

2018. № 3(4)

**ИЗВЕСТИЯ
УФИМСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК**

СОДЕРЖАНИЕ

№ 3(4). 2018

БИОЛОГИЯ, БИОХИМИЯ И ГЕНЕТИКА

- О.В. Дымова, Т.К. Головки*
Фотосинтетические пигменты: функционирование, экология,
биологическая активность 5
- Е.Ю. Егунова, М.Ю. Шарипова, И.Е. Дубовик*
Использование цианобактерий в качестве тест-объектов при применении
фунгицидов в сельском хозяйстве 17
- Р.Ф. Еникеева, А.В. Казанцева, А.Р. Романова, Д.Ю. Давыдова,
Э.К. Хуснутдинова*
Анализ ассоциаций полиморфных локусов rs1045881 и rs4971648
гена NRXN1 с фенотипическими вариациями в уровне
математической тревожности 23
- Р.И. Ибрагимов, В.О. Цветков, И.А. Шпирная, И.С. Марданишин, Л.Г. Яруллина*
Влияние пищевого субстрата на активность гидролаз колорадского жука 29
- Р.А. Ильясов, А.Г. Николенко, В.Р. Туктаров, К. Гото, Д. Такахаши, Х.В. Квон*
Митохондриальные геномы кавказской *A. m. caucasica* и карпатской
A. m. carpathica пчел 35
- М.А. Капустин, А.С. Чубарова, В.П. Курченко, Л.Н. Журихина,
В.Г. Цыганков, А.М. Бондарук*
Изучение термостабильности и токсичности наноструктур феруловой
кислоты с гидроксипропилированным бета-циклодекстрином 44
- М.Д. Каскинова, А.Р. Гатауллин, М.В. Хасанов, Р.А. Ильясов,
Хюн Вук Квон, А.Г. Николенко*
Оценка чистопородности популяции *Apis mellifera mellifera* L.
на территории заказника Алтын-Солок 51
- А.В. Коробова, Б.Р. Кулуев, Г.Р. Кудоярова, С.Ю. Веселов*
Особенности фенотипа, метаболизма, накопления и распределения
цитокининов у ENT3 мутанта арабидопсиса в норме и при дефиците
минерального питания 57
- А.А. Кочукова, А.Н. Саньков, А.А. Шмыгарева, А.В. Пантюхин*
Разработка технологии жидких лекарственных форм для внутреннего
применения на основе лекарственного растительного сырья – плоды
аронии черноплодной (*Fructus Aroniae melanocarpaе*) 64
- Т.Г. Кутлина, Я.В. Валова, Д.О. Каримов, Г.Ф. Мухаммадиева,
Н.Ю. Хуснутдинова, Д.А. Смолянкин, Э.Ф. Репина, А.Б. Бакиров*
Анализ экспрессии генов GSTT и GSTM при токсическом гепатите в
условиях эксперимента 70

<p>Я.П. Лебедев, Р.М. Баширова, Р.Г. Фархутдинов Липофильные соединения корней купыря лесного <i>Anthriscus sylvestris</i> (L.) Hoffm</p>	75
<p>Yu. Leontieva, A. Nalian, G. Damoff, A. Martynova-Van Kley Identification and phylogenetic analysis of Southeastern USA earthworm species using 16s rDNA and CO1 sequences</p>	80
<p>А.А. Лукаткин, А.С. Лукаткин Получение противогрибного препарата на основе бактерий <i>Pseudomonas aureofaciens</i> при разных условиях культивирования на послеспиртовой барде</p>	86
<p>Э.Т. Мингажева, Д.С. Прокофьева, А.Х. Нургалиева, Д.Д. Сакаева, Р.Р. Фаисханова, И.Р. Гилязова, Э.К. Хуснутдинова Роль аллелей гена <i>IL23R</i> в патогенезе рака яичников</p>	94
<p>Л.А. Никитина, А.М. Хузиахметова, Л.Я. Бородина, П.М. Алексеев, Р.А. Давыдов, Х.К. Аминев, А.С. Карунас, М.М. Юнусбаева Исследование роли полиморфных локусов генов цитокинов в развитии туберкулеза легких</p>	99
<p>Ю.В. Орлова, О.В. Майорова, Л.А. Халилова, Н.А. Мясоедов, О.И. Неделяева, Л.Г. Попова, Ю.В. Балнокин Накопление и распределение неорганических ионов в тканях органов галофита <i>Suaeda altissima</i>(L.)Pall. в условиях засоления</p>	107
<p>А.А. Плотников, Д.Р. Масленникова, Ч.Р. Аллагулова, Ф.М. Шакирова Реализация защитного действия оксида азота на растения пшеницы при натрий-хлоридном засолении</p>	115

CONTENTS

2018. № 3(4)

BIOLOGY, BIOCHEMISTRY AND GENETICS

- O.V. Dymova, T.K. Golovko*
Photosynthetic pigments: functioning, ecology and biological activity..... 5
- E.Yu. Egupova, M.Yu. Sharipova, I.E. Dubovik*
Use of cyanobacteria as biofertilizers and test-objects at application of fungicides in agriculture..... 17
- R.F. Enikeeva, A.V. Kazantseva, A.R. Romanova, D.Y. Davydova, E.K. Khusnutdinova*
Analysis of associations of polymorphic loci rs1045881 and rs4971648 of the NRXN1 gene with phenotypic variations of mathematical anxiety..... 23
- R. Ibragimov, V. Tsvetkov, I. Shpirnaya, I. Mardanshin, L. Yarullina*
Effect of food substrate on the activity of hydrolases of the Colorado potato beetle 29
- R. Ilyasov, A. Nikolenko, V. Tuktarov, Goto Kenji, Takahashi Jun-ichi, Kwon Hyung Wook*
Mitochondrial genomes of Caucasian *A. m. caucasica* and Carpathian *A. m. carpathica* honeybees 35
- M.A. Kapustin, A.S. Chubarova, V.P. Kurchenko, L.N. Zhurihina, V.G. Cigankov, A.M. Bondaruk*
Study of ferulic acid/hydroxypropylated beta-cyclodextrin nanostructures thermostability and toxicity..... 44
- M.D. Kaskinova, A.R. Gataullin, M.V. Khasanov, R.A. Ilyasov, Hyung Wook Kwon, A.G. Nikolenko*
The purebredness estimation of *Apis mellifera mellifera* L. population in the Altyn-Solok conservancy area 51
- A.V. Korobova, B.R. Kuluev, G.R. Kudoyarova, S.Yu. Veselov*
Plant phenotype, metabolism, accumulation and distribution of cytokinins in the ENT3 mutant arabidopsis under optimal and deficient mineral nutrition..... 57
- A.A. Kochukova, A.N. Sankov, A.A. Shmygareva, A.V. Pantyukhin*
Development of technology of liquid dosage forms for internal use on the basis of medicinal plant raw materials-fruits of *Aronia melanocarpa* (*Fructus Aroniae melanocarpa*)..... 64
- T.G. Kutlina, Ya.V. Valova, D.O. Karimov, G.F. Mukhammadiyeva, N.Yu. Khusnutdinova, D.A. Smolyankin, E.F. Repina, A.B. Bakirov*
Analysis of expression of GSTT and GSTM genes in toxic hepatitis in experimental conditions 70

<i>Ya.P. Lebedev, R.M. Bashirova, R.G. Farkhutdinov</i> Lipophylic compounds of parsley chervil <i>Anthriscus sylvestris</i> (L.) Hoffm. roots	75
<i>Yu. Leontieva, A. Nalian, G. Damoff, A. Martynova-Van Kley</i> Identification and phylogenetic analysis of Southeastern USA earthworm species using 16s rDNA and CO1 sequences	80
<i>A.A. Lukatkin, A.S. Lukatkin</i> Creation of antifungal preparation on the basis of <i>Pseudomonas aureofaciens</i> bacteria cultivated on the post-alcohol draff under different parameters of cultivation	86
<i>E.T. Mingajeva, D.S. Prokofyeva, A.Kh. Nurgalieva, D.D. Sakaeva, R.R. Faishanova, I.R. Gilyazova, E.K. Khusnutdinova</i> The role of alleles of <i>IL23R</i> gene in the pathogenesis of ovarian cancer	94
<i>L.A. Nikitina, A.M. Khuziakmetova, L.Ya. Borodina, P.M. Alekseev, R.A. Davyidov, H.K. Aminev, A.S. Karunas, M.M. Yunusbaeva</i> Association of cytokine genes polymorphisms with pulmonary tuberculosis	99
<i>Y.V. Orlova, O.V. Majorova, L.A. Khalilova, N.A. Myasoedov, O.I. Nedelyaeva, L.G. Popova, Y.V. Balnokin</i> Accumulation and distribution of inorganic ions in the tissues of halophyte <i>Suaeda altissima</i> (L.)Pall. in the conditions of salinization	107
<i>A.A. Plotnikov, D.R. Maslenikova, Ch.R. Alagulova, F.M. Shakirova</i> Realization of protective action of nitric oxide on wheat plants at sodium-chloride salting	115

УДК 581.175.11

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-4-3-5-16

ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИЕ ПИГМЕНТЫ: ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ, ЭКОЛОГИЯ, БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

© О.В. Дымова, Т.К. Головки

В обзоре кратко рассмотрены актуальные вопросы изучения фотосинтетических пигментов. Приведены данные об организации фотосинтетического аппарата и пигментной системы высших растений. Представлены сведения о содержании хлорофиллов и каротиноидов у растений разных функциональных групп и ботанико-географических зон. Рассмотрены качественные и количественные изменения пигментной системы под влиянием условий среды, роль пигментов в защите фотосинтетического аппарата. Затронуты некоторые аспекты применения показателей пигментной системы для оценки продуктивности фитоценозов, фотосинтетического стока углерода и трансформации растительного покрова. Отмечены свойства хлорофиллов и каротиноидов как биологически активных соединений для поддержания здоровья человека.

Ключевые слова: хлорофиллы, каротиноиды, пигмент-белковые комплексы, хлорофилльный индекс, продуктивность, здоровье человека.

Введение. Жизнь на Земле зависит от фотосинтеза, обеспечивающего введение в биосферные процессы солнечной энергии и создание органического вещества. Фотосинтез осуществляют растения, водоросли и некоторые прокариоты, благодаря наличию у них фотосинтетических пигментов, ответственных за поглощение, передачу и преобразование световой энергии. Хлорофилл *a* присутствует у всех известных эукариотических фотосинтетиков, среди прокариот обнаружен только у цианобактерий. Хлорофилл *b* — дополнительный пигмент высших растений и водорослей, является основным светособирающим пигментом большинства эукариот, за исключением красных и бурых водорослей. Наша планета буквально покрыта хлорофиллом, встроенным в сопрягающие мембраны фотосинтезирующих клеток. Ежегодно на планете трижды обновляется 300 млн.т хлорофилла, синтезируется около 100 млн.т каротиноидов.

Изучение пигментных систем фототрофных организмов — быстро развивающаяся область биологической науки, имеет длительную историю. Необходимость пигментов для фотосинтеза была открыта в конце XIX в. [1]. Современные представления о пигментном комплексе растений сформировались благодаря использованию методов и подходов биофизики, биохимии, физиологии и молекулярной биологии [2, 3].

В кратком обзоре будут рассмотрены актуальные вопросы структурной организации и функционирования пигментной системы, ее роли в защите фотосинтетического аппарата. Пигменты играют важную роль не только в биологии фототрофных организмов. Известно также, что они обладают биологической активностью и способны оказывать влияние на здоровье человека.

Структура фотосинтетического аппарата и пигментов. У высших растений процесс фотосинтеза локализован в хлоропластах, довольно

ДЫМОВА Ольга Васильевна — к.б.н., Институт биологии Коми НЦ УрО РАН,
e-mail: dymovao@ib.komisc.ru

ГОЛОВКО Тамара Константиновна — д.б.н., Институт биологии Коми НЦ УрО РАН,
e-mail: golovko@ib.komisc.ru

крупных органеллах (5-10 μm в диаметре), окруженных двойной мембраной, отделяющей стро-му хлоропласта от цитозоля. Хлоропласты – полуавтономные органеллы, содержат собственную ДНК, кодирующую около 100 белков, тогда как ядерный геном кодирует 3000 хлоропластных белков. Для фотосинтетической ассимиляции CO_2 необходимы фотоны и взаимодействие двух фотосистем (ФСII и FSI), локализованных в тилакоидах хлоропластов. ФСII и FSI являются суперкомплексами, состоящими из реакционного центра (РЦ) и нескольких типов светособирающих комплексов (ССК). Молекулярная масса ФСII и FSI составляет примерно 600 и 320 кДа соответственно. Хлорофиллы (Хл) и каротиноиды (Кар) участвуют в процессе фотосинтеза благодаря их локализации в тилакоидах мембран хлоропластов в составе пигмент-белковых комплексов (ПБК) РЦ и ССК FSI и ФСII [2].

Хлорофиллы – уникальные тетрапирролы. В основе их строения – Mg-порфириновый скелет с различными заместителями и дитерпеновый спирт фитол, за счёт которого молекула встраивается в липидный слой мембран. Важным свойством Хл является его способность к окислительно-восстановительным превращениям: за 1 с молекула Хл оборачивается 100 раз [4]. В природе обнаружено около 100 фотосинтетически активных хлорофиллов [5].

Процессы новообразования пигментов и формирования новых центров биосинтеза в специальных локусах мембран хлоропластов протекают непрерывно, так как весь фонд Хл постоянно обновляется, до 10% за одни сутки [5, 6]. В физиологических условиях полупериод жизни молекулы хлорофилла составляет 6-50 ч.

Биосинтез хлорофилла в растениях – строго координируемый процесс, включающий серию последовательных катализируемых ферментами реакций [7]. Сначала осуществляется синтез порфобилиногена, затем образуется протопорфирин IX, далее протохлорофиллид и, наконец, хлорофилл *a*. Превращение протохлорофиллида в Хл индуцируется светом, достаточно короткой вспышки (мс). Начинается процесс синтеза Хл с образования 5-аминолевулиновой кислоты, являющейся предшественником тетрапиррола. Предшественники Хл и сам

Хл являются потенциальными фотосенсибилизаторами. Избыточное их накопление может приводить к фотоокислительному повреждению клеток. Поэтому тонкая регуляция процесса биосинтеза Хл в онтогенезе и при адаптации к изменяющимся условиям среды жизненно важно для роста и развития растений. В регуляции биосинтеза Хл первостепенное значение отводится механизмам светового сигналинга. Воспринимаемый фоторецепторами свет определенной длины волны (красный, дальний красный, синий, ближняя УФ-радиация) вызывает специфическую и контролируемую активацию или подавление генов белков, участвующих в биосинтезе Хл.

Каротиноиды – вещества терпеноидной природы; представляют собой полиеновые соединения с 40 атомами углерода, построенные из восьми C_5 -изопреновых единиц. Известно свыше 600 различных видов каротиноидов [8]. В зависимости от содержания кислорода в молекуле они делятся на каротины и ксантофиллы. Эти липофильные макромолекулы локализованы в тилакоидных мембранах, заключены в жировые капли (пластоглобулы) и находятся в свободном состоянии в виде эфиров жирных кислот. Биосинтез Кар в хлоропластах связан с общим путем биосинтеза полиизопренодных соединений и находится под контролем сложной системы регуляторных механизмов с участием светоиндуцированной экспрессии каротиноидных генов.

Содержание хлорофиллов и каротиноидов в растениях. Термин «хлорофилл» впервые использовали Р.Ж. Pelletier и Ж.В. Caventou [9] для описания зеленых пигментов листьев. К.А. Тимирязев [10] исследовал спектр поглощения Хл и установил, что максимумы поглощения находятся в красной и синей части. Большой вклад в изучение хлорофилла внесен В.Н. Любименко [11, 12]. Им было определено содержание Хл у 623 видов природной флоры разных ботанико-географических зон, и обоснована идея светового и теневого типа растений.

