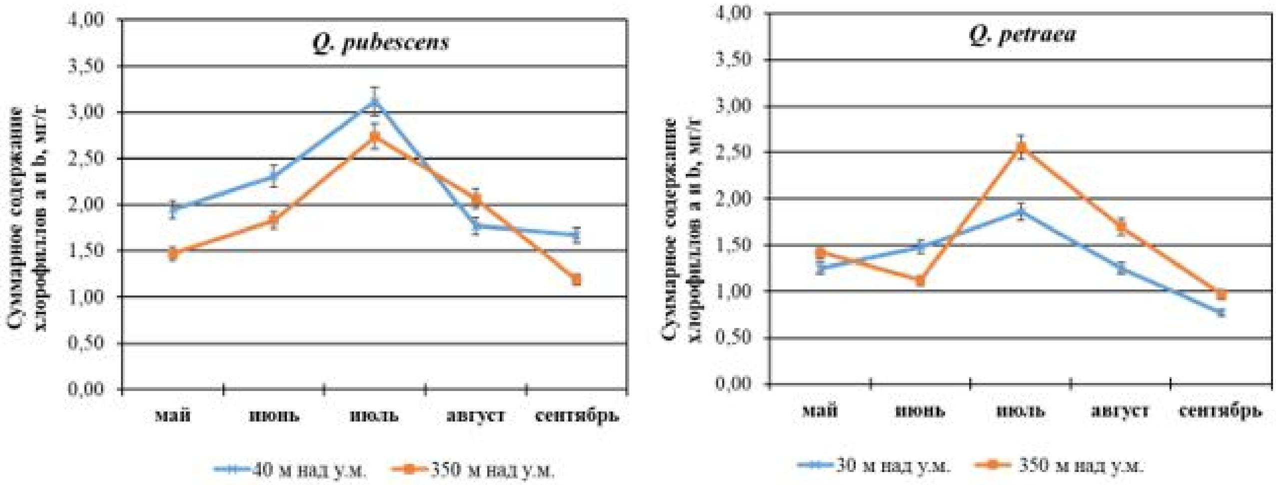


Рис. 1. Изменение содержания хлорофиллов a и b в листьях *Q. pubescens*, и *Q. petraea* в течение вегетационного сезона 2022 г.

Погодные условия в апреле-июне 2023 г. были дождливыми, умеренно-теплыми, что малохарактерно для этого времени года на ЮБК. Вторая половина летнего сезона, сопровождалась продолжительной экстремальной воздушно-почвенной засухой на фоне аномально высоких температур, длившейся до конца октября. Динамика накопления хлорофиллов a и b носила сходный характер для всех изученных образцов *Quercus* не зависимо от вида и высоты произрастания (рис. 2). Максимальные концентрации пигментов были выявлены в июле, затем при наступлении засухи они резко снижались и достигали минимума в сентябре. В теплый период 2023 г. листья *Q. pubescens* отличались более высоки содержанием хлорофиллов (1,19-3,12 мг/г в пересчете на сухой вес), чем *Q. petraea* (0,77-2,56 мг/г).

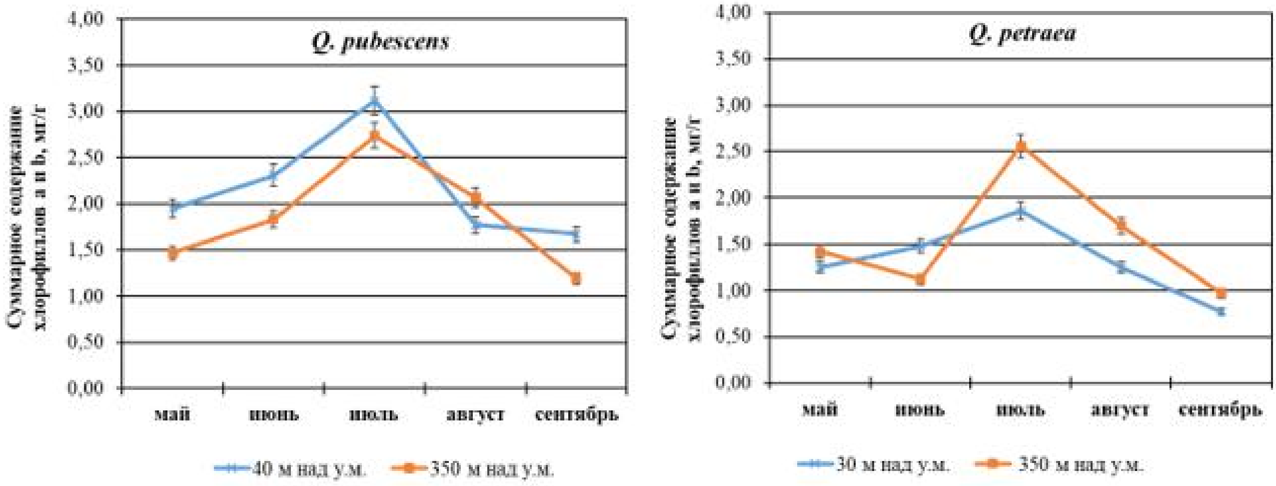


Рис. 2. Изменение содержания хлорофиллов a и b в листьях *Q. pubescens*, и *Q. petraea* в течение вегетационного сезона 2023 г.

Вегетационный период 2024 г. был рекордно теплым (средняя температура воздуха превысила климатическую норму на 2,7°С), он отличался засушливыми весенними месяцами (особенно аномально жарким апрелем), а также экстремально жарким июлем. В начале 2024 г. в листьях *Q. pubescens*, растущих на высоте 40 м над у. м. концентрации хлорофиллов a и b были на 30% выше, чем у растений, растущих на высоте 350 м (рис. 3).

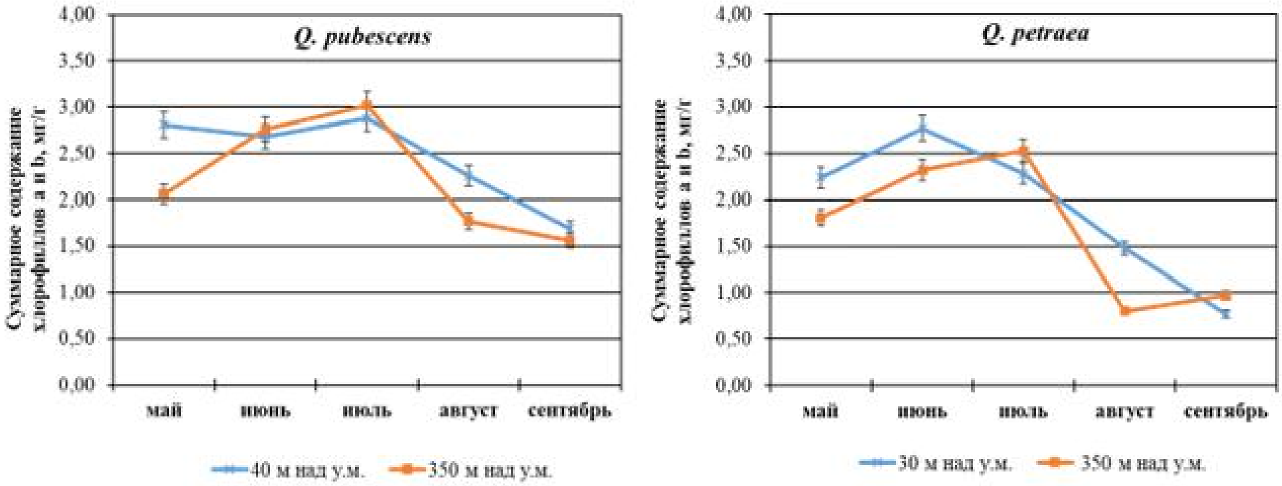


Рис. 3. Изменение содержания хлорофиллов a и b в листьях *Q. pubescens*, и *Q. petraea* в течение вегетационного сезона 2024 г.

В июне содержание пигментов становилось одинаковым и достигало максимальных значений в середине лета. У растений *Q. petraea* на высоте 30 м над у.м. максимальное содержание хлорофиллов выявлено в июне, а на высоте

350 м над у.м. – в июле. В целом, теплая погода начала вегетационного периода 2024 г. приводила к более раннему накоплению хлорофиллов в листьях дуба, а наступление засушливых условий (как и в 2023г.) – к резкому снижению содержания фотосинтетических пигментов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сопоставление данных 2022-2024 гг. о содержании хлорофиллов a и b в листьях *Quercus pubescens* и *Q. petraea* позволяет сделать вывод о том, что накопление фотосинтетических пигментов у данных видов зависит от погодных условий вегетационного периода и высоты произрастания растений. Установлено, что наиболее высокий уровень фотосинтетических пигментов у *Q. pubescens* всегда приходится на середину лета (июль), а для *Q. petraea* максимумы более характерны для первой половины вегетационного периода (май-июль). В теплый и влажный вегетационный сезон 2022 г. содержание хлорофиллов в листьях растений *Q. pubescens* и *Q. petraea*, произрастающих на высоте 350 м над уровнем моря изменялось более интенсивно, чем у растений в прибрежной полосе. Воздействие атмосферной засухи и высоких температур воздуха приводило к значительному снижению суммарного содержания хлорофиллов a и b листьях *Quercus pubescens* и *Q. petraea*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Доклад о климатических рисках на территории Российской Федерации / [ред. В. М. Катцов]. – Спб.: Росгидромет, 2017. – 106 с.
2. Школьник И. М. Федеральные округа России: изменения климата и экономика / И. М Школьник, Е. М. Акентьева, М. В. Клюева, В. В. Стадник, Е. И. Хлебникова, Д. В Фасолько., Е. Н. Разова, Ю. Л. Рудакова, В. Н. Павлова // Труды Главной геофизической обсерватории им. А.И. Воейкова. – 2022. – № 604. – С. 55–201.
3. Cuza P., Dascaliuc Al., Aproximaюia sistemicг on utilizarea raюionalг a speciilor єi genotipurilor de stejar la omprdurirea єi gospodrrirea durabilг a prdurilor din Republica Moldova, // Mediul Ambiant. – 2015. - No. 3 (81).- P. 7–15.
4. Михеева М.А., Федорова А.И. Влияние высоких температур на устойчивость древесных растении в городской среде // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: География. Геоэкология. – 2011. - № 2. – С. 166–175.
5. Esteban R, Barrutia O, Artetxe U, Fernбndez-Marнn B, Hernбndez A, Garcнa-Plazaola JI. Internal and external factors affecting photosynthetic pigment composition

in plants: a meta-analytical approach // New Phytol. – 2015. – V. 206(1). – P. 268-280.
6. Иванов Л.А., Ронжина Д.А., Юдина П.К., Золотарева Н.В., Калашникова И. В., Иванова Л.А. Сезонная динамика содержания хлорофиллов и каротиноидов в листьях степных и лесных растений на уровне вида и сообщества // Физиология растений – 2020. – № 67. – С. 278-288.
7. Garcia-Plazaola J., Becerril J.M. Seasonal changes in photosynthetic pigments and antioxidants in beech (Fagus sylvatica) in a Mediterranean climate: implications for tree decline diagnosis // Aust. J. Plant Physiol. – 2001. – V. 28. – P. 225.
8. Гавриленко В.Ф., Ладыгина М.Е., Хандобина Л.М. Большой практикум по физиологии растений. Фотосинтез. Дыхание. Учебное пособие. – М., «Высш. школа», 1975. – 392 с.

УДК 636.2.084.412

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЗАЩИЩЕННЫХ БЕЛКОВЫХ ДОБАВОК В КОРМЛЕНИИ КОРОВ

Перова Н.А., Калаев В.Н.

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Воронеж

В данной работе проведен анализ существующих исследований использования защищенных белковых добавок на основе подсолнечного и соевого сырья в кормлении сельскохозяйственных животных. В результате было подтверждено, что использование защищенных белков из подсолнечника и сои в кормлении высокопродуктивных коров способствует улучшению молочной продуктивности и усвояемости питательных веществ. Полученные нами данные согласуются с результатами научных исследований других авторов и подчеркивают важность выбора источников белка с учетом физиологических особенностей животных и стадии лактации.

Современное животноводство предъявляет повышенные требования к рациону кормления высокопродуктивных коров [1]. Одним из значимых направлений исследований является применение защищенных белков, которые позволяют улучшить усвоение питательных веществ и повысить продуктивность животных. Однако в настоящее время существует множество различных видов защищенных белковых добавок, отличающихся по составу, способу защиты и биологической эффективности. Возникает необходимость в систематическом анализе их влияния на продуктивность животных и выявлении наиболее эффективных решений для кормления.

Целью данной статьи является обзор существующих исследований по использованию защищенных белковых добавок на основе подсолнечного и соевого сырья, анализ их влияния на продуктивность высокопродуктивных коров и оценка эффективности их применения.

Сравнение эффективности защищенных белков из соевого и подсолнечного сырья в кормлении высокопродуктивных коров показывает различия в их воздействии на продуктивность и экономическую целесообразность их применения:

1) Соевый шрот. Благодаря высокому содержанию лизина и метионина, защищенный соевый шрот обеспечивает прирост молочной продуктивности на 1-3 кг в день у коров с удоем более 30 литров. Например, исследование Smith et al. (2015) [2] показало, что добавление термически обработанного соевого шрота (доля белка, нерасщепляемого в рубце, – 65%) в рацион увеличило содержание белка в молоке с 3,2% до 3,5%. Однако стоимость сои выше, что может ограничивать ее использование в некоторых хозяйствах.

2) Подсолнечный шрот. Защищенный подсолнечный шрот дает прирост удоя на 0,5-2 кг в день, что немного ниже, чем у сои, но экономическая выгода от его использования очевидна в регионах, где подсолнечник является основной культурой. Например, при использовании инкапсулированного подсолнечного шрота (доля белка, нерасщепляемого в рубце, – 60%) наблюдалось улучшение роста молодняка на 10-15% по сравнению с контрольной группой (Johnson, 2018) [3]. Низкое содержание лизина компенсируется добавлением синтетических аминокислот, если это необходимо.

Использование защищенных белков в рационе высокопродуктивных коров преследует несколько ключевых целей, которые можно разделить на два основных направления: улучшение физиологических показателей животных и повышение экономической эффективности производства молока.

1. Улучшение физиологических показателей животных.

Защищенные белки оказывают значительное влияние на обмен веществ, перевариваемость кормов, иммунитет, показатели воспроизводства и продуктивность животных.

- Обмен веществ и перевариваемость питательных веществ корма.

Защищенные белки эффективно усваиваются в тонком кишечнике, минуя рубец, где происходит значительная потеря питательных веществ. Это позволяет животным получать больше необходимых аминокислот, что улучшает обмен веществ. Помимо этого, защищенный белок способен влиять на микробиоту рубца. Снижение количества белка, доступного для микробов, способствует улучшению ферментации и переваривания клетчатки. Это помогает поддерживать оптимальный баланс микробных популяций в рубце, что в свою очередь улучшает пищеварение и усвоение других питательных веществ [4].

В исследовании «Влияние новых рецептов комбикормов на продуктивность скота», Кадырова Ч.Т., Конурбаева А. изучали влияние экструдирования кукурузы и ячменя с добавлением соевого шрота в рацион коров. Полученные результаты показали, что такая обработка улучшает питательность и переваримость корма, что положительно сказывается на молочной продуктивности животных [4].

В исследовании, проведенном в ООО “Суворово” (Краснодарский край), изучалось влияние кормовой добавки “Белкофф” на продуктивность молочных коров. При включении кормовой добавки “Белкофф” в рацион коров с продуктивностью около 5000 кг молока в год и дозировке 1 кг на голову в сутки наблюдалось увеличение суточного удоя молока на 15-18%, рост содержания молочного белка на 12%, снижение расхода кормов на 20%. Эти результаты подтверждают эффективность использования защищенных белков для повышения продуктивности и улучшения обмена веществ у молочных коров [5].

- Иммунитет и показатели воспроизводства.

Защищенные белки предотвращают дефицит аминокислот, который может спровоцировать метаболические нарушения, такие как кетоз или ацидоз. Стабильное снабжение питательными веществами поддерживает нормальный обмен веществ и уменьшает физиологический стресс, что особенно актуально для коров с высокой молочной продуктивностью. Это снижает восприимчивость коров к инфекционным заболеваниям и улучшает их общее состояние здоровья, что важно для длительного поддержания продуктивности. Достаточное поступление аминокислот также поддерживает гормональный баланс и репродуктивное здоровье коров. Это выражается в повышении оплодотворяемости и сокращении интервала между отелами, что позволяет сохранять стабильную продуктивность стада и снижать потери, связанные с задержками в воспроизводстве [6].

В исследовании Кузнецова С. отмечается, что внедрение в корма защищенных белков в долевом соотношении 35–38% от всей белковой массы существенно повышает содержание белка в молоке коров, положительно сказывается на их здоровье и продуктивности [7].

- Продуктивность.

За счет более полного усвоения аминокислот из защищенных белков коровы получают дополнительные строительные материалы для производства молока.

Испытания в хозяйстве «Дружба» показали, что включение защищенного белка в рацион повышает продуктивность коров на 18%, а содержание белка в молоке – на 12%. Исследования на фермах «Красного Востока-Агро» в Татарстане показали рост удоя на корову 4 кг/сут [6].

Таким образом, перечисленные выше исследования подтверждают, что использование защищенных белковых добавок в рационе высокопродуктивных коров приводит к ряду биологических эффектов, которые положительно сказываются на их здоровье и продуктивности. Эти эффекты связаны с улучшенным усвоением аминокислот и более эффективным использованием белка в организме животных, что особенно важно в условиях интенсивной лактации.

2. Повышение экономической эффективности производства молока.

Защищенные белки оказывают влияние на качество продукции, оптимизацию кормления и снижение затрат, а также способствуют экологической устойчивости.

- Качество молока.

Защищенные белки не только увеличивают количество молока, но и улучшают его качественный состав. Улучшенное обеспечение животных аминокислотами способствует синтезу белков и молочного жира. Добавление защищенного соевого шрота может повысить содержание белка в молоке с 3,2% до 3,5%, что улучшает его технологические свойства и рыночную стоимость.

Например, было показано, что применение защищенного белка из различного сырья в кормлении коров приводит к повышению содержания белка в молоке: при использовании защищенного соевого шрота — на 0,2-0,3%, а при использовании подсолнечного шрота — на 0,1-0,2%. Такой прирост улучшает питательную ценность молока и его пригодность для переработки [8].

В исследовании, проведенном Ноттингемским университетом, 44 высокопродуктивных коровы голштино-фризской породы получали рационы с различными источниками белка: соевый шрот с дозировкой 2,5 кг на голову в день и добавку NovaPro (смесь защищенных белков) с дозировкой 3,0 кг на голову в день. Результаты показали, что кормление NovaPro способствовало увеличению суточного надоя молока на 1,7 кг на корову, повышению содержания жира и белка в молоке, увеличению потребления сухого вещества на 1,2 кг в день. Кроме того, использование NovaPro способствовало снижению уровня мочевины в молоке, что положительно сказывается на его качестве [9].

- Оптимизация кормления, снижение затрат и соответствие экологической устойчивости.

Традиционные белки, расщепляясь в рубце, теряют часть азота в виде аммиака, который выводится через мочу, снижая эффективность корма и увеличивая экологическую нагрузку. Защищенные белки минимизируют эти потери, поскольку они усваиваются в тонком кишечнике. Это снижает выбросы азота в окружающую среду и делает кормление более экономичным и экологически безопасным [10].

За счет высокой усвояемости защищенных белков снижается потребность в традиционных добавках, которые теряются в рубце. Это позволяет уменьшить затраты на кормление. Например, использование защищенного белка Полиамин способствует повышению молочной продуктивности коров и сокращению затрат на концентрированные корма [11].

Использование защищенных белков снижает выбросы азота в окружающую среду, поскольку минимизирует потери белка в рубце и их превращение в аммиак. Это делает молочное производство более экологически устойчивым и помогает соответствовать современным стандартам устойчивого развития.

В исследовании, проведенном компанией Kemin, было установлено, что включение в рацион жвачных животных защищенных аминокислот, таких как метионин и лизин, приводит к снижению выбросов азота (N) и оксида азота (N, O) в атмосферу. Это достигается за счет повышения эффективности использования кормов и снижения их избыточного потребления. Кроме того, оптимизация кормления позволяет снизить углеродный след производства молока и мяса, что делает отрасль более экологически устойчивой [12].

Внедрение защищенных белков в рацион высокопродуктивных коров способствует не только улучшению физиологических показателей животных, но и позволяет повысить экономическую эффективность производства молока за счет улучшения качества продукции, оптимизации кормления, снижения затрат на кормление и соответствие экологической устойчивости.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что защищенные белковые добавки на основе соевого и подсолнечного шрота эффективно повышают продуктивность высокопродуктивных коров. Защищенные белки обеспечивают доставку аминокислот в тонкий кишечник, предотвращая его распад в рубце, что увеличивает содержание белка в молоке. Прирост удоя составляет 1-3 кг/день для соевого шрота и 0,5-2 кг/день для подсолнечного. Соевый шрот превосходит подсолнечный по биодоступности аминокислот, тогда как подсолнечный шрот выгоден экономически. Методы защиты повышают долю белка, не расщепляемого в рубце, до 50-80%, улучшая усвояемость. Например, Кадырова и Конурбаева (2020) [4] подтвердили рост продуктивности при экструзии.

Защищенные белки из сои и подсолнечника повышают удой и качество молока, улучшают здоровье коров и снижают затраты на кормление. Соевый шрот эффективен для высокой продуктивности, подсолнечный — для экономии, что делает их применение перспективным в животноводстве.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волгин, В. И., Романенко, Л. В., Прохоренко, П. Н., Федорова, З. Л., Корочкина, Е. А. Полноценное кормление молочного скота – основа реализации генетического потенциала продуктивности. – Москва: АгроНаука, 2021. – 256 с.
2. Smith, J. Brown, R., & Miller, T. Effects of heat-treated soybean meal on milk protein content in high-producing dairy cows / J. Smith, R. Brown, T. Miller // Journal of Dairy Science. – 2015. – Vol. 98. – P. 1234–1240.
3. Johnson, K. Impact of encapsulated sunflower meal on growth performance of dairy calves // Animal Feed Science and Technology. 2018. Vol. 245. P. 56–63.
4. Жаркынай И.К., Кадырова Ч.Т., Конурбаева А., Айтбекова Ж., Деркенбаев С.М. Влияние новых рецептов комбикормов на продуктивность скота // Биологические науки. — 2020. — С. 45–52.
5. Белкофф. «Применение защищенного соевого белка в рационах высокопродуктивных коров» // Белкофф. URL: https://belkoff.biz/page_20.php (дата обращения: 04.04.2025).
6. Агроинвестор. «Коров кормят «защищенным белком» // Агроинвестор. 2009. URL: https://www.agroinvestor.ru/technologies/article/10974-korov-kormyat-zashchishchennym-belkom/ (дата обращения: 04.04.2025).
7. Кузнецов, С. Г. «Содержание белка в молоке коров: от чего зависит и как повысить этот показатель» // Витасоль. 2019. URL: https://vitasol.ru/notes/belok-v-moloke-korov (дата обращения: 04.04.2025).

8. Satter, L. D. Protected Proteins and Amino Acids in Dairy Cattle Nutrition / L. D. Satter, A. J. Roffler // Journal of Dairy Science. — 1986. — Vol. 69, No. 10. — P. 2734–2744.
9. Агровестник «Меньше соевого шрота в рационе коров» // Agrovesti.net. 2019. URL: https://agrovesti.net/lib/tech/feeding-tech/menshe-soevogo-shrota-v-ratsione-korov.html (дата обращения: 04.04.2025).
10.тSantos, J. E. P. Nutritional Strategies to Improve Nitrogen Efficiency and Milk Production in Dairy Cows / J. E. P. Santos, J. T. Huber // Veterinary Clinics: Food Animal Practice. — 2005. — Vol. 21, No. 2. — P. 347–368.
11. КАМП Казань. «Защищенный белок Полиамин» [б. д.] // КАМП Казань. URL: https://kampkazan.ru/catalog/kormlenie/zashhishhennyj-belok/poliamin/ (дата обращения: 04.04.2025).
12. Kemin. «Экологические и экономические результаты включения в рацион аминокислот» // Kemin. 16.07.2021. URL: https://info.kemin.com/ru/ruminants/blog/sustainable-economic-implications-amino-acids (дата обращения: 04.04.2025).

УДК: 577.218

РАЗРАБОТКА СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ АНАЛИЗА ЭКСПРЕССИИ ГЕНА НАДФ-ЗАВИСИМОЙ ГЛИОКСИЛАТРЕДУКТАЗЫ ИЗ ЛИСТЬЕВ КУКУРУЗЫ *ZEA MAYS* L.

Плотникова Е.В., Анохина Г.Б., Кравцова А.Е., Епринцев А.Т.

Воронежский государственный университет, Воронеж

E-mail: *kate_plotnikova36@mail.ru*

НАДФ-зависимая глиоксилатредуктаза играет важную роль в метаболизме растительной клетки, затрагивая процессы детоксикации, редокс-регуляции и фотодыхания. Её функционирование обеспечивает не только выживание растения в неблагоприятных условиях, но и влияет на урожайность. Статья содержит результаты подбора специфических праймеров к нуклеотидной последовательности гена *GLYR2* и условий их оптимальной амплификации для дальнейшего анализа экспрессии.

ВВЕДЕНИЕ

Растения обладают сложной системой метаболических путей, обеспечивающих их рост, развитие и адаптацию к окружающей среде. Особое место в этих процессах занимают ферменты, катализирующие ключевые биохимические реакции. Одним из таких ферментов, играющих важную роль в метаболизме растений, является НАДФ-зависимая глиоксилатредуктаза (КФ 1.1.1.79) [1]. Глиоксилатредуктаза in vivo катализирует реакцию превращения токсичного для растительной клетки глиоксилата до гликолята посредством НАДФ-зависимой реакции [2]. Эта реакция имеет несколько ключевых последствий. Во-первых, она предотвращает накопление глиоксилата — высокореактивного соединения, способного образовывать токсичные продукты при взаимодействии с аминокислотами или другими метаболитами [3]. Во-вторых, процесс сопровождается окислением НАДФН, что способствует регуляции редокс-баланса в клетке [4]. Это особенно важно в условиях высоких световых нагрузок, когда в хлоропластах генерируется избыток НАДФН, и его утилизация помогает избежать окислительного стресса. Известно, что при воздействии стрессоров активность глиоксилатредуктазы возрастает, что позволяет рассматривать данный фермент в качестве маркера возникновения окислительного стресса в клетке [5].

Актуальность исследования НАДФ-зависимой глиокосилатредуктазы обусловлена ее потенциальным участием в адаптации растений к абиотическим стрессам. Известно, что стрессовые условия, такие как засоление и гипоксия, оказывают существенное влияние на метаболизм растений, в том числе на метаболизм глиоксилата. В этих условиях изменения активности гена *GLYR2* могут играть важную роль в поддержании метаболического гомеостаза и обеспечении выживания растений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Поиск аннотированной нуклеотидной последовательности гена, кодирующего НАДФ-зависимую глиоксилатредуктазу, осуществлялся при помощи международной базы данных GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/).

Для разработки праймеров был использован ресурс Primer-BLAST, доступный на веб-сайте Национального центра биотехнологической информации (NCBI) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/).

Проверка полученных олигонуклеотидов на предмет образования сшивок и димеров, а также оценка их термодинамической стабильности проводилась с использованием программных средств Multiple Primer Analyzer.

В качестве объекта исследования были использованы листья 10-дневных проростков кукурузы *Zea mays* L. сорта воронежская 76. Растения выращивались гидропонным методом в климатической камере «LabTech» (Южная Корея) с соблюдением параметров: 10-часовой световой день, интенсивность освещения 25 Вт/м^2 и постоянная температура +25^{o}С.

Выделение суммарной клеточной РНК из образцов растительной ткани проводилось с использованием коммерческого набора R-Plants (Biolabmix, Россия) в соответствии с протоколом, предложенным производителем.

Оценку выделенной тотальной РНК осуществляли методом электрофореза в 1% агарозном геле. Для визуализации нуклеиновых кислот в гель добавляли бромид этидия (Sigma Aldrich, США) в концентрации 0,5 мкг/мл. Продукты полимеразной цепной реакции разделяли электрофорезом в 2% агарозном геле [6].

Синтез комплементарной ДНК на основе выделенной тотальной РНК проводили методом обратной транскрипции с использованием коммерческого набора MMLV-RT Kit (Евроген, Россия). В качестве праймеров для синтеза первой цепи кДНК на РНК-матрице применяли Random(dN)10 (Евроген, Россия).

Проведение полимеразной цепной реакции осуществляли в ампилифакторе MiniAmp (Thermo Scientific, США) с использованием коммерческих наборов ScreenMix (Евроген, Россия). Продукты полимеразной цепной реакции (ПЦР) разделяли электрофорезом в 2% агарозном геле.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе исследования нуклеотидных последовательностей в геноме кукурузы был обнаружен ген, кодирующий НАДФ-зависимую глиоксилатредуктазу (*GLYR2,* LOC100280775), расположенный на 8 хромосоме.

В результате были подобраны специфические праймеры на основе гена *GLYR2* для проведения полимеразной цепной реакции (табл. 1)

Таблица 1.

Специфические праймеры к гену *GLYR2*, кодирующего НАДФ-зависимую глиоксилатредуктащу кукурузы

Ген	Праймер	Последовательность	Размер продукта
GLYR2	Прямой	GCATTGCTGTCAGTAGTGGT	242
	Обратный	GAGTTCTGGATCAAAAGGTCGG	

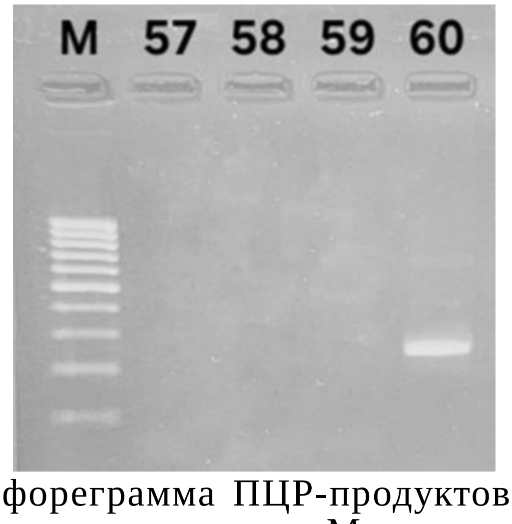


Рис. 1. Электрофореграмма ПЦР-продуктов гена *GLYR2* НАДФ-зависимой глиоксилатредуктазы кукурузы. М – маркер, 57-60 – температуры отжига.

Для подтверждения специфичности подобранных праймеров и оптимизации температуры отжига проводили амплификацию полученных олигонуклеотидов с кДНК в качестве матрицы. Анализ результатов, представленных на рисунке 1, показал, что образование специфического продукта амплификации наблюдалось при температуре отжига 60єС. Единственная полоса, визуализированная на электрофореграмме, подтверждает специфичное взаимодействие праймеров с кДНК-мишенью. Полученный ПЦР-продукт для гена *GLYR2* имел размер примерно 250 пар оснований, что согласуется с теоретическими расчетами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования были успешно разработаны специфические праймеры для гена НАДФ-зависимой глиоксилатредуктазы (*GLYR2*). Специфичность праймеров подтверждена методом полимеразной цепной реакции с последующей визуализацией продуктов в агарозном геле, что продемонстрировало образование единственного продукта амплификации с размером около 250 пар оснований, соответствующим теоретически рассчитанному размеру. Таким образом, разработанные праймеры обеспечивают эффективную амплификацию гена *GLYR2* в листьях кукурузы и могут быть использованы для дальнейшего изучения его экспрессии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Allan W. L., Clark S. M., Hoover G. J., Shelp B. J. Role of plant glyoxylate reductases during stress: a hypothesis //Biochemical Journal. – 2009. – Т. 423. – №. 1. – С. 15-22.
2. Allan W. L., Breitkreuz K. E., Waller J. C., Simpson J. P., Hoover G. J. Detoxification of succinate semialdehyde in Arabidopsis glyoxylate reductase and NAD kinase mutants subjected to submergence stress //Botany. – 2012. – Т. 90. – №. 1. – С. 51-61.
3. Yu L., Jiang J., Zhang C., Jiang L., Ye N., Lu Y. Glyoxylate rather than ascorbate is an efficient precursor for oxalate biosynthesis in rice //Journal of Experimental Botany. – 2010. – Т. 61. – №. 6. – С. 1625-1634.
4. Geigenberger P., Fernie A. R. Metabolic control of redox and redox control of metabolism in plants //Antioxidants & redox signaling. – 2014. – Т. 21. – №. 9. – С. 1389-1421.
5. Allan W. L., Simpson J. P., Clark S. M., Shelp B. J. г-Hydroxybutyrate accumulation in Arabidopsis and tobacco plants is a general response to abiotic stress: putative regulation by redox balance and glyoxylate reductase isoforms //Journal of Experimental Botany. – 2008. – Т. 59. – №. 9. – С. 2555-2564.
6. Епринцев А. Т. Идентификация и исследование экспрессии генов / А. Т. Епринцев, В. Н. Попов, Д. Н. Федорин. - Воронеж: Изд-во Воронеж. ун-та, 2008. – 63 с.