Содержание фотосинтетических пигментов в листьях высших растений варьирует в широких пределах в зависимости от вида, жизненной формы, этапа онтогенеза и экологических усло-

вий произрастания [13-15]. Культурные растения в агроценозах, как правило, накапливают в 2-3 раза больше пигментов по сравнению с дикорастущими. Это объясняет тем, что с.-х. культуры лучше обеспечены ресурсами и, в первую очередь, минеральными элементами. Значительная часть азота листьев заключена в молекулах Хл. В ряде работ показана прямая связь между содержанием азота и Хл [16, 17]. Максимум накопления Хл обычно приходится на период завершения интенсивного вегетативного роста и начало перехода растений к генеративному развитию. Содержание Хл снижается в процессе старения и при стрессе. По имеющимся в литературе сведениям [18, 19] фонд пигментов в растениях крайне суровых местообитаний (пустыни, полупустыни, арктические и горные тундры) меньше, но по относительному содержанию каротиноидов они превосходят растения умеренной зоны.

Согласно наших данных [20-22], концентрация зеленых пигментов в листьях 120 видов наземных и 44 видов прибрежно-водных и водных растений таежной зоны находится в диапазоне 1–17 мг/г сухой массы листьев. Большая часть наземных видов (57%) характеризуется сравнительно низким накоплением Хл, от 2 до 6 мг/г. У 30% видов величина этого показателя находилась в пределах 6-10 мг/г. Доля видов с очень низким (< 1.9 мг/г) и высоким (12-17 мг/г) содержанием Хл составляла менее 10 % всей выборки. У подавляющего числа видов водных макрофитов (71%) концентрация Хл в листьях составляла 6-10 мг/г, у 20% видов – 4-6 мг/г. В общем фонде хлорофилла превалирует Хл *a*, соотношения Хл *a/b* находится в пределах 2–3.5. На долю ССК приходится 55-65% всего фонда хлорофилла листьев.

Содержание каротиноидов в листьях коррелировало с содержанием хлорофилла. У большинства растений величина соотношения Хл/Кар составляла 4–5. Среди наземных растений доля видов со сравнительно низким соотношением Хл/Кар (2.0–3.9), а следовательно высоким относительным содержанием каротиноидов, составляла 35%.

Как и следовало ожидать, фонд пигментов в листьях травянистых растений был существенно

больше по сравнению с древесными, в среднем в 1.5 раза.

Функционирование пигмент-белковых комплексов в норме и при стрессе. Молекулярная организация пигмент-белковых структур обеспечивает эффективное поглощение квантов света, перенос энергии от ССК на РЦ и сопряжение электронного возбуждения молекул пигментов с переносом электрона между кофакторами РЦ [2]. Нарушение баланса между поглощением и использованием световой энергии в фотосинтезе может привести к фотоингибированию и фотодеструкции фотосинтетического аппарата (ФСА) [23-25]. Такая ситуация чаще всего возникает в природных условиях при воздействии на растения высокой интенсивности ФАР, УФ-радиации, низкой или высокой температуры, водного дефицита.

Пластичность и адаптивность пигментного аппарата – существенный фактор устойчивости растений, которые выработали в процессе эволюции несколько линий защиты от повреждения ФСА и нарушения баланса между световыми реакциями и фотосинтетическим метаболизмом углерода. К защитным механизмам относятся изменения ориентации листьев и хлоропластов, мезоструктуры, числа пигментов-светосборщиков и локализации ССК, синтез фотозащитных пигментов.

Наибольший интерес представляют механизмы, связанные с ПБК. Будучи основными фотоактивными кофакторами ПБК, хлорофиллы являются одновременно и их структурными кофакторами. Нековалентно связываясь с белками, Хл участвуют в структурной стабилизации ПБК. Они также участвуют в защите ФСА от избыточного поглощения световой энергии. В большинстве случаев фотоповреждения являются следствием генерации избытка триплетно возбужденного Хл, способного взаимодействовать с O_2 – продуктом оксигенного фотосинтеза. В результате образуются химически реактивные формы синглетного O_2 и другие АФК. Фотопротекторная роль Хл зависит от функции ПБК (РЦ ФС I и РЦ ФС II или ССК I и ССК II). Например, в ФС II избыточная энергия частично диссипируется вследствие флуоресценции Хл *a*. В РЦ ФС II имеется особая молекула Хл *a*, участвующая в циклическом транспорте.

Показатели пигментного комплекса листьев растений, произрастающих в местообитаниях с разным световым режимом ($n = 5$)

Показатель	<i>Ajuga reptans</i> L.		<i>Plantago media</i> L.	
	Световые	Теневые	Световые	Теневые
Хлорофилл $a+b$, мг/г сухой массы	7.6±0.2 ^a	15.2±1.1 ^b	2.6±0.2 ^a	5.6±0.6 ^b
Хлорофилл a/b	2.9±0.1 ^a	2.5±0.1 ^b	2.8±0.2 ^a	3.1±0.1 ^{ab}
Доля Хл в ССК, %	56	63	57	61
Сумма каротиноидов, мг/г сухой массы	1.7±0.1 ^a	2.8±0.2 ^b	0.68±0.02 ^a	1.24±0.09 ^b
Хл/Кар	4.6±0.1 ^a	5.9±0.2 ^b	3.2±0.1 ^a	4.4±0.1 ^b
УППЛ, г/дм ²	1.1±0.1 ^a	0.6±0.1 ^b	0.9±0.1 ^a	0.5±0.1 ^b

Примечание: приведены среднее значение ± стандартная ошибка; разные надстрочные символы обозначают достоверность изменений параметра (тест Дункана, при уровне $p < 0.05$).

Другой способ заключается в эффективном переносе энергии от триплетно возбужденного Хл на каротиноиды, которые рассеивают энергию в виде тепла. Особая роль принадлежит пигментам ксантофиллового цикла (КЦ), открытого Д.И.Сапожниковым в 1957 г. и названного им виолаксантиновым (ВКЦ) [26]. Ксантофилловый цикл включает светозависимую ферментативную дезэпоксидацию виолаксантина с образованием зеаксантина через интермедиат антераксантин. В темноте происходит обратная реакция эпоксидации. Ферменты ВКЦ – растительные липокалиновые белки – виолаксантиновая дезэпоксидаза (ВДЭ) и зеаксантиновая эпоксидаза (ЗЭ). Для осуществления реакции дезэпоксидации виолаксантина с помощью ВДЭ необходимы аскорбат в качестве восстановителя, рН люмена хлоропласта ниже 5.8 и липид тилакоидов моногалактозилдиацилглицерин (МГДГ). ЗЭ максимально активна при рН 7.5 и для прохождения реакции эпоксидации необходимы NADPH, FAD, молекулярный кислород. Реакции эпоксидации идут в 5-10 раз медленнее, чем реакции дезэпоксидации. При работе цикла и образовании зеаксантина излишек поглощенной в ССКII световой энергии диссипирует в тепло. Фотопротекторную функцию в хлоропластах может выполнять и виолаксантин, он способен диссипировать до 30% энергии триплетного Хл. В *цис*-форме виолаксантин способствует поддержанию физических свойств тилакоидных

мембран. Следует отметить, что КЦ является эффективным регулятором светового потока в ПБК. При низкой освещенности Кар действуют как светособирающие пигменты, перенося энергию к хлорофиллу.

Количественные и качественные изменения пигментной системы являются чувствительным показателем физиологического состояния растений и их ФСА, направленности адаптивных реакций при неблагоприятных воздействиях факторов среды. Это можно продемонстрировать на примере двух исследованных нами видов травянистых растений *Ajuga reptans* L. (живучка ползучая) и *Plantago media* L. (подорожник средний), произрастающих в разных эколого-ценотических условиях [27-31].

Листья живучки, обитающей при сильном затенении под пологом смешанного хвойно-мелколиственного леса, накапливали больше пигментов (в расчете на единицу сухой массы) (таблица). У них ниже соотношение Хл a/b , выше доля хлорофиллов, принадлежащих ССК и ниже относительное содержание каротиноидов, о чем свидетельствует величина соотношения Хл/Кар. Листья растений на опушке леса получали в 3-5 раз больше света, накапливали меньше пигментов, но характеризовались повышенным относительным содержанием каротиноидов. В дневные часы уровень дезэпоксидации пигментов КЦ (DEPS) в листьях световых растений достигал 60 %, тогда как у теневых растений

был на порядок ниже. В листьях теневых растений был обнаружен лютеин-эпоксид, способный повышать эффективность светосбора в антенне ФСII, что важно для адаптации к низкой освещенности под пологом леса.

Сходные закономерности в формировании фонда фотосинтетических пигментов были отмечены у растений подорожника. Листья растений, произрастающих на открытом участке, отличались от растений, обитающих в густом травостое, повышенным относительным содержанием Кар. Пул пигментов КЦ у них был на 15% больше (до 240 мкг/г сухой массы), а уровень депоксидации – выше. Максимум DEPS (75%) наблюдали в предполуденные часы. Тесная корреляционная зависимость нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла *a* ФСII от содержания зеаксантина в листьях подорожника свидетельствует об участии зеаксантин-зависимого защитного механизма в диссипации избыточной энергии [32].

Большой интерес представляет изучение закономерностей сезонных изменений содержания пигментов и состояния ПБК у растений, зимующих с зелеными листьями. Наши исследования показали, что к началу зимы в листьях живучки происходит диссоциация мегакомплекса ФСI-ФСII и суперкомплекса ФСII-ССКИ [33]. В процессе перезимовки содержание Хл в листьях и Хл в ФСII снижалось. Весной отмечали появление фракции свободных пигментов. Спектры низкотемпературной флуоресценции Хл перезимовавших листьев и выделенных из них хлоропластов, а также способность к ассимиляции CO₂ указывают на восстановление структуры ПБК ФСI и ФСII. По данным [34] редифференциация хлоропластов с восстановлением уровня Хл и структуры ПБК возможна даже после потери 90% Хл и деструктивных изменений тилакоидной системы. Учитывая особенности биологии данного вида, поддержание функциональной активности перезимовавших листьев важно для успешной генеративной и вегетативной репродукции растений и формирования новой генерации летне-зеленых листьев.

Пигменты и продуктивность растений.

Продуктивность является интегральным результатом всех функций растительного организма,

зависит от генотипических особенностей и физиолого-биохимических свойств видов и сортов, их взаимодействия со средой. Первоосновой формирования биологической продуктивности служит фотосинтез – сложный процесс поглощения, преобразования и запасаения солнечной энергии в химических связях органического вещества. Пигменты ответственны за поглощение световой энергии и ее преобразование в фотохимических реакциях фотосинтеза, участвуют в защите ФСА от фотоповреждения.

Для оптимального осуществления фотосинтетической деятельности и высокой продуктивности свойства фитоценозов должны отвечать ряду требований и, в первую очередь, иметь оптимальный размер и число рабочих единиц фотосинтезирующих систем разных уровней организации – хлоропластов, клеток, суммарной листовой поверхности. Способность фитоценозов эффективно поглощать свет зависит от листового индекса — площади листьев, приходящейся на единицу площади фитоценоза. Посевы с листовым индексом около 5 способны поглощать 90-95% ФАР. Чтобы поглощать больше света растения стремятся увеличить массу листьев по отношению к массе растения или площадь листьев по отношению к их массе. Большая часть света, достигающая поверхности листьев, в конечном счете, поглощается пигментами в хлоропластах.

Наличие пигментов является основной предпосылкой для осуществления процесса поглощения и превращения световой энергии при фотосинтезе. Поэтому не удивительно, что исследователи пытались установить количественную связь между скоростью фотосинтеза и содержанием хлорофилла. К. Willstatter и A. Stoll [35] предложили рассчитывать скорость фотосинтеза на единицу хлорофилла, и назвали этот показатель «ассимиляционное число» (АЧ). Сравнение большого числа видов растений по величине АЧ выявило высокую вариабельность данного показателя, что указывает на отсутствие прямой зависимости фотосинтеза от содержания пигментов. В дальнейшем было показано, что содержание Хл *a* лучше отражает фотосинтетическую продуктивность растений, чем сумма Хл (*a+b*) [36, 37]. Следует отметить, что

имеющиеся в литературе данные о связи продуктивности с содержанием пигментов противоречивы и неоднозначны. Например, одни авторы [38, 39] отмечали, что высокопродуктивные сорта пшеницы накапливали больше Хл ($a+b$) в листьях и характеризовались высокой эффективностью транспорта электронов в ФСII. Другие авторы не выявили связи между накоплением пигментов и продуктивностью [40]. Увеличение содержания Хл a во флаговом листе пшеницы происходило до цветения, а Хл b – после цветения растений [41].

Помимо листьев пигменты содержатся и в других органах растений. У афильного гороха уменьшение листовой поверхности частично компенсировалось гипертрофией усов и прилистников и увеличением содержания хлорофиллов в их тканях [42]. Заметное количество Хл накапливают стебли и колосья злаковых растений. Хлоропласты нелистовых органов растений не только содержат фотосинтетические пигменты, но также отличаются сравнительно высокой фотосинтетической активностью. По данным литературы фотосинтез колосьев пшеницы и ячменя в фазу колошения составляет в среднем 30% фотосинтеза целого растения, а на более поздних этапах развития может достигать 50-60% [43]. В фазу молочной спелости колосья пшеницы не уступали подфлаговому листу по ассимиляции CO_2 . По данным [44] вклад нелистовых хлорофиллоносных органов в общую продуктивность фотосинтеза за период вегетации растений озимой пшеницы составляет 31 – 38%. Участие нелистовых зеленых органов в формировании урожая возрастает в неблагоприятных условиях, особенно при засухе [43].

Количество пигментов в листе сильно изменяется с возрастом [15]. У картофеля максимальное содержание Хл в расчете на 1 хлоропласт, $2.5 \cdot 10^9$ молекул, было отмечено на завершающих этапах роста листовой пластинки [45]. В функционально зрелых листьях фонд хлорофилла постоянно обновляется. В стареющих листьях скорость деградации Хл возрастает и его количество значительно снижается. Полагают, что одной из причин потери хлорофилла является распад азотсодержащих соединений и реутилизации азота из листьев перед их отмиранием.

Деградация хлорофилла происходит с участием ферментов хлорофиллазы и магниевой дехелатазы [5]. Азот и магний экспортируются из листьев в другие органы растения, а остальные продукты катаболизма хлорофилла запасаются в вакуолях стареющих листьев. Нарушение соотношения между скоростью синтеза хлорофилла *de novo* и его деградацией нередко наблюдается при неблагоприятных воздействиях внешней среды.

Для выявления закономерностей формирования урожая и роли хлорофилла в продукционном процессе были предложены показатели, учитывающие содержание хлорофилла в растениях [46, 47]. Хлорофильный индекс (ХлИ) характеризует накопление пигментов в целом растении или на единице площади посева в определенный момент времени. Хлорофильный фотосинтетический потенциал (ХлФП) – интегральный показатель, учитывающий продолжительность работы хлорофилла, рассчитывается как сумма ежедневных значений хлорофильного индекса за определенное время или весь период вегетации. Эти показатели наиболее полно отражают степень развития фотосинтетического аппарата растений, его потенциальные возможности. Они удобны для сравнительного изучения сортов и видов растений, вклада листьев и содержащих хлорофилл нелистовых органов в фотосинтез и формирование урожая. По данным [47] величина ХлФП высокопродуктивных агроценозов составляет 1.5-2 т/га.

В последние десятилетия показатель хлорофильного индекса (проективное содержание хлорофилла) успешно используется для оценки фотосинтетического стока углерода и биоразнообразия растительного покрова разных ботанико-географических зон [48-49]. Хлорофилл играет важную роль в формировании спектральных характеристик фитоценозов. На основе данных, полученных с помощью методов дистанционного зондирования, можно оценить проективное покрытие хлорофилла и первичную продуктивность различных типов растительности [50]. Анализ многолетних трендов хлорофильного индекса позволяет выявить трансформацию растительного покрова экосистем, обусловленную климатическими изменениями и/или антропо-

генной деятельностью. В среднем за год с помощью энергии, поглощенной 1 кг хлорофилла, любой растительной ассоциацией связывается 145-150 кг углерода. Важно отметить, что био-разнообразие мало влияет на конечный результат расчета. Это облегчает задачу оценки продуктивности растительного покрова, учитывая содержание хлорофилла у нескольких доминирующих видов.

Растительные пигменты как биологически активные соединения. С растительной пищей человек потребляет около 50 разных каротиноидов, по количеству больше всего β -каротин, ликопина и лютеина [51, 52]. Интерес к каротиноидам и их возможном влиянии на здоровье возник после того как стало известно, что β -каротин является предшественником витамина А. Витамин А участвует в окислительно-восстановительных процессах, регуляции синтеза белков, способствует нормальному обмену веществ, функционированию клеточных мембран. Важен для восстановления и поддержания эпителиальных тканей (кожа и слизистые оболочки). Участвует в синтезе стероидных гормонов. Витамин А и β -каротин являются мощными антиоксидантами, защищают клетки от разрушительного действия свободных радикалов [53]. Лютеин и зеаксантин – главные каротиноиды, которые улучшают работу глаз: они поглощают вредные синие и близкие к ультрафиолету лучи, способствуют предупреждению катаракты. Ликопин защищает от атеросклероза, предотвращая окисление и накопление на стенках артерий холестерина, тормозит развитие онкозаболеваний. Рекомендуемое для человека потребление каротиноидов составляет примерно 700-900 мкг/сутки. Основным источником каротиноидов в диете человека являются фрукты и овощи.

Хлорофиллин и производные хлорофилла используются широко в качестве пищевых красителей (Е 141). Способны оказывать стимулирующее действие на иммунную систему, выводят токсины, нормализуют кровяное давление, предотвращают образованию и отложению солей кальция [54]. В темноте хлорофилл и его производные действуют как антиоксиданты, на свету являются прооксидантами [55]. Сделана

попытка использовать порфирин-индуцирующие свойства аминолевулиновой кислоты для фотодинамического разрушения раковых клеток (по аналогии с порфириновыми инсектицидами и гербицидами).

Важно отметить, что роль отдельных пигментов в поддержании здоровья человека трудно исследовать, так как они быстро метаболизируются в организме и часто проявляют биологическую активность в сочетании с другими веществами, содержащимися в пище.

Заключение и перспективы. Исследования фотосинтетических пигментов имеют 200-летнюю историю. К настоящему времени довольно хорошо изучены их функции в процессе фотосинтеза. Пигменты ответственны за поглощение и преобразование энергии в фотохимических реакциях фотосинтеза, являются важнейшим структурным элементом фотосинтетического аппарата. В тилакоидных мембранах хлоропластов они образуют пигмент-белковые комплексы, объединенные в светособирающие антенны, функционально сопряженные с реакционным центром фотосистем. В настоящее время достаточно полно изучены пути биосинтеза различных пигментов на уровне ферментов, но остаются слабо исследованными механизмы генной регуляции этих процессов, влияния внешних и внутренних факторов на накопление пигментов, структуру и состав пигментного фонда растений. Недостаточно данных о скорости синтеза и деградации пигментов, функциях отдельных пигментов не только в растениях, но и для человека. Пища с хорошо сбалансированным составом пигментов может быть использована для поддержания здоровья, предотвращения и терапии заболеваний. В этом плане открываются перспективы использования клеточных культур для получения определенных пигментов. Внося в клеточные культуры добавки различных предшественников, элиситоров, гормонов, можно управлять их биосинтезом.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственных заданий ИБ Коми НЦ УрО РАН (регистрационный номер АААА-А17-117033010038-7).

ЛИТЕРАТУРА

1. Willstätter R., Stoll A. Untersuchungen über Chlorophyll: Methoden und Ergebnisse. Berlin: Verlag von Julius Springer, 1913. 454 s.
2. Blankenship R. E. Molecular Mechanisms of Photosynthesis. Blackwell Science, 2002. 321 p.
3. Photosynthetic pigments – chemical structure, biological function and ecology / Ed. by T. K. Golovko et al. Syktyvkar : Komi Scientific Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 2014. 448 p.
4. Клейтон Р. Фотосинтез. Физические механизмы и химические модели. М.: Мир, 1984. 352 с.
5. Porra R. J., Scheer H., Krautler B. Biosynthesis and breakdown of chlorophylls // Photosynthetic pigments – chemical structure, biological function and ecology / Ed. by T. K. Golovko et al. Syktyvkar : Komi Scientific Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 2014. P. 55–85.
6. Willows R. Chlorophylls // Annual Plant Reviews. Boca Raton : CRC Press, 2004. P. 23–56.
7. Tanaka R., Tanaka A. Tetrapyrrole biosynthesis in higher plants // Annual Review of Plant Biology. 2007. V. 58. P. 321–346.
8. Карнаухов В. Н. Функции каротиноидов – объект биофизических исследований // Биофизика. 2000. Т. 45. № 2. С. 364–384.
9. Pelletier P.J., Caventou J.B. Sur la matière verte des feuilles // Journal de Pharmacie. 1817. № 11. P. 486–491.
10. Тимирязев К.А. Спектральный анализ хлорофилла. СПб: Товарищество Общественная польза, 1871. 67 с.
11. Любименко В. Н. Избранные труды. Работы по фотосинтезу и пигментам растений / Под ред. Н. А. Любинского. Киев : Издательство АН Украинской ССР, 1963. Т. 2. 681 с.
12. Любименко В. Н. Избранные труды. Работы по фотосинтезу и приспособлению растений к свету / Под ред. А. С. Оканенко. Киев : Издательство АН Украинской ССР, 1963. Т. 1. 614 с.
13. Горышина Т.К. Фотосинтетический аппарат растений и условия среды. Л.: Изд-во Ленинградского университета, 1989. 204 с.
14. Larcher W. Physiological plant ecology. Eco-physiology and stress physiology of functional groups. Fourth Edition. Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New-York, 2003. 513 p.
15. Sestak Z. 1977. Photosynthetic characteristics during ontogenesis of leaves. 1. Chlorophylls // Photosynthetica. V. 11(4). P. 367-374.
16. Evans J. R. Nitrogen and photosynthesis in the flag leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.) // Plant Physiology. 1983. V. 72. P. 297-302.
17. Bojovic B., Markovic A. Correlation between nitrogen and chlorophyll content in wheat (*Triticum aestivum* L.) // Kragujevac J. Sci. 2009. V. 31. P. 69-74.
18. Попова И. А., Маслова Т. Г., Попова О. Ф. Особенности пигментного аппарата растений разных ботанико-географических зон // Эколого-физиологические исследования фотосинтеза и дыхания растений. Ленинград : Наука, 1989. С. 115–130.
19. Слемнев Н. Н., Шереметьев С. Н., Маслова И. Г., Цоож Ш., Алтанцоож А. Разнообразие фотосинтетического аппарата растений Монголии: анализ биологических, экологических и эволюционных рядов // Ботанический журнал. 2012. Т. 97. № 11. С. 1377-1396.
20. Головки Т. К., Дымова О. В., Табаленкова Г. Н. Пигментный аппарат растений Приполярного Урала // Ботанический журнал. 2007. Т. 92. №11. С. 1732-1741.
21. Головки Т. К., И. В. Далькэ, О. В. Дымова, И. Г. Захожий, Г. Н. Табаленкова. Пигментный комплекс растений природной флоры европейского северо-востока // Известия Коми научного центра УрО РАН. 2010. № 1. С. 39–46.
22. Дымова О. В., Далькэ И. В. Фотосинтетические пигменты и CO₂-газообмен водных макрофитов в подзоне средней тайги // Известия Коми Научного Центра УрО РАН. 2016. № 1 (25). С. 37–44.
23. Powles S. B. Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light // Annu. Rev. Plant Physiol. 1984. V. 35. P. 15–44.
24. Long S. P., Humphries S., Falkowski P. G. Photoinhibition of photosynthesis in nature // Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1994. V. 45. № 1. P. 633–662.
25. Vass I., Aro E.-M. Photoinhibition of photosynthetic electron transport // Primary processes in photosynthesis, basic principles and apparatus / Ed. by G. Renger. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2007. P. 393–425.
26. Маслова Т. Г., Марковская Е. Ф. Современные представления о функционировании виолаксантинового цикла (развитие идей Д. И. Сапожникова) // Физиология растений. 2012. Т. 59. №3. С. 472-480.
27. Дымова О. В., Головки Т. К. Адаптация к свету фотосинтетического аппарата теневыносливых растений (на примере *Ajuga reptans* L.) // Физиология растений. 1998. Т. 45. № 4. С. 521–528.
28. Дымова О. В., Гриб И., Стржалка К., Головки Т. К. Состояние пигментного аппарата зимне- и летнезеленых листьев теневыносливого растения *Ajuga reptans* // Физиология растений. 2010. Т. 57.

№ 6. С. 809–818.

29. Дымова О. В., Головки Т. К. Состояние пигментного аппарата растений живучки ползучей в связи с адаптацией к световым условиям произрастания // Физиология растений. 2007. № 1. С. 47–43.

30. Головки Т. К., Далькэ И. В., Захожий И. Г., Дымова О. В., Табаленкова Г. Н. Функциональная пластичность и устойчивость фотосинтетического аппарата *Plantago media* к фотоингибированию // Физиология растений. 2011. Т. 58. № 4. С. 490–501.

31. Miszalski Z., Skoczowski A., Silina E., Dymova O., Golovko T., Kornas A., Strzalka K. Photosynthetic activity of vascular bundles in *Plantago media* leaves // J. Plant Physiol. 2016. V.204. P. 36–43.

32. Golovko T., Dymova O., Zakhzhizy I., Dalke I., Tabalenkova G. Photoprotection by carotenoids of *Plantago media* photosynthetic apparatus in natural conditions // Acta Biochim Pol. 2012. V.59. №1. P.145–147.

33. Dymova O., Khrystin M., Miszalski Z., Kornas A., Strzalka K., Golovko T. Characterization of leaf chlorophyll–protein complexes in wintergreen herbaceous plant *Ajuga reptans* L. // Func. Plant Biology. 2018. V. 45 (5). P. 519–527.

34. Zavaleta-Mancera H. A., Thomas B. J., Thomas H., Scott I. M. Re-greening of senescent *Nicotiana* leaves. II. Redifferentiation of plastids // J. Exp. Bot. 1999. V. 50. P. 1683–1689.

35. Willstätter K., Stoll A. Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure. Berlin: Springer, 1918.

36. Sestak Z. Limitation for finding a linear relationship between chlorophyll content and photosynthetic activity // Biol. Plantatum. 1966. V. 8(5). P. 336–46

37. Зеленский М.И. Селекционно-генетический аспект изучения фотосинтетической деятельности культурных растений // Тр. по прикл. бот., ген. и сел. 1980. Т. 67. Вып. 2. С. 38–47.

38. Lu C., Lu Q., Zhang J., Kuang T. Characterization of photosynthetic pigment composition, photosystem II photochemistry and thermal energy dissipation during leaf senescence of wheat plants grown in the field // J. Exp. Bot. 2001. V.52. P. 1805–1810.

39. Щадчина Т.М. Функциональные характеристики фотосинтетического аппарата современных сортов озимой пшеницы // Физиология и биохимия культурных растений. 2010. Т. 42. № 4. С. 339–347.

40. Шимко В. Е., Кульминская И. В., Калитухо Л. Н., Гордей И. А. Сравнительный анализ показателей фотосинтеза и продуктивности у гибридов F2 озимой ржи // Физиология растений. 2009. Т. 56. № 1. С. 139–146.

41. Дунаева С.Е., Галева А.З. Изменение некоторых фотосинтетических характеристик флагового

листа пшеницы в процессе его старения // Труды по приклад, ботанике, генетике и селекции. 1980. Т. 67. Вып. 2. С. 30–37.

42. Коф Э. М., Ооржак А. С., Виноградова И. А., Калиберная З.В., Кренделева Т.Е., Кукарских Г.П., Кондыков И.В., Чувашева Е.С. Листовой аппарат, пигментный комплекс и продуктивность дикого и афильного генотипов гороха // Физиология растений. 2004. Т.51. № 4. С. 500–506.

43. Кумаков В. А. Физиология яровой пшеницы. М.: Колос, 1980. 205 с.

44. Беденко В. П., Коломейченко В. В. Фотосинтетическая деятельность и продуктивность агрофитоценозов озимой пшеницы // Сельскохозяйственная биология. 2005. №1. С. 59–64.

45. Мокронос А.Т. Онтогенетический аспект фотосинтеза. М.: Наука, 1981. 198 с.

46. Тарчевский И. А. Андрианова Ю. Е. Содержание пигментов как показатель мощности развития фотосинтетического аппарата у пшеницы // Физиология растений. 1980. Т. 27. № 2. С. 341–347.

47. Андрианова Ю.Е., Тарчевский И.А. Хлорофилл и продуктивность растений. М.: Наука, 2000. 135 с.

48. Воронин П. Ю., Ефимцев Е. И., Васильев А. А., Ватковский О. С., Мокронос А.Т. Проектное содержание хлорофилла и биоразнообразие растительности основных ботанико-географических зон России // Физиология растений. 1995. Т. 42. №2. С. 295–302.

49. Воронин П. Ю., Коновалов П. В., Болондинский В. К., Кайбияйнен Л. К. Хлорофилльный индекс и фотосинтетический сток углерода в леса Северной Евразии // Физиология растений. 2004. Т. 51. С. 390–395.

50. Elsakov V. The spatial-temporal estimation of vegetation chlorophyll index: remote-sensing approaches // Photosynthetic pigments – chemical structure, biological function and ecology / Ed. by T. K. Golovko et al. Syktyvkar: Komi Scientific Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 2014. P.410–425.

51. Britton G. Carotenoids. Volume 5: Nutrition and Health. Basel-Boston-Berlin: Birkhäuser Verlag, 2009. 422 p

52. Tanumihardjo S.A. Carotenoids: health effects // Encyclopedia of Human Nutrition (Third Edition) / Eds. by Benjamin Caballero et al. Elsevier Ltd.: Academic Press, 2013. P. 292–297.

53. Burri B.J. Carotenoids: chemistry, sources and physiology // Encyclopedia of Human Nutrition (Third Edition) / Eds. by Benjamin Caballero et al. Elsevier Ltd.: Academic Press, 2013. P. 283–291.

54. İnanç A.L. Chlorophyll: structural properties, health benefits and its occurrence in virgin olive oils // *Academic Food Journal*. 2011. V. 9 (2). P. 26-32.

55. Wanasundara U.N., Shahidi F. Antioxidant and prooxidant activity of green tea extracts in marine oils // *Food Chemistry*. 1998. V. 63 (3). P. 335-342.

References

1. Willstätter R., Stoll A. Untersuchungen über chlorophyll: methoden und ergebnisse. Berlin: Verlag von Julius Springer, 1913. 454 p.

2. Blankenship R. E. Molecular mechanisms of photosynthesis. Blackwell Science, 2002. 321 p.

3. Photosynthetic pigments – chemical structure, biological function and ecology / Ed. by T. K. Golovko et al. Syktyvkar : Komi Scientific Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 2014. 448 p.

4. Kleiton R. Photosynthesis. Physical mechanisms and chemical models. Moscow, 1984. 352 p. [in Russ].

5. Porra R. J., Scheer H., Krautler B. Biosynthesis and breakdown of chlorophylls // Photosynthetic pigments – chemical structure, biological function and ecology / Ed. by T. K. Golovko et al. Syktyvkar : Komi Scientific Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 2014. P. 55–85.

6. Willows R. Chlorophylls // *Annual Plant Reviews*. Boca Raton : CRC Press, 2004. P. 23–56.

7. Tanaka R., Tanaka A. Tetrapyrrole biosynthesis in higher plants // *Ann. Rev. Plant Biol.* 2007. V. 58. P. 321–346.

8. Karnauchov V.N. Functions of carotenoids as subject of biophysical studies // *Biophysics*. 2000. V. 45. № 2. C. 364-384.