УДК 636.2.084.412

ВЛИЯНИЕ ЗАЩИЩЕННЫХ БЕЛКОВЫХ ДОБАВОК НА ПЕРЕВАРИМОСТЬ ПИТАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ КОРМОВ РАЦИОНА ВЫСОКОПРОДУКТИВНЫХ КОРОВ

Перова Н.А., Калаев В.Н.

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Воронеж

В целях изучения влияния защищённых от распада в рубце белковых добавок в рационе высокопродуктивных коров на переваримость питательных веществ рационов в условиях хозяйства был проведен опыт на группах голштинских коров. Показано, что применение защищенных белковых добавок повышает переваримость сырого протеина на 2,7%, а также способствует лучшему усвоению сухого и органического веществ кормов.

ВВЕДЕНИЕ

Наряду с такими показателями эффективности молочного животноводства как молочная продуктивность, качество молока, репродуктивные показатели, экономическая эффективность и статус здоровья животных, на сегодняшний день является актуальным показатель эффективности использования кормов. С помощью оптимизации кормления можно достигнуть повышения продуктивности животных, улучшения качества молока и снижения экономических затрат [1].

На сегодняшний день существует большое множество различных кормовых добавок, улучшающих конверсию корма, повышающих энергетическую обеспеченность рационов, восполняющих дефицит питательных веществ в кормах животных. Одним из привлекающих к себе внимание являются защищенные белковые добавки, направленные на повышение усвояемости аминокислот рациона, что особенно важно для высокопродуктивных коров, нуждающихся в большом количестве питательных веществ в период наивысшей молочной продуктивности [2, 3].

В период от отела до пика лактации у высокопродуктивных коров потребление корма отстает от потребностей, что приводит к мобилизации белков и жиров тела для производства молока. В первые 2-4 месяца лактации нормой считается потеря до 8-10% массы, но при дефиците питательных веществ потери могут достигать 10-30% жира и 10-25% белка [4, 5].

Для оптимального кормления важно учитывать уровень сырого протеина и его расщепление в преджелудках, а также качество белков. Несоблюдение баланса может привести к перерасходу кормов, нарушению обмена веществ и снижению продуктивности [6, 7].

Цель исследования. Оценить, как добавление защищенных белковых компонентов из сои и подсолнечника в рацион коров влияет на усвоение питательных веществ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Был проведен научно-хозяйственный эксперимент, в рамках которого были исследованы коровы голштинской породы. Для исследования были сформированы две подопытных группы. Все группы животных питались одинаковым рационом. В рацион коров из второй опытной группы добавлялись защищённые белковые добавки: экструдированный подсолнечный и соевый шрот.

Для изучения влияния защищенных растительных белковых добавок на переваримость питательных веществ кормов рациона коровами были проведены физиологические исследования с использованием метода инертных индикаторов. Сравнение средних значений изучаемых признаков осуществляли с использованием t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Было установлено улучшение показателей переваримости питательных веществ у животных опытной группы:

- эффективность усвоения сырого протеина возросла на 2,7%;
- улучшение усвоения сухого вещества на 1,4% и органического вещества на 1,2%;
- положительная динамика в процессах переваривания других важных компонентов на уровне тенденции: жиров на 0,85%, клетчатки на 0,75%, БЭВ на 0,95%.

Таким образом, проведенные исследования демонстрируют положительную динамику в процессах переваривания основных питательных веществ у животных опытных групп по сравнению с контрольной.

ВЫВОДЫ

Проведенный научно-хозяйственный опыт показал, что скармливание высокопродуктивным коровам защищенных белковых добавок позволяет улучшить переваримость сырого протеина и остальных питательных веществ кормов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Полноценное кормление молочного скота – основа реализации генетического потенциала продуктивности / В. И. Волгин, Л. В. Романенко, П. Н. Прохоренко, З. Л. Федорова, Е. А. Корочкина. – М.: РАН, 2018. – 260 с.
2. Лопатко, А.М. Будь здорова, кормилица-корова: Науч.-практ. пособие / А.М. Лопатко, А.М. Субботин, И.В. Сучкова [и др.]. – Орел, 2017. – 413 с.
3. Chojnacka, K. Innovative high digestibility protein feed materials reducing environmental impact through improved nitrogen-use efficiency in sustainable agriculture / K. Chojnacka, K. Mikula, G. Izydorczyk [et al.] // Journal of Environmental Management. – 2021. – Vol. 291. – Iss. 2. – Article number: 112693.
4. Хазиахметов, Ф.С. Особенности кормления высокопродуктивных коров / Ф.С. Хазиахметов // Рациональное кормление животных. - СПб. - М.- Краснодар: Лань. - 2011. - С.191-206.
5. Григорьев, Н. Современные требования к энергетической и протеиновой питательности кормов и рационов для высокопродуктивных коров / Н. Григорьев // Кормление сельскохозяйственных животных и кормопроизводство. - 2007. - №11. - С. 22-31
6. Харитонов, Е. Л. Физиология и биохимия питания молочного скота/ Е. Л. Харитонов. - Боровск: из-во «Оптима пресс». - 2011. - 372 с.
7. Рядчиков В.Г. Основы питания и кормления сельскохозяйственных животных: учебно-практическое пособие / В.Г. Рядчиков – Краснодар: КубГАУ. - 2012. – 328 с.

УДК 636.2.084.412

ВЛИЯНИЕ ЗАЩИЩЕННЫХ БЕЛКОВЫХ ДОБАВОК НА ВОСПРОИЗВОДИТЕЛЬНУЮ ФУНКЦИЮ КОРОВ

Перова Н.А., Калаев В.Н.

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Воронеж

В целях изучения влияния защищённых от распада в рубце белковых добавок в рационе высокопродуктивных коров на воспроизводительную функцию животных в условиях хозяйства был проведен опыт на группах голштинских коров. Скармливание коровам опытной группы защищенных белковых добавок привело к улучшению их воспроизводительных функций. Это проявилось в снижении индекса осеменения на 0,2%, что свидетельствует о повышении эффективности оплодотворения. Также сократился сервис-период на 19 дней, что указывает на более быстрое восстановление репродуктивной функции коров после отела.

ВВЕДЕНИЕ

У высокопродуктивных коров в первую треть лактации в силу повышенной потребности в энергии, но недостаточного потребления энергии с пищей и дефицита незаменимых аминокислот развивается отрицательный энергетический баланс, который приводит к снижению репродуктивных качеств скота, а именно: снижение синтеза половых гормонов (прогестерона, эстрогена), нарушение овуляторного цикла, увеличение сервис-периода, росту эмбриональной смертности [1].

Защищённые белки и аминокислоты, которые не распадаются в рубце, обеспечивают прямое поступление нутриентов в тонкий кишечник, минимизируют метаболический стресс, улучшают функции печени, повышают антиоксидантный статус, что нормализует гормональный фон и улучшает репродуктивные показатели животных [2, 3].

Цель исследования состояла в анализе воздействия белковых добавок, созданных из разных растительных материалов, на репродуктивную способность коров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Был проведен научно-хозяйственный эксперимент, в рамках которого были исследованы коровы голштинской породы. Для исследования были сформированы две подопытных группы. Все группы животных питались одинаковым рационом. В рацион коров из второй опытной группы добавлялись защищённые белковые добавки: экструдированный подсолнечный и соевый шрот.

Изучение воздействия защищенных белковых добавок на воспроизводительную функцию коров проводилось по оценке следующих характеристик воспроизводства стада: оплодотворяемость, индекс осеменения, длительность сервис-периода.

В ходе эксперимента также оценивалась упитанность животных по 5-бальной шкале [4; 5]: от 1 – очень низкая до 5 – чрезвычайно высокая.

Сравнение средних значений изучаемых признаков осуществляли с использованием t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ данных, отражающих воспроизводительные способности коров в экспериментальных группах, выявил, что показатели у животных опытных групп оказались выше: сервис-период в опытных группах в среднем был короче на 19 дней по сравнению с контрольной группой.

Кроме того, отмечено увеличение оплодотворяемости коров из опытной группы на 10% по сравнению с контролем, а также снижение числа осеменений, необходимых на одно результативное оплодотворение, на 0,2%.

Оценка упитанности животных показала, что животные группы, в рацион которых входил защищенный белок, обладали более высокой упитанностью (на 0,25 балла по сравнению с контролем).

ВЫВОДЫ

Проведенный научно-хозяйственный опыт показал, что скармливание высокопродуктивным коровам защищенных белковых добавок позволяет улучшить воспроизводительные функции высокопродуктивных коров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ветеринария и жизнь. Как кормление влияет на воспроизводство коров URL: https://vetandlife.ru/livestock/kak-kormlenie-vliyaet-na-vosproizvodstvo-korov/ (дата обращения 10.05.2025)

2. Rodec. Overcoming Negative Energy Balance in Dairy Cows. URL: https://rodec.in/blog/overcoming-negative-energy-balance-in-dairy-cows (дата обращения 10.05.2025)

3. Лопатко, А.М. Будь здорова, кормилица-корова: Науч.-практ. пособие / А.М. Лопатко, А.М. Субботин, И.В. Сучкова [и др.]. – Орел, 2017. – 413 с.

4. Сивкин, Н.В. Методика оценки упитанности молочно-мясных коров / Н.В. Сивкин, А.Н. Лавелин, Н.И. Стрекозов и др. // ВИЖ. – Дубровицы. – 2006. – С. 1-16.

5. Bewley, J.M. An Interdisciplinary Review of Body Condition Scoring for Dairy Cattle / J.M. Bewley, M.M. Schutz // The Professional Animal Scientist. – 2008. – 24:50.

УДК 631.81

АНТИОКСИДАНТНАЯ СИСТЕМА КАК ПОКАЗАТЕЛЬ ОЦЕНКИ ПРОЦЕССОВ АДАПТАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Полехина Н.Н., Юшкова Е.И.

«Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева», г. Орел
E-mail:*elen_yushkova@mail.ru*

В статье приведены результаты исследования повышения антиоксидантной ферментативной системы растений петрушки огородной (Petroselinum crispum), путем применения некорневых обработок проростков экспериментальной вытяжкой антиоксидантов плодов боярышника, в концентрациях 0,001 и 0,01%. Выявлена положительная динамика антиоксидантов боярышника на активность СОД, пероксидазы и каталазы проростков петрушки огородной и увеличение морфологических показателей лекарственного растения.

ВВЕДЕНИЕ

Ростостимулирующим и развивающим действием для растений могут быть вещества, имеющие негормональную природу (витамины, производные мочевины, некоторые фенолы) и ферментативные системы адаптации. По исследованиям Павловской Н.Е., Горьковой И.В., Гнеушевой И.А. и др. система антиоксидантных ферментов может служить диагностическим признаком содержания биологически активных веществ, оказывающих стимулирующее и иммуномодулирующее действие на живой организм [1, 2].

Для растительной клетки характерно принимать химические стимулы и менять направление и скорость биохимических реакций как ответ на прямое стимулирование метаболизма. Молекулу с сигнальной функцией называют первичным мессенджером. Биостимуляторы могут повышать уровень некоторых фитогормонов и белков, могут вызывать изменения во многих жизненно важных и структурных процессах, тем самым повышая урожайность и качество урожая лекарственных растений. К группе таких химических соединений можно отнести разные группы флавоноидов, в ответ на действие которых происходит повышение активности ферментов антиоксидантной защиты клетки (супероксиддисмутазы (СОД), каталазы и пероксидазы).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В данной работе исследовалось действие антиоксидантов, выделенных из плодов боярышника на ферментативную систему адаптации (СОД, пероксидаза и каталаза) петрушки огородной (Petroselinum crispum). Известно, что петрушка огородная являются фармакопейным растением и широко применяются в фитотерапии и комплексной терапии ряда заболеваний. Изучено изменение показателей ферментов антиоксидантной системы петрушки огородной и изменение содержания собственных биологически активных соединений фенольной природы при влиянии антиоксидантов плодов боярышника в концентрации 0,01 и 0,001 %. Методики определения активности СОД, пероксидазы и каталазы представлены в ранее опубликованных работах [3, 4].

Эксперимент проводился в закрытых лабораторных условиях с трехкратной повторностью. Обработка семян проводилась с момента прорастания растения подекадно путем опрыскивания. Контроль опрыскивали дистиллированной водой. Одновременно производились замеры морфологических показателей растений. Итоговые замеры морфологических показателей были проведены после 4-х кратной обработки растений.

Антиоксиданты боярышника исследовались в ранее проведенных испытаниях, основанных на качественном и количественном изучении биофлавоноидов и полифенольных соединений боярышника [5, 6].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 1 показана динамика активности антиоксидантной ферментативной системы петрушки огородной (*Petroselinum crispum*).

Контрольные проростки (без обработки) имеют низкую активность фермента (1-3 день) 209,15 усл. ед/г сырой массы. К восьмому дню прорастания показатели активности СОД достигают для концентрации 0,001% - 244,28 усл. ед/г сырой массы, а для концентрации 0,01% - 274,23 усл. ед/г сырой массы.

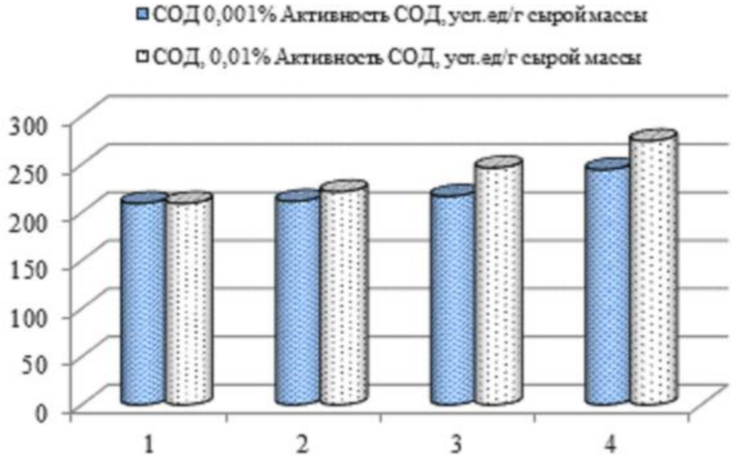


Рис. 1. Динамика супероксиддисмутазы (СОД) петрушки огородной (*Petroselinum crispum*), усл. ед/г сырой массы.

На рисунке 2 показана динамика активности пероксидазы антиоксидантной ферментативной системы петрушки огородной (*Petroselinum crispum*), где отражена зависимость последующих процессов повышения пероксидации в результате повышения СОД. Активация пероксидазы к восьмому дню прорастания достигает при концентрации антиоксидантов боярышника 0,001% - 17,28 и 0,01% -19,25 мкмоль/г сырой массы.

Рис. 2. Динамика пероксидазы петрушки огородной (Petroselinum crispum), мкмоль/г сырой массы.

В клетке при участи пероксидазы регулируются процессы созревания и построения тканей, а также синтез лигнина, входящего в состав клеточной стенки растения. Высокая активность пероксидазы дает возможность предположить, что так развивается устойчивость растений петрушки огородной к АФК в процессе онтогенеза [7, 8, 9].

На рисунке 3 показана динамика активности каталазы антиоксидантной ферментативной системы петрушки огородной (*Petroselinum crispum*).

Каталаза катализирует реакции защиты растения от действия пероксида водорода и таким образом уменьшает совместно с пероксидазой процессы избыточного действия свободных радикалов.

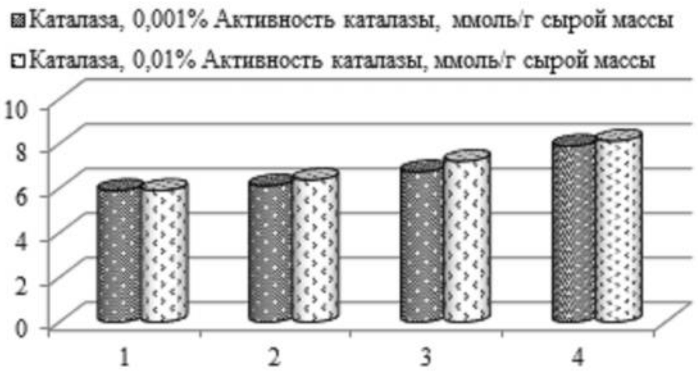


Рис. 3. Динамика каталазы петрушки огородной (*Petroselinum crispum*), ммоль/г сырой массы.

В первые сутки удельная активность каталазы петрушки огородной практически равна контролю, что вероятно связано со стабильностью под воздействием ростовых факторов на ранней стадии проращивания. На восьмые сутки удельная активность каталазы повышается до 7,89 ммоль/г сырой массы при 0,001% концентрации и до 8,12 ммоль/г сырой массы при 0,001% концентрации. Этот факт, по-видимому, свидетельствовал о повышении адаптивного потенциала в данных условиях действия антиоксидантов боярышника [10].

Таким образом, под влиянием антиоксидантов боярышника лекарственные растения активизируют свою защитную реакцию, повышая уровень практически всех её компонентов [11, 12]. В первую очередь повышается активность СОД, связанная с необходимостью накопления повышенного количества супероксид-анионов, что не только стимулирует рост клетки путем растяжения, но и запускает, как субстрат, активность пероксидазы и каталазы, синтезирующих пероксид водорода, более гидрофобное и менее реакционноспособное соединение.

В результате исследований выявлено положительное действие на морфофункциональные показатели проростков петрушки огородной.

Полученные результаты согласуются с литературными данными [13, 14, 15]. Антиоксиданты боярышника повышают энергию прорастания семян. Энергия прорастания семян петрушки выше контроля в 2,0-2,31 раза (рис.4).

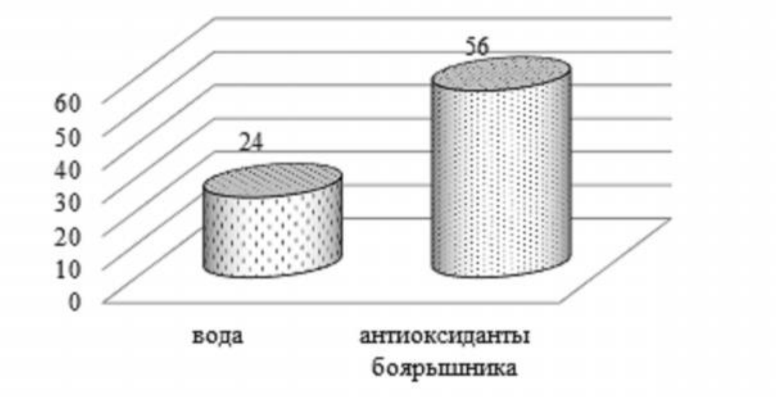
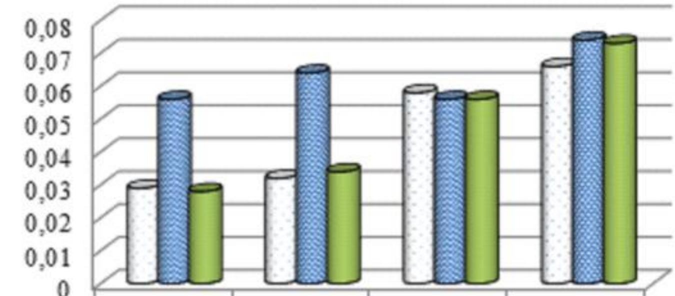


Рис. 4. Определение энергии прорастания, %.

При сравнительном анализе влияния антиоксидантов на весовые показатели проростков петрушки по сравнению с контролем отмечен к 4-ой декаде опыта рост массы проростков в пределах от 0,066 до 0,074 г (рис.5).



	1	2	3	4
Ряд1	0,029	0,032	0,058	0,066
Ряд2	0,056	0,064	0,056	0,074
Ряд3	0,028	0,034	0,056	0,073

Рис. 5. Динамика m проростка петрушки ЛР, г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, антиоксидантные соединения боярышника: флавоноиды, антоцианы, дубильные вещества, каротиноиды, тритерпеновые сапонины и др. оказали положительное влияние на антиоксидантную систему петрушки огородной (*Petroselinum crispum*), повышая уровень практически всех её компонентов, что позволяет прогнозировать более высокий выход лекарственной продукции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Павловская Н.Е., Бородин Д.Б. Влияние биологически активных веществ на антиоксидантную систему гороха // Защита и карантин растений, 2009. №8. С. 42-43.

2. Павловская Н.Е, Гнеушева И.А, Солохина И.Ю., Яковлева И.В. Испытание экстрактов биофлавоноидов из соломы гречихи на горохе // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов. Воронеж, ВГУ, 2010. Выпуск 12. С. 150-155.

3. ЮшковаЕ.И. Биологическая активность гуминового комплекса различного происхождения и его влияние на рост и развитие растений : 03.01.05 : диссертация ... доктора биологических наук. Воронеж, 2010. 318 с.

4. Полехина Н.Н. Динамика накопления флавоноидов в онтогенезе районированных в Орловской области сортах гречихи посевной (Fagopyrum esculentum M.) : 03.01.05: автореферат дис. ... кандидата биологических наук. Воронеж, 2013. 24 с.

5. Полехина Н.Н., Юшкова Е.И. Сравнительное исследование антиоксидантной активности некоторых видов боярышников Орловской области в разных препаративных формах // Сборник статей международной научно-практической конференции «Трансляционная медицина» (15-17 декабря 2017 г.) / Под ред. О.В. Пилипенко, И.А. Снимщиковой, Е.Н. Пузанковой, А.Л. Альянова, А.В. Дунаева. Орел: ФГБОУ ВО «ОГУ имени И.С. Тургенева», 2017. С.633-637.

6. Юшкова Е.И., Ярован Н.И., Полехина Н.Н. Зависимость антиоксидантной активности плодов боярышника обыкновенного (Crataegus rhipidofilla) от сроков хранения // Тенденции развития науки и образования, 2017. № 28-2. С. 41-43.

7. Образование активных форм кислорода и пероксидазы в каллусах у различных генотипов картофеля / М.Р. Садриддинов, М.Х. Шукурова, М.М. Шарипова [и др.] // Доклады Национальной академии наук Таджикистана, 2024. Т. 67, № 5-6. С. 308-313.

8. Чемаркин Д.А., Забродина З.А. Влияние антропогенных факторов на активность пероксидазы в листьях Populus pyramidalis // Экология: синтез естественно-научного, технического и гуманитарного знания: материалы III Всероссийского научно-практического форума и I Школы интерэкоправа, Саратов, 10–13 октября 2012 года. – Саратов: Евразийский научно-исследовательский институт проблем права, 2012. С. 156-158.

9. Кононенко В.А., Иваченко Л.Е. Активность и множественные формы пероксидазы в семенах сои // Проблемы экологии Верхнего Приамурья: Сборник научных трудов / под общ. ред. профессора Л. Г. Колесниковой. Благовещенск: Благовещенский государственный педагогический университет, 2009. Т.11. С. 56-61.

10. Брюхина С.А., Меделяева А.Ю., Трунов Ю.В. Активность каталазы и содержание хлорофилла в листьях у сортов земляники садовой // Наука и Образование, 2023. Т. 6. № 3.

11. Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / Е.Б. Меньщикова [и др.]. – М.: «Слово», 2006. С. 556.

12. Содержание малонового диальдегида и активность супероксиддисмутазы у хлопчатника при стрессе / Н. Х. Норкулов, З. Х. Норкулова, Б. А. Солиева [и др.] // Доклады Академии наук Республики Таджикистан, 2019. Т. 62. № 3-4. С. 242-246.

13. Фомина Л.В., Олейникова Е.Н. Эффективность применения природных биостимуляторов при формировании хозяйственно-ценных признаков зеленого // Вестник КрасГАУ, 2017. № 12. С. 34-43.

14. Белопухов С.Л., Сафонов А.Ф., Дмитревская И.И. Влияние биостимуляторов на морфологические показатели и урожайность льна-долгунца // Достижения науки и техники АПК, 2010. №3. С. 25-27.

15. Ламмас М.Е., Шитикова А.В. Влияние биостимуляторов роста на энергию прорастания, всхожесть и интенсивность прорастания семян ярового ячменя
// Плодородие. 2021. № 5(122). С. 61-64.

РАЗРАБОТКА ПРАЙМЕРОВ К ГЕНАМ CBL3, CBL7, CBL9, CBL10 ДЛЯ ВИДА *POPULUS NIGRA* L.

Ржевский С.Г.

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

E-mail: *slavaosin@yandex.ru*

В данной работе представлен результат подбора видоспецифичных праймеров к генам семейства кальциневрин-подобного белка (CBL) для тополя черного, с использованием программного обеспечения “Primer-Blast”. Гены CBL кодируют белки, являющиеся регуляторами реакций на стресс, их активность направлена на модификацию плазматической мембраны. Разработанные праймеры могут быть использованы для оценки экспрессии генов CBL в контексте изучения реакции на стрессовые воздействия: засоление, промораживание и засуху.

ВВЕДЕНИЕ

Тополь является одним из быстрорастущих видов, широко распространенных в России и за рубежом, его представители востребованы в различных отраслях промышленности, используются в защитных, озеленительных и рекреационных целях [1].

Различные виды и сорта тополя в разной мере адаптированы к жестким климатическим условиям. Немалый интерес представляет изучение реакции представителей данного рода на стрессовое воздействие. Одним из подходов для решения этой задачи является оценка экспрессии ключевых метаболических генов при моделировании стресса на посадочном материале: промораживании, обезвоживании, засолении почвы.

Сотрудниками ВНИИЛГИбиотех была выполнена серия работ, посвященная оценке влияния стрессовых факторов на экспрессию метаболических генов тополя, в том числе — относящихся к семейству кальциневрин-подобного белка (CBL).

Кальций-зависимый механизм является важным звеном в регуляции ионного гомеостаза растений [2]. Ион Ca^{2+} служит для передачи сигналов «критического состояния» во внутриклеточных процессах. Высокое содержание соли, холод, недостаточное питание и присутствие фитогормонов вовлекают его в качестве сигнального промежуточного звена. Подобные сигналы обнаруживаются и передаются чувствительными молекулами, в частности — кальций-связывающими белками. Семейство CBL содержит несколько белков, активность которых направлена на модификацию плазматической мембраны.

Исследования мутантов по CBL и CIPKs (CBL-взаимодействующим протеинкиназам) показали, что эти белки являются важными регуляторами реакций на стресс. Комплексы CBL/CIPKs воздействуют на нижестоящие мишени, такие как ионные каналы и транспортеры, обеспечивая выживание растений в неблагоприятных условиях [3].

В результате работ, проведенных сотрудниками ВНИИЛГИбиотех были получены данные о реакции экспрессии CBL1 и CBL2 для различных видов и сортов тополя под воздействием засухи и засоления.

Установлено, что праймеры генов, подобранные к виду тополь волосистоплодный (*P. trichocarpa* Torr. et Gray), успешно дают амплификацию с другими видами и гибридами тополя, принадлежащими к той же секции, в частности с тополем китайским (*P. simonii* Carr), тополем Максимовича (*P. maximowiczii* Henry) и позволяют определять их уровень экспрессии.

Различные генотипы тополя по-разному реагируют на солевой стресс. В частности, у тополя китайского и Максимовича экспрессия данных генов несколько повышалась, у тополя волосистоплодного обнаруженная разница оказалась незначительной.

Однако в случае других гибридов, произведенных от тополя белого и черного, с используемыми праймерами наблюдалось образование неспецифичных продуктов, данный результат был отбракован [4].

В другом исследовании проводилась оценка изменения экспрессии генов CBL1, CBL2, CBL5, CBL9 для клонов, представляющих гибриды тополя белого, подвергнутых солевому стрессу в культуре *in vitro*. Результат показал разные паттерны реакции на стресс у различных генотипов (так, наиболее выраженное снижение экспрессии всех генов наблюдалось для гибрида тополя белого и осины (*P. alba* L. Я *P. tremula* L.) [5].

Практика показывает, что для оценки экспрессии генов семейства CBL необходима разработка специфичных праймеров к отдельным видам тополя. В данном исследовании поставлена задача определения структурных различий генов CBL3, CBL7, CBL9 у разных видов тополя и подбора праймеров к ним для вида тополь черный (*P. nigra* L.).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Последовательности ДНК генов были взяты из базы данных Национального центра биотехнологической информации (National Center for Biotechnology Information — NCBI) [6]. Праймеры разрабатывались при помощи программного обеспечения Primer-Blast [7]. Проверка специфичности полученных праймеров и оценка структурных различий генов видов тополя выполнялась с использованием программного модуля “BLAST” на сайте NCBI, генетическое выравнивание сиквенсов осуществлялось в режиме “highly similar sequences” [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты оценки структурных различий генов семейства CBL различных видов тополя показали существенное сходство между видами *P. nigra, P. trichocarpa, P. alba, P. euphratica* Oliv. и родственных им представителей рода ива (*Salix* sp.). Однако в структуре генов имелись частные различия, которые могут сказываться на отжиге праймеров при переносе их с одного вида на другой (рис. 1). Попытка разработки праймеров, обладающей широкой специфичностью внутри рода *Populus* оказалась безуспешной, что еще раз подчеркивает необходимость создания специфичных праймеров для каждого вида.

Следует отметить, что оценка эволюционных расстояний, проведенная по рассматриваемым генам, показала наибольшее сходство генов тополя черного с тополем волосистоплодным.

Подобранные праймеры представлены в таблице 1. Среди полученных последовательностей были отобраны максимально удовлетворяющие следующим требованиям: отсутствие повторяющихся элементов и палиндромов, оптимальная длина в диапазоне 16–25 нуклеотидов, стремящееся к равному соотношение количества AT и GC; низкое значение самокоплиментарности полученных праймеров [9].