9. Pelletier P.J., Caventou J.B. Sur la matière verte des feuilles // *Journal de Pharmacie*. 1817. № 11. P. 486–491.

10. Timiriazev K. A. Spectral analyses of chlorophyll. Sankt-Petersburg, 1871. 67 p. [in Russ].

11. Lubimenko V. N. Chosen works. Works on photosynthesis and pigments of plants / Ed. by N. A. Lubinsky. Kiev, 1963. V. 2. 681 p. [in Russ].

12. Lubimenko V. N. Chosen works. Works on photosynthesis and plant adaptation to light / Ed. by A. S. Okanenko. Kiev, 1963. V. 1. 614 p. [in Russ].

13. Goryshina T.K. Photosynthetic apparatus and environmental conditions. Leningrad, 1989. 204 p. [in Russ].

14. Larcher W. Physiological plant ecology. Eco-physiology and stress physiology of functional groups. Fourth Edition. Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New-York, 2003. 513 p.

15. Sestak Z. 1977. Photosynthetic characteristics

during ontogenesis of leaves. 1. Chlorophylls // *Photosynthetic*. V. 11. P. 367-374.

16. Evans J. R. Nitrogen and photosynthesis in the flag leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Plant Physiol.* 1983. V. 72. P. 297-302.

17. Bojovic B., Markovic A. Correlation between nitrogen and chlorophyll content in wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Kragujevac J. Sci.* 2009. V. 31. P. 69-74.

18. Popova I. A., Maslova T. G., Popova O. F. Traits of pigment apparatus of plants from different botanical and geographical zones // *Ecological and physiological studies of photosynthesis and respiration*. Leningrad, 1989. P. 115–130. [In Russ].

19. Slemnev N. N., Sheremetiev S. N., Maslova T. G., Tsooj Sh., Altantsooj A. Diversity of photosynthetic apparatus in plants of Mongolia: analyses of biological, ecological and evolutionary series // *Botanical Journal*. 2012. V. 97. № 11. P. 1377-1396. [In Russ].

20. Golovko T. K., Dymova O. V., Tabalenkova G. N. Pigment apparatus of the Subpolar Ural plants // *Botanical Journal*. 2007. V. 92. №11. P. 1732-1741. [In Russ].

21. Golovko T. K., Dalke I. V., Dymova O. V., Zakhoyz I. G., Tabalenkova G. N. Pigment complex of plants of natural flora of the European northeast // *Proceedings of the Komi Science Centre, Ural Branch, Russian Academy of Sciences*. 2010. № 1. P. 39–46. [In Russ].

22. Dymova O. V., Dalke I. V. B. Photosynthetic pigments and CO₂-exchange of macrophytes in the middle taiga subzone // *Proceedings of the Komi Science Centre, Ural Branch, Russian Academy of Sciences*. 2016. № 1. P. 37–44. [In Russ].

23. Powles S. B. Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light // *Annu. Rev. Plant Physiol.* 1984. V. 35. P. 15–44.

24. Long S. P., Humphries S., Falkowski P. G. Photoinhibition of photosynthesis in nature // *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1994. V. 45. P. 633–662.

25. Vass I., Aro E.-M. Photoinhibition of photosynthetic electron transport // *Primary processes in photosynthesis, basic principles and apparatus* / Ed. by G. Renger. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2007. P. 393–425.

26. Maslova T. G., Markovskaya E. F. Current views on the function of the violaxanthin cycle (Development of ideas put forward by D.I. Sapozhnikov) // *Russ. J. Plant Physiol.* 2012. V.59. P. 434–441.

27. Dymova O.V., Golovko T.K. Light adaptation of photosynthetic apparatus in *Ajuga reptans* L., a shade-tolerant plant as an example // *Rus. J. Plant Physiol.* 1998. V. 45. P. 440-446.

28. Dymova O.V., Grzyb J., Golovko T.K.,

Strzalka K. Characterization of pigment apparatus in winter-green and summer-green leaves of a shade-tolerant plant *Ajuga reptans* // Russ. J. Plant Phys. 2010. V.57. P.755-763.

29. Dymova O.V., Golovko T.K. Pigment apparatus in *Ajuga reptans* plants as affected by adaptation to light growth conditions // Rus. J. Plant Physiol. 2007. V. 54. P. 39-45

30. Golovko T.K., Dalke I.V., Zakhochiy I.G., Dymova O.V., Tabalenkova G.N. Functional plasticity of photosynthetic apparatus and its resistance to photoinhibition in *Plantago media* // Russ. J. Plant Physiol. 2011. V.58. P.549-559.

31. Miszalski Z., Skoczowski A., Silina E., Dymova O., Golovko T., Kornas A., Strzalka K. Photosynthetic activity of vascular bundles in *Plantago media* leaves // J. Plant Physiol. 2016. V.204. P. 36-43.

32. Golovko T., Dymova O., Zakhochiy I., Dalke I., Tabalenkova G. Photoprotection by carotenoids of *Plantago media* photosynthetic apparatus in natural conditions // Acta Biochim Pol. 2012. V.59. P.145-147.

33. Dymova O., Khrystin M., Miszalski Z., Kornas A., Strzalka K., Golovko T. Characterization of leaf chlorophyll–protein complexes in wintergreen herbaceous plant *Ajuga reptans* L. // Func. Plant Biology. 2018. V. 45. P. 519-527.

34. Zavaleta-Mancera H. A., Thomas B. J., Thomas H., Scott I. M. Re-greening of senescent *Nicotiana* leaves. II. Redifferentiation of plastids // J. Exp. Bot. 1999. V. 50. P. 1683-1689.

35. Willstätter K., Stoll A. Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure. Berlin: Springer, 1918.

36. Sestak Z. Limitation for finding a linear relationship between chlorophyll content and photosynthetic activity // Biol. Plant. 1966. V. 8. P. 336-346

37. Zelensky M.I. Genetic and breeding aspects in the study of photosynthetic activity of cultivated plants // Bull. Appl. Bot. Gen. Plant Breed. 1980. V. 67. P. 38-47

38. Lu C., Lu Q., Zhang J., Kuang T. Characterization of photosynthetic pigment composition, photosystem II photochemistry and thermal energy dissipation during leaf senescence of wheat plants grown in the field // J. Exp. Bot. 2001. V.52. P. 1805-1810.

39. Shadchina T.M. Functional characteristics of the photosynthetic apparatus of the modern varieties of winter wheat // Ukr. J. Physiol. Biochem. Cultiv. Plants. 2010. V. 42. P. 339-347.

40. Shimko V.E., Kulminskaya I.V., Kalitukho L.N., Gordei L.A. Comparative analysis of photosynthetic characteristics and productivity in F2 hybrids of winter rye. Russ J. Plant Physiol. 2009. V. 56. P. 139-146.

41. Dunaeva S. E., Galeeva A.Z. Variations of some photosynthetic characteristics of the flag leaf wheat

in the process of its senescence // Bull. Appl. Bot., Gen., and Plant Breed. 1980. V. 67. P. 30-37.

42. Kof E.V., Oorzhak A.S., Vinogradova L.A., Kalibernaya Z.V., Krendeleva T.E., Kukarskikh G.P., Kondykov L.V., Chuvashева E.S. Leaf morphology, pigment complex, and productivity in wild-type and *afila* pea genotypes // Russ. J. Plant Physiol. 2004. V. 51. P. 449-454.

43. Kumakov V.A. Physiology of spring wheat. Moscow, 1980. 205 p. [in Russ.]

44. Bedenko V.P., Kolomeichenko V.V. Photosynthetic activity and agrophytocenosis productivity of winter wheat // Russ. J. Agr. Biol. 2005. V. 1. P. 59-64.

45. Mokronosov A.T. Ontogenetic aspects of photosynthesis. Moscow, 1981. 198 p. [in Russ.]

46. Tarchevskiy I.A., Andriyanova Yu. E. The pigment content as an index photosynthetic apparatus development in wheat // Russ. J. Plant Physiol. 1980. V. 27. P. 341-347.

47. Andriyanova Y.E., Tarchevskiy I.A. Chlorophyll and plant productivity. Moscow, 2000. 135 p. [in Russ.]

48. Voronin P.Yu., Efimtsev E.I., Vasil'ev A.A., Vatkovskiy O.S., A.T.Mokronosov. Chlorophyll projective content and vegetation biodiversity of main zones in Russia // Russ J. Plant Physiol. 1995. T. 42. C. 295-302.

49. Voronin P. Yu., Kononov P. V., Bolondinskii V. K., Kaipainen L. K. Chlorophyll index and photosynthetic carbon sequestration in Northern Eurasia forests // Russ. J. Plant Physiol. 2004. V. 59. P. 390-395.

50. Elsakov V. The spatial-temporal estimation of vegetation chlorophyll index: remote-sensing approaches // Photosynthetic pigments – chemical structure, biological function and ecology / Ed. by T. K. Golovko et al. Syktyvkar: Komi Scientific Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 2014. P.410-425.

51. Britton G. Carotenoids. Volume 5: Nutrition and Health. Basel-Boston-Berlin: Birkhäuser Verlag, 2009. 422 p

52. Tanumihardjo S.A. Carotenoids: health effects // Encyclopedia of Human Nutrition (Third Edition) / Eds. by Benjamin Caballero et al. Elsevier Ltd.: Academic Press, 2013. P. 292-297.

53. Burri B.J. Carotenoids: chemistry, sources and physiology // Encyclopedia of Human Nutrition (Third Edition) / Eds. by Benjamin Caballero et al. Elsevier Ltd.: Academic Press, 2013. P. 283-291.

54. İnanç A.L. Chlorophyll: structural properties, health benefits and its occurrence in virgin olive oils // Academic Food Journal. 2011. V. 9. P. 26-32.

55. Wanasundara U.N., Shahidi F. Antioxidant and prooxidant activity of green tea extracts in marine oils // Food Chemistry. 1998. V. 63. P. 335-342.



PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS: FUNCTIONING, ECOLOGY AND BIOLOGICAL ACTIVITY

© **O.V. Dymova, T.K. Golovko**

Institute of Biology, Komi Science Centre, Ural Division, Russian Academy of Sciences,
28, ulitsa Kommunisticheskaya, 167982, Syktyvkar, Russian Federation

The review briefly discusses the topical issues of the study of photosynthetic pigments. The basic data on the organization of photosynthetic apparatus and pigment system of higher plants are presented. Information on the content of chlorophyll and carotenoids in plants of different functional groups and botanical-geographical zones is discussed. Qualitative and quantitative changes of the pigment system under the influence of environmental conditions, and the role of pigments in the protection of photosynthetic apparatus are considered. Some aspects of the application of pigment system indicators to assess the productivity of phytocenoses, photosynthetic carbon flow and transformation of vegetation cover are discussed. The properties of chlorophylls and carotenoids as biologically active compounds to maintain human health are noted.

Key words: chlorophylls, carotenoids, pigment-protein complexes, chlorophyll index, plant productivity, human health.

УДК: 502.3/7, 579.6, 581.6

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-4-3-17-22

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЦИАНОБАКТЕРИЙ В КАЧЕСТВЕ ТЕСТ-ОБЪЕКТОВ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ФУНГИЦИДОВ В СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ

© Е.Ю. Егупова, М.Ю. Шарипова, И.Е. Дубовик

Приводится краткий обзор литературы о применении экологичных способов решения биотехнологических задач, а именно использования цианобактерий в качестве биотестеров и биоудобрений в сельском хозяйстве. Раскрыты основные причины выбора этих объектов для дальнейшего применения в сельскохозяйственной практике, а также обобщен имеющийся в настоящее время опыт использования цианобактерий в сельском хозяйстве. Представлены экспериментальные данные о влиянии фунгицидов «Метабактерин» и пенконазол на состав почвенных водорослей. Выявлено сокращение таксономического состава и спектра экобиоморф. Резистентными оказались представители цианобактерий 3 видов: *Nostoc commune*, *N. punctiforme* и *Cylindrospermum stagnale*. «Метабактерин» на рост цианобактерии *Nostoc commune* только при концентрации фунгицида, начиная с 1 г/л. Наибольшее влияние, заключающееся в гибели колоний и полном лизисе клеток, оказали концентрации «Метабактерина» 25 и 50 г/л. Таким образом, цианобактерии могут быть использованы в качестве альтотестера в отношении определенных фунгицидов.

Ключевые слова: цианобактерии, биотестеры, метабактерин, пенконазол, *Nostoc commune*, *Nostoc punctiforme*, *Cylindrospermum stagnale*.

В условиях существующих экологических проблем, будь то эрозия почв или загрязнение окружающей среды, поиск экологичных биотехнологических решений является как никогда актуальным во всех сферах человеческой деятельности, особенно в сельском хозяйстве. Приоритетным направлением является его экологизация за счет применения биологических агентов (биоудобрения, биоиндикаторы, биофунгициды) в качестве безопасной альтернативы химическим веществам. Одним из наиболее перспективных биотехнологических объектов являются цианобактерии [1] – наиболее сложно устроенные морфологически и генетически среди прокариотов организмы, что обуславливает их широкое распространение и высокий адаптационный потенциал по отношению к

негативным условиям окружающей среды (засуха, засоление, загрязнение и др.). Кроме того, быстрый рост и неприхотливость к условиям искусственного культивирования, способность к оксигенному фотосинтезу, фиксации молекулярного азота, особенности физиолого-биохимических процессов, частое обнаружение цианобактерий в симбиотических взаимодействиях с живыми элементами экосистем определяет успешность их выбора для создания биопрепаратов для различного применения в сельском хозяйстве.

Благодаря перечисленным свойствам, цианобактерии могут успешно применяться в земледелии как биоудобрения и фитостимуляторы. В большей степени изучена и уже внедрена в сельскохозяйственную практику некоторых ази-

ЕГУПОВА Елена Юрьевна, Башкирский государственный университет,
e-mail: egupovaelena@yandex.ru

ШАРИПОВА Марина Юрьевна – д.б.н., Башкирский государственный университет,
e-mail: sharipovamy@mail.ru

ДУБОВИК Ирина Евгеньевна – д.б.н., Башкирский государственный университет,
e-mail: dubovikie@mail.ru

атских стран (Китай, Вьетнам, Индия) ростстимулирующая активность цианобактерий по отношению к рису [2]. Выявлено улучшение прорастания и урожайности культуры, увеличение в почве содержания N, P, K при внесении цианобактерий из родов *Anabaena* (Born. ex. Born.) Flah., *Nostoc* (Vauch. ex. Born.) Flah. и их ассоциаций с микроорганизмами. Также отмечено их положительное влияние на рост злаковых [3], например, инокуляция семян пшеницы в лабораторных условиях культурой *Nostoc linckia* (Born. ex. Born.) Flah. показала прирост корней и проростков на 70 и 64% соответственно [4].

Установлен положительный эффект использования цианобактерий на культурах томата, огурцов, хлопчатника и др. [5]. Эффект заключался в активной колонизации ризопланов растений, увеличении энергии прорастания и морфометрических параметров на различных стадиях роста по сравнению с необработанными контрольными растениями, увеличении урожайности на 20 – 40% в зависимости от вида культуры. Сравнительный анализ влияния цианобактерий, цианобактериальных консорциумов, минеральных и органических удобрений показал преимущество применения первых в неблагоприятных для растений условиях, например при засухе.

Возможность получения положительного результата от применения цианобактерий в качестве фитостимуляторов опосредована образованием и выделением ими различных метаболитов в почву. Так, обнаружено, что некоторые цианобактерии способны продуцировать гормоноподобные и некоторые другие вещества (ауксины, цитокинины, гиббереллины, жасмонины), улучшающие рост и развитие высшего растения [2].

Помимо синтеза различных БАВ выявлено, что широкий спектр физиологических особенностей, уникальных для разных видов и даже штаммов цианобактерий также определяет степень и направленность влияния (стимуляции/ингибирования) на бактериализованные растения в микробно-растительных системах [6]. Ниже будут рассмотрены некоторые из них.

- Азотфиксирующая активность. Известно, что цианобактерии вносят в почву примерно 20 – 30 кг N/га в год, что значительно для

небольших фермерских хозяйств, для которых минеральные азотные удобрения являются дорогими [2].

- Обогащение и структурирование почвы. Цианобактерии в составе почвенных микробиологических сообществ производят экзометаболиты, которые позволяют микробной биопленке существовать как целостной структуре. Эти соединения наряду с образованием слизистых чехлов в процессе жизнедеятельности могут способствовать лучшему удержанию воды почвой и предотвращать ее эрозию. При этом, являясь обязательным компонентом сообщества почвенных микроорганизмов, цианобактерии активны на всех стадиях почвообразовательного процесса [7]. Также они способны обогащать почву органическими веществами (полигидроксиалканойдами, полиненасыщенные жирные кислоты, и др. [8]), улучшать биологическую доступность фосфора для растений, мобилизуя нерастворимые органические фосфаты.

- Ферментативная активность, пигментный состав. В работе Дидович С. В. с соавторами [6] установлена взаимосвязь физиолого-биохимических показателей цианобактерий и развития бактериализованных растений. Была исследована ферментативная активность оксидоредуктаз – ферментов каталаз (катализ реакции разложения токсичных перекисей, участвующих в дыхании), пероксидаз, (контролирование адаптационного потенциала), полифенолоксидаз (регуляция окислительных процессов). Выяснилось, что с увеличением каталазной и пероксидазной активности одного штамма цианобактерии угнетался рост надземной и корневой массы пшеницы (*Nostoc sphaeroides* (Kütz. ex Born.) Flah., *Nostoc punctiforme* (Kütz.) Hariot), тогда как аналогичное явление у другого штамма (*Nostoc* sp.) стимулировало рост растения. Пигментное соотношение у различных штаммов также показало прямые или обратные корреляции в системах "инокулированное растение - рост растения". Так, увеличение каротиноидов, хлорофилла А в одних штаммах (*Nostoc* sp.) приводило к улучшению развития растения, у других штаммов (*Desmonostoc muscorum* (Ag. ex Born. et Flah.) Hrouz. ex Vent., *Nostoc punctiforme*) – к ухудшению.

Некоторые виды цианобактерий помимо обитания в ризосфере и ризоплане растения способны к эндофитному существованию в клубеньках бобовых культур. Обнаружен ризогенный эффект их присутствия, а именно увеличение количества клубеньков. При предпосевной инокуляции семян гороха и сои цианобактериальными консорциумами (*Nostoc* + *Rhizobium* Frank, *Flavobacterium* Berg. et al., *Pseudomonas* Migula, *Agrobacterium* Conn) отмечено увеличение образования клубеньков гороха на 50% [4] по сравнению с инокуляцией только бактериями, а также накопление фотосинтетических пигментов в листьях и повышение содержания протеина в семенах бобовых.

Цианобактерии могут выступать в качестве биоиндикаторов, биотестеров, а также в качестве адсорбентов и деструкторов поллютантов различной химической природы [1, 9]. Наиболее ярко биоиндикационная роль цианобактерий проявляется в агроэкосистемах, отражая уровень биогенных элементов как при их исчерпании, так и при избытке.

Применение цианобактерий в качестве биоремедиантов загрязненных почв [10] показало, что они могут повышать скорость процессов восстановления почвы, являясь для нее экологически безопасными. При этом цианобактерии могут оказывать благоприятный эффект на почву не только при ее загрязнении химическими веществами, но и выявленной активностью против микромицетов – возбудителей грибковых заболеваний у растений [4, 6].

Следует отметить неоднозначное влияние вносимых в почву синтетических фунгицидных препаратов на микробиоту, в том числе на альгофлору. Важно, чтобы препараты не только устраняли болезни у растений и защищали их от повторного заболевания, но и не нарушали состояние почвенных организмов, их видового разнообразия. В исследовании С. Л. Неходимовой и Н. В. Фоминой [11] показано, что обработка почвы тремя различными биофунгицидами: Байкал ЭМ-1, Бактофит и Глиокладин в рекомендуемых производителем концентрациях, не сказывается негативно на альгофлоре почвы, в частности, отмечалась стимулирующая

активность некоторых представителей водорослей и цианобактерий. Однако имеются утверждения и о негативном воздействии фунгицидов и пестицидов на альгофлору [12]. Исследуемые препараты уменьшали не только видовое разнообразие водорослей и цианобактерий, но и их биомассу. При этом ингибирующее действие веществ может снижаться в почве, богатой гумусом.

На сегодняшний день по-прежнему недостаточно информации о влиянии многих средств химической защиты растений на почвенную альгофлору. В связи с этим нами были проведены исследования по влиянию фунгицидов на цианобактерии в модельных опытах на агаризованной среде.

В работе использовались следующие фунгициды:

1. «Метабактерин» – биофунгицид на основе лиофилизированной культуральной жидкости грамотрицательных бактерий, разработанный во ВНИИ «Фитопатологии». Рекомендован для защиты культур от фузариозной гнили, септориоза, фузариоза и др.

2. «Топаз» – органический фунгицид на основе пенконазола. Умеренно опасен для человека и животных, опасен для рыб, не влияет на птиц и растения. Эффективен против мучнистой росы, гнилей; долго сохраняется в почве, но разлагается полностью.

Были использованы следующие методы исследования. Метод культивирования тест-объектов на агаризованной среде с заданной концентрацией фунгицида. В нашем случае опытными растворами являлись растворы биофунгицида «Метабактерин» и органического фунгицида пенконазола («Топаз»). Для приготовления агаризованной 2%-ной среды использовали среду Громова № 6, которую разливали в стерильные чашки Петри и смешивали с растворами «Метабактерина» в концентрациях, рекомендованных ВНИИ «Фитопатологии» (0.5, 1, 5, 25 и 50 г/л), а также растворами пенконазола (0.05, 0.2 и 0.8 мл/л). Концентрация 0.2 мл/л является рекомендованной производителем для обработки большинства плодовых и ягодных культур и огурцов открытого и защищенного

грунта; также взяли концентрацию меньше рекомендованной и концентрацию 0.8 мл/л – в два раза больше концентрации, рекомендованной для использования в отношении цветочных культур. Затем на агаризованные среды высевали жидкую культуру *Nostoc commune* методом «сплошного газона». На агаризованной среде подсчитывали число колоний, при культивировании в жидкой среде количество клеток считали в камере Горяева. Продолжительность инкубации 2 недели. Опыты проводили в трех повторностях. В таких же концентрациях обрабатывали и пробы почвы, отобранные в Иглинском районе Республики Башкортостан. Использовали метод со «стёклами обрастания»: просеянную через мелкое сито почву помещали в стерильные чашки Петри и увлажняли дистиллированной водой или раствором фунгицидов в концентрации 0.05; 0.5 и 5 г/л. Через две недели проводили прямое микроскопирование образцов и выявляли таксономический состав и спектр эковиоморф.

Результаты, полученные в модельных опытах по влиянию «Метабактерина» на цианобактерии на агаризованной среде, представлены в таблице 1.

N. commune образовывал колонии в контрольном образце и при концентрациях биофунгицида 1 и 5 г/л на 11 день опыта; при концен-

трациях 25 и 50 г/л колонии лизировались. Таким образом, можно сделать вывод о том, что *N. commune* чувствителен к данному биофунгициду только в высоких концентрациях (25 и 50 г/л).

Кривая роста культуры представлена на рисунке. Она характеризовалась длительной лаг-фазой и быстрым переходом к лог-фазе как в контроле, так и в опытных образцах. Замедление роста произошло на 11 день культивирования, фазы стационарного роста и отмирания культуры были четко выражены.

Однако, и при концентрациях 1 и 5 г/л, метабактерин способствовал изменению кривой роста: развитие колоний происходило замедленно по сравнению с контролем (на пике развития в 1.5 и 3 раза соответственно). Действие биофунгицида в концентрации 25 и 50 г/л проявлялось в ингибировании роста и приводило к лизису клеток сразу после его внесения.

Изучить влияние пенконазола на жизнедеятельность цианобактерий при культивировании в чашках Петри оказалось невозможным вследствие разной плотности агаризованной среды и раствора пенконазола. Поэтому были проведены опыты с внесением двух исследованных препаратов непосредственно в почву в чашечных культурах.

Под влиянием биофунгицида видовое разнообразие альгофлоры уменьшалось обратно пропорционально величине концентрации внесимого фунгицида. Наблюдали сокращение спектра эковиоморф – с 8 жизненных форм в контроле до 3 форм ($\text{CH}_2\text{CF}_2\text{NF}_1$ и $\text{CF}_2\text{CH}_1\text{NF}_1$) после внесения «Метабактерина» в больших концентрациях (25 и 50 г/л).

При внесении в почву пенконазола также отмечено сокращение таксономического состава и спектра эковиоморф. Обработка пенконазолом оказалась более губительной для диатомовых, желто-зеленых и зеленых водорослей. Резистентными оказались представители цианобактерий 3 видов: *Nostoc commune*, *N. punctiforme* и *Cylindrospermum stagnale*. Спектр выявленных форм сократился до двух (CF_2NF_1 при концентрациях 0,05 и 0,2 мл/л) и одной (CF_1 – при концентрации 0,8 мл/л).

Таким образом, уникальность строения и жизнедеятельности цианобактерий позволяет

Т а б л и ц а 1

Устойчивость штамма цианобактерии *Nostoc commune* к «Метабактерину»

Концентрация биофунгицида «Метабактерин», г/л	Жизнеспособность цианобактерии
Контроль	Исходный титр 106 КОЕ/мл
0.5	Незначительное влияние на рост колоний (0.85 · 106 КОЕ)
1	Уменьшение количества микроорганизмов (0.7 · 106 КОЕ)
5	Остановка развития приблизительно на 40-50% (0.5 · 106 КОЕ)
25	Гибель колоний
50	Полный лизис клеток

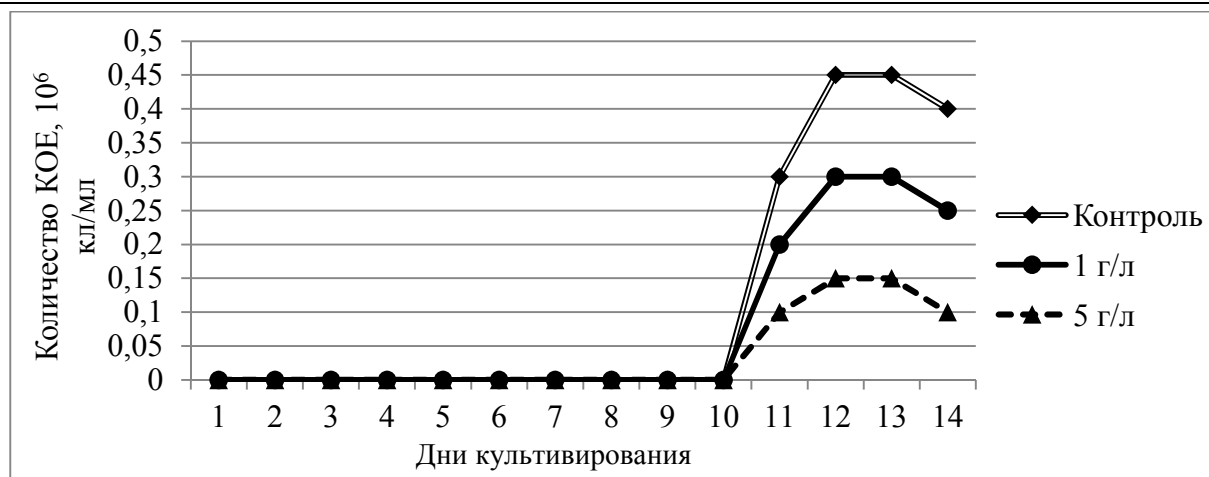


Рис. 1. Кривая роста колоний *Nostoc commune* при обработке биофунгицидом «Метабактерин»

применять данные микроорганизмы в сельском хозяйстве в качестве эффективных биоиндикаторов и биотестеров, в частности для оценки влияния фунгицидов на состав и качество почвенной альгофлоры. При этом рекомендуется использовать чашечные культуры со «стеклами обрастания». Этот метод позволяет наиболее адекватно оценить токсичность фунгицидов в условиях близких к природным.

ЛИТЕРАТУРА

1. Фокина А. И., Огородникова С. Ю., Домрачева Л. И., Лялина Е. И., Горностаева Е. А., Ашихмина Т. Я., Кондакова Л. В. Цианобактерии как тест-организмы и биосорбенты // Почвоведение. 2017. № 1. С. 77–85.
2. Singh J. Sh., Kumar A., Rai A. N., Singh D. P. Cyanobacteria: A Precious Bio-resource in Agriculture, Ecosystem, and Environmental Sustainability // Front. in Microb. 2016. V.7. P. 1–19.
3. Mohan A., Kumar B. Growth Performance and Yield Potential of Cereal Crops (Wheat, Maize and Barley) in Association with Cyanobacteria // Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 2017. V. 6(10). P. 744 – 758.
4. Трефилова Л. В. Использование цианобактерий в агробиотехнологии: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Саратов, 2008.
5. Дидович С. В., Москаленко С. В., Темралеева А. Д., Хапчаева С. А. Биотехнологический потенциал почвенных цианобактерий (обзор). – Вопросы современной альгологии. 2017. 2(14). URL: <http://algotology.ru/1170-> (дата обращения: 31.03.2018).
6. Дидович С. В., Темралеева А. Д., Дидович А. Н., Алексеенко О. П., Горгулько Т. В., Чайковский В.

А. Метаболический потенциал цианобактерий в растительно-микробном взаимодействии // Таврический вестник аграрной науки. 2017. № 4(12). С. 9 – 17.

7. Шарипова М. Ю., Дубовик И. Е. Современные методы альгологии. Уфа: РИЦ БашГУ, 2012. – 116 с.

8. Кокшарова О. А. Цианобактерии: перспективные объекты научного исследования и биотехнологии // Успехи Современной Биологии. 2008. №. 7. С. 3–20.

9. Дубовик И. Е., Шарипова М. Ю. Наземные и водные эпифитные цианопрокариоты и водоросли и возможность их использования в оценке состояния окружающей среды // Теоретическая и прикладная экология. 2016. №1. С. 51 – 55.

10. Дубовик И. Е., Шарипова М. Ю., Кабиров Р. Р. Изменение цианобактериально-водорослевых ценозов нефтезагрязненных почв при биоремедиации // Вестник Башкирского университета. 2015 Т. 20. № 1. С.111 – 114.

11. Неходимова С. Л., Фомина Н. В. Особенности изменения состава цианобактериально-водорослевых сообществ агропочв после применения биофунгицидов // Проблемы современной аграрной науки: мат. межд. заоч. науч. конф., Красноярск, 2015. С. 30 – 32.

12. Доценко К. А. Влияние систем защиты растений и агротехнических приемов на почвенную альгофлору в зерноотравнопропашном севообороте: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Краснодар, 2000.

References

1. Fokina A. I., Ogorodnikova S. Yu., Domracheva L. I., Lyalina E. I., Gornostaeva E. A., Ashihmina T. Ya., Kondakova L. V. Cyanobacterii kak test-organizmy i biosorbenty // Pochvovedenie. 2017. № 1.

S. 77 – 85.

2. Singh J. Sh., Kumar A., Rai A. N., Singh D. P. Cyanobacteria: A Precious Bio-resource in Agriculture, Ecosystem, and Environmental Sustainability // Front. In Microb. 2016. V.7. P.1–19.

3. Mohan A., Kumar B. Growth Performance and Yield Potential of Cereal Crops (Wheat, Maize and Barley) in Association with Cyanobacteria // Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 2017. V. 6 (10). P. 744 – 758.