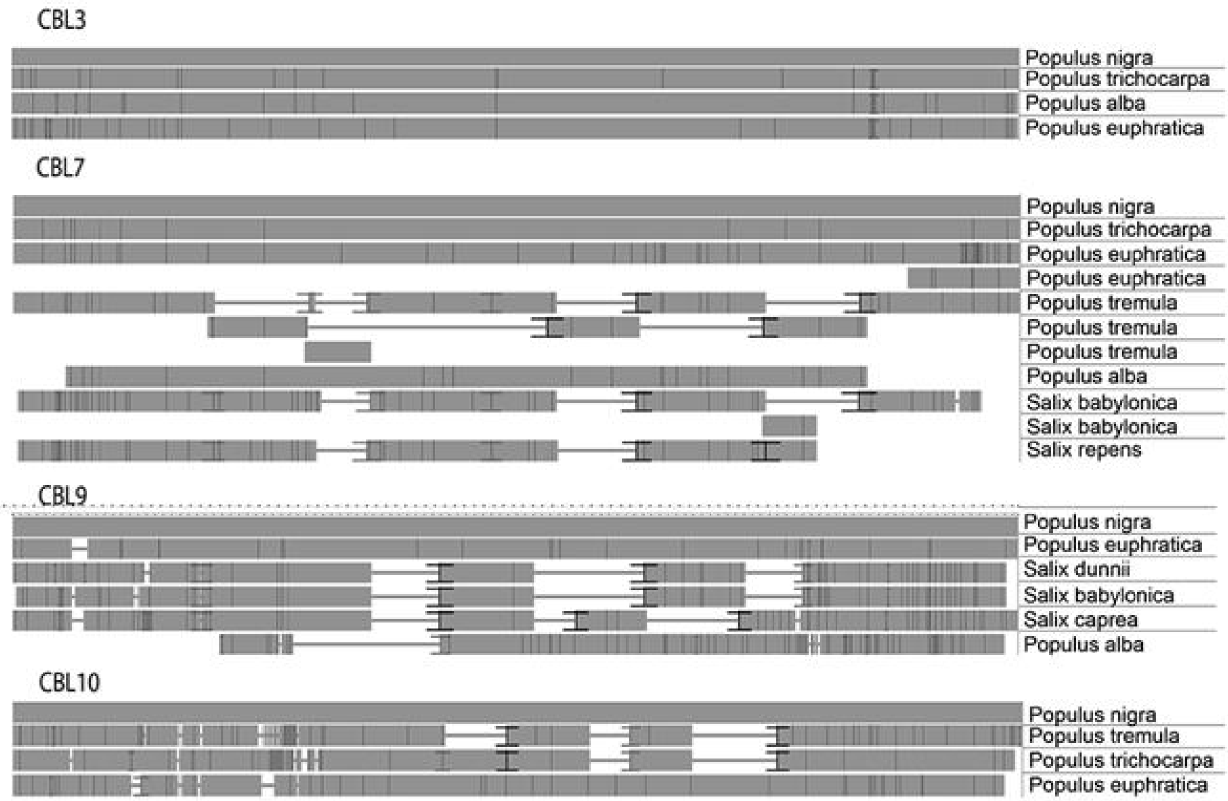


Рис. 1. Визуализация результатов генетического выравнивания сиквенсов генов белков семейства CBL у представителей родов *Populus* и *Salix* (вертикальными чертами отмечены несоответствия структуры).

Таблица 1.

Характеристики разработанных праймеров (F/R — прямой/обратный, Tm – температура плавления праймеров, °C; GC % – содержание GC-оснований, %)

Праймер	Последовательность (5'->3')	Длинна продукта	Tm	GC%	Самокомплиментарность	Самокомплиментарность 3'
CBL3						
F	GCGTCGCAATTGTACACAACC	21	60.98	52.38	6.00	2.00
R	GCTTCTGCTAGCCAATCCCA	20	60.11	55.00	6.00	0.00
CBL7						
F	AAGCCTGCTGCTGTATTGGT	20	59.96	50.00	4.00	0.00
R	CGCGTTCGATGAAACCTGTC	20	59.9	55.00	4.00	2.00
CBL9						
F	TAGTAGCCGTCCGATTACGGT	21	60.48	52.38	4.00	3.00
R	GTTTGTGAGGCAAGGGCAAC	20	60.25	55.00	3.00	0.00
CBL10						
F	AGAATTTGCCCGAGCACTCA	20	59.96	50.00	6.00	2.00
R	ACATCTGCCGGACTTCTTCC	20	59.75	55.00	4.00	1.00

ВЫВОДЫ

Проведенное исследование показало структурные различия между генами CBL3, CBL7, CBL9, CBL10 различных видов тополя, которое может затруднять использование праймеров, разработанных для одного вида, на другом. Для тополя черного подобраны специфические праймеры к рассматриваемым генам. Их использование позволит оценивать экспрессию генов семейства CBL, являющуюся маркером реакции растительного организма на абиотическое стрессовое воздействие.

В статье использованы данные, полученные в ходе работ по выполнению государственного задания по теме НИР “Сортоизучение и сортоиспытание новых гибридов и генотипов быстрорастущих древесных растений” в 2020 г.

ИСПОЛЬЗОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Царев А.П. Многообразие использования древесины тополей // Известия высших учебных заведений. Лесной журнал. – 2018. – № 5 (365). – С. 48–64.
2. Tang R.J., Yang Y., Yang L., Liu H., Wang C.T., Yu M.M., Gao X.S., Zhang H.X. Poplar calcineurin B like proteins PtCBL10A and PtCBL10B regulate shoot salt tolerance through interaction with PtSOS2 in the vacuolar membrane // Plant, cell & environment. – 2014. – Vol. 37. – No. 3. – P. 573–588.
3. Batistiи O., Kudla J. Plant calcineurin B-like proteins and their interacting protein kinases // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research. – 2009. – Vol. 1793. – No. 6. – P. 985–992.
4. Ржевский С.Г., Гродецкая Т.А., Царев В.А., Федулова Т.П. Изменение экспрессии CBL-генов у генотипов тополя различных морфолого-систематических групп в условиях абиотического стресса // Труды Санкт-Петербургского научно-исследовательского института лесного хозяйства. – 2020. – №. 4. – С. 4–13.
5. Аминева Е.Ю., Кондратьева А.М., Ржевский С.Г. Изучение экспрессии генов тополя, ассоциированных с устойчивостью к солевому стрессу // Труды Санкт-Петербургского научно-исследовательского института лесного хозяйства, 2024. – № 3. – С. 15–23.
6. “The National Center for Biotechnology Information”; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ (available: 03/25/2025).
7. “Primer-Blast”; URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi (available: 01/25/2025).
8. “BLAST”; URL: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi (available: 01/25/2025).
9. Козырева А.А., Злотина А.М., Головкин А.С., Калинина О.В., Костарева А.А. Конструирование праймеров для ПЦР в программе Primer-BLAST // Трансляционная медицина. – 2021. – №8 (3). – С. 37–52.

УДК 577.15

РАЗРАБОТКА ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ К ГЕНУ ПИРУВАТКАРБОКСИЛАЗЫ КРЫС (*RATTUS NORVEGICUS* L.)

Самойлова Д.В., Дедов Я.И., Селиванова Н.В., Епринцев А.Т.

Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

E-mail: *bc366@bio.vsu.ru*

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) представляет собой мощный и универсальный метод молекулярной биологии, широко применяемый в медицинской диагностике, криминалистике и биотехнологических исследованиях. Эффективность ПЦР напрямую зависит от качества исходной ДНК, условий проведения реакции и, что особенно важно, от разработки специфических праймеров. Для успешной амплификации критически важно, чтобы праймеры обладали высокой специфичностью и не образовывали нежелательных комплексов с другими участками ДНК. Это позволяет избежать кросс-реакций и повысить точность анализа. В работе затронуты принципы подбора праймеров, используя современные специализированные программные инструменты. Нами был проведен подбор праймеров для гена пируваткарбоксилазы — фермента, катализирующего необратимую реакцию образования оксалоацетата из пирувата. С использованием программного обеспечения были определены температуры плавления, что позволило установить оптимальные условия отжига. Эти параметры обеспечивают максимальную эффективность амплификации и минимизируют риск возникновения неспецифических продуктов реакции.

ВВЕДЕНИЕ

Пируваткарбоксилаза (ПК; КФ 6.4.1.1) — это митохондриальный биотин-содержащий фермент, который катализирует АТФ-зависимое карбоксилирование пирувата в оксалоацетат (ОА), служащий для пополнения цикла трикарбоновых кислот (ЦТК). Данный энзим участвует в процессах глюконеогенеза в печени, биосинтеза жирных кислот в адипоцитах и секреции инсулина в клетках поджелудочной железы, обеспечивая метаболическую гибкость и адаптацию организма к изменяющимся условиям окружающей среды [3].

По своей структуре ПК — это тетрамерный белок, который широко распространён как среди эукариот, так и среди прокариот. Активность данного фермента регулируется аллостерически, что позволяет тонко настраивать метаболические пути. Ацетил-КоА и аспартат являются ключевыми аллостерическими эффекторами ПК. Активация пируваткарбоксилазы ацетил-КоА приводит к увеличению образования оксалоацетата. Этот метаболит играет важную роль в цикле трикарбоновых кислот, обеспечивая его непрерывность и эффективное функционирование. Таким образом, при наличии ацетил-КоА поддерживается оптимальный поток ОА в ЦТК, что способствует поддержанию энергетического баланса и метаболической стабильности организма [3].

Фермент кодируется одним геном *Pc*, который расположен на хромосоме 1q43 (Gene ID: 25104) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/25104).

В связи с этим цель нашего исследования заключалась в разработке пары праймеров для гена пируваткарбоксилазы крыс *Rattus norvegicus* L., а также определении температуры отжига и размеров ампликона.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения исследования нуклеотидная последовательность гена ПК крыс (*Rattus norvegicus* L.) *Pc* была взята из международной базы данных GenBank Национального Центра Биотехнологической Информации США (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/).

Выявление гомологии генов и сравнительный анализ их состава проводили с помощью программы BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/). Разработка и подбор праймеров осуществлялись с помощью программы Primer-BLAST.

Полученные праймеры подвергались проверке на специфичность с использованием программы BLAST-online [1,2], а также отсутствие шпилек и димеров и их термодинамической стабильности проверяемого с помощью программного пакета FastPCR, и программы TermoFisher.

Суммарную клеточную РНК выделяли с помощью метода фенол-хлороформной экстракции с использованием в качестве осадителя LiCl [4]. Для визуализации и анализа качества выделенной РНК применяли электрофорез в 1%-ном агарозном геле (масса/объём). Окрашивание геля осуществляли 0,1% спиртовым раствором бромистого этидия. Обратную транскрипцию мРНК проводили с использованием фермента M-MuLV обратной транскриптазы и праймерами олиго(dT) (“СибЭнзим”, Россия) для синтеза первой цепи кДНК согласно инструкции производителя. Полимеразную цепную реакцию с генспецифичными праймерами проводили с помощью набора реактивов AmpliSence (“Хеликон”, Россия) на приборе LightCycler 96 (“Roche”, Швейцария)

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате в качестве праймеров к гену Pc были подобраны следующие нуклеотидные последовательности (табл. 1).

Таблица 1.

Последовательность праймеров к гену *Pc* пируваткарбоксилазы

Ген	Праймер	Нуклеотидная последовательность	Температура плавления, ^{0}C	Размер продукта, п.н.
Pc	Прямой	5’-ttccctgtcagtggaggc-3’	57.6	264
	Обратный	5’-ggatggcaatctcacctctg-3’	59.6	

Температура отжига праймеров подбиралась при помощи проведения полимеразной цепной реакции с использованием комплементарной ДНК, полученной в ходе обратной транскрипции и составила 59^{0}C (рис. 1).

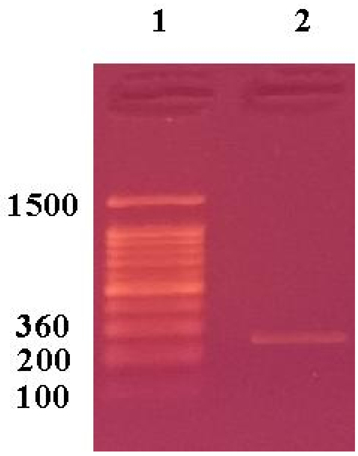


Рис. 1. Электрофорез в агарозном геле ДНК-маркера (1) и полученного ампликона с использованием подобранных праймеров к гену *Pc* при температуре отжига праймеров 59^{0}C.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, подобраные специфические праймеры к гену *Pc*, кодирующего митохондриальную пируваткарбоксилазу в геноме крыс могут быть использованы для дальнейшего анализа скорости транскрипции данного гена у крыс в различных условиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Alvarez-Fernandez R. Explanatory chapter: PCR primer design // Methods Enzymol. - 2013. - V.529. - P. 1-21.
2. Noguera D.R. Mathematical tools to optimize the design of oligonucleotide probes and primers / Noguera D.R., [et al.] // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2014. - V. 98. - № 23. - P.9595- 9608.
3. Wallace J. Distribution and biological functions of pyruvate carboxylase in nature. In: Keech D, Wallace J, editors. Pyruvate Carboxylase. // Boca Raton: CRC Press. - 1985. - P. 5–64.
4. Епринцев А.Т., Федорин Д.Н. Идентификация и исследование экспрессии генов, Издательство Воронеж. ун-та, Воронеж. – 2008. - 62 с.

ИЗОФЕРМЕНТНЫЙ СОСТАВ ГАМК-ТРАНСАМИНАЗЫ В ЛИСТЬЯХ КУКУРУЗЫ (*ZEA MAYS* L.)

Самокиш Э.Р., Шахов З.Н., Анохина Г.Б., Епринцев А.Т.

Воронежский государственный университет, Воронеж
E-mal: *bc366@bio.vsu.ru*

Статья содержит данные анализа изоферментного состава ГАМК-трансаминазы в листьях кукурузы. Методом нативного электрофореза белков в ПААГ показано, что в листьях кукурузы обнаруживаются две формы фермента, обладающего ГАМК-трансаминазной активностью: ГАМК-Т, использующая в качестве акцептора аминогрупп 2-оксоглутарат и ГАМК-Т, использующая пируват в качестве акцептора аминогруппы.

ВВЕДЕНИЕ

Ферменты — это биокатализаторы, которые играют ключевую роль в клетках живых организмов. Растения являются недорогими производственными платформами для фармацевтических препаратов [1]. ГАМК-трансаминаза (ГАМК-Т; КФ 2.6.1.19) — является важным компонентом пути ГАМК-шунт, обеспечивающего катаболизм γ-аминомасляной кислоты (ГАМК) в сукцинат через последовательные реакции трансаминирования и окисления [2]. ГАМК-Т катализирует реакцию передачи аминогруппы с ГАМК на α-кетоглутарат или пируват с образованием сукцинилового полуальдегида и глутамата или аланина. Это приобретает особую значимость при воздействии стрессовых факторов, поскольку в таких условиях наблюдается повышение концентрации ГАМК в растительных тканях. Фермент локализован преимущественно в митохондриях [3]. Изучение особенностей функционирования ГАМК-трансаминазы позволит расширить понимание процессов регуляции метаболизма ГАМК в том числе и в процессе адаптации к стрессовым факторам, что особенно актуально для сельскохозяйственных культур, таких как кукуруза (*Zea mays* L.) [4].

Известно, что ГАМК-Т в качестве акцептора аминогруппы может использовать как 2-оксоглутарат, так и пируват. Активность ГАМК-Т в растениях отличается от активности большинства других организмов. ГАМК-Т у млекопитающих, дрожжей и *Escherichia coli* использует исключительно 2-

оксоглутарат, тогда как в растениях проявляются как пируват-зависимые, так и 2-оксоглутарат-зависимые формы фермента. Таким образом, в растительной клетке возможно присутствие двух типов фермента (как по отдельности, так и одновременно): пируватзависимой ГАМК-трансаминазы (ГАМК-ТП) и 2-оксоглутаратзависимой ГАМК-трансаминазы (ГАМК-ТО).

Хотя между двумя типами ферментов, как правило, наблюдается сильное сходство, в томатах был идентифицирован только ГАМК-ТП, также как и у растений *A. thaliana*. У табака обнаруживается оба типа ГАМК-трансаминаз. Однако, интересно отметить, что 2-оксоглутарат-зависимая ГАМК-Т очень нестабильна при очистке. В то время как пируват-зависимая форма ГАМК-трансаминазы была очищена до гомогенности, что позволило частично секвенировать аминокислотную последовательность и идентифицировать кДНК *Arabidopsis* (*AtGABA-T*). Рекомбинантная экспрессия кДНК в *E. coli* подтвердила, что она кодирует пируват-зависимую ГАМК-Т, которая не проявляет заметной 2-оксоглутарат-зависимой активности. Предполагается, что *AtGABA-T*, как и фермент млекопитающих, содержит N-концевой сигнал, направляющий его в митохондриальный матрикс [6]. Несмотря на достаточно большой объем данных, посвященный катаболизму ГАМК, до сих пор остается до конца не определенной роль 2-оксоглутаратзависимой и пируват-зависимой ГАМК-трансаминаз в метаболизме растительных клеток. В связи с этим целью данной работы являлось изучение изоферментного состава ГАМК-трансаминазы в листьях кукурузы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования использовали листья 12-дневных проростков кукурузы (*Zea mays* L.) сорта «Воронежская 76», выращенные гидропонным методом с интенсивностью света 25 Дж/м^2·с при температуре 20°С и 10-часовом световом дне.

Нативный электрофорез белков в ПААГ

Изоферментный состав ГАМК-трансаминазы в листьях кукурузы определяли путём проведения нативного электрофореза в ПААГ по методу Дэвиса при 2–4°С[5]..

Растительный материал гомогенизировали на холоде в фарфоровой ступке в 50 мМ фосфатном буфере (рН 8.0) с добавлением 0.1 мкМ пиридоксаль5-фосфата и 0.05% Тритон X-100 в соотношении 1:10. Гомогенат центрифугировали при 1000g в течении 5 минут при 4°С. Отбирали надосадочную жидкость и использовали для проведения нативного электрофореза в ПААГ. Разделение изоферментов ГАМК-Т проводили в двуфазном полиакриламидном геле с концентрацией 4% и 7%. Гели готовили по методу Маурера. Электрофоретическое разделение проводилось при 4°С[5]. Контроль за движением проб осуществляли путём добавления 0,1% раствора бром-фенолового синего.

Специфическое проявление ГАМК-Т

Для специфического проявления исследуемого энзима использовалась среда следующего состава:

1. Для проявления ГАМК-ТО:

0,1 M Tris-HCL буфер (pH 8,0), 50 мМ ГАМК, 5 мМ 2-оксоглутарат натрия, 10 мМ азид натрия, 1,8 мМ нитросиний тетразолий, 7 мМ NAD^+, 1 мМ ФМС, 20 мМ малонат натрия.

2. Для проявления ГАМК-ТП:

0,1 M Tris-HCL буфер (pH 8,0), 50 мМ ГАМК, 5 мМ пируват натрия, 10 мМ азид натрия, 1,8 мМ нитросиний тетразолий, 7 мМ NAD^+, 1 мМ ФМС, 20 мМ малонат натрия.

Принцип метода основан на появлении окрашенного в синий цвет соединения – формазана, который является продуктом восстановления НСТ.

Анализ электрофореграмм и расчет значений электрофоретической подвижности осуществлялся с помощью программы GelAnalyzer 19.1.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведение нативного электрофореза белков в полиакриламидном геле позволило исследовать изоферментный состав ГАМК-трансаминазы в листьях кукурузы. Выявлено, что в листьях кукурузы обнаруживаются обе формы ГАМК-Т. На электрофореграмме (рис. 1) обнаруживались две белковые полосы (Р1 и Р2), обладающие разной электрофоретической подвижностью (*Rf*). В среде проявления, содержащей в качестве акцептора аминогруппы 2-оксоглутарат, на электрофореграмме проявлялась белковая полоса со значением Rf =0.24. В тоже время, электрофореграмма, проявление которой осуществлялась в среде с пируватом, демонстрировала белковую полосу со значением Rf= 0.54.

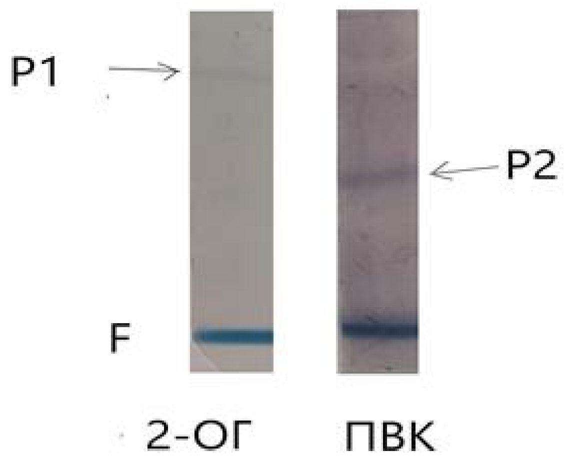


Рис. 1. Изоферментный состав ГАМК-трансаминазы в листьях кукурузы. 2-ОГ – электрофореграмма, проявление которой осуществлялось в среде, содержащей 2-оксоглутарат натрия; ПВК – электрофореграмма, проявление которой осуществлялось в среде, содержащей пируват натрия. P1 и P2- белковые полосы, F – фронт красителя.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенный анализ изоферментного состава ГАМК-трансаминазы методом нативного электрофореза в ПААГ показал присутствие в листьях кукурузы двух разных форм ГАМК-Т : 2-оксоглутарат-зависимая форма ГАМК-Т имеет значение Rf=0.24, а пируват-зависимая ГАМК-Т обладает значением электрофоретической подвижности = 0.54. Различия в значениях электрофоретической подвижности указывают на различия в структуре нативных молекул ГАМК-Т, что связано с отличием в аминокислотном составе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Khan, Muhammad Sarwar et al. Enzymes: Plant-based Production and their Applications.// Protein and peptide letters. - 2018.- V. 25, - №2. – p.136-147.
2. Nonaka, Satoko et al. An Agrobacterium tumefaciens Strain with Gamma-Aminobutyric Acid Transaminase Activity Shows an Enhanced Genetic Transformation Ability in Plants.// Scientific reports. - 2017. - V. 7. – p. 42649
3.Shimajiri Y. et al. Differential subcellular localization, enzymatic properties and expression patterns of г-aminobutyric acid transaminases (GABA-Ts) in rice (Oryza sativa) //Journal of Plant Physiology. – 2013. – V. 170. – №. 2. – С. 196-201.
4. Guo X. et al. An aminobutyric acid transaminase in Zea mays interacts with Rhizoctonia solani cellulase to participate in disease resistance //Frontiers in Plant Science. – 2022. – V. 13. – P. 860170.
5. Маурер Г. Диск-электрофорез: Теория и практика электрофореза в полиакриламидном геле: Пер. с нем. – Мир, 1971.
6. Clark SM, Di Leo R, Dhanoa PK, Van Cauwenberghe OR, Mullen RT, Shelp BJ. Biochemical characterization, mitochondrial localization, expression, and potential functions for an Arabidopsis gamma-aminobutyrate transaminase that utilizes both pyruvate and glyoxylate// J Exp Bot. – 2009. – V.60. - №6. – p.1743-1757.

УДК 577.11

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ПРИ АЦЕТАМИНОФЕНЗАВИСИМОМ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ У КРЫС

Федорин Д.Н., Самофалова А.А., Епринцев А.Т.

Воронежский государственный университет, Воронеж
E-mail: *rybolov@mail.ru*

Установлено, что развитие гепатита печени крыс изменяет активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, ключевого фермента окислительного пентозофосфатного пути. Установлен высокий уровень транскриптов гена глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в печени крыс при гепатите, что может способствовать увеличению содержания белковых компонентов фермента, которое проявляется в увеличении активности данного фермента.

ВВЕДЕНИЕ

Окислительный пентозофосфатный путь представляет собой метаболический путь, протекающий в цитоплазме на ряду с гликолизом и имеющий с ним общее начало. Он генерирует НАДФН и пентозы (5- углеродные сахара), а также рибозо-5-фосфат, предшественник синтеза нуклеотидов [1]. Хотя пентозофосфатный путь действительно включает окисление глюкозы, его основная роль – анаболическая, а не катаболическая.

Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г6ФД, КФ 1.1.1.49) - первый фермент пентозофосфатного гликолиза. Основная функция фермента заключается в восстановлении НАДФ до НАДФН, необходимого для перехода окисленного глутатиона (GSSG) в восстановленную форму. Восстановленный глутатион (GSH) требуется для связывания активных форм кислорода (перекисей). Пентозофосфатный путь не обеспечивает клетку энергией в виде АТФ. Биохимический смысл данного пути в синтезе пентоз, вовлекаемых затем в синтез нуклеиновых кислот, и восстановление НАДФ до НАДФН+Н.

Показано, что глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы - высококонсервативный фермент у большинства видов млекопитающих [2] и присутствует во многих нормальных тканях, таких как молочные железы и надпочечники, жировая ткань, селезенка, легкие, печень и нейрональные клетки [3]. В печени и жировой ткани регуляция активности Г6ФД зависит от механизмов, включающих изменение потребности в НАДФН, увеличение потребления НАДФН сопровождается увеличением уровней Г6ФД [3]. Более того, уровень Г6ФД в печени также регулируется пищевыми сигналами, включая диету с высоким содержанием углеводов, полиненасыщенными жирными кислотами и гормонами, такими как инсулин и глюкокортикоиды [2].

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали самцов лабораторных белых крыс *Rattus norvegicus* L. массой 180-200 г. Животные выращивались в лаборатории. Рацион составлял сухой корм, семечки подсолнечника, семена гороха.

Для индукции гепатита лабораторному животному (крысе) перорально вводился ацетаминофен из расчета 500 мг на 1 кг массы тела в течение 14 дней. Развитие гепатита определяли по содержанию общего билирубина, содержание которого у крысы с развитым гепатитом возрастает более чем в 10 раз. Печень извлекали и использовали для дальнейших исследований. Экспериментальные исследования проводились в соответствии с правилами Европейской конвенции “О защите позвоночных животных”. Для исследований осуществлялся забор крови из хвостовой вены у опытных и контрольных крыс [4].

Активность гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТП) определяли спектрофотометрически при длине волны 405 нм по увеличению оптической плотности при образовании нитроенилина в реакционной смеси, образуемой в ходе реакции [1]. Ферментативная единица (Е) - количество фермента, которое катализирует превращение 1 мкмоля L-γ-глутамил-n-нитроанилида в минуту в стандартных оптимальных условиях.

Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы определяли спектрофотометрически при длине волны 340 нм по уменьшению (НАДФН) оптической плотности реакционной смесей. Активность фермента выражали в ферментативных единицах (Е) на 1 мг белка или Е в расчете на 1 г сырой массы материала (печень). Ферментативная единица (Е) - количество фермента, которое катализирует превращение 1 мкмоля оксалоацетат в минуту в стандартных оптимальных условиях.

Опыты проводили в 3-4 кратной повторности, аналитические определения для каждой пробы осуществляли в трех повторностях. Для обработки результатов нами применялся программный пакет STATISTICA. Обсуждаются статистически достоверные различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования значений общей активности ГГТП в сыворотке крыс в норме и при развитии токсического гепатита показали, что анализируемая величина выше в 1,2 раза (1,56 ± 0,08 Е/мл), чем в контроле (1,31 ± 0,6 Е/мл). Активность ГГТ у крыс с индуцированным с помощью ацетаминофеном имела более высокие показатели, чем у контрольных крыс (рис. 1).

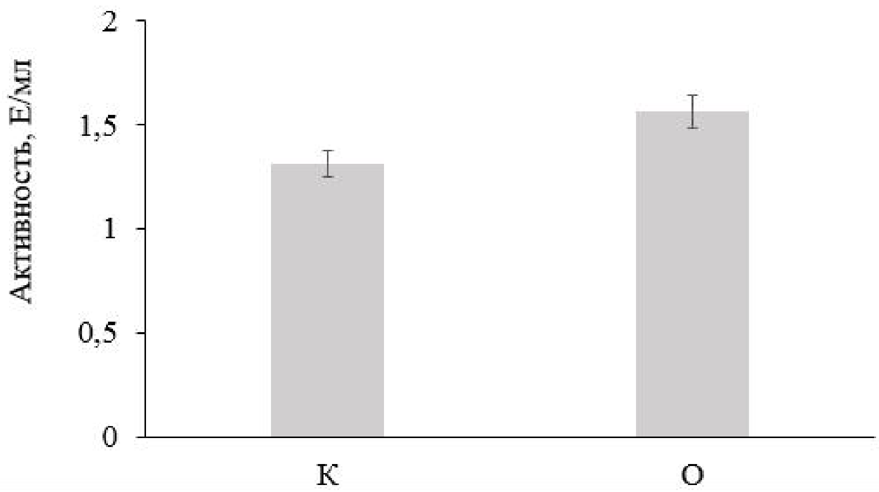


Рис. 1. Активность гамма-глутамилтранспептидазы в крови крыс в норме (К) и при ацетаминофен-индуцированном гепатите (О).

Многие исследования показывают, что содержание ГГТП в печени увеличивается под действием препаратов, индуцирующих ферменты, и что это увеличение отражается на повышении активности фермента в сыворотке крови. Анализ сыворотки имеет потенциал для контроля за соблюдением режима лечения. Повышенная активность ГГТП в сыворотке крови у хронических алкоголиков, по-видимому, частично связана с индукцией микросомальных ферментов.

В ходе опыта были проведены измерения активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в печени лабораторных крыс, данные которых представлены на рисунке 2. Измерения скорости функционирования глюкозо-

6-фосфатдегидрогеназы показали, что общая активность исследуемого фермента, полученного из тканей печени животных контрольной группы составляет 0,15 Е/г сырой массы. Но в печени крыс данный показатель составил 0,64 Е/ г сырой массы, что в 4,64 раза больше, чем в норме.

Изменение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в клетках печени крыс с гепатитом может происходить несколькими путями, либо путем модуляции скорости функционирования имеющихся энзимов, либо изменением скорости синтеза новых молекул. Для выяснения роли экспрессионной регуляции активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в печени крыс при развитии гепатита необходимо исследование уровня транскрипции генов исследуемой ферментной системы в печени крыс в норме и при ацетаминофен-зависимом гепатите.

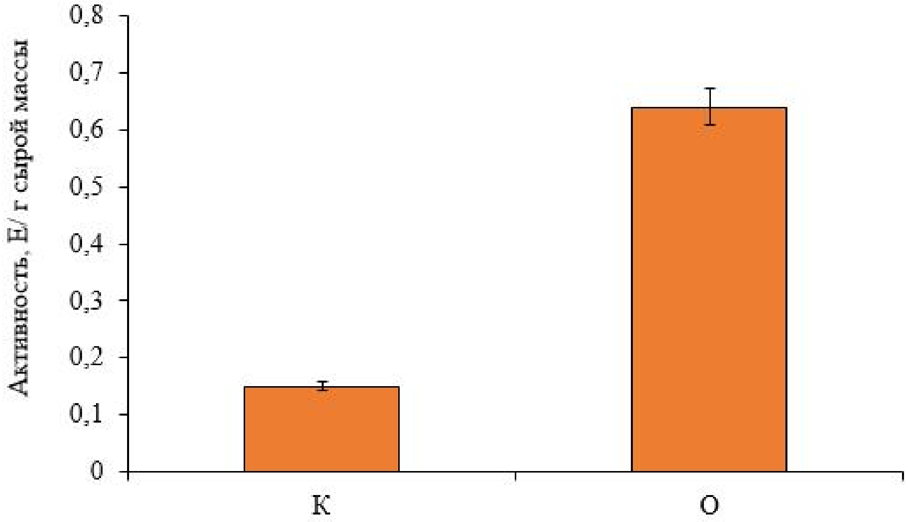


Рис. 2. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в клетках печени крыс в норме (К) и при ацетаминофен-индуцированном гепатите (О).

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что наблюдалось снижение активности Г6ФДГ. Изменение уровня НАДФН способствует регуляции активности глутатионредуктазы, а это, в свою очередь, обеспечивает поддержание нормального уровня восстановленного глутатиона — одного из основных компонентов антиоксидантной защиты организма. Восстановленный глутатион ингибирует Г6ФДГ из печени контрольных крыс. Полученные результаты дают основание полагать, что направленность участия Г6ФДГ в регуляции активности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование ацетаминофена в качестве индуктора токсического гепатита у крыс проявляется в изменении функционирования печени, что находит свое отражение в повышении уровня общего билирубина в крови относительно контроля. Подобный эффект связан с негативным действием на метаболизм клеток печени продуктов распада ацетаминофена, приводящее к формированию окислительного стресса, вызванного, в том числе, истощением глутатиона как фактора детоксикации АФК.

Анализ результатов по изменению активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в печени крыс в условиях гепатита свидетельствует об его активации. Изменение активности малатдегидрогеназы связано с приспособлением животного организма к патологическим условиям. В частности, увеличение уровня активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы может обуславливать активацию синтеза восстановленного НАДФН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Luzzatto L. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. Hematology / L. Luzzatto, C. Nannelli, R. Notaro // Oncology Clinics of North America. – 2016. – V. 30. – P. 373–393.
2. Kletzien R.F. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a “housekeeping” enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress / R.F. Kletzien, P.K. Harris, L.A. Foellmi // FASEB J. – 1994. – V. 8. – P. 174–181.
3. Glucose-6-phosphate dehydrogenase expression associated with NADPH-dependent reactions in cerebellar neurons / E. Biagiotti [et al.] // Cerebellum. – 2003. – V. 2. – P. 178–183.
4. Меньшикова В.В. Справочник Лабораторные методы исследования в клинике / В.В. Меншикова. – М.: Медицина, 1987. – 368 с.