4. Trefilova L. V. Ispol'zovanie cianobakterij v agrobiotekhnologii: avtoref. dis. ... kand.biol. nauk. Saratov, 2008.

5. Didovich S. V., Moskalenko S. V., Temraleeva A. D., Napchaeva S. A. Biotekhnologicheskij potencial pochvennyh cianobakterij (obzor). – Voprosy sovremennoj al'gologii. 2017. 2(14). URL: [http://algology.ru/1170-\(data obrashcheniya: 31.03.2018\)](http://algology.ru/1170-(data obrashcheniya: 31.03.2018)).

6. Didovich S. V., Temraleeva A. D., Didovich A. N., Alekseenko O. P., Gorgul'ko T. V., CHajkovskij V. A. Metabolicheskij potencial cianobakterij v rastitel'no-mikrobnom vzaimodejstvii // Tavricheskij vestnik agrarnoj nauki. 2017. № 4(12). S. 9 – 17.

7. SHaripova M. Yu., Dubovik I. E. Sovremennye

metody al'gologii. Ufa: RIC BashGU, 2012. – 116 s.

8. Koksharova O. A. Cianobakterii: perspektivnye ob'ekty nauchnogo issledovaniya I biotekhnologii // Uspekhi Sovremennoj Biologii. 2008. № 7. S. 3 – 20.

9. Dubovik I. E., SHaripova M. Yu. Nazemnye I vodnye ehpifitnye cianoprokarioty I vodorosli i vozmozhnost' ih ispol'zovaniya v ocenke sostoyaniya okruzhayushchej sredy // Teoreticheskaya i prikladnaya ehkologiya. 2016. №1. S. 51 – 55.

10. Dubovik I. E., SHaripova M. Yu., Kabirov R. R. Izmenenie cianobakterial'no-vodoroslevyh cenozov neftezagryaznennyh pochv pri bioremediacii // Vestnik Bashkirskogo universiteta. 2015. T. 20. № 1. S. 111–114.

11. Nekhodimova S. L., Fomina N. V. Osobennosti izmeneniya sostava cianobakterial'no-vodoroslevyh soobshchest v agropochve posle primeneniya biofungicidov // Problemy sovremennoj agrarnoj nauki: mat. mezhd. zaoch. nauch. konf., Krasnoyarsk, 2015. S. 30 – 32.

12. Docenko K. A. Vliyanie system zashchity rastenij I agrotekhnicheskikh priemov na pochvennyuyu al'gofloru v zernotravyanopropashnom sevooborote: avtoref. dis. ... kand. biol. nauk. Krasnodar, 2000.

USE OF CYANOBACTERIA AS BIOFERTILIZERS AND TEST-OBJECTS AT APPLICATION OF FUNGICIDES IN AGRICULTURE

© E.Yu. Egupova, M.Yu. Sharipova, I.E. Dubovik

Bashkir State University,
32, ulitsa Zaki Validi, 450076, Ufa, Russian Federation

A brief review of the literature on the application of environmentally friendly methods for solving biotechnological problems is given, namely, the use of cyanobacteria as biofertilizers and biotesters in agriculture. The main reasons for choosing these objects for further application in agricultural practice are disclosed, and the experience of using cyanobacteria in agriculture is now generalized. Reduction of taxonomic composition and ecobio-morph spectrum was revealed. Resistant species were representatives of cyanobacteria: *Nostoc commune*, *N. punctiforme* and *Cylindrospermum stagnale*. "Metabacterin" on the growth of the cyanobacterium *Nostoc commune* only at a fungicide concentration, starting at 1 g / l. The greatest influence, consisting in the death of colonies and complete lysis of cells, was provided by concentrations of "Metabacterin" 25 and 50 g / l. Thus, cyanobacteria can be used as an algotester for certain fungicides.

Key words: cyanobacteria, biotesters, metabacterin, penaconazole, *Nostoc commune*, *Nostoc punctiforme*, *Cylindrospermum stagnale*.

УДК 57.024

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-4-3-23-28

АНАЛИЗ АССОЦИАЦИЙ ПОЛИМОРФНЫХ ЛОКУСОВ *rs1045881* И *rs4971648* ГЕНА *NRXN1* С ФЕНОТИПИЧЕСКИМИ ВАРИАЦИЯМИ В УРОВНЕ МАТЕМАТИЧЕСКОЙ ТРЕВОЖНОСТИ

© Р.Ф. Еникеева, А.В. Казанцева, А.Р. Романова, Д.Ю. Давыдова, Э.К. Хуснутдинова

Трудности в обучении математике могут быть обусловлены наличием математической тревожности (МТ), характеризуемой болезненными ощущениями при решении математических задач. К настоящему времени существуют единичные работы, выявляющие ассоциации полиморфных вариантов генов-кандидатов с развитием математической тревожности. Согласно литературным данным, повышенная математическая тревожность встречается у 4% студентов высшей школы, а около 85% студентов отмечают у себя умеренные ее проявления. В настоящее время проведено множество близнецовых исследований, доказывающих роль наследственности в появлении трудностей в обучении математике, коэффициент наследуемости при этом составил 0,2 – 0,9. Гены, семейства нейрексинов, вовлечены в регуляцию синаптической пластичности являющейся одним из механизмов формирования рабочей памяти, а значит, способности справиться со стрессовой ситуацией. Целью данного исследования являлась оценка основного эффекта полиморфных локусов гена *NRXN1* (*rs1045881* и *rs4971648*) а также эффекта гаплотипов в формировании математической тревожности. В исследовании приняли участие 523 психически здоровых индивида (75,7% женщин) - студентов ВУЗов Республики Башкортостан (средний возраст $20,99 \pm 3,32$ лет). Уровень математической тревожности был определен при помощи теста Mathematics Anxiety Rating Scale (MARS). Генотипирование проводили с помощью Real-Time PCR. Статистический анализ был осуществлен с использованием программы Plink v.1.07. Полученные данные указывают на вовлеченность локуса *rs1045881* гена *NRXN1* в развитие межиндивидуальных различий в уровне математической тревожности. А именно, анализ ген-средовых взаимодействий позволил обнаружить модели, которые ассоциированы с фенотипическими вариациями математической тревожности. Так, у носителей генотипа *rs1045881**GG гена *NRXN1* в группах лиц, которые испытывают трудности при общении с людьми ($\beta = -8.853$; $P_{FDR} = 0.034$; $r^2 = 0,059$), была обнаружена повышенная математическая тревожность.

Ключевые слова: математическая тревожность, генетика поведение, гены кандидаты.

Введение. Изучение продуктивности когнитивных функций как составной части психического здоровья приобретает сегодня все большую актуальность в связи с повышенными требованиями к эффективной интеллектуальной

деятельности во всех сферах функционирования общества. В последнее время интерес ученых направлен на изучение математической тревожности (МТ), которая представляет собой одну из причин возникновения трудностей в обучении

ЕНИКЕЕВА Рената Фануровна, Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,
e-mail: enikeevarf@gmail.com

КАЗАНЦЕВА Анастасия Валерьевна – к.б.н., Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН
e-mail: kazantsa@mail.ru

РОМАНОВА Альбина Рауфовна – к.б.н., Башкирский государственный университет,
e-mail: albina_far_81@mail.ru

ДАВЫДОВА Юлия Дмитриевна, Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,
e-mail: julia.dmitrievna@list.ru

ХУСНУТДИНОВА Эльза Камилевна – д.б.н., Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,
e-mail: elzakh@mail.ru

математике. Математическая тревожность - состояние, при котором индивиды испытывают отрицательные эмоции (избегание, тревожность, стресс) и даже болезненные ощущения при необходимости решения задач, требующих использования математических навыков.

Экспериментальные данные, современной когнитивной психологии, свидетельствуют о влиянии математической тревожности на познавательные процессы. Считается, что тревожность может приводить к сужению поля внимания. Люди, находящиеся в тревожном состоянии, концентрируются на том, чего они боятся, игнорируя другую информацию [1]. Большинство исследователей, склоняется к мнению, что наибольшее влияние, математическая тревожность оказывает на рабочую память [2]. Данную теорию подтверждают нейробиологические исследования, согласно данным которых, стресс, вызванный высокой тревожностью, вызывает высвобождение ацетилхолина, который является ключевым нейромедиатором когнитивных процессов в целом и памяти в частности [3]. После активного выброса ацетилхолина, происходит истощение, ведущее за собой снижение эффективности функционирования памяти.

Большое количество литературных данных свидетельствует о вовлеченности гена *NRXN1* в развитие расстройств аутистического спектра, шизофрении, задержки развития и умственной отсталости [4]. Ген *NRXN1* охватывает регион размером 1,12 Мб и содержит 23 экзона, что делает его одним из крупнейших в геноме человека. В транскрипции белка *NRXN1* участвуют два альтернативных промотора гена *NRXN1*, образующие два транскрипта *NRXN1*- α и $-\beta$, в результате альтернативного сплайсинга которых формируется большое количество эволюционно консервативных изоформ *NRXN1*. Исследования, проведенные на эмбриональных стволовых клетках человека, показали, что инактивация гена *NRXN1* ухудшает синаптическую функцию в нейронах [5]. Таким образом, ген *NRXN1* является важным геном кандидатом при изучении молекулярно-генетических механизмов формирования МТ.

Ген *NRXN1* характеризуется большим количеством полиморфных локусов. В нашем исследовании были изучены два из них, *rs1045881*

и *rs4971648*. Локус *rs1045881* часто ассоциируют с когнитивными нарушениями, как в выборке здоровых людей, так и среди больных аутизмом и шизофренией. Согласно литературным данным аллель *rs1045881*G* гена *NRXN1* образует сайт связывания для miR-339 и miR-1274, что предполагает функциональную роль этого полиморфного локуса, включая изменения в экспрессии гена *NRXN1* [6].

Большое количество эмпирических данных подтверждают ассоциацию наличия делеции (от 5 до 322 кб) в области 2p16.3 гена *NRXN1* с аутизмом и шизофренией. В то же время, Need с коллегами сообщают о возможном сцеплении этой делеции с *rs4971648* [7], что делает этот локус интересным для дальнейшего изучения.

Материалы и методы. В исследовании приняли участие 523 психически здоровых индивида (75,7% женщин) - студентов ВУЗов Республики Башкортостан (средний возраст 20,99 \pm 3,32 лет), прошедшие психологическое тестирование. Из них русских - 119, татар - 143, башкир - 94, удмуртов - 25, индивидов смешанной этнической принадлежности - 142. Кроме того, все испытуемые прошли анкетирование, учитывающее национальную принадлежность до трех поколений, порядок рождения и количество детей в семье, статус курения, стиль воспитания, наличие у близких родственников отягощенности по психическим заболеваниям, знание своего родного языка (башкирского, татарского и др.). Информация о стиле воспитания включала в себя такие вопросы об отношении родителей в семье как: эпизоды плохого обращения в детстве, росли ли испытуемые в полной семье, материальном положении семьи, а так же возрасте матери при рождении ребенка. Все индивиды не состояли на учете у психиатра и нарколога и отрицали у себя отягощенную наследственность по психическим заболеваниям. Для участия в эксперименте от всех участников было получено добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Общая выборка была разделена на шесть групп, в зависимости от этнической и половой принадлежности. В качестве материала для исследования служили образцы ДНК, выделенные из венозной крови по методу Mathew. Образцы ДНК получены из

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфных локусов гена *NRXN1* и тест Харди-Вайнберга в изученных группах.

SNP	Позиция на хромосоме	Локализация в гене	Минорный/мажорный аллель	Частота генотипа			PHWE
rs1045881	33775715	3'-UTR	A/G	0,019	0,237	0,744	1
rs4971648	33966259	Интрон 8	A/G	0,03	0,343	0,627	0,1756

Примечание. PHWE – значение P-value для теста Харди-Вайнберга, 3'-UTR – 3'-нетранслируемый регион гена.

10 мл венозной крови человека. В качестве антикоагулянта использовали 0,5 мл 0,5 М раствора этилендиаминтетрауксусной кислоты.

Для оценки уровня математической тревожности (МТ) был использован опросник Revised Mathematics Anxiety Rating Scale (MARS, Suinn & Taylor, 1988), адаптированный для студентов ВУЗов, состоящий из 25 вопросов (Психологический институт РАО, Москва). Участникам было предложено прочитать ряд утверждений относительно уроков математики и оценить беспокойство, нервозность и волнения, которые они испытывали с использованием 5-балльной шкалы Ликерта (1 = менее тревожный, 3 = довольно тревожный, 5 = очень тревожный).

Генотипирование полиморфных вариантов гена *rs1045881* и *rs4971648* гена *NRXN1* проводили методом ПЦР с флуоресцентной детекцией (FLASH/RTAS, ФГУП «ГосНИИГенетика», г. Москва). Образцы ДНК амплифицировали в смеси двух пар последовательностей олигонуклеотидов, помеченных различными флуоресцентными красителями. Детекцию результатов проводили на амплификаторе с возможностью проведения анализа флуоресценции по конечной точке – 'CFX96' ('BioRad', США).

Для оценки основного эффекта полиморфных локусов генов-кандидатов, эффекта гаплотипов в вариации уровня МТ был проведен линейный регрессионный анализ в программе PLINK v.1.07.

Результаты и обсуждения. Результаты оценки распределения частот аллелей и генотипов

полиморфных локусов гена *NRXN1* (*rs1045881* и *rs4971648*) соответствовали распределению Харди-Вайнберга. Оценка распределения частот аллелей в общей выборке, позиции локусов и частоты генотипов для всех локусов показаны в таблице 1. Согласно данным проекта HarMap частоты генотипов изученных локусов в гене *NRXN1* совпадали с таковыми для европейских популяций.

В результате линейного регрессионного анализа не было выявлено ассоциации полиморфных локусов гена *NRXN1* (*rs1045881*, *rs4971648*) с математической тревожностью. Последующий стратификационный анализ, проведенный среди мужчин, женщин, индивидов татарской, русской, башкирской, удмуртской и смешанной этнической принадлежности, показал ассоциацию локуса *rs1045881* в гене *NRXN1* с МТ у мужчин ($P = 0,04$, $r^2 = 3,90$) и у башкир ($P = 0,04$, $r^2 = 5,45$) (Таблица 2). Так, у индивидов башкирской этнической принадлежности с аллелем *rs1045881**A в гене *NRXN1* наблюдался пониженный уровень МТ.

Проведен мета-анализ результатов исследования локуса *rs1045881* в гене *NRXN1* в двух выборках – у мужчин и у женщин, обнаружена гомогенность исследуемых выборок по локусу *rs1045881* (критерий гетерогенности Хиггинса $I^2 = 28,59\%$), в связи с чем, рассматривалась модель с фиксированным эффектом (оценка Мантеля-Гензеля). Мета-анализ подтвердил ассоциацию локуса *rs1045881* в гене *NRXN1* с МТ ($\beta = -4,27$; $P = 0,0484$) ранее обнаруженную у женщин. Мета-анализ результатов исследования локуса *rs1045881* в гене *NRXN1* в пяти выборках – у татар, русских, башкир, удмуртов и лиц смешанной

этнической принадлежности показал гомогенность исследуемых выборок по локусу *rs1045881* (критерий гетерогенности Хиггинса $I^2 = 29,54\%$). В результате мета-анализа не было выявлено вовлеченности локуса *rs1045881* в фенотипические вариации МТ в общей выборке ($P = 0,3$), ранее показанной в группе башкир.

Проведенный нами анализ неравновесия по сцеплению между локусами *rs1045881* и *rs4971648* в гене *NRXN1* выявил отсутствие неравновесия по сцеплению между маркерами ($D' < 0,1$), что обусловлено большим расстоянием между локусами (более 190 кб). В связи с этим, гаплотипический анализ не проводился.

Дальнейший анализ ген-средовых взаимодействий позволил обнаружить модели, которые ассоциированы с фенотипическими вариациями МТ. Так, у носителей генотипа *rs1045881*GG* гена *NRXN1* в группах лиц, которые испытывают трудности при общении с людьми ($\beta = -8,853$; $P_{FDR} = 0,034$; $r^2 = 0,059$), была обнаружена повышенная МТ (рисунок 1). К настоящему времени известно большое количество интронных полиморфных локусов, которые приводят к экспрессии большого количества различных

изоформ нейрексина 1, что в дальнейшем определяет различия в синаптической пластичности и, следовательно, в когнитивных функциях. Изученный нами полиморфный локус *rs1045881* находится в 3'-нетранслируемом регионе гена *NRXN1*, что, в свою очередь, предполагает его возможное участие в изменении эпигенетической регуляции гена. В исследованиях Voimeskos с коллегами (2011) индивиды с генотипом *rs10490162*GG* демонстрировали меньшие объемы белого вещества в лобной доле по сравнению с носителями аллеля *rs10490162*A*. Кроме того, в этом же исследовании была показана ассоциация генотипа *rs10490162*GG* с низкими баллами в когнитивных тестах [8] что, в определенной мере, согласуется с полученными нами результатами. В нашей работе, генотип *rs10490162*GG* был связан с МТ в группе лиц, испытывающей трудности при общении с людьми. Согласно литературным данным, вариации числа копийности (в частности делеции размером до нескольких сот килобаз) в гене *NRXN1* приводят к нарушениям когнитивной сферы. Ранее было обнаружено, что полиморфные локусы в интроне 1 гена *NRXN1*

Т а б л и ц а 2

Результаты линейного регрессионного анализа ассоциации полиморфных локусов *rs1045881* и *rs4971648* в гене *NRXN1* с показателями по шкале математическая тревожность

	N	rs1045881			rs4971648		
		β	r2	P	β	r2	P
Общая выборка	523	-4,20	0,80	0,06	1,06	0,07	0,60
Мужчины	127	-8,53	3,90	0,04	-5,14	1,53	0,21
Женщины	396	-2,73	0,36	0,28	2,44	0,4	0,25
Русские	119	-5,59	1,20	0,29	2,28	0,38	0,55
Татары	143	0,78	0,023	0,87	3,00	0,47	0,46
Башкиры	94	-9,62	5,45	0,04	-3,83	1,07	0,37
Удмурты	25	-0,86	0,03	0,94	-0,83	0,06	0,91
Метисы	137	-4,00	1,17	0,25	2,35	0,39	0,51

Примечание. N – число проанализированных индивидов. β – коэффициент регрессии, r2 – процент вариации, %, P – P-value для теста Вальда (Wald test), МТ – математическая тревожность.

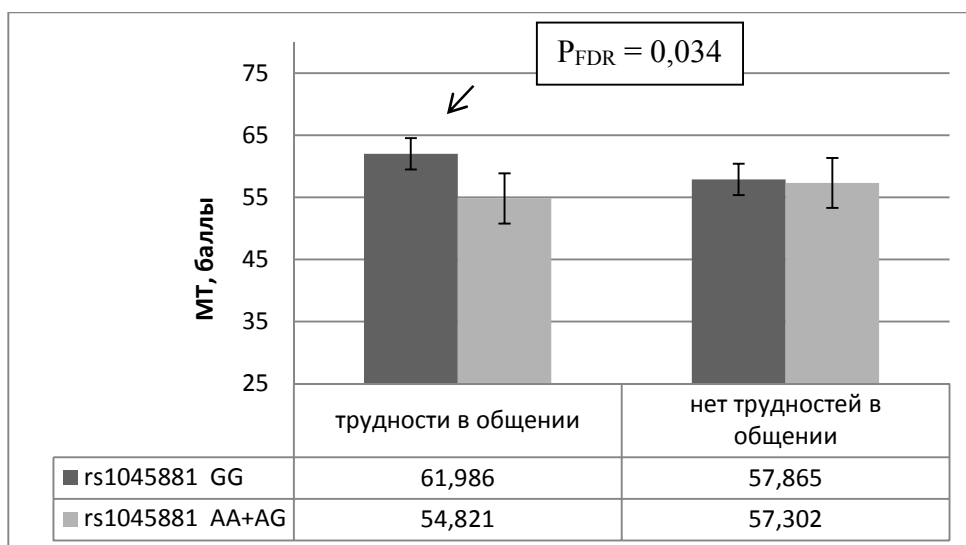


Рис. 1. Средние значения уровня математической тревожности, обусловленные наличием определенного полиморфного варианта в локусе *rs1045881* в гене *NRXN1* в зависимости от наличия или отсутствия трудностей в общении с другими людьми на основании результатов GxE анализа

(*rs10490162*, *rs12467557* и *rs12623467*) [9] и в интроне 3 (*rs2193225*, *rs2052328* и *rs3850333*) [10] ассоциированы с никотиновой зависимостью, которая также характеризуется повышенным уровнем тревожности. Полученные в настоящей работе данные свидетельствуют о вовлеченности гена нейрехина 1 в формирование различий в уровне математической тревожности.

Работа выполнена при поддержке грантов Российского гуманитарного научного фонда 17-16-02009 а(р) Российского фонда фундаментальных исследований 17-29-02195. Исследование поддержано программой развития биоресурсных коллекций ФАНО.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сидоров К.Р., Крохина И.Г. Исследование причин тревожности учащихся // Новое образование. 2013. № 1. С. 3–5.
2. Parka S., Goodingb D. Working memory impairment as an endophenotypic marker of a schizophrenia diathesis // Schizophr. Res. Cogn. 2014. V. 1. № 3. С. 127 – 136.
3. Литвиненко И.В. Нарушения сна и памяти, ацетилхолин при некоторых нейродегенеративных заболеваниях, применение пролонгированной формы галантамина// Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2012. Т. 4. № 2. Р. 100-105.
4. Tucker T., Zahir F., Griffith M. et al. Single exon-resolution targeted chromosomal microarray analysis of known and candidate intellectual disability genes// Eur. J. Hum. Genet. 2014. V. 22. № 6. P. 792–800.
5. Pak C., Danko T., Zhang Y., et al., Human Neuropsychiatric Disease Modeling using Conditional Deletion Reveals Synaptic Transmission Defects Caused by Heterozygous Mutations in *NRXN1*// Cell. Stem. Cell. 2015. V. 17. № 3. P. 316-28.
6. Ameis S.H. I, Szatmari P. Imaging-Genetics in Autism Spectrum Disorder: Advances, Translational Impact, and Future Directions //Front. Psychiatry. 2012. № 3. P. 46.
7. Need A.C., Attix D.K., McEvoy J.M. A genome-wide study of common SNPs and CNVs in cognitive performance in the CANTAB// Hum. Mol. Genet. 2009. V. 18. № 23. P. 4650–4661.
8. Voineskos A.N., Lett A.P., Lerch J.P. et al. Neurexin-1 and Frontal Lobe White Matter: An Overlapping Intermediate Phenotype for Schizophrenia and Autism Spectrum Disorders// PLoS One. 2011.V.6. № 6. P. e20982.
9. Bierut L.J., Madden A.F., Breslau N. et al. Novel Genes Identified in a High Density Genome Wide Association Study for Nicotine Dependence// Hum. Mol. Genet. 2007. V. 16. № 1. P. 24–35.
10. Nussbaum J., Xu Q., Thomas J. Payne T. J. et al. Significant association of the neurexin-1 gene (*NRXN1*) with nicotine dependence in European- and African-American smokers// Hum. Mol. Genet. 2008. V. 17. № 11. P. 1569–1577.

**ANALYSIS OF ASSOCIATIONS OF POLYMORPHIC LOCI *RS1045881* AND *RS4971648* OF THE *NRXN1* GENE WITH PHENOTYPIC VARIATIONS OF MATHEMATICAL ANXIETY**

© R.F. Enikeeva^{1,2}, A.V. Kazantseva², A.R. Romanova¹, D.Y. Davydova², E.K. Khusnutdinova^{1,2}

¹ Bashkir State University,

32, ulitsa Zaki Validi, 450076, Ufa, Russian Federation

² Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Centre of RAS,

71, prospect Octyabrya, 450054, Ufa, Russian Federation

Nowadays mathematics difficulties frequently caused by increased mathematical anxiety (MA) negatively affect individual's life success. MA manifested as a sense of high anxiety and awkwardness connected with difficulties in manipulations with numbers in both academic and everyday situations. To date no studies demonstrating distinct systems and genes responsible for the development of high MA have been published. According to the published studies, increased MA was present in 4% of high school students, and about 85% of students reported moderate MA. To date, a number of twin studies have been conducted that provide evidence of the role of genetic factors in the mathematical learning (the coefficient of inheritance was 0.2–0.9). The proteins encoded *NRXN1* are involved in the regulation of synaptic plasticity representing one of the mechanisms of working memory and, hence, in resistance to stressful life events. The present study aimed to estimate the main effect of *NRXN1* (*rs1045881* and *rs4971648*) gene polymorphisms, as well as haplotype effect in mathematics anxiety. The study involved 523 healthy individuals from Republic of Bashkortostan (75% women) (mean age 20.3 ± 3.87 years). MA level was assessed via Mathematics Anxiety Rating Scale (MARS). SNPs genotyping was performed via Real-Time PCR. Statistical analysis was conducted with Plink v.1.07. Revealed findings evidence association of *NRXN1* gene with individual variations in MA. Analysis of gene-environment interactions allowed detecting models that are associated with phenotypic variations of mathematical anxiety. In individuals with the genotype *rs1045881* * GG of the *NRXN1* gene, which have difficulty communicating ($\beta = -8.853$, PFDR = 0.034, $r^2 = 0.059$), increased mathematical anxiety was detected.

Key words: mathematical anxiety, genetics of behavior, genes candidates.

УДК 577.1

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-4-3-29-34

ВЛИЯНИЕ ПИЩЕВОГО СУБСТРАТА НА АКТИВНОСТЬ ГИДРОЛАЗ КОЛОРАДСКОГО ЖУКА

© Р.И. Ибрагимов, В.О. Цветков, И.А. Шпирная, И.С. Марданшин, Л.Г. Яруллина

Колорадский жук *Leptinotarsa decemlineata* Say является одним из самых опасных вредителей пасленовых культур, в первую очередь, картофеля. Колорадский жук - олигофаг, и фактор влияния кормового растения для вида имеет особое значение. В настоящее время система «фитофаг – растение-хозяин» рассматривается как результат процессов коадаптации и коэволюции животных-олигофагов и кормовых растений. В условиях современных агроэкосистем в популяциях насекомых еще должны осуществляться интенсивные микроэволюционные процессы, в первую очередь, процессы физиологической и биохимической коадаптации компонентов системы «колорадский жук и культурный картофель». Биохимические аспекты взаимодействия насекомых и растений в последние годы интенсивно исследуются. В листьях картофеля обнаружены химические соединения, оказывающие токсический эффект на насекомых и снижающие усваиваемость растительной пищи. В успешной реализации процессов пищевого обеспечения насекомых большая роль принадлежит гидролитическим ферментам фитофага и их ингибиторам из растений.

В статье представлены результаты измерения пищевой активности и определения активности, молекулярной гетерогенности гидролаз колорадского жука в зависимости от условий питания насекомых. Выявлены существенные различия в активности гидролитических ферментов при питании личинок колорадского жука различными видами пасленовых растений. Количество молекулярных компонентов протеиназ у личинок колорадского жука не зависело от типа растительного пищевого субстрата.

Полученные результаты исследований позволяют детализировать механизмы взаимоотношений колорадского жука и пасленовых растений и выявить видовые и сортовые особенности проявления устойчивости растений к поражению насекомыми. Оказалось, что территориально разделенные локальные популяции колорадского жука характеризуются неодинаковой пищевой активностью по отношению к различным видам и сортам растений. Состав пищи (кормового растения) изменяет активность пищеварительных ферментов насекомых, но не влияет на их количественный состав.

Ключевые слова: колорадский жук, пищевая активность, протеазы, пектиназы, целлюлазы, амилазы.

Введение. Колорадский жук *Leptinotarsa decemlineata* Say является одним из самых опасных вредителей пасленовых культур, в первую очередь, картофеля. Колорадский жук - олигофаг,

и фактор влияния кормового растения для вида имеет особое значение. Известно, что пригодны для питания и развития колорадского жука только 20 видов пасленовых [1]. Устойчивость

ИБРАГИМОВ Ринат Исмагилович – д.б.н., Башкирский государственный университет,
e-mail: IBRAGIMOV56@yandex.ru

ЦВЕТКОВ Вячеслав Олегович – к.б.н., Башкирский государственный университет,
e-mail: zv347@ya.ru

ШПИРНАЯ Ирина Андреевна – к.б.н., Башкирский государственный университет,
e-mail: i-shia@yandex.ru

МАРДАНШИН Ильдар Салимьянович – к.с.-х.н., Башкирский НИИСХ Россельхозакадемии,
e-mail: ildar.mardanshin1966@yandex.ru

ЯРУЛЛИНА Любовь Георгиевна – д.б.н., Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,
e-mail: yarullina@bk.ru

растений картофеля к повреждениям насекомыми обеспечивается как анатомическими барьерами, так и биохимическими особенностями растений. В настоящее время система «фитофаг – растение-хозяин» рассматривается как результат процессов коадаптации и коэволюции животных-олигофагов и кормовых растений. Как известно, формирование вида *L. decemlineata* происходило без взаимодействия его с *Solanum tuberosum*, в качестве основной кормовой базы насекомые начали использовать растения картофеля относительно недавно, с начала XVIII века [2]. Поэтому можно предположить, что в условиях современных агроэкосистем в популяциях насекомых еще должны осуществляться интенсивные микроэволюционные процессы, в первую очередь, процессы физиологической и биохимической коадаптации компонентов системы «колорадский жук и культурный картофель».

Биохимические аспекты взаимодействия насекомых и растений в последние годы интенсивно исследуются. В листьях картофеля обнаружены химические соединения, оказывающие токсический эффект на насекомых и снижающие усваиваемость растительной пищи: стероидные гликоалкалоиды, метиловые кетоны, фенолы, никотин [3–6]. В успешной реализации процессов пищевого обеспечения насекомых большая роль принадлежит гидролитическим ферментам фитофага и их ингибиторам из растений [7–10]. Так, подавляя процессы протеолиза в пищеварительной системе, ингибиторы снижают поступление аминокислот, в т.ч. и незаменимых, в организм насекомого. Наличие в растительной пище нескольких ингибиторов протеиназ существенно снижает пищевую активность насекомых и их репродуктивный потенциал [11, 12]. Доказательства защитной функции ингибиторов протеиназ впервые были представлены в работе С. Риана с сотр. [13], когда повреждение растений картофеля колорадским жуком вызывало в них активацию и синтез «de novo» защитных молекул, в т.ч. белков (пептидов), подавляющих активность протеиназ. Причем, повреждение даже одного листа вызывало активацию ингибиторов протеиназ во всем растительном организме.

Добавление в пищу низкомолекулярного ингибитора цистеиновых протеиназ E-64 привело к значительной задержке роста личинок [14]. Оказалось, что потребление пищи с высоким содержанием ингибиторов вызывает в организме насекомых ответные реакции, приводящие к изменению его метаболизма. Так, кормление личинок КЖ листьями картофеля с повышенным содержанием ингибитора конкретной пищеварительной протеиназы, стимулирует синтез в кишечнике насекомых других ферментов, неспецифичных к данному ингибитору [15]. Можно предположить, пищевые особенности растений будут оказывать влияние на пищевую активность насекомых, посредством изменений биохимических параметров насекомых.

Целью нашей работы было выявление изменений в активности и компонентном составе гидролитических ферментов при питании личинок колорадского жука различными видами пасленовых растений.

Материалы и методы. В опытах были использованы имаго и личинки колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata*), растения картофеля (*Solanum tuberosum*, сорта Невский, Луговской, Удача и Башкирский), томата (*Solanum lycopersicum*, сорт Молдавский ранний) и баклажана (*Solanum melongena*, сорт Юбилейный).