УДК 577.12

ОЦЕНКА УЧАСТИЯ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА FOXA В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *G6PD* ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ КРЫС

Самофалова А.А., Шелушинина Е.А., Федорин Д.Н.

Воронежский государственный университет, Воронеж
E-mail: *rybolov@mail.ru*

Показано наличие в промоторе гена *G6pd* глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы крыс специфического цис-элемента, характерного для транскрипционного фактора Foxa в зоне инициации транскрипции указывает на возможность его регуляции данным фактором. Разработаны специфические праймеры для оценки его транскрипционной активности.

ВВЕДЕНИЕ

В печени для некоторых генов характерна регуляция при участии транскрипционного элемента - Foxa, который был идентифицирован как участвующий в контроле гомеостаза глюкозы, особенно в ответе на голодание. Примерами являются глюконеогенные ферменты фосфоенолпируваткарбоксикиназа (Pepck), глюкозо-6-фосфатаза (G6pc) и тирозинаминотрансфераза [1]. Роль Foxa заключается в регуляции генов в печени: снижается экспрессия ферментов глюконеогенеза, как и экспрессия Glut2, белка канала, используемого для экспорта глюкозы из гепатоцитов. Таким образом, семейство Foxa является важным регулятором программы глюконеогенеза в печени [2, 3].

Фактор транскрипции участвует в эмбриональном развитии, установлении тканеспецифической экспрессии генов и регуляции экспрессии генов в дифференцированных тканях. Считается, что он действует как «пионерский» фактор, открывающий уплотненный хроматин для других белков посредством взаимодействия с гистонами нуклеосомного ядра и тем самым заменяя линкерные гистоны на целевых участках энхансера и/или промотора. Связывает ДНК с консенсусной последовательностью 5’-[AC]A[AT]T[AG]TT[GT][AG][CT]T[CT]-3’ [4].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для анализа элементов, регулирующих экспрессию гена *G6pd* (Gene ID: 24377), кодирующего фермент глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы *Rattus norvegicus*, была изучена промоторная область этих генов: ~900 пар нуклеотидов до стартового кодона. Последовательность промоторной области была получена с использованием базы данных NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov). Анализ возможных сайтов связывания различных факторов транскрипции проводился на основе последовательностей их цис-элементов, взятых в базе данных GeneCards (https://www.genecards.org/).

Специфические праймеры для оценки транскрипционной активности гена фактора Foxa были разработаны при помощи программного обеспечения Pramer-Blast.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты анализа нуклеотидной последовательности промотора гена *G6pd* глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы крыс свидетельствуют об отсутствии в его составе специфического сайта связывания с транскрипционным фактором CREB. Однако, обнаружен цис-элемент, характерный для осуществления взаимодействия с транскрипционным фактором Foxa (рис. 1). Следовательно, регуляция исследуемого гена *G6pd* может находится под контролем данного регуляторного элемента. Важно отметить, что место расположения сайта присоединения фактора Foxa находится в зоне инициации транскрипции (TSS).

```
TCAGTCAAAGCACACGCCCTCTTGCGTTAAATGGGCCAACGAAGCTTAGCCCCCGGAAACGGGCTGTGCA
CTCCAGATCTGTGAACGTGTTTGGCAGCGGCAACTAAATTCAGGTAAAGGGGTGGTCTGATGTCACATCG
GTGGAGGGACATGCTGCCCGCTTGTATGCCGCGTGTTCCTTTGATGCGCGCTAATCTACAAGGTCTTAAC
CCATCTCTTTGTATCCCGCACTTTCTCTGCACTGGGCCCAAGAGAACTAGACCTTTACAAGAGGAGGTAC
GTTCCGGAATCTCCTAACTGGGCCAGAAGAGAGCCGGAGCTGAACTCCATCATCTACACAATCAAACCTG
CTCAGTTCATTGTGGAGTTTCTGGCAGACACCAGAGTATGATGGTCCCATATAGAGTGTGATGCCCTGAC
TGTATTATATCTAGCTGCCCAGAGTGGATGCCTTAGGTGAATTCTATTAATGCTTTAGTACTTTCGTAAT
GTACAGCCCCTAGTGAAGGCAATATAGGAGGTTATGATTGGATCCCAGAGGCAGCAGTTTCTGAGTCTCC
GAATGCACAGGCGCGCGCGCGTGTACACACACACACAGCATTCCCAGCCAGTGGTTTTAGTAATCGTC
ACCGGTCTGGTGAGAACTTAAAGGACCCTTGAACGAGGCTAAGTTGTTAATGCTCTTCCATTCTCCTGCC
TATCAATGAGCCTTTCTTCCACCAGAAAACATCATG
```

Рис. 1. Нуклеотидная последовательность промотора гена *G6pd* глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы крыс. Серым выделено расположение специфичного сайта для фактора Foxa, подчеркиванием – стартовый кодон.

Базовый промотор содержит TSS и обычно он имеет положение от -60 до +40 п.н. Область от 200 до 300 п.н. непосредственно выше TSS обычно называют проксимальным промотором, который содержит множество регуляторных элементов, ответственных за специфическую регуляцию транскрипции [5]. Эти области обычно содержат цис-элементы, которые могут действовать как энхансеры или сайленсеры за счет связывания специфических транскрипционных факторов (ТФ) и, особенно в базовом промоторе, обоих инициаторов транскрипции [а именно TATA-бокса, области инициации (INR) и нижестоящих промоторных элементов (DPE)] и посредников (таких как CAAT-блок и область Y-патча). Некоторые исследования, посвященные сайтам связывания транскрипционных факторов (TFBS), продемонстрировали, что различные мотивы расположены во всех ключевых генах пути биосинтеза таксанов [6, 7]. Связь между TFBS и доступностью генов для аппарата транскрипции РНК может быть изменена и подвержена влиянию метилирования ДНК, что находит отражение в контроле экспрессии генов и, следовательно, влияя на различные клеточные процессы [8]. Следовательно, именно транскрипционной фактор Foxa способен оказывать значимое влияние на уровень транскрипционной активности гена глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в печени крыс при развитии гепатита, вызывая его активацию.

С помощью программного обеспечения Primer-BLAST осуществили подбор праймеров к транскрипционному фактору Foxa крыс. Полученные пары праймеров показали абсолютную специфичность к мРНК фактора Foxa *Rattus norvegicus* L. и не было обнаружено их значимой гомологии с нуклеотидными последовательностями каких-либо других эукариот или бактерий.

Таблица 1.

Нуклеотидные последовательности праймеров к мРНК гена Foxa (NM_012742) крыс

мРНК	Прямой праймер	Обратный праймер
Foxa	GCACAATTTTCCCCGGTTCA	CCTGCCACGGGACTAGAATG

Разработанные праймеры позволяют провести оценку содержания транскриптов исследуемого гена в печени крыс в норме и при токсическом гепатите, вызванном ацетаминофеном.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование нуклеотидной последовательности промотора гена *G6pd* глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы крыс свидетельствует о наличии в его составе специфического цис-элемента, характерного для осуществления взаимодействия с транскрипционным фактором Foxa. Данный фактор взаимодействует с промотором исследуемого гена в зоне инициации транскрипции (TSS), что играет важное значение в привлечении РНК-полимеразы. Следовательно, регуляция исследуемого гена *G6pd* может находиться под контролем данного регуляторного элемента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Friedman JR, Kaestner KH. The Foxa family of transcription factors in development and metabolism. Cell Mol Life Sci. 2006 Oct;63(19-20):2317-28.
2. Shen, W., Scearce, L. M., Brestelli, J. E., Sund, N. J. and Kaestner, K. H. (2001) Foxa3 (hepatocyte nuclear factor 3gamma) is required for the regulation of hepatic GLUT2 expression and the maintenance of glucose homeostasis during a prolonged fast. J. Biol. Chem. 276, 42812–42817.
3. Kaestner, K. H., Hiemisch, H. and Schutz, G. (1998) Targeted disruption of the gene encoding hepatocyte nuclear factor 3gamma results in reduced transcription of hepatocyte-specific genes. Mol. Cell Biol. 18, 4245–4251
4. Lin L, Miller CT, Contreras JI, Prescott MS, Dagenais SL, Wu R, Yee J, Orringer MB, Misek DE, Hanash SM, Glover TW, Beer DG. The hepatocyte nuclear factor 3 alpha gene, HNF3alpha (FOXA1), on chromosome band 14q13 is amplified and overexpressed in esophageal and lung adenocarcinomas. Cancer Res. 2002 Sep 15;62(18):5273-9.
5. Roy A.L., Singer D.S. Core promoters in transcription: old problem, new insights // Trends Biochem. Sci. – 2015. – V. 40. – P. 165-171.
6. Yanfang Y., Kaikai Z., Liying Y., Xing L., Ying W., Hongwei L., Qiang L., Duanfen C., Deyou Q. Identification and characterization of MYC transcription factors in Taxus sp. // Gene. – 2018. – V. 675. – P. 1-8.
7. Zhou et al., Zhou T., Luo X., Yu C., Zhang C., Zhang L., Song Y., Dong M., Shen C. Transcriptome analyses provide insights into the expression pattern and sequence similarity of several taxol biosynthesis-related genes in three Taxus species // BMC Plant Biol. – 2019. – V. 19: 33.
8. Law J.A., Jacobsen S.E. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals // Nat. Rev. Genet. – 2010. – V. 11. – P. 204-220.

УДК 577.11

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА В АГАРОЗНОМ ГЕЛЕ ДЛЯ РАЗДЕЛЕНИЯ ИЗОФЕРМЕНТОВ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ СЕРДЦА КРЫС

Селиванов А.Ю., Селиванова Н.В.

Воронежский государственный университет, Воронеж

E-mail: *aleck.selivanoff2013@yandex.ru*

В данной работе произведен подбор оптимальных условий для разделения изоферментов лактатдегидрогеназы (ЛДГ, КФ 1.1.1.27) с помощью электрофореза в агарозном геле. Было показано, что 5 изоферментов ЛДГ эффективно разделяются только при использовании агарозного геля и рабочего раствора на основе TBE-буфера pH 8.3.

ВВЕДЕНИЕ

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ, КФ 1.1.1.27) - это тетрамерный фермент, состоящий из двух субъединиц (A и B), которые, сочетаясь в различном порядке, образуют 5 изоферментов: ЛДГ1 (4B), ЛДГ2 (3B1A), ЛДГ3 (2B2A), ЛДГ4 (1B3A) и ЛДГ5 (4A) в соответствии с различной скоростью миграции в электрическом поле. ЛДГ1 и ЛДГ2 с большим количеством субъединицы B демонстрируют высокое сродство к лактату и играют ключевую роль в катализе лактата в пируват, в то время как ЛДГ5 и ЛДГ4 с большим количеством субъединицы A преимущественно катализируют обратную реакцию [1].

Зимография ЛДГ - распространенный метод изучения распределения форм данного фермента в органах и тканях, несмотря на существование некоторых проблем. Основываясь на различии зарядов изоферментов лактатдегидрогеназы, обычный гель-электрофорез в полиакриламидном геле по своим особенностям не позволяет качественно разделить их на 5 изоферментов, что объясняется особенностями электрофоретической подвижности каждой формы [1]. Использование агарозного геля решает проблему с улавливанием более анодных форм. По литературным данным для электрофореза ЛДГ используют 3 буфера - Трис-глициновый, TAE, и ТБЕ с pH 8.6 [1] и 8,3 [2].

Целью данной работы явился подбор оптимальных условий электрофоретического разделения изоформ лактатдегидрогеназы из тканей сердца крыс, которые могли бы гарантировать стабильный качественный результат и применяться для различных исследований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования были 5 месячные самцы крыс линии Вистар. Для получения материалов, животным проводили декапитацию с применением гильотины [3]. При проведении исследований соблюдались основные принципы надлежащей лабораторной практики GLP. Работа выполнена в соответствии с санитарными правилами для вивария и нормами гуманного обращения с лабораторными животными.

Для получения тканей сердца экспериментальных животных подвергали декапитации. Сердце извлекалось и промывалось в течение 3-5 минут ледяным физраствором. Образцы гомогенизировали в буфере 50 мМ Tris-HCl буфер, pH=7.8, 2 мМ KCL, 1 мМ ЭДТА. Затем центрифугировали 5000 об/мин при температуре 4^{o}C в течение 5 минут.

Приготовление агарозного геля. Мы использовали 3 варианта геля для разных рабочих буферов:

1. 0,5% агарозный гель на 1× трис-глициновом буфере, 8.3 pH
2. 0,5% агарозный гель на 1× TAE буфере, 8.3 pH
3. 0,5% агарозный гель на 1× TBE буфере, 8.3 pH

Подготовка образцов. Гомогенаты тканей смешивали с лидирующим красителем (0,04 г бромфенолового синего и 10 г сахарозы растворяли в 10 мл 1× TAE буфера, нагревали для растворения, и объем доводили до 20 мл), наносили на каждый подготовленный образец и осторожно перемешивали кончиком пипетки. Когда гель застывал переносили в горизонтальную камеру электрофореза и заполняли 1× буфером (трис-глициновым буфером, 8.3 pH, TAE буфером, 8.3 pH или TBE буфером, 8.3 pH в зависимости от используемого буфера при приготовлении геля), так чтобы гель был полностью погружен в раствор. Образцы осторожно вносили в лунки (делали достаточные интервалы между пробами). Электрофорез проходил при напряжении 100 В до тех пор, пока фронт красителя не прошел примерно 96% геля. Температура составляла около 10°С и контролировалась при помощи термопары.

Окрашивание и визуализация. Окрашивание проводили в среде 0,5 М фосфатный буфер рН 7.8, 3 мМ НАД$^+$, 2мМ лактат натрия, 0.01 М ФМС, 0.01 М НСТ. Инкубировали в этой среде 2 часа при температуре 37°С.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведения электрофореза в агарозном геле с использованием различных буферных сред и последующим окрашиванием на активность лактатдегидрогеназы показаны на рисунке, из которого видно, что формы ЛДГ1-3 эффективно разделяются во всех трех случаях. Иная ситуация с четвертой и пятой изоформой фермента.

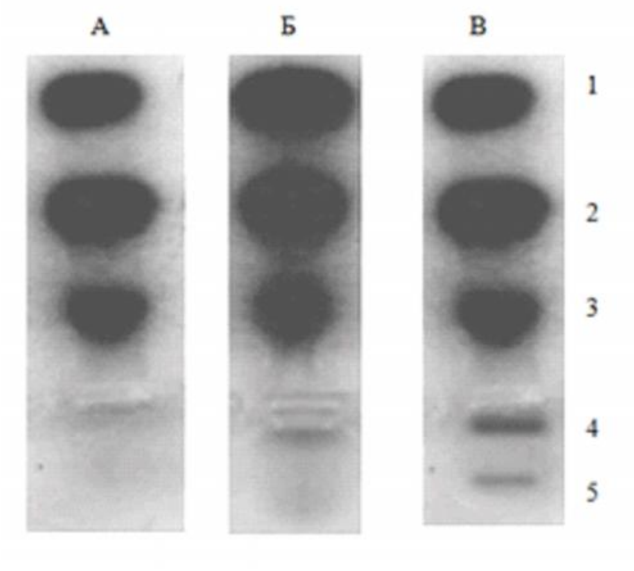


Рис. 1. Специфическое проявление ЛДГ из сердца крыс в разных рабочих буферах. А – с ТАЕ-буфером, Б – с трис-глициновым буфером, В – с ТВЕ-буфером. 1-5 – белковые полосы.

Было замечено, что при использовании ТАЕ- и трис-глицинового буферов полоса, характерная для ЛДГ5, отсутствовала, кроме того в ТАЕ-буфере ЛДГ 4 находилась вблизи кармана для внесения, что мешает последующей визуализации и анализу. Тогда как при использовании ТВЕ-буфера разделение всех пяти форм лактатдегидрогеназы было полным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, для максимально полного разделения изоферментов лактатдегидрогеназы, выделенной из животных тканей, следует использовать 0,5% агарозный гель и TBE-буфер. Электрофорез должен проходить при напряжении 100В и температуре 10^{o}С.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Barnett H. The staining of lactic dehydrogenase isoenzymes after electrophoretic separation on cellulose acetate. J Clin Pathol. 1964 Sep;17(5):567-70

2. Li P.J., Qiu N.H., Zhang L., Zhong G.S., Zeng F.C. A more universal and stable method for lactate dehydrogenase isoenzyme test. Anal. Methods. 2019;11:4173–4183.

3. Епринцев А.Т. Транскрипционная регуляция функционирования лактатдегидрогеназы в клетках почек крыс при диабетической нефропатии / А.Т. Епринцев, Е.С. Пресняков, Н.В. Селиванова // Бюллетень сибирской медицины. – 2024. - №1.

УДК 577.1

АКТИВНОСТЬ АКОНИТАТГИДРАТАЗЫ В СЕРДЦЕ КРЫС ПРИ ГИПОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ

Серебрякова П.А., Селиванова Н.В.

Воронежский государственный университет, Воронеж

E-mail: *polina_02_11@bk.ru*

Показано изменение активности аконитатгидратазы (АГ, КФ 4.2.1.3) в сердце крыс при компенсаторной гипобарической гипоксии. Вероятно, наблюдаемые биохимические изменения связаны с перестройкой метаболических путей, в которых принимает участие исследуемый фермент, на адекватный условиям гипоксического воздействия режим функционирования.

ВВЕДЕНИЕ

Принято полагать, что ведущим патогенетическим звеном при гипоксии тканей любой этиологии является дефицит энергии в клетках [1]. Одной из часто встречающихся в природе и крупных мегаполисах форм кислородной недостаточности является гипоксическая (гипобарическая) гипоксия, вызванная снижением процентного содержания кислорода во вдыхаемом воздухе. В то же время интенсивное промышленное освоение горных и арктических регионов, проведение военных, спортивных, оздоровительных и других мероприятий ставят перед современной медициной вызовы, связанные с разработкой ранних диагностических критериев гипоксической полиорганной недостаточности, оптимизации процессов адаптации и сохранения высокой работоспособности человека, длительно или регулярно находящегося в экстремальных зонах, что невозможно без понимания современных механизмов адаптации организма к гипоксии [2].

Важная роль в осуществлении адаптивных реакций организма принадлежит ферменту - аконитатгидратазе (аконитаза, АГ, КФ 4.2.1.3). Установлено, что среди митохондриальных протеинов аконитаза обычно используется в качестве чувствительного маркера окислительного стресса [3], а также окислительного повреждения при различных дегенеративных заболеваниях и старении [4]. В связи с этим, целью данной работы являлось исследование особенностей функционирования аконитатгидратазы в сердце крыс при компенсаторной гипобарической гипоксии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования были избраны самцы лабораторных крыс (*Rattus norvegicus*) в возрасте трех месяцев и массой 150-200 г., которых содержали согласно требованиям международных правил гуманного отношения к животным, отражённых в санитарных правилах по отбору и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев).

Животных разделили на две группы. 1-ю группу контроля составили 3 интактные крысы, во 2-ю группу вошли 3 особи, которым на протяжении 60 дней моделировали гипобарическую гипоксию (ГГ) без коррекции. На протяжении всего эксперимента животных 2-й группы ежедневно на 1,5 ч погружали в прозрачную барокамеру VALUE «1 Stage Vacuum Pump», снабженную манометром, предохранительным клапаном, щелочным поглотителем для устранения избытка углекислого газа. В барокамере создавалось давление ниже атмосферного, что соответствовало подъему на 5500 м над уровнем моря (375 мм рт.ст.), а это эквивалентно умеренно интенсивному гипоксическому воздействию [5]. Для получения тканей сердца опытных животных подвергали декапитации под эфирным наркозом.

Концентрацию диеновых коньюгатов (ДК) определяли спектрофотометрическим методом. Принцип данного метода состоит в том, что в процессе ПОЛ на стадии образования свободных радикалов в молекулах полиненасыщенных жирных кислот образуется система сопряженных двойных связей, ассоциированная с появлением максимума в спектре поглощения при 233 нм [6].

Выделение аконитазы осуществляли центрифугированием при 3000 об./мин в течение 10 минут. Для получения ферментной вытяжки сердце растирали в среде выделения, состоящей из 0,1 М трис-HCl-буфера, pH 8,0, содержащего 20 мМ цитрата натрия.

Активность аконитатгидратазы измеряли спектрофотометрически при длине волны 240 нм по изменению оптической плотности [7]. Определение концентрации содержания белка осуществлялось по методу Лоури.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Показано, что уровень первичных продуктов перекисного окисления липидов - диеновых конъюгатов в крови крыс опытной группы достоверно увеличивался на протяжении всего времени эксперимента (рис. 1) относительно исследуемого показателя у контрольной группы животных.

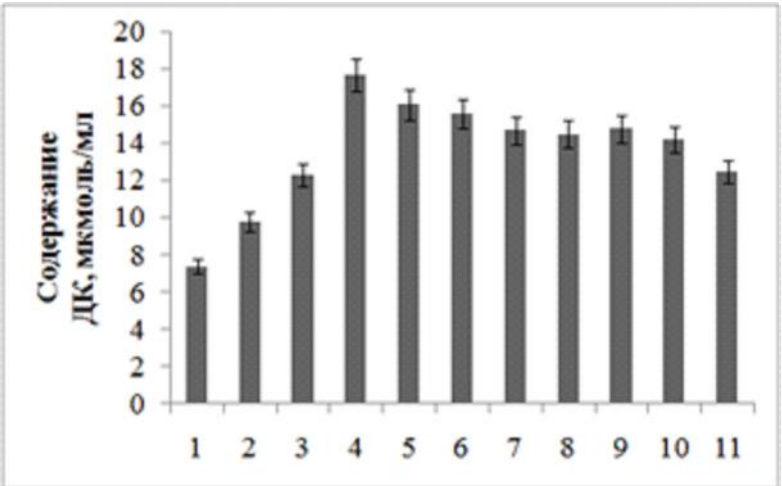


Рис. 1. Содержание диеновых коньюгатов в сыворотке крови в норме (1), и при гипобарической гипоксии на 5 (2), 10 (3), 15 (4), 20 (5), 25 (6), 30 (7), 35 (8), 40 (9), 50 (10) и 60 (11) день эксперимента.

Активность аконитатгидратазы в сердце крыс при гипобарической гипоксии показана на рисунке 2, из которого видно, что при недостатке кислорода данный показатель в сердце крыс увеличивается более чем в 5 раз.

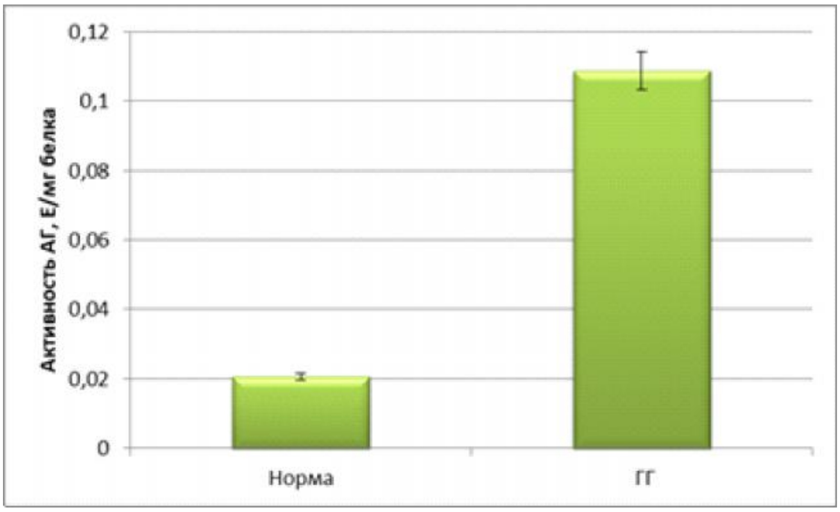


Рис. 2. Удельная активность аконитатгидратазы в сердце крыс в условиях компенсаторной гипобарической гипоксии. Норма – контрольная группа крыс. ГГ – животные, подвергавшиеся воздействию гипобарической гипоксии.

Увеличение активности АГ может указывать на повышенный синтез и образование цитрата, что, в свою очередь, может способствовать компенсации недостатка кислорода.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, наблюдающиеся в условиях компенсаторной ГГ биохимические изменения в сердце крыс свидетельствуют о перестройке активности антиоксидантных систем и метаболических путей, в которых принимает участие аконитатгидратаза, на адекватный условиям гипоксического воздействия режим функционирования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Заднипряный И.В., Третьякова О.С., Сатаева Т.П. Исследование антиоксидантной активности и кардиопротекторного эффекта реамберина и цитофлавина в условиях гемической гипоксии у новорожденных крысят. Архив патологии. 2015;77(6):39-44. https://doi.org/10.17116/patol201577639-44

2. Баранов А.В., Бочаров М.И., Рощевская И.М. Компенсаторная реакция сердечно-сосудистой системы человека на кратковременную нормобарическую гипоксию. Вестник Уральской медицинской академической науки. 2011;3:39-41.

3. Chen X.J., Wang X., Butow R.A. (2007) Yeast aconitase binds and provides metabolically coupled protection to mitochondrial DNA. PNAS USA., 104, 13738-13743.

4. Bulteau A.L., O'Neill H.A., Kennedy M.C., Ikeda-Saito M., Isaya G., Szweda L.I. (2004) Frataxin acts as an iron chaperone protein to modulate mitochondrial aconitase activity. Science., 305, 242-245.

5. Мамадалиева Н.И., Саатов Т.С., Хайбуллина З.Р., Умеров О.И. Динамика фосфолипидного состава сердечных тканей как основа для формирования толерантности к гипоксии. Вестник Ташкентской медицинской академии. 2014;1:25-31

6. Стальная И.Д. Метод определения диеновой коньюгации ненасыщенных высших жирных кислот / И.Д. Стальная // Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1972. – С. 63-64.

7. Cherkasov A.A., Overton R.A.Jr., Sokolov E.P., Sokolova I.M. (2010) Temperature-dependent effects of cadmium and purine nucleotides on mitochondrial aconitase from a marine ectotherm, Crassostreavirginica: a role of temperature in stress and allosteric enzyme regulation. The Journal of Experimental Biology., 210, 46-55.

УДК 577.1 / 616-092

СОДЕРЖАНИЕ ЦИТРАТА В РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНАХ КРЫС ПРИ ГИПОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ

Серебрякова П.А., Селиванова Н.В., Шипко В.И.

Воронежский государственный университет, Воронеж
E-mail: *polina_02_11@bk.ru*

В исследовании анализировали содержание цитрата в сердечной и почечной тканях крыс в условиях гипобарической гипоксии. В миокарде отмечено повышение уровня цитрата в 1,3 раза по сравнению с контролем, тогда как в почках исследуемый показатель у опытной группы животных, наоборот, снижался в 1,7 раза. Полученные результаты демонстрируют различную реакцию органов на гипоксическое воздействие.

ВВЕДЕНИЕ

Принято полагать, что ведущим патогенетическим звеном при гипоксии тканей любой этиологии является дефицит энергии в клетках [1]. Недостаток энергии в тканях может возникать из-за нарушения метаболизма цитрата, поскольку он играет важную роль в цикле Кребса. Лимонная кислота является ключевым метаболитом в клетках, участвующим в энергетическом обмене, регуляции ферментов и других биохимических процессах [6]. Сердце в условиях гипоксии испытывает энергодефицит, что способствует снижению его функций и развитию гипертрофии [4]. В почках нарушается кровоток и pH-баланс [5].

Лимонная кислота является ключевым адаптогеном, помогающим клеткам выживать в условиях гипоксии за счет регуляции энергетического метаболизма, коррекции кислотно-щелочного баланса и антиоксидантной защиты. В связи с этим, целью данной работы являлось исследование изменения содержания цитрата в разных органах крыс при компенсаторной гипобарической гипоксии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования были избраны самцы лабораторных крыс (*Rattus norvegicus*) в возрасте трех месяцев и массой 150-200 г., которых содержали согласно требованиям международных правил гуманного отношения к животным, отражённых в санитарных правилах по отбору и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев).

Животных разделили на две группы. 1-ю группу контроля составили 3 интактные крысы, во 2-ю группу вошли 3 особи, которым на протяжении 60 дней моделировали гипобарическую гипоксию (ГГ) без коррекции. На протяжении всего эксперимента животных 2-й группы ежедневно на 1,5 ч погружали в прозрачную барокамеру VALUE «1 Stage Vacuum Pump», снабженную манометром, предохранительным клапаном, щелочным поглотителем для устранения избытка углекислого газа. В барокамере создавалось давление ниже атмосферного, что соответствовало подъему на 5500 м над уровнем моря (375 мм рт.ст.), а это эквивалентно умеренно интенсивному гипоксическому воздействию [2]. Для получения тканей сердца опытных животных подвергали декапитации под эфирным наркозом.

Для измерения концентрации цитрата в клетках сердца был использован метод Нательсона, основанный на образовании пентабромацетона из цитрата при реакции с бромным реагентом и перманганатом калия [3].

Статистическиая обработка данных проводилась с помощью программы Статтех (Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Показано, что гипобарическая гипоксия вызывает изменения содержания цитрата в исследуемых тканях крыс (табл.). В сердечной мышце концентрация лимонной кислоты при гипоксии повышается в 1,3 раза относительно контрольной группы животных. Тогда как в почечной ткани зафиксировано снижение исследуемого показателя у опытной группы животных почти в 2 раза.

Таблица 1.

Определение содержания цитрата (мкмоль/грамм сырой массы) в клетках сердца и почек крыс в условиях компенсаторной гипобарической гипоксии

Сердце		Почки	
Норма	ГГ	Норма	ГГ
0,3395	0,4457	0,3747	0,2242

Норма – контрольная группа крыс; ГГ – животные, подвергавшиеся воздействию гипобарической гипоксии.

Полученные результаты демонстрируют выраженную тканеспецифичность метаболического ответа на гипоксическое воздействие. Известно, что на процессы накопления/расходования цитрата влияют разнообразные факторы, такие как потребность в синтезе АТФ (концентрация интермедиата повышается в условиях избытка энергии) и изменение активности ферментов, участвующих в его обмене. Наблюдаемые различия в содержании данного метаболита требуют дополнительного изучения возможных причин, связанных подобной тканеспецифичностью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенное исследование выявило существенные различия в содержании цитрата в миокарде и почках крыс при гипобарической гипоксии, что может свидетельствовать о существовании органоспецифических механизмов адаптации к кислородной недостаточности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Заднипряный И.В., Третьякова О.С., Сатаева Т.П. Исследование антиоксидантной активности и кардиопротекторного эффекта реамберина и цитофлавина в условиях гемической гипоксии у новорожденных крысят / Архив патологии. – 2015 . – Т.77. - №6. С. 39-44. https://doi.org/10.17116/patol201577639-44
2. Мамадалиева Н.И., Саатов Т.С., Хайбуллина З.Р., Умеров О.И. Динамика фосфолипидного состава сердечных тканей как основа для формирования толерантности к гипоксии / Вестник Ташкентской медицинской академии. – 2014. – Т.1. – С.25-31
3. Резяпкин В. И., Слышенков В. С., Заводник И. Б., Бурдь В. Н., Сушко Л. И., Романчук Е. И., Караедова Л. М. Лабораторный практикум по биохимии и биофизике. - Гродненский государственный университет имени Янки Купалы. - 2009.
4. Lopaschuk G.D, Karwi Q.G., Tian R., Wende Ad.R., Abel E.D. Cardiac Energy Metabolism in Heart Failure / Circ Res. – 2021. – Vol. 128. – No 10. – P. 1487-1513.
5. Zuckerman J.M., Assimos D.G. Hypocitraturia: pathophysiology and medical management / Rev Urol. – 2009. – Vol. 11. – No 3. P. -134-44.
6. Nelson D.L., Cox M.M. Lehninger Principles of Biochemistry, 6th Edition. - 2017.

УДК 630* 161. 443. 66

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ МОДИФИКАЦИЙ ОТВЕТНЫХ РЕАКЦИЙ КЛОНИРОВАННЫХ РАСТЕНИЙ ТОПОЛЯ В УСЛОВИЯХ *EX VITRO* С ПОМОЩЬЮ ЦИРКОНА

Табацкая Т.М.

ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии», г. Воронеж

Email: *tatyana.tabacky@gmail.com*

На примере культуры микрорастений регенерантных линий тополя белого (*Populus alba L.*), т. сереющего (*P. canescens Sm.*), а также гибрида т. белого и осины, полученных в условиях последовательного, многократно моделируемого стресса засоления (NaCl) *in vitro*, проведено изучение влияния биопрепарата циркона на адаптивные реакции клонированных растений к условиям нестерильной почвы *ex vitro*. Показано полифункциональное действие циркона, одновременно стимулирующее рост, развитие и приживаемость растений-регенерантов в процессе адаптации к стрессовым условиям *ex vitro*.

ВВЕДЕНИЕ

Негативные экологические изменения климата – глобальное потепление, заметное сокращение осадков, в настоящее время приобретают устойчивую направленность. В связи с этим, все более остро ставится вопрос о получении не только продуктивных, но и устойчивых к неблагоприятным факторам быстрорастущих форм древесных растений [1].

Многоплановые исследования, направленные на изучение аспектов стрессоустойчивости растений, получение растений с повышенной устойчивостью, их быстрого воспроизводства подтверждают актуальность этих исследований [2-4].

Одной из ключевых, но недостаточно изученных проблем клонального микроразмножения растений, полученных в условиях моделируемого стресса *in vitro*, является определение условий более полной реализации их жизнеспособности в условиях нестерильной почвы *ex vitro* [2].

Наряду с получением новых, устойчивых генотипов растений методами селекции, в том числе и в условиях *in vitro*, большое значение придается использованию биопрепаратов, усиливающих адаптивные возможности клонированных растений. Одним из таких биопрепаратов, зарегистрированных Госхимкомиссией и внесенных в Государственный каталог агрохимреактивов, разрешенных к использованию на территории России, является циркон, характеризующийся низкими нормами расхода, экологической безопасностью.

Основным действующим компонентом циркона являются гидрокоричные кислоты и их производные, полученные из эхинацеи пурпурной (*Ehinacea purpurea* (L.) *Moench.*). Согласно литературным данным, циркон стимулирует рост и ризогенез растений, компенсируя их природные регуляторы роста [5, 9].

Адаптация и перевод пробирочных микрорастений в нестерильную почву – один из критических этапов при воспроизводстве клонированного материала.

Оптимизация регламентов перевода полученных *in vitro* растений в нестерильные условия почвы актуальна в связи с отсутствием универсальных агротехнологий, использованием новых исходных объектов клонирования, значительными климатическими изменениями.

В связи с этим, цель настоящих исследований – определение возможных модификаций ответных реакций клонированных растений тополя в условиях *ex vitro* с помощью циркона.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исходным материалом для исследования служили регенерантные линии тополя белого (*Populus alba* L.), т. сереющего (*P. canescens* Sm.), в виде микрорастений, полученные нами в результате последовательного отбора на селективном фоне многократного солевого (NaCl) стресса на тканевом и клеточном уровнях [6, 7].

Для высадки в грядку теплицы отбирались растения с хорошо развитой корневой системой, прямоствольные, высотой в пределах 5-7см [8].

В качестве основных биотехнологических параметров оценки реакции растений-регенерантов тополя на воздействие циркона использовали показатели их сохранности, роста, особенности морфотипа. Перед пикировкой в прямолинейные борозды грядки теплицы с размещением 100шт. на 1м^2 растения обрабатывали цирконом. Обработку извлеченного из пробирки микрорастения проводили мелкодисперсионным опрыскиванием водным раствором препарата.

Из трех испытанных концентраций циркона (0,1 мг/л; 0,2 мг/л; 0,3 мг/л) концентрация 0,2 мг/л оказывала существенное влияние на параметры роста и жизнеспособность растений-регенерантов тополя *ex vitro*. Контролем служили растения, не подвергшиеся обработке биопрепаратом.

Достоверность результатов тестирования на различных этапах исследований обеспечена объемом экспериментального материала (более 200 культур тополя в виде микрорастений), наличием завершенных технологий клонального микроразмножения, быстротой, воспроизводимостью реакций растительных объектов на изменения условий культивирования, доступностью их учета, кратностью экспериментов.

Повторность в пределах одного варианта составила 20 растений для каждой регенерантной линии тополя. Повторность эксперимента трехкратная.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное испытание влияния препарата циркона на высаженные в почву микрорастения тополя позволило выявить заметную стимуляцию скорости возобновления их роста (скорости появления первого нового листа).

Через 15 дней культивирования (после однократной обработки извлеченных из пробирки и высаженных в почву микрорастений) среднее количество культур с возобновлением роста в опытном варианте превышало контрольное в 1,6 раза (46,6% и 29,5% соответственно) (рисунок1).

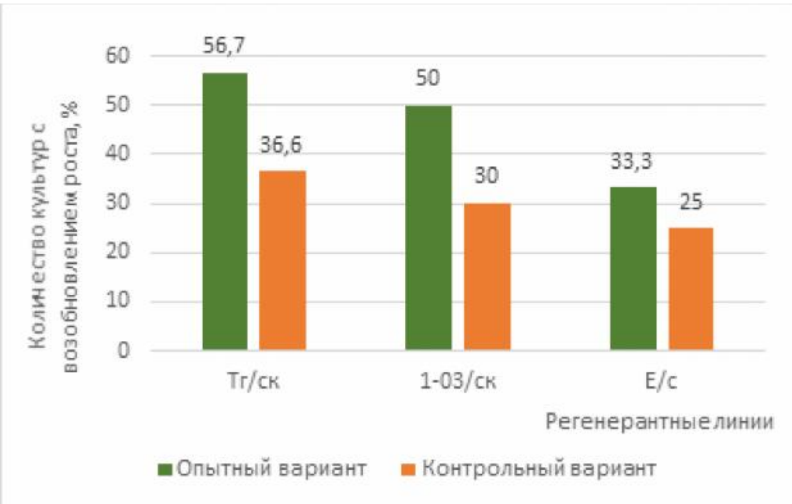


Рис. 1. Влияние циркона на возобновление роста растений-регенерантов тополя в условиях *ex vitro*.

Полученные результаты по стимулирующей активности циркона в начале вегетации высаженных в почву растений подтверждены и в последующей вегетации (таблица 1).

Таблица 1.

Влияние циркона на рост и приживаемость растений-регенерантов тополя, адаптированных к условиям почвы

Регенерантные линии	Опыт		Контроль	
	Высота побега, см	Приживаемость, %	Высота побега, см	Приживаемость, %
Тг/ск	14,5±1,40	96,7±1,30	10,6±2,10	90,0±1,02
1-03/ск	14,8±1,20	98,3±1,40	12,3±1,40	88,3±1,20
Е/с	12,9±1,20	91,6±1,04	9,0±2,20	81,7±1,60
Среднее	14,1±0,3	95,5±1,0	10,6±0,5	86,7±1,3

Примечание: представлены средние значения высот двухмесячных растений-регенерантов, их приживаемости в грядке теплицы.

Согласно литературным данным, циркон стимулирует рост и развитие растений, компенсируя природные регуляторы роста. Есть данные, что биологическая активность циркона определена также выраженными оксидантными свойствами [5,9].

В наших исследованиях для всего экспериментального материала отмечены высокие показатели приживаемости (в среднем 91,1%) с заметным превышением данного показателя в опытном варианте относительно контрольного (95,5% против 86,7%, соответственно). Выявленное увеличение приживаемости экспериментального материала в опытном варианте подтверждает эффективность использования биопрепарата циркона на этапе адаптации клонированных растений к условиям нестерильной почвы теплицы.

При этом не отмечено проявления фенотипических отклонений ни у одной из регенерантных линий тополя. В целом все высаженные растения характеризовались развитием морфотипа, характерного исходным клонам (рисунок 2).

Интегральным показателем положительного воздействия на растения регуляторов роста является изменение ростовых характеристик. Как показано в таблице 1 через 2 месяца адаптации растений-регенерантов тополя к условиям почвы в теплице отмечается их активный рост в обоих вариантах. Однако, средние показатели высот растений, обработанных цирконом (14,1 см) в 1,3 раза выше таковых контрольного варианта (10,6 см).

Рис. 2. Общий вид двухмесячных растений регенерантных линий тополя в теплице: a, b – контрольный вариант (без обработки цирконом), c, d – опытный вариант (с обработкой цирконом).

Межклоновые различия в реакциях на действие циркона (варьирование высоты растений-регенерантов) отмечены, как в опытном варианте, так и в контрольном в пределах 12,9-14,8 см и 9,0-12,3см соответственно. Влияние циркона на вариабельность данного признака не столь очевидно. Данный эффект от одноразовой обработки растений биопрепаратом сохраняется на протяжении всего периода вегетации (рисунок 2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, экспериментально подтверждена способность биопрепарата циркона активизировать рост и развитие, повышать приживаемость клонированных растений в стрессовых условиях их адаптации *ex vitro*.

Показано полифункциональное действие циркона на растения-регенеранты тополя, одновременно стимулирующее их рост, развитие и повышающее показатель приживаемости с самого начала вегетации (скорость возобновления роста и развития опытного варианта в 1,6 раза больше контрольного). Данный эффект сохраняется на протяжении всего эксперимента. В конце вегетационного периода растения-регенеранты опытного варианта превышали контрольные по показателям линейного роста в высоту (14,1 см и 10,6 см соответственно) и приживаемости (95,5 и 86,7% соответственно).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Павлов И.Н. Глобальные изменения среды обитания древесных растений. – Красноярск: Сиб. ГТУ, 2003. – 156с.
2. Лебедев В.Г., Муратова С.А., Шестибратов К.А. Полевые испытания и коммерциализация биотехнологических форм лесных древесных растений // Лесоведение. – 2015. – № 5. – С. 388-397.
3. Munns R., Tester M. Mechanisms of salinity tolerance // Annu Rev Plant Biol. – 2008. –V. 59, №1. – P. 651-681.
4. Жигунов А.В. Применение биотехнологий в лесном хозяйстве России // Лесной журнал. – 2013. – №2. – С.27-35.
5. Будыкина Н.П., Титов А.Ф. Модификация реакций растений на действие неблагоприятных факторов внешней среды с помощью синтетического регулятора роста – циркона. // Структурные и функциональные отклонения от нормального роста и развития растений под воздействием факторов среды. Материалы муждународной конференции. 20-24 июня 2011 г. Петрозаводск. стр. 46-50.
6. Аминева Е.Ю., Табацкая Т.М., Машкина О.С. Оценка солеустойчивости Populus L. в условиях моделируемого стресса in vitro // Субтропическое и декоративное садоводство. – 2021. – № 79. – С. 60-66.
7. Tabatskaya T.M., Mashkina O.S., Korchagin O.M. In vitro modelling of salinity stress for the selection of stress-tolerant birch lines // E3S Web of Conferences. – 2020. – Vol. 224 : 04013.
8. Машкина О.С., Табацкая Т.М., Морковина С.С., Панявина Е.А. Выращивание посадочного материала тополя белого (*Populus alba* L.) на основе коллекции *in vitro* и оценка его себестоимости // Лесотехнический журнал. – Воронеж, 2016. – №1. – С. 28-44.
9. Прусакова Л.Д., Малеванная Н.Н., Белопухов С.Л., Вакуленко В.В. Регуляторы роста растений с антистрессовым и иммунопротекторными свойствами // Агрохимия 2005. №1. С. 76-86.

УДК 574.24

ВЛИЯНИЕ СВИНЦА НА ОКСИДАТИВНЫЙ СТАТУС БАКТЕРИЙ ИЗ РОДА *AZOSPIRILLUM*

Трандина В.А., Гуреева М.В.

Воронежский государственный университет, Воронеж
E-mail: *maryorl@mail.ru*

В данной работе были определены концентрации диеновых конъюгатов (ДК) и восстановленного глутатиона (GSH) в штаммах *Azospirillum brasilense* DSM 1690^{T}, *A. picis* DSM 19922^{T} без свинца и в его присутствии. Наличие тяжелого металла привело к повышению концентраций ДК и к понижению уровня GSH в исследуемых бактериях.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время загрязнение окружающей среды тяжёлыми металлами — глобальная проблема, которая влияет на состояние экосистем и здоровье человека. Благодаря горнодобывающей промышленности и другим промышленным и сельскохозяйственным методам тяжелые металлы (свинец, кадмий, мышьяк и т. д.) попадают в почву. Загрязнение почвы приводит к накоплению металлов в органах растений, что влечет за собой их миграцию в организм животных и, в конечном счете, человека [8, 12].

Известно, что тяжелые металлы индуцируют синтез активных форм кислорода (АФК) в живых организмах [7]. Повышение уровня АФК может негативно сказаться на клеточных функциях, вызывая разрушение мембран, окисление липидов, денатурацию белков, повреждение генетического материала и пигментов. Однако многие микроорганизмы проявляют специфическую устойчивость к некоторым ионам тяжелых металлов. После многих лет эволюции у микроорганизмов появились физиологические и химические механизмы, чтобы преодолеть их токсичность [6].

Есть данные о бактериях *Azospirillim* spp., обладающих толерантностью к воздействию тяжелых металлов. Были проведены различные исследования, результаты которых показали, что *A. brasilense* EMCC1454 может переносить стресс, вызванный Cr в концентрациях до 260 мкМ, *A. lipoferum* 137 толерантны к Pb и Cd, а *A. brasilense* Cd обладает высокой устойчивостью к As, так как был способен расти при содержании до 5 мМ As(V) и 250 мкМ As(III) [3, 5, 11]. В данной работе мы проверили уровень окислительного стресса в *A. brasilense* DSM 1690^T и *A. picis* DSM 19922^T в присутсвии Pb. В качестве маркеров окислительного стресса использовали диеновые конъюгаты (ДК) и восстановленный глутатион (GSH). ДК - первичные продукты перекисного окисления липидов, которые образуются в результате свободнорадикального окисления жирных кислот. Сульфгидрильная группа GSH играет важную роль в защите клеток от окислительного стресса: она связывается с металлом, нейтрализуя его.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являлись штаммы *Azospirillum brasilense* DSM 1690^T, *A. picis* DSM 19922^T. Все перечисленные штаммы культивировались на питательной среде следующего состава: $(NH_4)_2SO_4$ – 1,0 г/л, $MgSO_4 * 7H_2O$ – 1,0 г/л, $CaCl_2 * 2H_2O$ – 0,03 г/л, сукцинат натрия – 1,0 г/л, пептон – 2,0 г/л, дистиллированная вода – 1,0 л, набор витаминов и микроэлементов [4, 10], pH 7,5. Бактерии культивировались в колбах под ватно-марлевыми пробками в течение 3 дней при 29°С без свинца и в присутствии $Pb(NO_3)_2$ в концентрации 51 мг/л.

Предварительно осаженные с помощью центрифугирования при 11000 g в течение 10 мин и отмытые 0,1M Tris-HCl буфером pH 7,5 клетки разрушили под действием ультразвука при помощи ультразвукового дезинтегратора УЗДН-2Т (Академприбор, Россия). Супернатант был получен после центрифугирования гомогената при 11000 об/мин в течение 15 мин. Полученную надосадочную жидкость использовали для биохимического анализа. Концентрацию ДК определяли исходя из того, что в процессе полного окисления липидов на стадии образования свободных радикалов в молекулах полиненасыщенных жирных кислот образуется система сопряженных двойных связей, ассоциированная с появлением максимума в спектре поглощения при 233 нм [2]. Принцип метода определения концентрации GSH основан на способности его сульфгидрильной группы вступать в реакцию с реактивом Эллмана, при этом образуется тионитрофенильный анион, имеющий желтую окраску и максимум поглощения при 412 нм [1]. Белок определяли методом Лоури [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Диеновые конъюгаты являются первичными продуктами перекисного окисления липидов, относятся к токсичным метаболитам, которые оказывают повреждающее действие на липопротеиды, белки, ферменты и нуклеиновые кислоты. Диеновая конъюгация является показателем степени выраженности процессов перекисного окисления липидов. В нашей работе у обоих исследованных штаммов, *A. brasilense* DSM 1690^{T} и *A. picis* DSM 19922^{T}, концентрация ДК увеличилась в 1,5–2 раза в присутствии свинца (рис. 1).

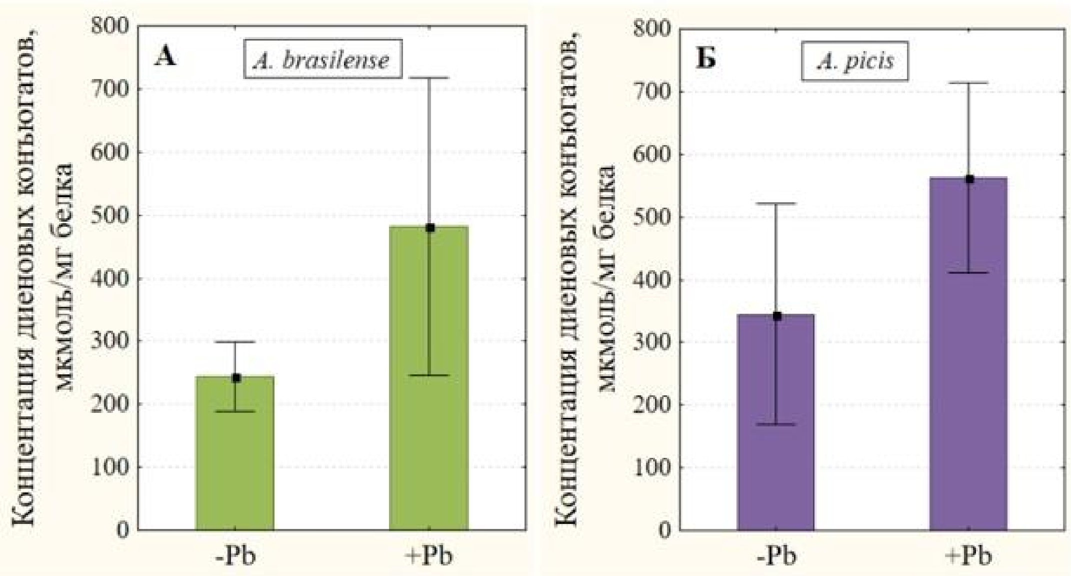


Рис. 1. Концентрация диеновых конъюгатов у *A. brasilense* (А) и *A. picis* (Б) без свинца и в его присутствии. Столбцы отражают значение концентрации диеновых конъюгатов в мкмоль/мг белка.

Однако уровень GSH, напротив, незначительно понизился в образцах со свинцом (рис. 2). Взаимодействие токсичных металлов с глутатионом (GSH) является важной частью механизма нейтрализации многих ионов. Когда GSH истощается под действием любого металла, системы синтеза начинают производить больше GSH из цистеина через гамма-глутаминовый цикл. Однако, если истощение продолжается из-за постоянного воздействия металлов, GSH поступает неэффективно [7].

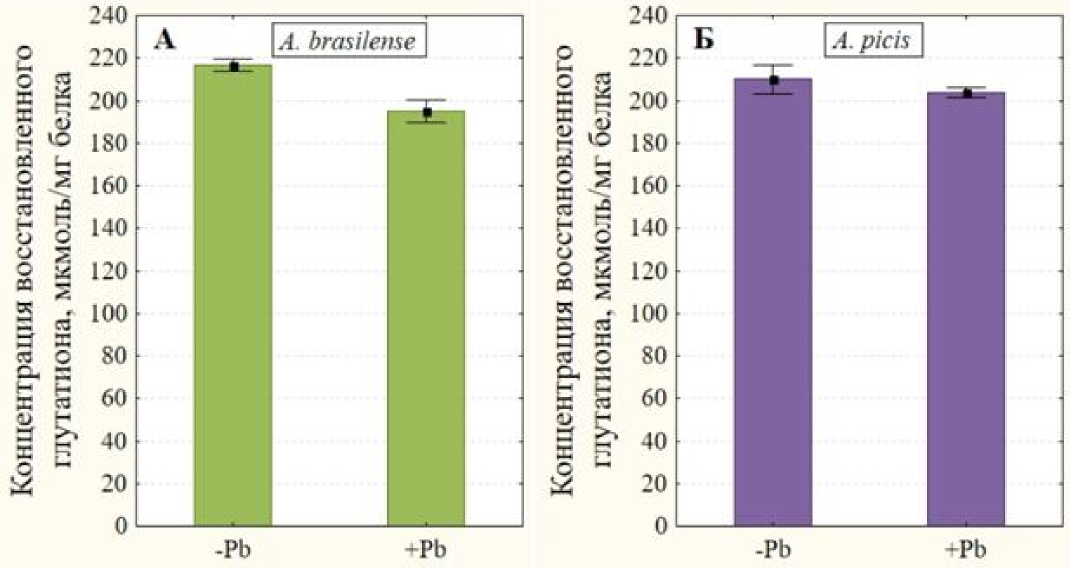


Рис. 2. Концентрация восстановленного глутатиона у *A. brasilense* (А) и *A. picis* (Б) без свинца и в его присутствии. Столбцы отражают значение концентрации восстановленного глутатиона в мкмоль/мг белка.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, судя по маркерам окислительного стресса можно сделать вывод, что свинец оказывает влияние на оксидативный статус бактерий, вызывая окислительный стресс, сопровождающийся перекисным окислением липидов и понижением концентрации GSH.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Брусков В.И. Образование активных форм кислорода под действием тепла при восстановлении растворённого кислорода воздуха / В.И. Брусков, Ж.К. Масолимов, А. В. Черников // Доклады Академии Наук. – 2001. – Т. 381, № 2. – С. 262–264.
2. Стальная И.Д. Метод определения диеновой коньюгации ненасыщенных высших жирных кислот / И.Д. Стальная // Современные методы в биохимии / Под ред. В. Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1972. – С. 63–64.
3. Belimov A. A. Employment of rhizobacteria for the inoculation of barley plants cultivated in soil contaminated with lead and cadmium / A. A. Belimov [et al.] // Microbiology. - 2004. - Vol. 73. - P. 99–106.
4. Caraway B. H. Aerotaxis in Spirillum volutans / B. H. Caraway, N. R. Krieg // Canadian Journal of Microbiology. – 1974. – Vol. 20. – P. 1367–1377.
5. El-Ballat E. M. Metal-Resistant PGPR Strain Azospirillum brasilense EMCC1454 Enhances Growth and Chromium Stress Tolerance of Chickpea (Cicer arietinum L.) by Modulating Redox Potential, Osmolytes, Antioxidants, and Stress-Related Gene Expression / E. M. El-Ballat [et al.] // Plants. - 2023. - Vol. 12. - P. 2110.

6. Huertas M. J. Metals in Cyanobacteria: Analysis of the Copper, Nickel, Cobalt and Arsenic Homeostasis Mechanisms / M. J. Huertas [et al.] // Life. - 2014. - Vol. 4. - P. 865–886.
7. Hultberg B. Interaction of metals and thiols in cell damage and glutathione distribution: potentiation of mercury toxicity by dithiothreitol / B. Hultberg [et al.] / / Tox. - 2001. - Vol. 156. - P. 93–100.
8. Li Y. Enrofloxacin at environmentally relevant concentrations enhances uptake and toxicity of cadmium in the earthworm Eisenia fetida in farm soils / Y. Li [et al.] // J. Hazard. Mater. - 2016. - Vol. 308. - P. 312–320.
9. Lowry O.H., Rosenbrough N., Farr A., Randall R.J. Protein measurement with the folin pihenold reagent // The Journal of Biological Chemistry. – 1951. – V. 193. – P. 265–75.
10. Pfennig N. Ьber das Vitamin B12-Bedьrfnis phototropher Schwefelbakterien / N. Pfennig, K. D. Lippert // Archiv. Mikrobiol. – 1966. – Vol. 55. – P. 245–256.
11. Vezza M. E. Biochemical and molecular characterization of arsenic response from Azospirillum brasilense Cd, a bacterial strain used as plant inoculant / M. E. Vezza [et al.] // Environ Sci Pollut Res. - 2020. - Vol. 27. - P. 2287–2300.
12. Wahid A. Cadmium phytotoxicity: responses, mechanisms and mitigation strategies: a review / A. Wahid [et al.] // Organic Farming, Pest Control and Remediation of Soil Pollutants. - 2009. - P. 371–403.

УДК 579.62

ВЛИЯНИЕ ИНТЕРФЕРОНА НА КИШЕЧНУЮ МИКРОБИОТУ БРОЙЛЕРОВ НА ФОНЕ ИММУНОСУПРЕССИИ

Трапезникова Е.И. [1], Плютина О.А. [1], Антоненкова А.А. [1], Михайлов Е.В. [3], Сыромятников М.Ю.[1,2]

[1] *Воронежский государственный университет, Воронеж*
[2] *Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж*
[3] *Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии, Воронеж*
E-mail: *mihan.vrn@mail.ru*

Проведен сравнительный анализ относительной обильности различных бактериальных филумов у экспериментальных групп, подвергнутых воздействию циклофосфомида для индукции иммуносупрессии. Исследование показало значимые изменения в составе микробиома. Эти изменения свидетельствуют о нарушении микробиологического баланса и возможном повышении рисков для здоровья птицы. В одной из групп применяли интерферон для коррекции состояния. Было установлено, что применение интерферона заметно снижает рост числа потенциально патогенных микроорганизмов на фоне иммуносупресии.

ВВЕДЕНИЕ

Жёлудочно-кишечный тракт домашней птицы является средой обитания около 400 видов бактерий. Основополагающими представителями микрофлоры желудочно-кишечного тракта являются такие бактерии, как бифидобактерии, лактобактерии и бактероиды, составляющие около 90% нормальной микрофлоры [4]. Интенсификация птицеводства повышает продуктивность, но также увеличивает чувствительность к стрессам, что может отрицательно сказаться на здоровье птиц и экономике отрасли [1].

Иммунодефицит у сельскохозяйственных птиц представляет собой серьезную проблему, снижающую устойчивость организма к патогенным микробам. Причинами могут быть генетическая предрасположенность, неблагоприятные условия и недостаток витаминов. Это приводит к высокой чувствительности к инфекциям и замедлению роста [2].

Иммуносупрессия — подавление активности иммунной системы из-за болезней, стресса или плохого питания — также снижает нагрузку на функции организма [3]. Применение интерферонов может играть роль при пониженном иммунитете, так как они усиливают стабилизацию. Однако лечение должно проводиться под контролем врача, так как его эффективность зависит от состояния иммунной системы перед началом терапии [5].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили образцы содержимого кишечника бройлеров (*Gallus gallus domesticus*) возраста 16 суток. Бройлеры были поделены на группы: «Контроль», «Циклофосфомид» (бройлеры, которым внутрибрюшинно вводили циклофосфомид), «Интерферон» (бройлеры, которым внутрибрюшинно вводили циклофосфомид и интерферон). Циклофосфомид использовали для моделирования иммуносупрессии.

Выделение ДНК осуществляли комплектом реагентов ПРОБА-ГС (ДНК-технология, Россия).

ПЦР-анализ проводили на приборе «Bio-Rad CFX96TM Real-Time System» с добавлением красителя SYBR Green. В пробирке объемом 0,2 мл смешивались следующие компоненты: деионизированная вода – 12 мкл; ДНК-матрица – 2 мкл; прямой праймер – 1 мкл; обратный праймер – 1 мкл; 5X qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) – 4 мкл. Был использован следующий температурный цикл: первоначальный прогрев при 95 °C – 2 мин; 39 циклов вида: денатурация при 95 °C в течение 30 сек; отжиг праймеров при 51 °C в течение 30 сек; элонгация цепи при 72 °C в течение 45 сек; инкубирование смеси при 72 °C в течение 5 мин. Для анализа микробиома использовали праймеры согласно Yun-Wen Yang, 2015.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Был проведен анализ бактериальных филумов с помощью ПЦР в реальном времени.

На рисунке 1 показана относительная обильность бактерий *Bacteroidetes*.

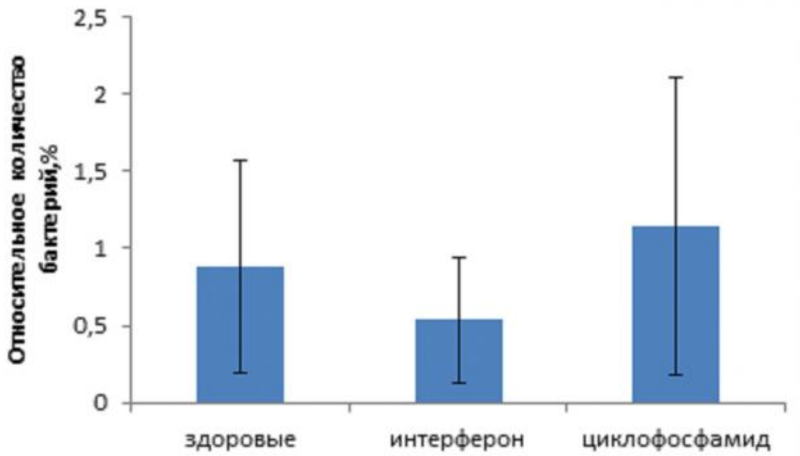


Рис. 1. Относительная обильность филума *Bacteroidetes*. *- различия статистически достоверны (p<0,05).

Наблюдали тенденцию уменьшения на 40% бактерий филума *Bacteroidetes* у группы интерферон и тенденцию увеличения на 30% количества бактерий этого филума у группы циклофосфамид.

На рисунке 2 показана относительная обильность бактерий филума *Actinobacteria*.

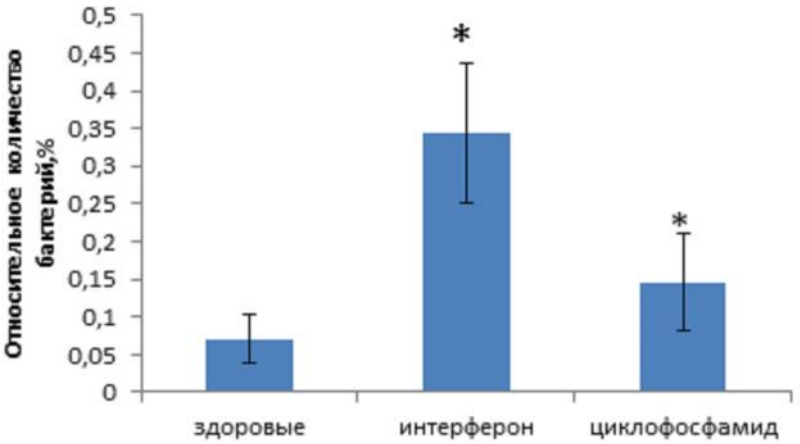


Рис. 2. Относительная обильность филума *Actinobacteria*. * - различия по отношению к группе «Здоровые» статистически достоверны (p<0,05).

Наблюдается увеличение количества бактерий филума *Actinobacteria* у группы интерферон в 5 раз, и у группы циклофосфамид в 2 раза. На рисунке 3 показана относительная обильность филума *Deferribacteres*.

На 80% уменьшилось относительное содержание филума *Deferribacteres* у группы циклофосфамид.

На рисунке 4 показана относительная обильность филума *Saccharibacteria*.

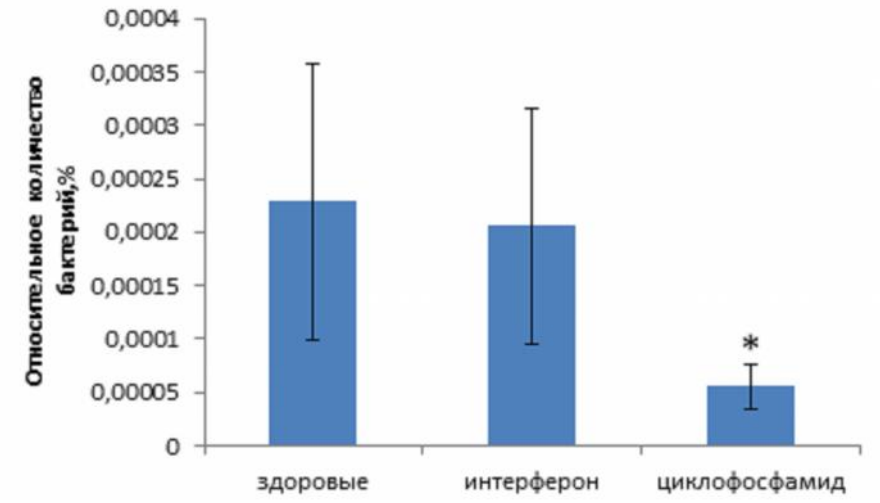


Рис. 3. Относительная обильность филума *Deferribacteres*. *- различия по отношению к группе «Здоровые» статистически достоверны ($p<0,05$).

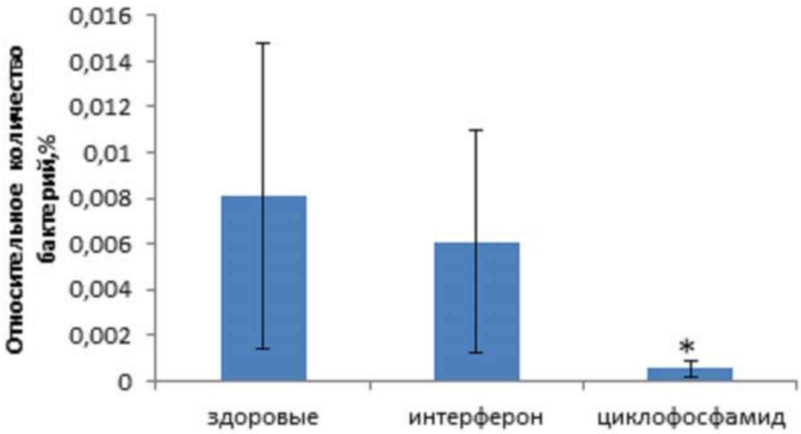


Рис. 4. Относительная обильность филума *Saccharibacteria*. *- различия по отношению к группе «Здоровые» статистически достоверны ($p<0,05$).

Наблюдалось снижение на 93 % у группы циклофосфамид бактерий филума *Saccharibacteria.*

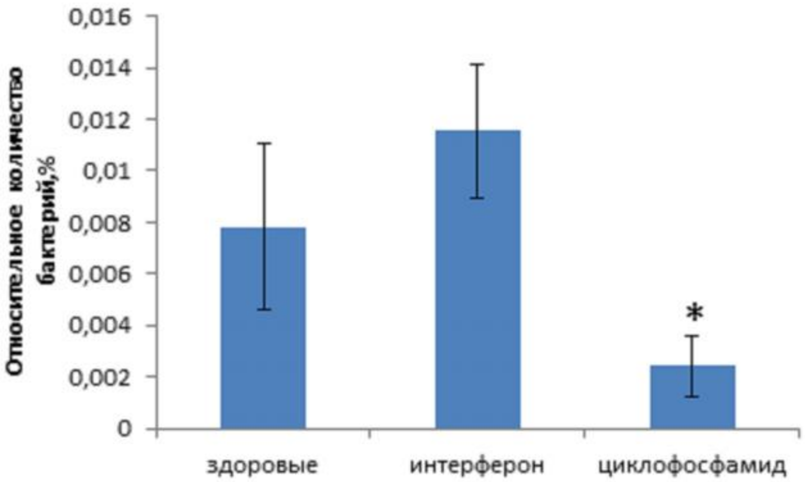


Рис. 5. Относительная обильность филума *Verrucomicrobia*. *- различия по отношению к группе «Здоровые» статистически достоверны ($p<0,05$).

На рисунке 5 показана относительная обильность филума Verrucomicrobia.

Было показано, что на 70% снижается содержание *Verrucomicrobia* у группы циклофосфамид по отношению к группе «Здоровые».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Были выявлены изменения в микробиоме в группах «Интерферон» и «Циклофосфамид». Применение интерферона может снизить риск воспалительных процессов и их последствий. У группы «Интерферон» зафиксировано пятикратное увеличение *Actinobacteria*, тогда как у группы циклофосфамида — двукратное, что положительно сказывается на нормальной микрофлоре. Численность *Deferribacteres* снизилась в группе «Циклофосфамид», что может отражать воспалительные процессы в кишечнике, в группе «Интерферон» изменений не отмечено. Снижение *Verrucomicrobia* в группе «Циклофосфамид» может сигнализировать об изменениях в функционировании слизистого барьера кишечника.

Таким образом, исследование демонстрирует, что интерферон способен влиять на качественный и количественный состав микробиома кишечника птицы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lebedev S. Cytokine and immunoglobulin profiles of Arbor Acres broiler chickens at different stages of physiological development / S.Lebedev, T. Kazakova, O.Marshinskaia // Vet World.- 2024. - 17(5) – P.988-993.
2. Li C. Editorial: Immunosuppressive disease in poultry/ C.Li, L. Wang, S.Zheng. / / Front Immunol. – 2023. – 14 – P.1215513.
3. Nazar F.N. The immune-neuroendocrine system, a key aspect of poultry welfare and resilience / F.N. Nazar, I. // Estevez *Poult Sci*. – 2022. – 101(8) – P. 101919.
4. Алексеева И.И. Изменения кишечной микрофлоры у бройлеров под воздействием пробиотических бактерий / И.И. Алексеева // Журнал микробиологии и биотехнологии. – 2018. – 34(2)– С. 45-52.
5. Денисов Л. А. Открытие интерферона и его клиническое применение / Л. А. Денисов, И. В. Шолохов // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. – 2017. – № 1(18). – С. 23-31

УДК 630*4

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ КАК ОСНОВА ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ УСТОЙЧИВЫХ ДЕРЕВЬЕВ ЯСЕНЯ ОБЫКНОВЕННОГО *(FRAXINUS EXCELSIOR)*

Усачева Р.В.

ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии», Воронеж

E-mail: *Rima.usa@yandex.ru*

Ясень обыкновенный - одна из самых ценных лиственных пород европейской части России - оказался подвержен заражению инвазивным видом изумрудной златки (*Agrilus planipennis)*. Группа исследователей, изучив устойчивые к златке ясени, выделила гены, которые контролируют синтез защитных веществ. Используя такой подход, можно сохранить популяции ясеней, применив межвидовую гибридизацию, геномное редактирование и селекцию для создания ясеней, устойчивых к златке.

ВВЕДЕНИЕ

Ясень обыкновенный *(Fraxinus excelsior)* - является одной из самых ценных лиственных пород европейской части России. Его можно встретить в лесах и парках, в посадках вдоль автомобильных и железных дорог. Родина ясеня обыкновенного — это Европа и Закавказье. В России он произрастает в Европейской части, в Поволжье, Центрально-Черноземном районе и на Северном Кавказе в широколиственных и смешанных лесах, чаще на опушках или светлых полянах. Благодаря своей упругой древесине и мощной корневой системе, которая скрепляет частички почвы - это главная порода в лесозащитных полосах, ветрозащите и мелиорации. Древесина ясеня обыкновенного обладает ценными характеристиками и не уступает древесине дуба по твердости, богатству текстуры и прочности. Поэтому применяется в производстве дорогой мебели, паркетов, деталей машин и самолетов. А такое свойство, как упругость, подходит для производства спортивного инвентаря. В то же время ясень очень декоративен, поэтому широко применяется в озеленении населенных пунктов, в садово-парковых ансамблях, аллейной посадке.

Стойкость ясеня к внешним воздействиям определяет возможность его высадки на уплотнённых почвах, в местах загрязнения воздуха пылью, копотью, вредными газами — в городских садах, парках, вдоль железных дорог [1].

Но завезенная из Восточной Азии изумрудная златка (*Agrilus planipennis)* представляет серьезную угрозу для европейских ясеней *(Fraxinus excelsior)*, не приспособленных к противоборству с этим инвазивным вредителем.

ОБСУЖДЕНИЕ

В России популяция златки изумрудной быстро распространилась на ряд областей - это Белгород, Брянск, Владимир, Волгоград, Воронеж, Калуга, Курск, Липецк, Москва, Орёл, Рязань, Смоленск, Тамбов, Тула, Тверь, Ярославль. Так, в Воронежской области, по данным реестров Государственного Лесопатологического Мониторинга (ГЛПМ), площади, поврежденные златкой (чистые и смешанные насаждения), составляют почти 13 тыс. га, из которых погибшие насаждения занимают около 400 га [2, 3, 4].

Повреждение заражённых деревьев происходит в результате питания личинок. Самки откладывают яйца в щели и трещины коры, поэтому им необходима полноценная, сформированная и достаточно толстая кора уже взрослых деревьев. Личинки питаются древесиной под корой ясеня (*Fraxinus*) в течение одного-двух лет. Яйца мелкие овальные, 1 Ч 0,6 мм. Длина кремово-белых личинок значительно превосходит размер имаго и достигает 3 см (от 26 до 32 мм). Они прогрызают флоэму и питаются сосудистым камбием, нарушая транспортировку сахаров и воды [5]. Змеевидные кормовые ходы личинок эффективно опоясывают и тем самым убивают дерево, поскольку оно больше не может транспортировать достаточное количество воды и питательных веществ к листьям, чтобы выжить [6, 7].

Одним из способов сохранения насаждений ясеня европейского (*Fraxinus excelsior*), может стать создание деревьев, устойчивых к повреждению златкой. На Дальнем Востоке и севере Восточной Азии, существуют виды ясеней, которые обладают устойчивостью к изумрудной златке. Так как они эволюционировали вместе с изумрудной златкой и приспособились сосуществовать с ней. Изумрудные златки (A*grilus planipennis*), широко распространенные на востоке России и Китая, в своём естественном ареале обычно поражают старые и больные ясени, при этом не затрагивая здоровые деревья [8,9,10]. Чтобы выявить виды ясеней, устойчивых к узкотелой изумрудной златке (*Agrilus planipennis*), ученые использовали метод прикрепления к их коре яиц этой златки и наблюдали за развитием и состоянием подопытных деревьев. У устойчивых видов ясеня наблюдали гибель личинок, когда те проникали в их стволы, а восприимчивые сами погибали от внутренних поражений, которые наносили растущие насекомые [11,12]. Таким методом было выявлено шесть устойчивых к вредителю видов ясеня, при этом все они родом из Восточной Азии. Это плосконожковые, китайские, манчжурские ясени и еще три других вида азиатских ясеней, которые "не позволили" личинкам достичь последних стадий развития. Изучив генеалогические взаимоотношения 26 видов и подвидов ясеней, исследователи пришли к выводу, что некоторые из устойчивых видов азиатских ясеней оказались ближайшими родственниками уязвимых видов из Европы [13,14]. Так же было выявлено, что способность противостоять изумрудной златке трижды независимо возникала в роде *Fraxinus*. Это дает надежду на создание гибридных ясеней, которые могут спасти популяции этих деревьев, а так же позволит ученым найти гены устойчивости. Авторами были выявлены похожие места в генетических последовательностях резистентных видов, которые отличались от таковых в восприимчивых. И таким методом были обнаружены гены, связанные с устойчивостью к действиям насекомых - вредителей [15, 16, 17]. Всего молекулярными генетиками было изучено 53 гена-кандидата, которые, возможно, помогают азиатским ясеням обороняться от жуков. Из них 48 генов независимо возникли в трех эволюционных линиях. Семь генов участвуют в синтезе защитных веществ фенилпропаноидов – активных против насекомых - вредителей, а еще семнадцать связаны с распознаванием вредных насекомых, и передачей защитных сигналов для активации генов, контролирующих выработку фенилпропаноидов [17, 18, 19]. Выявление генетической основы признака устойчивости деревьев к насекомым – вредителям, его молекулярное маркирование способствует селекционному процессу.

Виды ясеней, произрастающие в европейской части России и в Восточной Европе, сталкиваются еще с дополнительной угрозой в виде аскомицетового гриба *Hymenoscyphus fraxineus*. Это патогенный вид грибов, входящий в род *Hymenoscyphus*, входящий в порядок Гелоциевые, который вызывает грибковое заболевание - суховершинность у ясеня. Гриб был впервые научно описан в 2006 году под названием *Chalara fraxinea*. В 2009 году было обнаружено, что *Chalara fraxinea* является бесполой стадией гриба, который впоследствии был назван *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, а затем переименован в *Hymenoscyphus fraxineus*. *H. fraxineus* является возбудителем смертельного заболевания ясеня, известного как усыхание ясеня, названного так из-за усыхания кроны, вызванного этим заболеванием [20]. Симптомы заболевания проявляются на стволах, ветках и побегах ясеня в виде темных вытянутых некротических пятен, которые могут расширяться и окольцовывать побеги, что приводит к увяданию листьев и усыханию побегов, особенно на верхушке дерева. На стволах деревьев пятна имеют характер язв, однако выделение экссудата не наблюдалось. Спороношения на поверхности пораженных органов также не обнаруживали. При продольном и радиальном рассечении пораженных участков видна ксилема, окрашенная в серый или иногда в коричневатый цвет. Отмечались случаи гибели деревьев, а также хроническая форма болезни. Болезнь быстро распространяется по континенту и в настоящее время возбудитель обнаружен в России, Западной и Восточной Европе. Деревья европейского ясеня, заражённые *H. fraxineus*, по оценкам, погибают в 85% случаев на плантациях и в 69% случаев в лесных массивах [21]. В первую очередь это затронуло популяции европейского или обыкновенного ясеня (*Fraxinus excelsior).* Кроме ясеня обыкновенного (*Fraxinus excelsior*) патоген поражает ясень узколистный (*F. angustifolia*) [22].

Генетика может стать важным инструментом в борьбе с угрозами, которые представляют инвазивные вредители и патогены. Выявление, анализ и идентификация генов, учавствующих в механизмах регуляции защиты от насекомых-вредителей и грибов-патогенов и, их кодирующих областей, способствуют осуществлению селекции на устойчивость деревьев к болезням. Европейский ясень (*F. excelsior*) на сегодняшний день обладает самым непрерывным и хорошо аннотированным геномом среди ясеней, состоящим из 89 514 ядерных каркасов и 38 852 генов, кодирующих белки [23]. Геномы, аннотированные на уровне каркасов или контигов, также доступны для 26 других видов *Fraxinus*. Изучено влияние стрессовых факторов на экспрессию генов у деревьев, и 1201 молекулярный маркер стрессоустойчивости у ясеня пансильванского. Проведено исследование генетических связей ясеня пансильванского и европейского [24]. Выявление молекулярной конвергенции может быть эффективным подходом к обнаружению локусов, лежащих в основе адаптивных признаков, которые независимо развивались в разных линиях. В пределах рода *Fraxinus* (ясень) низкая восприимчивость к грибковому патогену *Hymenoscyphus fraxineus*, возбудителю эпидемии усыхания ясеня (ADB), наблюдается в трёх независимых линиях известных или вероятных естественных хозяев [25]. Виды ясеня по всему миру различаются по уровню восприимчивости к данным вредителям и патогенам, и межвидовая гибридизация ясеней может позволить передавать устойчивость между видами. Для селекции и создания устойчивых к болезням межвидовых гибридов ясеня необходимо использовать это генетическое разнообразие, точно идентифицировать виды ясеня со всего мира. Но многие виды ясеня трудно идентифицировать только по морфологическим признакам, это приводит к ошибочной их маркировке в живых коллекциях. Для решения данного вопроса группой исследователей была разработана система генетического штрих-кодирования видов ясеня и проведена серия экспериментов по гибридизации европейского ясеня с другими видами. Удалось получить десять широколистных гибридных растений: два гибрида *F. Pennsylvanica * F. excelsior* и восемь гибридов *F. Ornus *F. Excelsior и F. latifolia.* F. Excelsior.* По одному гибриду из каждого скрещивания пережили естественное заражение патогеном, вызывающим усыхание ясеня. Эти открытия способствуют сохранению глобального разнообразия видов ясеней в ответ на появление чужеродных вредителей и патогенов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты позволяют предположить, что для сохранения европейских ясеней, подверженных риску поражения изумрудной златкой и патогенными грибами, можно будет применить редактирование генома, межвидовую гибридизацию и последующую селекцию. Воспользовавшись данными методами, можно предотвратить вымирание этих деревьев и восстановить их популяции в районах, которые уже пострадали от нашествия инвазивных патогенов и вредителей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Базарбаева С.Биологические особенности ясеня обыкновенного (*Fraxinus excelsior*)/ С. Базарбаева, Г. Серекеева //Мировая наука. – 2021. – №. 7 (52). – С. 10-12.

2. Касаткин Д. Г. К распространению ясеневой изумрудной узкотелой златки (*Agrilus planipennis)* (*Coleoptera: Buprestidae*) на юге Ростовской области / Д.Г. Касаткин, Э.А. Хачиков, Д.П. Купрюшкин //Экосистемы. – С. 33.

3. Романчук Р. В. К распространению ясеневой изумрудной узкотелой златки (*Agrilus planipennis*)(*Coleoptera: Buprestidae*) на юге Ростовской области /Р.В. Романчук и др. //Экосистемы. – 2022. – №. 32. – С. 33-41.

4. Селиховкин А. В. Ясеневая изумрудная узкотелая златка (*Agrilus planipennis)* в Санкт-Петербурге в 2022 году / А.В. Селиховкин и др. //Леса России: политика, промышленность, наука, образование. – 2022. – С. 317-319.

5. Лапина Е. Ю. Влияние климатических условий на онтогенез ясеневой изумрудной узкотелой златки/ Е.Ю. Лапина, В.А.Пернацкая //Математисеские модели техники, технологий и экономики. – С. 25.

6. Valenta V. A new forest pest in Europe: a review of Emerald ash borer (*Agrilus planipennis*) invasion / V. Valenta et al. // Journal of Applied Entomology. — 2016. — Vol. 141. — P. 507—526.

7. Wang Xiao-Yi. The biology and ecology of the emerald ash borer, *Agrilus planipennis*, in China/ Xiao-Yi Wang // Journal of Insect Science. — 2010. — Vol. 10. - P. 97—116.

8. Сергеева Е. С. Экологические последствия инвазии ясеневой изумрудной узкотелой златки (*Agrilus planipennis)* на территорию Нижнего Поволжья/ Е.С. Сергеева //Куражсковские чтения. – 2023. – С. 18-21.

9. Хляп Л. Самые опасные инвазионные виды России/Л. Хляп, Ю. Дгебуадзе, В. Петросян //Сборник инвазивных видов. – Litres. - 2022.

10. Baranchikov Y. N. Changes in Climatic Range of the Emerald Ash Borer *Agrilus planipennis Fairmaire (Coleoptera: Buprestidae*) in the Northern Hemisphere/ Y. N.Baranchikov, N. Y. Dobrolyubov, S. M. Semenov //Russian Journal of Biological Invasions. – 2024. – Т. 15. – №. 4. – С. 480-490.

11. Poland T. M. Review of the emerald ash borer (Coleoptera: Buprestidae), life history, mating behaviours, host plant selection, and host resistance/T.M. Poland et al. //The Canadian Entomologist. – 2015. – Т. 147. – №. 3. – С. 252-262.

12. Showalter D. N. Resistance of European ash (*Fraxinus excelsior*) saplings to larval feeding by the emerald ash borer (*Agrilus planipennis*)/ D. N. Showalter, R. J. Saville et al. // Plants, People, Planet. — 2020. — Vol. 2. — P. 41—46.

13. Plumb W. J. Genetic barcodes for ash *Fraxinus species* and generation of new wide hybrids W. J. Plumb et al. / //bioRxiv. – 2024. – С. 958 – 1010.

14. Sollars E. S. A. Genome sequence and genetic diversity of European ash trees/ E. S. A. Sollars et al. //Nature. – 2017. – Т. 541. – №. 7636. – С. 212-216.

15. Duan J. J. Progress and challenges of protecting North American ash trees from the emerald ash borer using biological control/ J. J. Duan et al. //Forests. – 2018. – Т. 9. – №. 3. – С. 142.

16. Huff M. A high quality reference genome for *Fraxinus pennsylvanica* for ash species restoration and research / M.Huff et al. //Molecular ecology resources. – 2022. – Т. 22. – №. 4. – С. 1284-1302.

17. Kelly L. J. Convergent molecular evolution among ash species resistant to the emerald ash borer/ L. J. Kelly et al. //Nature ecology & evolution. – 2020. – Т. 4. – №. 8. – С. 1116-1128

18. Kelly L. J. Genes for ash tree resistance to an insect pest identified via comparative genomics/ L. J. Kelly et al. //bioRxiv. – 2019. – С. 772 – 913.
19. Kelly L. J. Analysis of the giant genomes of *Fraxinus* indicates that a lack of DNA removal characterizes extreme expansions in genome size/ L. J. Kelly et al. //New Phytologist. – 2015. – Т. 208. – №. 2. – С. 596-607.
20. Bakys R. Investigations concerning the role of Chalara fraxinea in declining Fraxinus excelsior/ R. Bakys et al. //Plant pathology. – 2019. – Т. 58. – №. 2. – С. 284-292.
21. Nielsen L. R. The susceptibility of Asian, European and North American Fraxinus species to the ash dieback pathogen Hymenoscyphus fraxineus reflects their phylogenetic history/ L. R. Nielsen et al. //European Journal of Forest Research. – 2017. – Т. 136. – С.59-73.
22. Bakys R. Occurrence and pathogenicity of fungi in necrotic and non-symptomatic shoots of declining common ash (Fraxinus excelsior) in Sweden/ R. Bakys et al. //European Journal of Forest Research. – 2019. – Т. 128. – С. 51-60.
23. Sollars E. S. A. Genome sequence and genetic diversity of European ash trees/ E. S. A. Sollars et al. //Nature. – 2017. – Т. 541. – №. 7636. – С. 212-216.
24. Kowalski T. Virulence of Hymenoscyphus albidus and H. fraxineus on Fraxinus excelsior and F. pennsylvanica /T. Kowalski, P. Bilacski, O. Holdenrieder //PloS one. – 2015. – Т. 10. – №. 10. – С.141-192.
25. Nielsen L. R. The susceptibility of Asian, European and North American Fraxinus species to the ash dieback pathogen Hymenoscyphus fraxineus reflects their phylogenetic history/ L. R. Nielsen et al. //European Journal of Forest Research. – 2017. – Т. 136. – С. 59-73.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ В ОРГАНИЗМЕ КОШЕК, ИНФИЦИРОВАННЫХ ВИРУСОМ ЛЕЙКОЗА КОШАЧЬИХ

Нургелдиева Р.[1], Гурбанова М.[1], Мамедов Ш., Федосов Д.В.[2]

[1] *Воронежский государственный университет, Воронеж*

[2] *Центр «Племген» Воронежский государственный аграрный университет, Воронеж*

E-mail: *f_dmitri@mail.ru*

Инфицирование животных вирусом лейкоза кошачьих (ВЛК) приводит к патологическим изменениям в количественном и качественном составе клеток крови в зависимости от продолжительности и тяжести воспалительного процесса и стадии инфицирования. Нарушение работы некоторых органов и систем, жизнедеятельности и функциональной активности их клеток, связанные, в том числе, с физиологическими особенностями кошачьих, отражаются в изменениях показателей метаболизма животных.

ВВЕДЕНИЕ

Вирусный лейкоз у кошек или вирусная лейкемия – инфекционное заболевание, поражающее иммунную систему, органы кроветворения и вызывающее рост опухолей [1]. Патология может протекать скрыто, подавляя резистентность организма и маскируясь под инфекции, возникшие на фоне иммуносупрессии (угнетения иммунитета). Кроме того, кошка становится носителем вируса, выделяет его во внешнюю среду, заражая других животных. ВЛК инфицирует преимущественно иммунокомпетентные клетки, такие как лейкоциты крови, клетки лимфоидных органов (лимфоузлы, селезенка и другие), а так же иммунные клетки в органах (тканевые макрофаги, например клетки Купфера в печени).

При остром воспалительном процессе иммунного ответа наблюдается увеличение количества некоторых типов лейкоцитов, в частности лимфоцитов и эозинофилов. Первые из них отвечают за иммунный ответ, выделяют антитела, регуляторы иммунного ответа (цитокины, медиаторы воспаления), вторые в своих гранулах содержат активные белки, обладающие цитотоксическим действием против зараженных клеток, цитокины иммунного ответа и другие.

Активация иммунитета в процессе воспалительной реакции в ответ на инфицирование вирусом лейкоза кошачьих приводит к усилению метаболизма с синтезом специфических белковых молекул, таких как иммуноглобулины (антитела, медиаторы воспаления, факторы роста отдельных иммунокомпетентных клеток, цитокинов), обеспечение высокоэнергетических молекул для обеспечения энергией необходимых биохимических реакций.

В то же время, в начале воспалительной реакции и иммунного ответа синтезируются вещества активаторы, такие как простагландины и лейкотриены — производные арахидоновой кислоты. Арахидоновая кислота является одним из основных строительных элементов клеточной мембраны в соединении с холестеролом. Для кошек, как высокоорганизованных хищников, арахидоновая кислота является незаменимой, и они получают ее только извне, с пищей [2]. Во время острой стадии воспалительной реакции у животных снижен аппетит и поступление необходимых питательных веществ нарушено. Для восполнения необходимых молекул организм использует внутренние резервы, в частности, источником арахидоновой кислоты могут служить сложные эфиры холестерола и жирных кислот клеточной мембраны.

В результате инфицирования животных вирусом лейкоза кошачьих и последующего иммунного ответа с развитием воспалительной реакции в организме кошек происходят морфологические изменения клеток крови и биохимические показатели, которые отражают функциональные особенности органов и систем.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. Материалом для исследования являлись цельная кровь и сыворотка крови инфицированных и не инфицированных вирусом лейкоза кошачьих животных.

Цельную кровь брали из лучевой вены в вакуумные пробирки с антикоагулянтом (K_2ЭДТА), сыворотку получали из крови, взятой из лучевой вены в вакуумные пробирки с активатором свертывания и разделительным гелем с последующим центрифугированием при 2500 об/мин в течение 10 минут.

Показатели состава крови исследовали при помощи автоматического гематологического анализатора Mindray BC-2800 vet с реагентами согласно инструкции производителя. Для определения форменных элементов крови делали мазок капли цельной крови объемом 10 мкл на подготовленном предметном стекле. После фиксации раствором метанола и высушивании на воздухе, мазок окрашивали при помощи набора для окрашивания Лейкодифф (Lachema, Чехия). Микроскопию проводили при помощи светового микроскопа Микроскоп МИКМЕД 5 (Микромед, Россия) под иммерсионным маслом при увеличении окуляр 10Х, объектив 100х1,25ми.

Подтверждение наличия вируса лейкоза в крови кошек проводили при помощи ПЦР на амплификаторе ДТПрайм (ДНК-Технология) в реальном времени с использованием диагностических тест-систем на определение ДНК-провируса лейкоза кошек (Фрактал Био, Россия).

Активность ферментов (аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза, щелочная фосфатаза, гамма-глутамилтрансфераза) и концентрацию метаболитов (мочевина, креатинин, холестерол, общий белок, альбумин) определяли в сыворотке крови на автоматическом биохимическом анализаторе DIRUI CS-300B с применением наборов для определения активности ферментов и метаболитов по инструкциям производителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе проведения молекулярно-генетического анализа (ПЦР в реальном времени) были отобраны образцы животных, инфицированных (20 особей) и неинфицированных (20 особей) вирусом лейкоза кошачьих.

В результате проведенных исследований выяснили, что основные биохимические показатели состояния органов и их систем, уровень метаболитов липидного и белкового обмена у животных, инфицированных вирусом лейкоза кошек, изменяются по сравнению с неинфицированными животными и с физиологическими нормами (Табл. 1).

Повышение основных трансаминирующих ферментов (АЛАТ, АСАТ, ГГТ) и ЩФ свидетельствует об интенсивных катаболических реакциях в условиях воспалительного стресса и снижения поступления питательных веществ извне. Нагрузка на клетки печени приводит к угнетению синтетической функции — снижение сывороточного альбумина, и нейтрализующей — повышение концентрации мочевины, как продукта распада аминокислот. Увеличение концентрации холестерола указывает на разрушение клеточной мембраны в результате цитолиза инфицированных клеток, а так же выделения из нее арахидоновой кислоты для продукции медиаторов воспаления.

Таблица 1.

Биохимические показатели сыворотки крови инфицированных и неинфицированных кошек

Показатель	Здоровые (20)	Больные (20)	Норма
АЛАТ (Ед/л)	52,5	125,7	10-55
АСАТ (Ед/л)	43,7	95,4	10-40
ЩФ (Ед/л)	55,4	425,6	12-55
ГГТ (Ед/л)	2,8	22,8	1-10
Мочевина (ммоль/л)	4,6	24,3	3-11,3
Креатинин (мкмоль/л)	89,5	248,5	35-165
Холестерол (ммоль/л)	3,7	10,6	1,3-6
Альбумин (г/л)	35,2	22,4	25-35
Общий белок (г/л)	77,4	57,8	43-75

В результате проведенных морфологических исследований животных с признаками, характерными для острого или хронического воспаления, выявили изменения в эритроцитарном составе крови (Табл. 2). Общее количество лейкоцитов у животных, инфицированных ВЛК, было разным: 2 животных были с признаками лейкоцитоза — 19,5х10^9 клеток и 18,4х10^9 клеток при физиологической норме 5,5-18х10^9 клеток; 2 животных с признаками лейкопении — 4,27х10^9 клеток и 5,1х10^9 клеток.

В составе форменных элементов крови (лейкоцитарная формула) обнаружили следующие изменения:

- у животных, инфицированных ВЛК, сдвиг в лимфоцитарном профиле — повышение относительного количества лимфоцитов до 65% при физиологической норме 20-45%, повышение количества эозинофилов до 15% при физиологической норме до 4%, снижение количества сегментоядерных нейтрофилов до 25-30% при физиологической норме 40-75%, отсутствие палочкоядерных нейтрофилов, моноцитов. А также появление слабодифференцированных и недифференцированных форм клеток с признаками митоза (бластных форм клеток).

В результате инфицирования кошек вирусом лейкоза кошачьих в процессе иммунного ответа с развитием воспалительной реакции изменяется качественный и количественный состав клеток крови:

- повышается общее количество лейкоцитов, в основном за счет повышения количества лимфоцитов, основных производителей медиаторов воспаления, цитокинов, как регуляторов стадий иммунного ответа, и антител к антигенам ВЛК.

- при длительном течении болезни, при истощении резервов организма, в кровяном русле циркулируют юные формы клеток с низкой функциональной активностью.

Таблица 2.

Состав крови исследуемых животных

Показатель	Инфицированные животные	Неинфицированные животные	Физиологическая норма
Гемоглобин, г/л	71	105	80-150
Гематокрит, %	24	30	29-45
Количество эритроцитов, x10^{12} клеток	4,2	5,2	4,8-10
MCV (объем эритроцитов), fl	54,8	48,6	38-53
MCH (среднее содержание гемоглобина в эритроците), pg	14,6	15,3	13-20
MCHC (средняя концентрация гемоглобина в эритроците), г/л	254	347	300-360

Биохимические показатели сыворотки крови указывают на нарушение обмена веществ, синтетической и антитоксической функции печени и выделительной функции почек.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jarrett, O.; Neil, J.C. Feline Leukaemia Virus. In eLS; John Wiley & Sons, Ltd.: Hoboken, NJ, USA, 2012.
2. Verbrugghe A., Bakovic M. Peculiarities of One-Carbon Metabolism in the Strict Carnivorous Cat and the Role in Feline Hepatic Lipidosis. Nutrients. 2013 Jul 19;5(7). P. 2811–2835.

ПРИМЕНЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В СИМПТОМАТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ ЖИВОТНЫХ ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ ВИРУСОМ ЛЕЙКОЗА КОШАЧЬИХ

Мамедов Ш.[1], Федосов Д.В.[2]

[1] Воронежский государственный университет, Воронеж

[2] Центр «Племген» Воронежский государственный аграрный университет, Воронеж

E-mail: *f_dmitri@mail.ru*

Лечение вирусных инфекций включает в себя в том числе и симптоматическую (поддерживающую) терапию. Во время борьбы с инфекцией организм потребляет большое количество ресурсов и энергии. Интенсивные процессы окисления органических молекул с образованием высокоэнергетических соединений могут приводить к истощению внутренних резервов и повреждению структурных и функциональных компонентов клеток. В условиях стресса, при потере аппетита, связанных с течением заболевания, а так же учитывая физиологические особенности у кошачьих, как облигатных хищников, необходимо применение препаратов с незаменимыми жирными кислотами.

ВВЕДЕНИЕ

ВЛК инфицирует преимущественно иммунокомпетентные клетки, такие как лейкоциты крови, клетки лимфоидных органов (лимфоузлы, селезенка и другие), а так же иммунные клетки в органах (тканевые макрофаги, например клетки Купфера в печени).

Инфицирование вирусом лейкоза кошек запускает в организме животных защитные механизмы. Первичный ответ включает в себя образование медиаторов воспаления, специальных веществ, отвечающих за передачу сигналов между клетками. Такими медиаторами являются простагландины, лейкотриены и тромбоксаны. Предшественником медиаторов является арахидоновая кислота – полиненасыщенная (омега-6) жирная кислота. В организме арахидоновая кислота присутствует в составе липидов клеточных стенок, миелоидных оболочек нервных волокон, фосфолипидов надпочечников.

Большая часть поступает в организм с пищей, некоторые виды животных могут синтезировать ее из незаменимой линолевой кислоты [1]. Однако у кошек синтез арахидоной кислоты не происходит, так как у них не наблюдается или значительно снижена активность ферментов Д5- и Д6-десатуразы. Поэтому для кошек арахидоновая кислота является истинно незаменимой [2]. Необходимые количества кислоты для синтеза медиаторов воспаления потребляются из внутренних резервов организма, в результате этого при инфицировании и, как следствие, снижения аппетита, арахидоновая кислота выводится из клеточных стенок и других источников [3].

Тяжелый острый или длительный хронический процесс воспаления, связанный с инфицированием вирусом лейкоза кошачьих, требует значительных энергетических затрат и органических компонентов для синтеза защитных белков и других соединений. В условиях стресса и голодания в организм поступает ограниченное количество ресурсов, поэтому используются внутренние запасы глюкозы, в виде гликогена в клетках печени, и незаменимых полиненасыщенных жирных кислот.

Интенсивное потребление запасов энергетических и структурных молекул и накопления продуктов клеточного метаболизма в результате проходящих реакций приводят к повреждению функционально активных компонентов клеток. Что в конечном итоге приводит их к гибели и усилению патологических процессов в организме.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. Материалом служила сыворотка крови инфицированных вирусом лейкоза кошачьих животных. Животные (n=20) были разделены на 2 группы по 10 особей, первой группе в качестве дополнительной терапии применяли препарат липотон 5000 (ООО НПП «Агрофарм») в рекомендованной производителем дозировке 0,1 мл/кг массы тела внутримышечно 1 раз в день, вторая группа получала стандартную противовирусную и симптоматическую терапию.

Кровь животных брали из лучевой вены в вакуумные пробирки с активатором свертывания и разделительным гелем, для получения сыворотки взятые пробы выдерживали при комнатной температуре в течение 30 минут для образования сгустка, затем центрифугировали при 2500 об/мин в течение 10 минут.

Активность ферментов (аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза, щелочная фосфатаза, гамма-глутамилтрансфераза) и концентрацию метаболитов (мочевина, креатинин, холестерол, общий белок, альбумин) определяли в сыворотке крови на автоматическом биохимическом анализаторе DIRUI CS-300B с применением наборов для определения активности ферментов и метаболитов по инструкциям производителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

После установки диагноза, первичного исследования и применения в качестве дополнительного средства липотона через 14 дней терапии у опытных групп животных провели исследование биохимических показателей сыворотки крови (Табл. 1).

Таблица 1.

Изменение биохимических показателей сыворотки крови после применения липотона у инфицированных животных

Показатель	После применения липотона	Без применения липотона
АЛАТ (Ед/л)	76,4	93,4
АСАТ (Ед/л)	65,3	75,8
ЩФ (Ед/л)	95,2	146,3
ГГТ (Ед/л)	5,4	15,2
Мочевина (ммоль/л)	13,6	16,3
Креатинин (мкмоль/л)	184,3	212,5
Холестерол (ммоль/л)	7,3	8,6
Альбумин (г/л)	26,7	24,3
Общий белок (г/л)	66,4	61,5

После применения липотона в качестве источника полиненасыщенных жирных кислот у животных наблюдалось снижение активности ферментов, концентрации метаболитов липидного и белкового обмена, а так же увеличение содержания общего белка и альбумина.

Применение липотона в качестве источника полиненасыщенных жирных кислот способствовало снижению поражения органов инфицированных животных. Липотон – это липофильная фракция тканей плаценты свиней растворенная в 1,2 пропиленгликоле. В его состав входят гексозы, фосфолипиды, триглицериды, ненасыщенные жирные кислоты, витамины, микроэлементы. Полисахариды и триглицериды, входящие в состав липотона, обеспечивают ткани питанием и энергией, улучшая углеводный и липидный обмен.

Полиненасыщенные кислоты и фосфолипиды обладают мембранопротекторными свойствами, регулируя проницаемость мембран, активность мембраносвязанных ферментов, нормализуют процессы окислительного фосфорилирования в клеточном метаболизме.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Основы биохимии: в 3-х томах, Т. 2 / А. Уайт, Ф. Хендлер, Э. Смит, Р. Хилл, И. Леман. — Мир, 1981. — С. 766. Биохимия: Учебник для ВУЗов / Под ред. Е. С. Северина. — ГЭОТАР-Медиа, 2003. — С. 371, 372, 417, 418.
2. Verbrugghe A., Bakovic M. Peculiarities of One-Carbon Metabolism in the Strict Carnivorous Cat and the Role in Feline Hepatic Lipidosis. Nutrients. 2013 Jul 19;5(7). P. 2811–2835.
3. S. Gleich, K. Hartmann. Hematology and Serum Biochemistry of Feline Immunodeficiency Virus-Infected and Feline Leukemia Virus-Infected Cats. Volume23, Issue3, May/June 2009, Pages 552-558.

УДК 581.162.41:581.522.4

ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ГЕНЕРАТИВНОЙ СФЕРЫ ИНТРОДУЦИРОВАННОЙ СОСНЫ БАНКСА В ВОРОНЕЖСКОЙ ОБЛАСТИ

Чугреев М.Ю.

ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии»

E-mail: *michael.yurievich@yandex.ru*

Представлены результаты исследования состояния генеративной сферы деревьев сосны Банкса, произрастающих на территории лесопаркового участка ФГБУ «ВНИИЛГИСбиотех». Представлены фенофазы основных этапов развития генеративной сферы. Определена жизнеспособность пыльцы, оценены уровни адаптационного потенциала исследованных деревьев.

ВВЕДЕНИЕ

Сосна Банкса (*Pinus banksiana* Lamb.) – дерево 20-25 метров высотой и диаметром ствола 0,5-1 м. Происходит из Северной Америки, где она произрастает от равнин до склонов гор. Обладает достаточно твердой, легкой древесиной, хорошо колется и гнется. Используется при производстве шпал и целлюлозы, в качестве топлива, как источник фитонцидов для оздоровления. Дерево очень выносливое, зимостойкое (до -50!), может расти на бедных сыпучих песках, болотистых почвах, скалах. Вид перспективен практически для всей территории Российской Федерации [1]. Представляет интерес в качестве декоративного растения для озеленения парков и скверов.

Растения-интродуценты, произрастая вне границ естественного ареала, испытывают дополнительный стресс. Это может привести к повышению чувствительности к неблагоприятным факторам. Под их воздействием могут нарушаться процессы формирования и развития генеративных структур, вызывая аномалии строения и прорастания пыльцевых зерен [2].

Изучение состояния генеративной сферы растений в новых для них условиях позволяет оценить экологический потенциал вида и степень влияния на него различных стрессовых факторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучались деревья сосны Банкса возрастом около 10 (молодое) и около 30 лет (взрослое), произрастающие в условиях лесопаркового участка экспериментально-показательного дендрария ВНИИЛГИСбиотех (ЭПД).

При проведении фенологических наблюдений регистрировались следующие фенофазы: начало набухания почек, разверзание генеративных почек, начало и окончание пыления микростробилов, либо рецептивной фазы макростробилов. Оценивалась интенсивность образования микро- и макростробилов по 5-бальной шкале [3]. Вычислялись суммы эффективных температур (ЭТ) выше 5°С, приходящихся на основные фенофазы [4].

Микростробилы собирались незадолго до начала пыления, просушивались. Полученная пыльца просеивалась и хранилась до проращивания в пробирках при +4°С. Проращивание пыльцы осуществлялось на искусственной питательной среде [5] в течение 72 часов, при стандартной (+27°С) [6] или повышенной (+35°С) температурах культивирования. Анализ опытов проводился с помощью тринокулярного микроскопа «Ziess Primo Star». Подсчитывалось число проросших и непроросших пыльцевых зерен, вычислялась жизнеспособность пыльцы, отмечались встречающиеся аномалии. Различия в числе проросших при разной температуре пыльцевых зерен использовались для оценки адаптационного потенциала изучаемых деревьев. Проводился дисперсионный анализ полученных результатов.

Статистическая обработка проводилась с использованием пакета анализа данных программного продукта Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Метеоусловия весны 2024 года были сложными: теплый март, очень теплые апрель и первые числа мая, сменившиеся заморозком и похолоданием, длившимся до начала третьей декады мая, а также малое число осадков в весенние месяцы, компенсированное обильными осадками с октября по январь.

Набухание почек и начало удлинения побега сосен Банкса отмечались в середине второй декаде апреля, при накоплении суммы ЭТ в 173,9°С, близкой к предыдущему году исследования, но достигнутой раньше на 2 календарные недели. Разверзание генеративных почек началось 18 апреля (сумма ЭТ 202,9°С). Пыление микростробилов и рецептивная фаза макростробилов сосны Банкса начались 3 мая при сумме ЭТ 342,7°С, продолжались 3-4 дня и пришлись на время похолодания. На исследованных деревьях количество микростробилов можно оценить на 4 балла, макростробилов – на 3. У взрослого дерева наблюдалась озимь, ее количество можно оценить на 2 бала.

Качество пыльцы при стандартной температуре культивирования было высоким. Взрослое дерево имело несколько большее значение жизнеспособности (92,5±0,9°С), чем молодое (85,0±2,4°С). Повышение температуры культивирования не привело к статистически достоверному изменению числа проросших пыльцевых зерен: у взрослого дерева проросло 90,5±2,6% пыльцы, у молодого – 87,0±2,4%. Значимые различия между деревьями разного возраста при этом перестали наблюдаться.

Это подтверждается однофакторным дисперсионным анализом: при стандартной температуре проращивания P-значение составило $2{,}06 \cdot 10^{-4}$, при повышенной – 0,158. Двухфакторный дисперсионный анализ показал, в целом, отсутствие достоверных различий между образцами и между разными температурами культивирования (P-значение составило 0,222 и 1,0 соответственно). Это значит, что у изученных деревьев сосны Банкса в 2024 году адаптационный потенциал был высоким.

Среди аномалий строения и прорастания пыльцы у сосны Банкса встречались: оптически пустые, деформированные пыльцевые зерна, двусторонне проросшие, образующие вздутия и ветвления пыльцевые трубки. По встречаемости аномалий различий между деревьями не наблюдалось. Повышение температуры культивирования увеличивало число пыльцевых трубок с вздутиями на конце.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У сосны Банкса в 2024 году наблюдался сдвиг наступления фенофаз развития генеративной сферы на более ранние сроки, вызванный превышением температур марта-апреля относительно среднемноголетней нормы и более быстрым накоплением суммы эффективных температур. На показатели качества пыльцы метеоусловия года наблюдений не оказали существенного влияния – жизнеспособность пыльцы вне зависимости от возраста изученных деревьев была высокой. Уровни адаптационного потенциала изученных деревьев к неблагоприятным факторам окружающей среды были высоки и не только не позволили климатическому стрессу серьезно повредить генеративную сферу, а также оставили возможность пыльце адаптироваться к повышенному температурному режиму проращивания в ходе выполненных экспериментов и сохранить стабильно высокое качество и в таких условиях.

На основании этого можно сделать вывод, что сосна Банкса хорошо приспособлена к условиям произрастания в Воронежской области и способна даже перенести некоторые стрессовые погодные явления.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Матюхин Д.Л., Симахин М.В. Виды и формы хвойных, культивируемые в России. Часть 4. *Pinus* L. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2021. – 267 с.
2. Калашник Н. А. Аномалии пыльцы у сосны обыкновенной в различных экологических условиях // Бюл. Бот. сада СГУ. 2012. №10. С.46-52.
3. Корчагин А.А. Методы учета семеношения древесных пород и лесных сообществ. Полевая геоботаника, II, изд. АНСССР, М.-Л., 1960.
4. Практикум по агрометеорологии: учеб./ В.А.Сенников [и др.]. - М.: Колос, 2006, – 215 с.
5. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. Москва: Колос, 1974. 288 с.
6. Свинцова В.С., Влияние засухи на генеративную сферу и жизнеспособность пыльцы сосны обыкновенной/ В.С. Свинцова, Н.Ф. Кузнецова, Е.Ю. Пардаева// Лесоведение. 2014. № 3. С.50-58.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНА-ПРЕДШЕСТВЕННИКА *PRE-MIR165A* В ГЕНОМЕ КУКУРУЗЫ

Чуйкова В.О.

Воронежский государственный университет, Воронеж
E-mail: *v.chuykova2020@mail.ru*

Проведена идентификация гена-предшественника зрелой miR165a методом ПЦР со специфическими праймерами и последующей идентификацией нуклеотидной последовательности ампликона секвенированием по Сэнгеру. Биоинформатический анализ нуклеотидной последовательности транскрипта собственного гена микроРНК показал идентичность с геном *zm-miR166*, кодирующего семейство микроРНК miR165/166.

ВВЕДЕНИЕ

МикроРНК (миРНК) — это небольшие некодирующие молекулы размером 20-22 п.н., которые регулируют экспрессию генов на транскрипционном и посттранскрипционном уровне. Благодаря своему воздействию на широкий спектр биологических процессов, включая рост, развитие и реакцию на стресс, они являются незаменимыми ключевыми элементами клеточной жизни [2, 3].

На данный момент описано несколько тысяч микроРНК, среди которых есть светозависимые, в том числе и miR165a [4]. Одной из главных ролей микроРНК считается присоединение в составе RISC комплекса к 3’-нетранслируемому концу мРНК, в ходе которого деградируется последняя или блокируется процесс трансляции [8].

Гены микроРНК в зависимости от их локализации относительно элементов генома можно отнести к межгенным, интронным и экзонным. Около 50% генов известных микроРНК расположены внутри белок-кодирующих и белок-некодирующих областей (гены-хозяева), по большей части в интронах и реже в экзонах [7].

Особое внимание следует уделить механизму формирования зрелой микроРНК. На сегодняшний момент принято выделять несколько источников, детерминирующих miR. Одним из таких вариантов является наличие в геноме организма собственного гена для конкретной микроРНК. Кроме того, предшественниками могут выступать кодирующие и некодирующие части генов, в частности, интроны и экзоны. Новые гены микроРНК образуются или в результате дупликации существующих генов микроРНК (так происходит в большинстве случаев), или *de novo* из шпилечных структур, расположенных внутри интронов или межгенных областей [5].

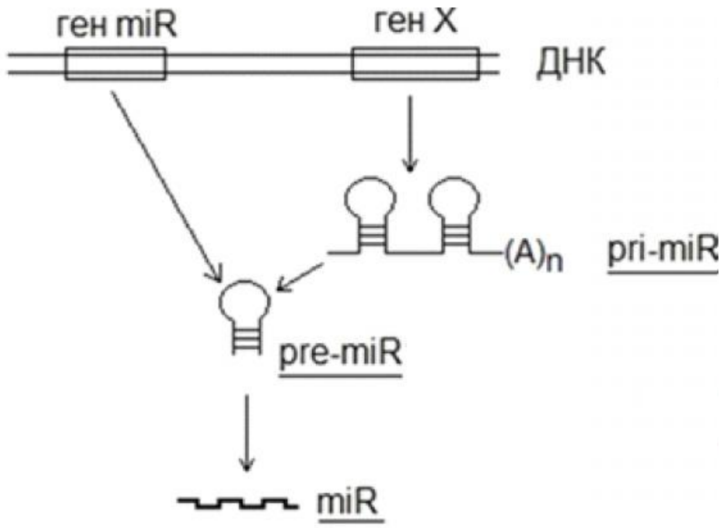


Рис. 1. Схема биогенеза зрелой микроРНК в геноме организма с этапом формирования предшесвенника (pre-miR).

Структуры *de novo* возникают посредством различных механизмов: 1) инвертированной дупликации гена, который впоследствии станет мишенью микроРНК; 2) из генов транспозонов; 3) спонтанной эволюции из случайных последовательностей. Наиболее распространенный путь биогенеза микроРНК получил название канонического. Помимо него, описаны другие пути образования микроРНК, в которых участвуют другие белки и пропущены один или несколько этапов канонического биогенеза; их называют неканоническими [6].

С момента первого описания микроРНК у *Caenorhabditis elegans* было разработано множество различных методов для идентификации как микроРНК, так и их предшественников, образующихся в ходе транскрипции собственного гена miR или процесса сплайсинга пре-мРНК. В более ранних исследованиях многие микроРНК, их гены-мишени, а также предшественники были идентифицированы с помощью нескольких экспериментальных подходов, включая клонирование, опосредованную расщеплением-лигированием и генетический скрининг. Несмотря на эффективность таких экспериментальных методов обнаружения, они требуют значительных затрат времени, труда и средств, поэтому не подходят для высокопроизводительных и комплексных исследований. В последнее время точность вычислительных подходов для прогнозирования пре-микроРНК значительно возросла. Большинство из них основаны на алгоритмах машинного обучения (ML) или статистических моделях. Но, несмотря на столь широкое разнообразие способов идентификации, устоявшийся метод секвенирования по Сэнгеру является наиболее надёжным способом обнаружения транскриптов и исторически представляет собой золотой стандарт для проектов по аннотированию как микроРНК, его предшественников, так и генома в целом [2]. Неизученным остается вопрос формирования предшественника (pre-miR) miR165a на основе транскрипции собственного гена.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Листья 14-дневной кукурузы (*Zea mays* L.), которая была выращена гидропонным способом при 12 часовом свете. При выращивании интенсивность света составляла 90 мкмоль квантов · $м^{-2}·с^{-1}$.

Выделение суммарной РНК из растительных образцов осуществляли методом фенол-хлороформной экстракции, с применением специфического осадителя 12M LiCl. Для получения кДНК анализируемой микроРНК проводили обратную транскрипцию с набором MMLV (СибЭнзим, Россия) с random праймером.

Полимеразную цепную реакцию с генспецифичными праймерами к pre-miR проводили с помощью набора реактивов 5X qPCRmix-HS (Евроген, Россия) на приборе Mini AMP Thermal cycler (Thermo Fisher, США).

Нуклеотидный состав праймеров pre-mir: прямой - 5’ GAGGGGAATGTTGTCTGGCT 3’; обратный – 5’ GCCTGGTCCGAGATCTACAC 3’. Параметры амплификации были следующие: предварительная денатурация – 95 ^{0}C 5 минут, цикл – 95 ^{0}C - 30 сек., 58 ^{0}C - 30 сек., 72 ^{0}C - 30 сек. (детекция), финальная элонгация – 72 ^{0}C - 10 минут.

Качественный анализ ПЦР-продукта проводили путем электрофоретического исследования в геле 2% агарозы. Красителем выступал бромистый этидий.

Очистку ампликона осуществляли методом электрофореза в 2%-ном агарозном геле с помощью 10 % PVP. Очищенный ампликон секвенировали в компании ЗАО «Евроген» по методу Сэнгера на автоматическом секвенаторе 3500xL Applied Biosystems.

Опыты проводили в 3-4-кратной повторности, аналитические определения для каждой пробы осуществляли в трех повторностях. Представленные в работе различия статистически достоверны ($p<0.05$) [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Разработанные праймеры на основе петлевой последовательности, формируемой при созревании miR165a, использовали для постановки ПЦР с кДНК из листьев кукурузы. В результате проведения ПЦР анализа со специфичными праймерами был получен ПЦР-продукт размером приблизительно 200 п.н. (рис. 1).

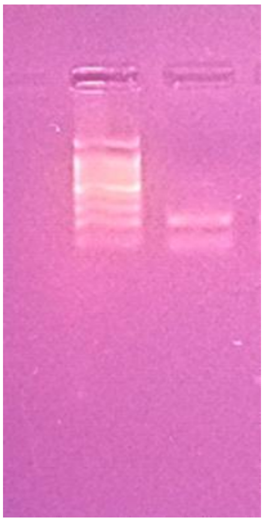


Рис. 1. Электрофореграмма ПЦР-продукта с праймерами к гену-предшесвеннику miR165.

После очистки ампликона установлена нуклеотидная последовательность потенциального предшественника miR165a методом Сэнгера. Размер потенциального предшественника miR165a составлял 176 п.н., что соответствует показателям, которые были определены в ходе электрофоретического метода. Сравнительный анализ ампликона с последовательностями базы данных NCBI показал высокий уровень сходства с геном zm-miR166, кодирующим семейство микроРНК miR165/166 (рис. 2).

CACAGACCGCCGCTCCGCTCCTTCCTTCTCTAGTCTCTCTTCTCTCCTAG

CAGCTACTCTTCGCTTCCTACTCCTATCTCGATCCCTCTCTTCTTCTTCTT

CTTCTTCTTCCTCCCCCCTCCCTTGGATCGAGACCGAGCGGACGCAGAC

GAGTGGTGTAGATCTCGGACCAGGCA

Рис. 2. Нуклеотидная последовательность ампликона со специфическими праймерами к гену-предшественнику miR165a.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведения ПЦР анализа со специфичными праймерами был получен ПЦР-продукт размером приблизительно 200 п.н. После очистки ампликона установлена нуклеотидная последовательность потенциального предшественника miR165a методом Сэнгера. Таким образом, в результате исследования была проведена идентификация гена-предшественника микроРНК (pre-miR165a).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1.Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. — М.: Высш. шк., 1990. — 351с.
2.lptekin B. A Comprehensive Prescription for Plant miRNA Identification / B. lptekin, B.A. Akpinar, H. Budak // Front. Plant Sci. — 2017. — Vol. 7.
3. Yanfei D. Emerging roles of microRNAs in the mediation of drought stress response in plants / D. Yanfei, T. Yueliang, Z. Cheng // Experimental Botany. — 2013. — V.64. — P. 3077 — 3086.
4. Borges F. The expanding world of small RNAs in plants / F. Borges, R.A. Martienssen // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. — 2015. — V. 16. — 727—741.
5. Aequorin-based luminescence imaging reveals stimulus- and tissue-specific Ca2+ dynamics in Arabidopsis plants / X. Zhu [et al.] // Mol. Plant. — 2013. – V. 6. — P. 444—455.
6. Characterization and Function of MicroRNA”s in Plants / W.W Liu [et al.] // Front. Plant Sci. — 2017. Vol. 8.
7. A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development / A.M. Krichevsky [et al.] // RNA. — 2003. — 9. — P. 1274—1281.
8. Deciphering the role of miRNA in reprogramming plant responses to drought stress / A. Singh [et al.] // Crit. Rev. Biotechnol. — 2023. — V. 43. — P. 613 — 627.

УДК 57.084.1

ВЛИЯНИЕ МИЛДРОНАТА И L-КАРНИТИНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ЭРИТРОЦИТОВ НА ФОНЕ ИСТОЩАЮЩИХ ФИЗИЧЕСКИХ НАГРУЗОК

Чурсина Д.Т., Кокина А.В., Садовникова И.С., Калаев В.Н., Гуреев А.П.

Воронежский государственный университет, Воронеж

Работа посвящена оценке влияния избыточных физических нагрузок при применении милдроната и L-карнитина на дисфункции эритроцитов и изменение параметра глюкозы.

ВВЕДЕНИЕ

Физические нагрузки оказывают положительное влияние на организм человека, способствуя активации кровообращения, поддержанию функционального состояния мышц и суставов, а также сохранению их подвижности. Однако некорректная дозировка или неадекватный режим физической активности могут привести к патологическим изменениям, включая нарушения гемопоэза и дисфункцию системы крови [5].

По своей природе интенсивные физические нагрузки носят анаэробный характер, что сопровождается развитием гипоксии вследствие несоответствия между потребностью тканей в кислороде и его доставкой. Данное состояние может индуцировать гемолиз эритроцитов, обусловленный оксидативным стрессом и механическим повреждением клеточных мембран при повышенной нагрузке на систему микроциркуляции. Избыточные физические нагрузки способны индуцировать повреждение элементов крови, в частности эритроцитов, что связано с их ключевой ролью в кислородтранспортной функции. Поскольку эритроциты подвержены механическому стрессу при интенсивной гемодинамической нагрузке, а также оксидативному повреждению вследствие гипоксии, их деструкция может приводить к нарушению кислородного обеспечения тканей [1].

Милдронат и L-карнитин потенциально способны модулировать функциональную активность эритроцитов, снижая степень их повреждения за счет модуляции метаболизма. Для подтверждения данного эффекта необходимо детальное изучение влияния этих препаратов на реологические свойства крови, антиоксидантную защиту и энергетический метаболизм эритроцитов, а также выявление возможных корреляций между их применением и динамикой биохимических маркеров гемолиза [2]. Целью данного исследования является изучение милдроната и L-карнитина на функциональную целостность эритроцитов в крови мышей, их структурные изменение и возможное влияние метаболических препаратов на них.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали 30 самцов мышей линии C57BL/6. Мыши были разделены 4 группы: контроль – группа, которая не подвергалась физическим нагрузкам и не получала метаболические препараты; физ. нагрузки – группа, которая подвергалась принудительному плаванию в течение 30 минут ежедневно, в течение 7 дней; физ. нагрузки + милдронат – группа, которая подвергалась принудительному плаванию и регулярно принимала милдронат в дозе 200мг/кг. Плав+ L-карнитин - группа, которая подвергалась принудительному плаванию и регулярно принимала L-карнитин в дозе 200мг/кг.

Кровь для исследования отбиралась у мышей путём пункции ретро орбитального синуса с предшествующим добавление цитрата натрия в шприц для предотвращения сворачивания крови. На предметное стекло добавлялось 3,7 мкл крови, после чего шпателем делался ровный монослой. Мазок высыхал до матового слоя и покрывался метиловым спиртом для закрепления. После высыхания предметное стекло с мазком погружалось в краситель для окрашивания на 15 минут. Краситель смывался под проточной водой. Мазки исследовались после полного высыхания с использованием светового микроскопа «Микмед-6 ЛОМО» страны производителя Россия. Уровень глюкозы в крови оценивали с помощью глюкометра «Диаконт Концепт» (Тайвань, Китай). Для оценки влияния фактора принудительной физической нагрузки и фактора приёма метаболических препаратов использовался двухфакторный дисперсионный анализ (MANOVA).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Нами было показано, что физические нагрузки не оказывают статистически достоверного влияния на состояние красных кровяных телец мышей (Wilks lambda=0,79663, F(6, 20)=0,85098, p=0,54642). Приём метаболических препаратов вызывал серьезные изменения в функциональной целостности эритроцитов и уровне глюкозы в крови (Wilks lambda=0,36702, F(12, 40)=2,1688, p=0,03345)

Таблица 1.

Среднее количество эритроцитов с нарушениями на 3000 клеток в различных экспериментальных группах

	шизоциты	эхиноциты	аканоциты	кодоциты	сфероциты
контроль	6,5±1,7	1,5±0,5	0,0±0,0	1,5±1,0	0,0±0,0
физ. Нагрузки	4,9±1,7	0,4±0,2	0,1±0,1	0,0±0,0	0,0±0,0
физ. Нагрузки + милдронат	7,7±2,8	3,0±2,0	0,0±0,0	0,2±0,1	8,0±5,4
физ. Нагрузки + L-карнитин	8,1±2,3	5,7±2,0	0,1±0,1	5,9±3,4	0,0±0,0

В ходе эксперимента обнаружили, что среднее количество шизоцитов на 3000 просмотренных кровяных клеток варьировалось от 4,9 до 8,1. Милдронат приводил к 18% увеличению числа шизоцитов; L-карнитин к 24% увеличению. Но физические нагрузки без применения препаратов приводили к 32% уменьшению (табл). В крови шизоциты имеют ярко выраженные угловатые формы с острыми выступами (рис 1Б) [3].

Число эхиноцитов на 3000 просмотренных кровяных клеток варьировалось от 0,4 до 5,7. Милдронат приводил к 2х увеличению числа эхиноцитов; L-карнитин к 3,8 увеличению. Но физические нагрузки без применения препаратов приводили к 3,75х уменьшению (табл. 1). Имеют вытянутую форму с шипами по всей поверхности (рис. 1В) [3].

Число аканоцитов на 3000 просмотренных кровяных клеток варьировалось от 0,0 до 0,1. Милдронат не приводил к увеличению аканоцитов; L-карнитин к 1% увеличению. При физических нагрузках также наблюдалось увеличение 1% (табл). Внешне похожи на эхиноциты, но имеют более чётки округлые края (рис. 1Г) [3].

Число кодоцитов на 3000 просмотренных кровяных клеток варьировалось от 0,0 до 5,9. Милдронат приводил к 7,5х уменьшению числа кодоцитов; L-карнитин к 3,9х увеличению (табл). Но физические нагрузки без применения препаратов приводили к тому, что кодоцитов не обнаруживалось в крови (рис. 1Д) [3].

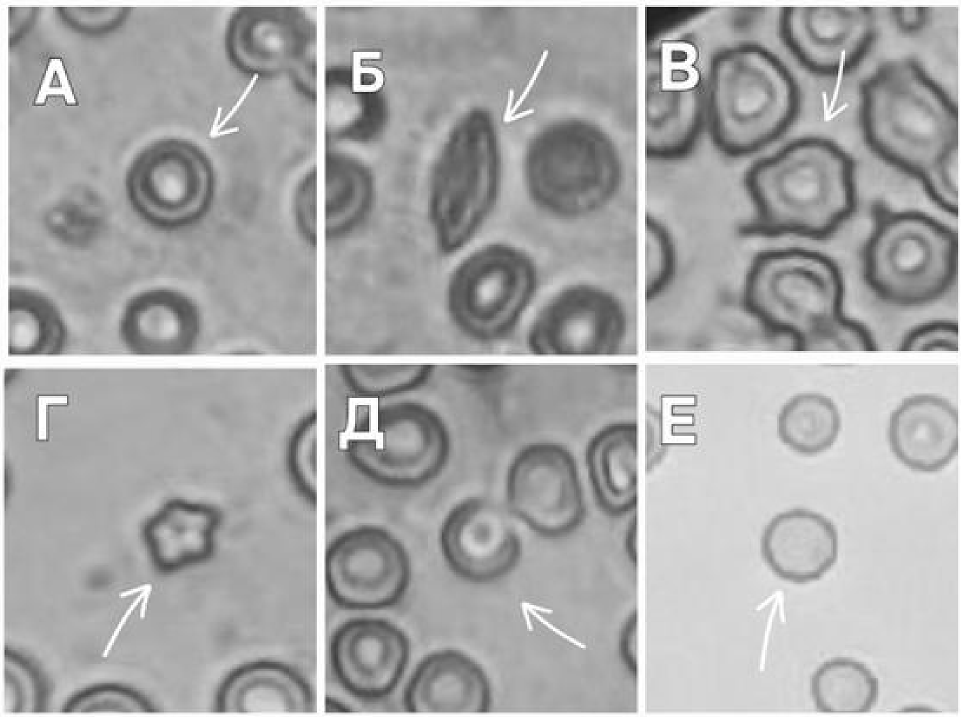


Рис. 1. Микрофотографии репрезентативных примеров нормального эритроцита (А), шизоцита (Б), эхиноцита (В), аканоцита (Г), кодоцита (Д) и сфероцита (Е). Увеличение 40х.

Число сфероцитов на 3000 просмотренных кровяных клеток варьировалось от 0,40 до 8,0. L-карнитин и физические нагрузки без применения препаратов приводили к тому, что эти клетки не обнаруживались в крови (табл). Это эритроциты, имеющие ровную поверхность, округлые, без белого пятна в центре (рис. 1Е)[3].

Если проанализируем общее количество нарушенных эритроцитов, то мы видим, что наибольшее количество наблюдалось у тех мышей, которые помимо физических нагрузок получали еще и метаболические препараты (рис. 2А).

Экспериментальные данные выявили достоверное повышение уровня глюкозы в крови у мышей, получавших милдронат (рис. 2Б). Данный эффект может быть обусловлен ингибированием β-окисления жирных кислот под действием препарата, что приводит к метаболическому переключению на гликолитический путь энергообеспечения. Подобный сдвиг в метаболизме сопровождается активацией анаэробного гликолиза, что фенотипически сходно с адаптационными реакциями при гипоксии.

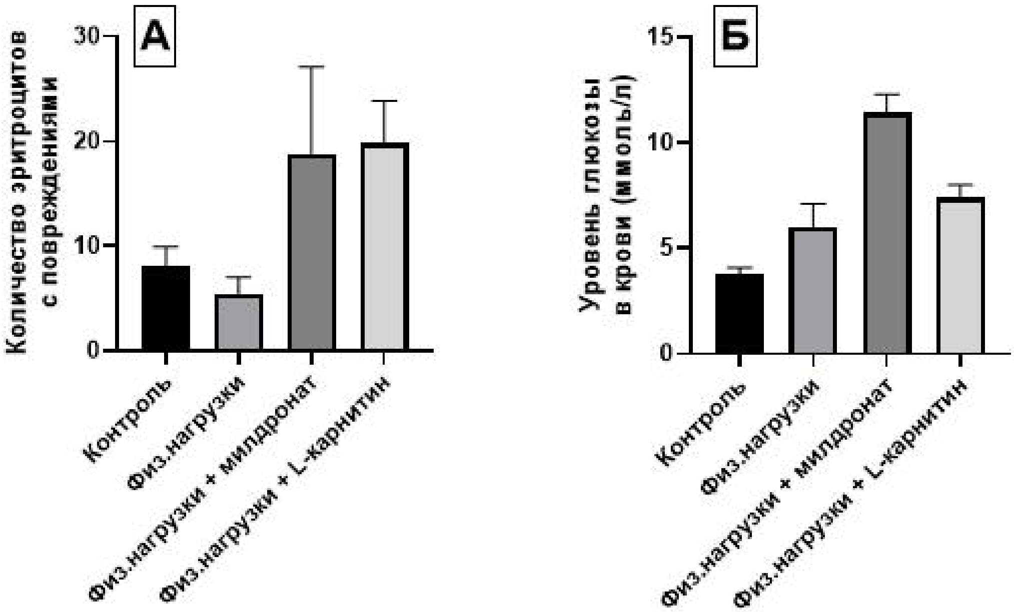


Рис. 2. Эффект физических нагрузок и приёма метаболических препаратов на общее количество эритроцитов с повреждениями (А) и уровень глюкозы в крови (Б).

Этот механизм предполагает, что милдронат, модулируя субстратное предпочтение клеток, может имитировать гипоксический метаболический профиль, что требует дальнейшего изучения его влияния на энергетический гомеостаз и окислительно-восстановительные процессы в условиях физиологических и патологических нагрузок [4].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что в условиях постоянной физической нагрузки и приёме препаратов, наблюдаются изменения в составе крови.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдурахманов Р.Ш. Физиологические аспекты гипоксии нагрузки / Р.Ш. Абдурахманов // Биомедицина (Баку). — 2004. — № 2. — С. 3-9.
2. Ларина В.Н. МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ И ЦИТОПРОТЕКТИВНАЯ НАПРАВЛЕННОСТЬ МЕЛЬДОНИЯ НА ФОНЕ МУЛЬТИМОРБИДНОСТИ / В. Н. Ларина, Д. Г. Карпенко // Врач. — 2022. — № 12. — С. 56-62.
3. Свищева Т.Я. АТЛАС КЛЕТОК КРОВИ И ПАРАЗИТОВ ЧЕЛОВЕКА / Т.Я. Свищева. — Москва - Санкт-Петербург: «ДИЛЯ», 2003 — 128 с.
4. Фармакодинамика и клиническое примененииеантигипоксантов / О.С. Левченкова, В.Е. Новиков, Е.В. Пожилова. // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. — 2012. — № 1. — С. 3-12.
5. Фроленков В.Н. ФИЗИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ - ВАЖНЕЙШАЯ СОСТАВЛЯЮЩАЯ ЗДОРОВЬЯ ЧЕЛОВЕКА / В.Н. Фроленков // Наука о здоровье. — 2022. — № 5. — С. 128-133.

УДК 577.12

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФУМАРАТГИДРАТАЗЫ В ПЕЧЕНИ КРЫС В НОРМЕ И ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ

Федорин Д.Н., Шелушинина Е.А., Епринцев А.Т.

Воронежский государственный университет, Воронеж

E-mail: *rybolov@mail.ru*

Рассмотрено моделирование ацетоминофен - индуцированного нарушения функций печени крыс. Изучены механизмы изменения активности фермента фумаратгидратазы при индукции гепатита. Установлено, что развитие гепатита печени крыс снижает активность фумаразы, фермента цикла трикарбоновых кислот. Исследование показало, что изменение скорости функционирования изоферментов ФГ обеспечивается регуляцией метаболизма фумарата и малата, что может быть обусловлено изменением экспрессии ее гена.

ВВЕДЕНИЕ

Фумаратгидратаза (ФГ, КФ 4.2.1.3) - это хорошо исследованный в биохимическом аспекте фермент, который является важным связующим звеном энергетического и конструктивного метаболизмов клетки. Данный фермент ускоряет химическую реакцию в ЦТК, превращая фумарат в малат или наоборот.

Известно, что фумараза имеет универсальное распространение в клетках живых организмов и имеет различные молекулярные формы, отличающиеся физико-химическими, кинетическими и регуляторными характеристиками [3]. Следует отметить, что так как формы малатдегидрогеназы имеют различную внутриклеточную локализацию, то каждая из них кодируется своим геном [3]. Кроме того, интермедиаты ЦТК зачастую выполняют функцию биосубстратов, которые используются в процессах анаболизма [4]. ФГ играет важную роль в организме, обеспечивая его энергией, а также фермент является исходным материалом для биосинтеза, то есть обеспечивает протекание как энергетического, так и конструктивного обменов. В связи с этим, актуальным представляется исследовать функционирование ФГ в печени крыс с ацетаминофен-зависимым гепатитом.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали самцов лабораторных крыс *Rattus norvegicus* L., массой 180-200 г. Животные выращивались в лаборатории. Рацион составлял сухой корм, семечки подсолнечника, семена гороха.

Для индукции гепатита лабораторному животному (крысе) перорально вводился ацетаминофен из расчета 500 мг на 1 кг массы тела в течение 14 дней. Развитие гепатита определяли по содержанию общего билирубина, содержание которого у крысы с развитым гепатитом возрастает более чем в 10 раз. Печень извлекали и использовали для дальнейших исследований. Экспериментальные исследования проводились в соответствии с правилами Европейской конвенции “О защите позвоночных животных”. Для исследований осуществлялся забор крови из хвостовой вены у опытных и контрольных крыс [5].

Активность ФГ определяли спектрофотометрическим методом, по увеличению оптической плотности среды спектрофотометрирования при длине волны 240 нм при 25^{0}С из-за формирования двойной связи в фумаровокислой молекуле в течение 3 мин. Среда фотометрирования содержала 50 мМ фосфатный буфер (pH 7.4), 5 мМ малат Na. Активность фермента рассчитывали. За единицу ферментативной активности принимали количество фермента, образующего 1 микромоль продукта за 1 мин при 25^{0}С.

Опыты проводили в 3-4 кратной повторности, аналитические определения для каждой пробы осуществляли в трех повторностях. Представленные в работе результаты исследования представляют собой математически обработанные данные, с применением методов математической статистики. Обсуждаются статистически достоверные различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что содержание общего билирубина в сыворотке крови у экспериментальных крыс превышает норму в 2,3 - 2,5 раза. При этом у контрольной группы концентрация билирубина находится в пределах нормы. В ходе наших исследований было установлено, что в условиях лекарственного гепатита, происходит резкое снижение содержания желчных кислот в желчном секрете [6]. Это может быть связано с нарушением синтеза желчных кислот, за счет инактивации микросомальных ферментов либо за счет нарушения секреции гепатоцитами желчных кислот. Повышение концентрации билирубина у опытных крыс относительно контроля свидетельствует о нарушении коллоидных свойств желчи и желчеобразующей функции печени в условиях моделирования ацетаминофен-индуцированного повреждения печени. Результаты исследования представлены на рисунке 1.

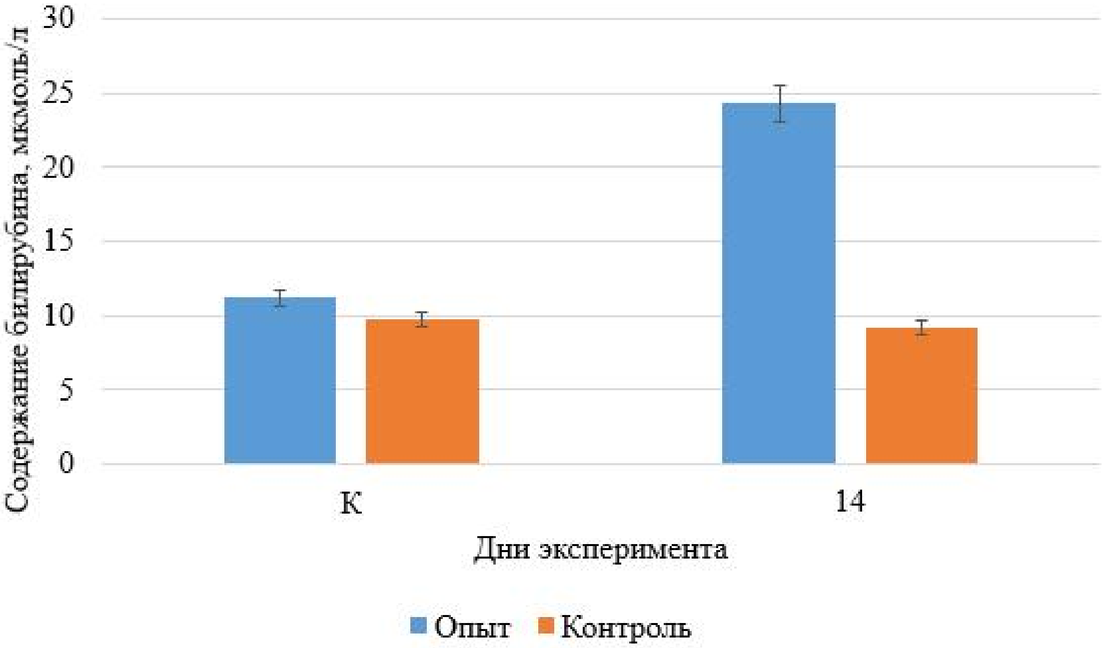


Рис. 1. Содержание общего билирубина в сыворотке крови крыс при индукции ацетаминофен-зависимого гепатита.

В ходе опыта были проведены измерения активности фумаратгидратазы в печени лабораторных крыс (рис. 2). Измерения скорости функционирования фумаратгидратазы показали, что общая активность исследуемого фермента, полученного из тканей печени животных контрольной группы, составила 0,098 Е/г сырой массы. В печени крыс с индуцированным гепатитом данный показатель составил 0,05 Е/г сырой массы, что в 2,35 раз меньше, чем в норме.

Такой характер изменения интенсивности работы фумаратгидратазы системы свидетельствует об ингибировании митохондриальных процессов, в частности цикла Кребса, обуславливающего эффективность функционирования дыхательного процесса (рис. 2).

Поскольку показано, что заболевание ингибирует исследуемый фермент, это вызывает уменьшение скорости функционирования цикла трикарбоновых кислот, обеспечивающего клетку энергией и биосубстратами.

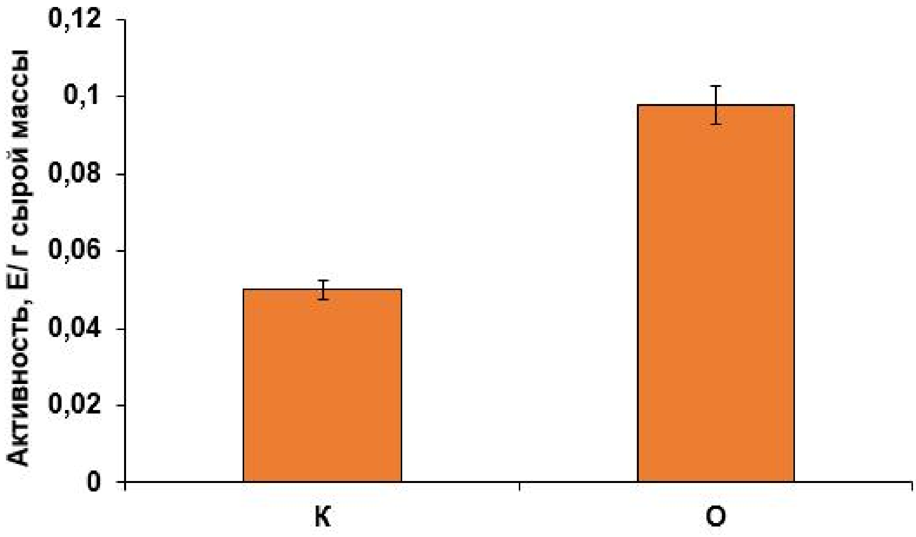


Рис. 2. Общая активность фумаратгидратазы в гепатоцитах крыс в норме и при патологии.

Важное значение в контроле скорости работы метаболических потоков клетки играет энергизация клетки на уровне НАД/НАДН [7]. Смещение данного показателя в ту или иную сторону приводит к изменению интенсивности протекания НАД-зависимых реакций, в том числе и в ЦТК, от интенсивности которого зависит и работа ЭТЦ митохондрий. Подобные изменения связаны в свою очередь и с развитием различных патологических процессов в клетках [8]. Дисбаланс соотношения НАД/НАДН выступает основным фактором развития энергетического кризиса, что обусловлено торможением энергозависимых реакций, в том числе и в ЦТК, являющегося основным поставщиком энергии в клетке при окислительном метаболизме.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ результатов по изменению активности ФГ в печени крыс в условиях гепатита свидетельствует об индукции его активности. Изменение активности фумаратгидратазы связано с приспособлением животного организма к патологическим условиям. В частности, повышение уровня активности ФГ может обуславливать индукцию глиоксилатного цикла, являющегося важнейшим этапом глюконеогенеза.

Показано, что характер изменения скорости функционирования фумаразы соотносится с изменением содержания транскриптов гена митохондриальной формы фермента. В условиях токсического гепатита, вызванного ацетаминофеном, в клетках печени крыс наблюдается увеличение количества мРНК гена исследуемого фермента. Полученные данные указывают на генетический механизм регуляции активности ФГ в печени крыс при ацетаминофен-зависимом гепатите.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Petersen M.C. Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease / M.C. Petersen, D.F. Vatner, G.I. Shulman // Nat Rev Endocrinol. – 2017. – V. 13. – P. 572–587.
2. Rui L. Energy metabolism in the liver / L. Rui // Comprehensive Physiology. – 2014. – V. 4, №1. – P. 177 - 197.
3. Богданов А.Н. Гемолитические анемии / А.Н. Богданов, В.И. Мазуров // Вестник Санкт-Петербургской медицинской академии последипломного образования. – 2011. – Т. 3. – № 3. – С. 107-114.
4. Дефицит глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы / Е.А. Скорнякова, А.Ю. Щербина, А.П. Продеус, А.Г. Румянцев // Трудный пациент. – 2007. – Т. 5. – № 2. – С. 19-20.
5. Ревякин А.О. Моделирование лекарственного токсического гепатита на крысах / А.О. Ревякин, Г.Д. Капанадзе, Н.В. Касинская, О.И. Степанова, О.В. Баранова // Биомедицина. – 2014. – № 1. – С. 52–53.
6. Metabolic oxidation of acetaminophen (paracetamol) mediated by cytochrome P-450 mixed-function oxidase and prostaglandin endoperoxide synthetase in rabbit kidney / J. Mohandas [et al.] // Toxicol Appl Pharmacol. – 1981. – V. 61. – P. 252–259.
7. Voloshchuk O. Activity of liver mitochondrial Krebs cycle NAD^{+}-dependent dehydrogenases in rats with hepatitis induced by acetaminophen under conditions of alimentary protein deficiency / O. Voloshchuk., G. Kopylchuk // Biochemistry (Moscow) Supplement Series B Biomedical. - 2016. - V. 62. -P. 283-286.
8. Thomas D. Identification of the structural gene for glucose-6-phosphate dehydrogenase in yeast. Inactivation leads to a nutritional requirement for organic sulfur / D. Thomas, H. Cherest, Y. Surdin-Kerjan // The EMBO Journal. – 1991. – V. 10. – P. 547–553.

УДК 577.151.05

НАЛИЧИЕ САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ В ПРОМОТОРНОЙ ОБЛАСТИ ГЕНА *GTA-2* ГАМК-ТРАНСАМИНАЗЫ КУКУРУЗЫ

Шкурченко В.В., Шишкова О.С., Шахов З.Н., Анохина Г.Б., Епринцев А.Т.

Воронежский государственный университет, Воронеж
E-mail: *dowi2009@mail.ru*

ВВЕДЕНИЕ

В процессе развития растения постоянно подвергаются воздействию стрессовых факторов. Абиотический стресс существенно влияет на метаболические процессы растений, вызывая необходимость активации специфических механизмов адаптации.

Одним из ключевых компонентов, участвующих в регуляции обменных путей при стрессовых воздействиях, является фермент ГАМК-трансаминаза (ГАМК-Т, КФ 2.6.1.19). Он катализирует реакцию трансаминирования гамма-аминомасляной кислоты с участием альфа-кетоглутарата, продукты которой осуществляют важную роль в функционировании ГАМК-шунта [1, 5]. Этот метаболический путь способствует поддержанию углеродно-азотного баланса, энергетического гомеостаза и играет значительную роль в адаптационных реакциях растений на такие стрессовые факторы, как засуха, гипоксия, солевой стресс и колебания температур [2, 4, 7].

Факторы транскрипции составляют 6–8% генов и представляют собой белки, содержащие ДНК-связывающие домены, способные распознать и взаимодействовать с регуляторными элементами в промоторных областях целевых генов. Это взаимодействие приводит к пространственной перестройке структуры ДНК и к активации репрессии транскрипции, регулируя экспрессию многочисленных генов, вовлеченных в ответ на стрессовые воздействия. Транскрипционные факторы классифицируются в отдельные семейства на основании структуры их ДНК-связывающих доменов [3, 6, 8].

На сегодняшний день выявлены гены, кодирующие ГАМК-трансаминазу у различных видов растений, однако регуляторные механизмы их экспрессии в условиях абиотического стресса остаются недостаточно изученными. Известно, что стрессовые условия активируют множество транскрипционных факторов, которые способны модулировать экспрессию стресс-ассоциированных генов [2, 6].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Целью данной работы являлся анализ нуклеотидной последовательности длиной в 1000 п.н. перед стартовым кодоном гена ГАМК-трансаминазы кукурузы *GTA-2 (LOC103645944)* на наличие сайтов связывания транскрипционных факторов. Последовательность гена взята из NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Поиск транскрипционных факторов осуществлялся в базе данных Plant Transcriptional Regulatory Map (http://plantregmap.gao-lab.org/).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе анализа промоторной области гена *GTA-2* ГАМК-трансаминазы выявлено 62 транскрипционных фактора с описанными функциями, которые входят в состав 13 семейств (Табл. 1).

Таблица 1.

Предсказанные сайты связывания транскрипционных факторов для гена *GTA2 (LOC103645944)*

ТФ	Семейство	Положение в п.н.	Направление	Таргетная последовательность	Функции
AC207656.3_FG002	ARF	480-500	+	TAAATATTTTTTGAGAGAAAG	Фактор ответа на ауксин.
GRMZM2G164735	BBR-BPC	347-370	-	GTGAAATGAAAAGAGAAAGGGATG	Специфически связывается с GAGA-повторами, которые находятся в регуляторных последовательностях генов, участвующих в процессах развития.
GRMZM2G118690		886-906	+	CTCGCGCTCTTCCTCTCTTGC	
GRMZM2G118690		884-904	+	TTCTCGCGCTCTTCCTCTCTT	
GRMZM2G118690		344-364	+	TCCCATCCCTTTCTCTTTTCA	
GRMZM2G164735		345-368	-	GAAATGAAAAGAGAAAGGGATGGG	

GRMZM2 G164735		889-912	-	GCGGAGGCAA GAGAGGAAGA GCGC	
GRMZM2 G164735		343-366	-	AATGAAAAGA GAAAGGGATG GGAC	
GRMZM2 G118690		346-366	+	CCATCCCTTTC TCTTTTCATT	Специфически связывается с GAGA-повторами, которые находятся в регуляторных последовательностях генов, участвующих в процессах развития.
GRMZM2 G118690		348-368	+	ATCCCTTTCTC TTTTCATTTC	
GRMZM2 G149040	bZIP	204-214	-	CCAAGCTGGC G	Вероятно, участвует в развитии сосудов и организации тканей побегов.
GRMZM2 G050939	C2H2	845-863	+	TCTCCCCCCTC CCCTCCCC	Незаменимый белок. Изоформа 1 является активатором транскрипции, связывает как 5S рДНК, так и 5S рРНК и стимулирует транскрипцию гена 5S рРНК, регулирует уровни 5S рРНК во время развития.
GRMZM2 G050939		894-912	+	CTTCCTCTCTT GCCTCCGC	
GRMZM2 G050939		225-243	+	ACTCATCAGCC ATCTCATC	
GRMZM2 G050939		943-961	+	CGCCGTCCGCC CCCGCCTC	
GRMZM2 G050939		897-915	+	CCTCTCTTGCC TCCGCCTG	
GRMZM2 G179677		312-328	-	TAGTAAAAGC CAAAGGT	Действует как положительный регулятор синтазы крахмала SS4. Контролирует развитие хлоропластов и образование гранул крахмала.
GRMZM2 G079653	ERF	949-963	-	CGGAGGCGGG GGCGG	Выступает как репрессор транскрипции. Связывается с GCC-боксом промотора патогенез-связанных генов. Участвует в регуляции экспрессии генов под действием стрессовых факторов и компонентов сигнальных путей передачи стрессового сигнала, а также может регулировать другие AtERF.
GRMZM2 G138396		322-336	+	TTTACTACGGC GCCA	Вероятно, действует как активатор транскрипции. Связывается с GCC-боксом промотора патогенез-связанных генов. Может участвовать в регуляции экспрессии генов под действием стрессовых факторов и компонентов стрессовых сигнальных путей.
GRMZM2 G144744	GRAS	347-366	-	AATGAAAAGA GAAAGGGATG	Выступает как репрессор сигнального пути гиббереллинов (GA). Действует, входя в состав мультибелковых комплексов, подавляющих транскрипцию GA-индуцируемых генов. При обработке GA разрушается протеасомой, что активирует сигнальный путь GA.
GRMZM2 G144744		309-328	-	TAGTAAAAGC CAAAGGTGAT	
GRMZM2 G144744		349-368	-	GAAATGAAAA GAGAAAGGGA	
GRMZM2 G144744		66-85	-	CAGTACGAAA GAAAAGGGGC	
GRMZM2 G118250	LBD	313-333	+	CCTTTGGCTTT TACTACGGCG	Способствует переходу от пролиферации к дифференциации в зародышевом мешке. Отрицательный регулятор пролиферации клеток на адаксиальной стороне листьев. Регулирует образование симметричной пластинки и установление жилкования.
GRMZM2 G118250		800-820	+	TCTTCTCCGCG AACCTCGCGT	
GRMZM2 G110153	MIKC_ MADS	352-365	-	ATGAAAAGAG AAAG	Участвует в развитии цветочных органов, необходим для нормального развития лодикул.
GRMZM2 G171365		885-905	+	TCTCGCGCTCT TCCTCTCTTG	Регулирует время цветения. Может контролировать удлинение междоузлий и ускорять переход к фазе цветения. Возможно, действует раньше регуляторов цветения MADS1, MADS14, MADS15 и MADS18 в пути индукции цветения.
GRMZM2 G171365		891-911	+	GCTCTTCCTCT CTTGCCTCCG	

GRMZM2 G095904	MYB	915-935	+	GCCTCCAGGCT CCAACAACCC	Выступает негативным регулятором холодоустойчивости. Подавляет транскрипцию генов бета-амилаз в ответ на холодовой стресс, взаимодействуя с TIFY11A/JAZ9. Мальтоза, продуцируемая бета-амилазами, защищает клеточные мембраны при холодовом стрессе у риса усиливая холодоустойчивость.
GRMZM2 G008374	NAC	141-158	+	TTAATTGAGA AACAAGAA	Связывается с промоторными областями генов, участвующих в процессах катаболизма хлорофилла, таких как NYC1, SGR1, SGR2 и PAO.
AC23386 5.1_FG00 3		142-158	+	TAATTGAGAA ACAAGAA	Контролирует энуклеацию ситовидных элементов и деградацию цитозоля. Не требуется для формирования литических вакуолей.
GRMZM2 G069047		141-157	+	TTAATTGAGA AACAAGA	Активатор транскрипции генов, участвующих в биосинтезе вторичных клеточных стенок. Вместе с NST2 и NST3 необходим для утолщения вторичных стенок (склеренхимных волокон), формирования вторичной ксилемы (трахеальных элементов) и развития эндотеция пыльника. Также может регулировать лигнификацию вторичных стенок в других тканях.
GRMZM2 G139700		138-156	-	CTTGTTTCTCA ATTAATTT	Участвует в регуляции формирования апикальной меристемы побега во время эмбриогенеза, разделении органов, сращении перегородок гинецея по длине завязей. Необходим для образования побегов в каллусе, развития края листа и формирования зубчатости, инициации пазушных меристем и их отделения от главного стебля. Регулирует филлотаксис на всех этапах развития растения. Вероятно, выступает как ингибитор клеточного деления.
GRMZM2 G058518		142-156	-	CTTGTTTCTCA ATTA	Регулирует развитие вторичных волокон клеточной стенки. Участвует в регуляции генов биосинтеза целлюлозы и гемицеллюлозы, а также генов, участвующих в полимеризации и сигнализации лигнина.
GRMZM2 G179885		140-156	-	CTTGTTTCTCA ATTAAT	Транскрипционный фактор семейства NAC, связанный с содержанием белка в зерне (GPC). Ускоряет старение листьев и усиливает ремобилизацию питательных веществ из листьев в развивающиеся зёрна.
GRMZM2 G017087	TALE	848-867	+	CCCCCCTCCCC TCCCCGTGC	Транскрипционный фактор, связывающийся с РНК. Вероятно, регулирует гены, участвующие в развитии.
GRMZM2 G017087		858-877	+	CTCCCCGTGCC TCCCTCGGG	
GRMZM2 G017087		945-964	+	CCGTCCGCCCC CGCCTCCGG	
GRMZM2 G017087		856-875	+	CCCTCCCCGTG CCTCCCTCG	
GRMZM2 G017087		870-889	+	CCCTCGGGCCT CGCTTCTCG	
GRMZM2 G017087		846-865	+	CTCCCCCCTCC CCTCCCCGT	
GRMZM2 G017087		886-905	+	CTCGCGCTCTT CCTCTCTTG	
GRMZM2 G017087		844-863	+	GTCTCCCCCCT CCCCTCCCC	
GRMZM2 G017087		854-873	+	TCCCCTCCCCG TGCCTCCCT	
GRMZM2 G135447		303-310	+	GCTGTCAT	Может участвовать в формировании побегов во время эмбриогенеза.

GRMZM2 G047370	Trihelix	673-682	+	CTAACCACAC	Может действовать как молекулярный переключатель в ответ на световые сигналы.
GRMZM2 G047448	WOX	682-692	+	CCAATCAATC A	Репрессор транскрипции, необходимый для формирования и развития почек побега. Играет важную роль на ранних стадиях формирования пазушной меристемы. Предположительно, не участвует в поддержании апикальной меристемы побега.
GRMZM2 G069274		684-693	+	AATCAATCAC	Фактор транскрипции, который может участвовать в процессах развития.
GRMZM2 G162481		139-149	+	AATTAATTGA G	
GRMZM2 G162481		618-628	-	TTTTAATTAGT	
GRMZM2 G038252		682-689	+	CCAATCAA	
GRMZM2 G162481		49-59	-	TGTTAATTGAA	
GRMZM2 G069274		680-689	+	CACCAATCAA	
GRMZM2 G038252		50-57	+	TCAATTAA	
GRMZM2 G038252		141-148	-	TCAATTAA	
GRMZM2 G162481		617-627	+	AACTAATTAA A	

Выявленные транскрипционные факторы участвуют в процессах роста и развития растительного организма, в частности в развитии хлоропластов, проводящей системы, тканей побегов, пролиферации, эмбриогенезе, регуляции процессов цветения, ответе на световой сигнал. Также имеются транскрипционные факторы, ассоциированные с воздействием таких фитогормонов как гиббереллины и ауксины. Стоить отметить, что среди представленных факторов транскрипции некоторые из них вовлечены в адаптацию растений к абиотическим стрессовым факторам (холодовой стресс).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, была проанализирована промоторная область в 1000 п.н. до стартового кодона гена *GTA-2* ГАМК-трансаминазы на наличие сайтов присоединения транскрипционных факторов. Было обнаружено 62 предположительных фактора транскрипции с аннотированными функциями из 13 семейств. Среди найденных факторов транскрипции GRMZM2G095904 участвует в ответе на абиотический стрессор – экстремально низкие температуры. Проведенный анализ позволит в дальнейшем экспериментально выявить транскрипционные факторы, участвующие в регуляции экспрессии гена ГАМК-трансаминазы в ответ на стрессовые воздействия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bouche N., Fromm H. GABA in plants: just a metabolite? // Trends in Plant Science. — 2004. — Vol. 9, No. 3. — P. 110–115.

2. Renault H., Roussel V., El Amrani A., et al. The Arabidopsis pop2-1 mutant reveals the involvement of GABA transaminase in salt stress tolerance. // BMC Plant Biology. — 2010. — Vol. 10. — Article 20.

3. Kinnersley A.M., Turano F.J. Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress. // Critical Reviews in Plant Sciences. — 2000. — Vol. 19, No. 6. — P. 479–509.

4. AkCay N., UCarli C., CiftCi Y. GABA Shunt and Its Role in Stress Tolerance in Plants // Plant Stress. — 2021. — Vol. 2, No. 1. — P. 100032.

5. Fait A., Fromm H., Walter D., Galili G., Fernie A.R. Highway or byway: the metabolic role of the GABA shunt in plants. // Trends in Plant Science. — 2008. — Vol. 13, No. 1. — P. 14–19.

6. Michaeli S., Fromm H. Closing the loop on the GABA shunt in plants: are GABA metabolism and signaling entwined? // Frontiers in Plant Science. — 2015. — Vol. 6. — Article 419.

7. Batushansky A., Kirma M., Grillich N., et al. Phosphorylation of GABA transaminase is critical for regulating the levels of GABA during hypoxia in plants. // Plant Cell. — 2015. — Vol. 27, No. 6. — P. 1532–1548.

8. Shelp B.J., Bown A.W., McLean M.D. Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. // Trends in Plant Science. — 1999. — Vol. 4, No. 11. — P. 446–452.

Научное издание

ОРГАНИЗАЦИЯ И РЕГУЛЯЦИЯ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Межрегиональный сборник научных работ

Редактор: Ю. М. Кургузов
Оригинал-макет подготовлен Д. Н. Федориным

Подписано в печать 30.05.2025г. Формат 60х84/16
Усл. печ. л. 15,35. Тираж 100 экз. Заказ № 113

ООО Издательско-полиграфический центр «Научная книга»
394018, г. Воронеж, ул. Никитинская, 38, оф. 308
Тел.: +7 (473) 200-81-02, 229-78-68
http://www.n-kniga.ru   E-mail: zakaz@n-kniga.ru

Отпечаано в типографии ООО ИПЦ «Научная книга»
394026, г. Воронеж, Московский пр-т, 11/5
Тел.: +7 (473) 229-32-87
http://www.n-kniga.ru   E-mail: nautyp@yandex.ru