Навеску свежих насекомых растирали в ступке и экстрагировали трис-НСI- или ацетатным буфером при 4 °С, дважды центрифугировали 10 мин при 11000 g при 4 °С. Супернатант использовали для определения активности и выделения гидролитических ферментов.

Активность гидролаз определяли с помощью иммобилизованных в геле агарозы субстратов для ферментов: крахмала КМЦ и пектина, соответственно [8]. Выделение ферментов и гомогенатов насекомых осуществляли аффинной хроматографией с сорбентом на основе полиакриламидного геля. В качестве лигандов были использованы ферментные субстраты: желатин (для протеиназ), яблочный пектин (для пектиназ), картофельный крахмал (для амилаз), карбоксиметилцеллюлоза (для целлюлаз).

Для разделения белков проводили SDS-электрофорез в 10%-ном ПААГ по Лэммли.

Т а б л и ц а 1

Пищевая активность имаго колорадского жука из нескольких локальных популяций по отношению к различным растениям (мг/сутки на 1 насекомого)

Культура, сорт	Пищевая активность			
	Выборка 1	Выборка 2	Выборка 3	Выборка 4
Картофель (Башкирский)	36.9±4.3	32.1±2.2	37.1±6.8	30.6 ±2.0
Картофель (Удача)	30.2±6.3	27.9±0.7	28.2±2.8	22.1 ± 3.5
Картофель (Невский)	28.1±3.0	37.7±3.8	25.4±4.8	23.1 ±5.1
Баклажан (Юбилейный)	25,3±2.1	29,6±4.2	30,1±3.1	22.1±3.9
Томат (Молдавский)	3,1±0.2	0	3,4±0.3	2,9± 0,3

Гели окрашивали Кумасси G-250. Эксперименты проводили в трехкратной биологической и четырехкратной аналитической повторности.

Результаты и обсуждение. В таблице 1 приведены данные о поедании листьев различных культурных растений имаго колорадского жука, представителями выборок (локальных популяций) из различных районов РБ. Как видно, листья исследуемых сортов картофеля и баклажана активно используются в пищу перезимовавшими особями колорадского жука. Тем не менее, насекомые различных групп характеризуются неодинаковой пищевой активностью по отношению к различным сортам картофеля. Интересно отметить, что наиболее предпочитаемой пищей для насекомых всех четырех групп оказались листья устойчивого сорта Башкирский; листья сортов с меньшим показателем устойчивости поедались насекомыми менее интенсивно. В целом, экспериментальные насекомые за 1 сутки съедали на 5-10 мг (на 20-25%) больше листьев картофеля сорта Башкирский, чем листьев сортов Удача и Невский. Исключение составили насекомые из выборки 2, которые активно поедали и листья сорта Невский. По сравнению с листьями картофеля, листья баклажана менее активно поедались колорадским жуком. Насекомые практически не использовали в пищу

листья томата. Пищевая активность по отношению к этому субстрату была на порядок ниже, чем по отношению к картофелю и баклажану. Пищевая активность представителей выборки 2 по отношению к листьям томата оказалось равной нулю.

На рисунке 1 представлены данные об активности гидролитических ферментов в личинках колорадского жука, питавшихся листьями растений различных видов. У контрольных насекомых, не получавших пищу в течение 48 часов, активность исследованных гидролаз выявляется на невысоком уровне и составляет 16-23 Е/г массы, в зависимости от типа фермента. Видно, что видовые особенности растений оказывают существенное влияние на уровень активности пищеварительных ферментов насекомых. При питании личинок листьями картофеля и баклажана активность протеиназ и пектиназ у насекомых значительно (в 1,5 – 2 раза) повышается по сравнению с уровнем активности контрольных (голодных) личинок. Тогда как целлюлолитическая и амилолитическая активности насекомых, питающихся листьями этих растений, выявляются на уровне показателей контрольных насекомых или ниже этих показателей. Поедание насекомыми листьев томата приводит к полному или частичному подавлению активности пищеварительных ферментов.

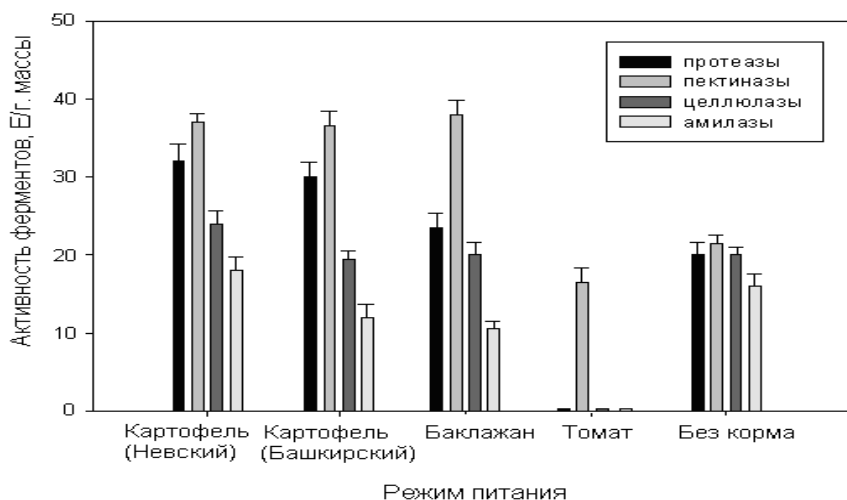


Рис.1. Активность гидролитических ферментов в гомогенатах личинок колорадского жука в зависимости от пищевого субстрата (вида растения). Контроль (без корма) – личинки, лишенные пищи в последние 48 ч

Так, в гомогенате личинок этого варианта практически отсутствует амилитическая, целлюлитическая и протеолитическая активности, а пектиназная активность более чем в два раза ниже, чем в варианте с листьями картофеля и баклажана. Как видно, крайне низкая поедаемость листьев томата определяется подавлением активности основных пищеварительных ферментов при попадании растительной пищи в организм насекомого. Можно предположить, что высокий уровень ингибирования пищеварительных ферментов не позволяет насекомым полноценно усваивать пищевые компоненты растений томатов, что обеспечивает их высокую устойчивость к поеданию жуком.

Как видно из наших результатов, уровень активности протеаз, пектиаз, амилаз целлюлаз у личинок колорадского жука изменяется в зависимости от вида и сорта растений, которыми питаются насекомые. Данные об изменении активности и количественного состава протеолитических ферментов при питании различными пищевыми субстратами были получены и другими авторами [16, 17]. Наши результаты электрофореза аффинноочищенных протеиназ личинок колорадского жука показали, что число электрофоретических компонентов фермента не зависит типа питательного растительного субстрата (рис. 2.). Как видно, при питании личинок жука различными видами растений в электрофоретическом спектре протеиназ выявляется одинаковое количество (5) молекулярных форм.

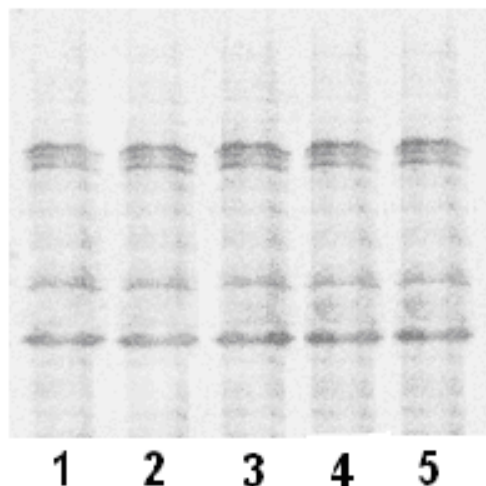


Рис. 2. Разделение аффинноочищенных протеиназ личинок колорадского жука методом электрофореза в 10%-ном SDS-ПААГ при кормлении насекомых листьями различных растений: 1 - без корма; 2 - картофель (сорт Невский); 3 - картофель (сорт Башкирский); 4 - баклажан (сорт Юбилейный); 5 - томат (сорт Молдавский ранний)

Выявленные различия в уровне активности фермента обуславливаются, по-видимому, неодинаковой относительной активностью различных молекулярных форм фермента.

Полученные результаты исследований позволяют детализировать механизмы взаимоотношений колорадского жука и пасленовых растений и выявить видовые и сортовые особенности проявления устойчивости растений к поражению насекомыми. Оказалось, что территориально раз-

деленные локальные популяции колорадского жука характеризуются неодинаковой пищевой активностью по отношению к различным видам и сортам растений. Состав пищи (кормового растения) изменяет активность пищеварительных ферментов насекомых, но не влияет на их количественный состав.

ЛИТЕРАТУРА

1. Jansky S.H., Simon R., Spooner D.M. A test of taxonomic predictivity: resistance to the Colorado potato beetle in wild relatives of cultivated potato // *J. Econ. Entomol.* 2009. V. 102. No. 1. P. 422-431.
2. Колорадский картофельный жук, *Leptinotarsa decemlineata* Say: Филогения, морфология, физиология, экология, адаптация, естеств. враги. Р. С. Ушатинская, Е. П. Иванчик, С. С. Ижевский, М. Наука. 1981. 375 С.
3. Walling LL: // *Journal of Plant Growth Regulation.* 2000. № 19. P. 195–216.
4. Zagrobelny M, Bak S, Rasmussen AV, Jørgensen B, Naumann CM, Lindberg Møller B // *Phytochemistry.* 2004. № 65. P. 293–306.
5. Lankau RA // *New phytologist.* 2007. № 175. P.176–184.
6. Hopkins RJ, Van Dam NM, Van Loon JJA // *Annual Review of Entomology.* 2009. № 54. P. 57
7. 7.Chen H, Gonzales-Vigil E, Wilkerson CG, Howe GA, Chen H, Gonzales-Vigil E, Wilkerson CG, Howe GA // *Plant Physiol.* 2007. № 143. P. 1954–1967.
8. Шпирная И.А., Ибрагимов Р.И., Умаров И. А. Подавление активности гидролитических ферментов колорадского жука растительными белками//*Вестник БашГУ*, 2006, Т.11, № 3, С. 49 -52.
9. Ibragimov R.I., Mardanshin I.S., Benkovskaya G.V., Udalov M.B., Shpirnaya I.A., Tsvetkov V.O. Hydrolytic Enzyme Inhibitors and Necrotic Reactions in Potato Leaves Reduce Reproductive Success of Colorado Potato Beetle // *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2014, № 4 P. 331-34.
10. Tsvetkov V.O., Shpirnaya I.A., Valiakmetova K.I., Ibragimov R.I. Physico-chemical characterization of amylases of *L. decemlineata* and their inhibitors from plants // *Journal of biomolecular structure and dynamics*, 2015, V. 33, No sup1, pp 109-110.
11. Brunelle F, Cloutier C, Michaud D. Colorado potato beetles compensate for tomato cathepsin D inhibitor expressed in transgenic potato // *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 2004. № 55. P. 103–113
12. Ibragimov R.I., Tsvetkov V.O., Shpirnaya I.A., Mardanshin I.S., Benkovskaya G.V., Yarullina L.G. Inhibitors of proteinases and necrotic reactions in the potato leaves reduce the reproductive potential of the Colorado potato beetle // *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 2015, No 6(6), pp. 703-708
13. C.A. Ryan. Insect-induced Chemical Signals Regulating Natural Plant Protection Responses. // *Variable plants and herbivores in natural and managed systems.* New York, Academic press.
14. Hines M., Nielsen S., Shade R., Pomeroy M. The effect of two proteinase inhibitors, E-64 and the Bowman-Birk inhibitor, on the developmental time and mortality of *Acanthoscelides obtectus*// *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 1990, V.57, Issue 3, P. 201–207.
15. Jongsma M., Bakker P., Peters J., Bosch D., Stiekema W. Adaptation of Spodoptera exigua larvae to plant proteinase inhibitors by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibition // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, Vol. 92, pp. 8041-8045.
16. Overney S, Fawe A, Yelle S, Michaud D. Diet-related plasticity of the digestive proteolytic system in larvae of the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) // *Insect Biochemistry and Physiology*, 1997, V. 36, № 4. P. 241–250.
17. Zhu-Salzman K, Zeng R. Molecular mechanisms of insect adaptation to plant defense: Lessons learned from a Bruchid beetle // *Insect Science*, 2008, V. 15, № 6. P. 477–481.

EFFECT OF FOOD SUBSTRATE ON THE ACTIVITY OF HYDROLASES OF THE COLORADO POTATO BEETLE

© R. Ibragimov¹, V. Tsvetkov¹, I. Shpirnaya¹, I. Mardanshin², L. Yarullina³

¹ Bashkir State University,
32, ulitsa Zaki Validi, 450076, Ufa, Russian Federation

² Research institute of agriculture,
19, ulitsa Rikharda Zorge, 450059, Ufa, Russian Federation

³ Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Centre of RAS,
71, prospect Otyabrya, 450054, Ufa, Russian Federation

Colorado beetle *Leptinotarsa decemlineata* Say is one of the most dangerous pests of nightshade crops, primarily potatoes. Colorado potato beetle - oligophage, and the influence of host plants for the species is of special importance. Currently, the system "phytophage – plant-host" is seen as the result of processes of co-adaptations and co-evolution of animals oligophagous and fodder plants. In modern agro-ecosystems in the populations of insects should be intensive microevolutionary processes in the first place, the physiological and biochemical processes of co-adaptations of the system components "Colorado potato beetle and cultural potatoes." Biochemical aspects of insect-plant interaction have been intensively studied in recent years. Chemical compounds that have a toxic effect on insects and reduce the digestibility of plant food were found in potato leaves. In the successful implementation of the food supply of insects a large role belongs to the hydrolytic enzymes of the phytophagus and their inhibitors from plants.

The article presents the results of measurement of food activity and determination of activity, molecular heterogeneity of hydrolases of the Colorado potato beetle depending on the conditions of food of insects. Significant differences in the activity of hydrolytic enzymes in the nutrition of Colorado potato beetle larvae by different species of nightshade plants were revealed. The number of molecular components of proteinases in Colorado potato beetle larvae did not depend on the type of plant food substrate.

The results of the research allow to detail the mechanisms of relationships between the Colorado potato beetle and nightshade plants and to identify species and varietal characteristics of plant resistance to insect damage. It turned out that geographically separated local populations of the Colorado potato beetle are characterized by different nutritional activity in relation to different species and varieties of plants. The composition of food (forage plant) changes the activity of digestive enzymes of insects, but does not affect their quantitative composition.

Key words: Colorado potato beetle, food activity, proteases, pectinases, cellulases, amylases.

УДК 638.12 : 631.523.5

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-4-3-35-43

**МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ ГЕНОМЫ КАВКАЗСКОЙ *A. M. CAUCASICA*
И КАРПАТСКОЙ *A. M. CARPATHICA* ПЧЕЛ**

© Р.А. Ильясов, А.Г. Николенко, В.Р. Туктаров, К. Гото, Д. Такахаша, Х.В. Квон

Проанализированы полные последовательности митохондриального генома подвидов медоносных пчел *A. m. caucasica* (16341 п.н.) и *A. m. carpathica* (16336 п.н.). Обе последовательности митохондриальной ДНК (мтДНК) содержали 13 белок-кодирующих генов (СДС), 22 генов транспортной РНК (тРНК), 2 гена рибосомальной РНК (рРНК) и одну АТ-богатую регуляторную область. Общий состав нуклеотидов в мтДНК *A. m. caucasica* / *A. m. carpathica* - А (43,2 / 43,3%), С (9,5 / 9,6%), G (5,6 / 5,5%) и Т (41,6 / 41,6%). Показано, что 9 белок-кодирующих генов и 14 генов тРНК расположены на тяжелой цепи, а 4 белок-кодирующих гена, 2 гена рРНК и 8 генов тРНК расположены на светлой нити для обоих подвидов. Результаты этого исследования могут быть полезны для дальнейших филогенетических и популяционных генетических исследований у пчел.

Ключевые слова: *Apis mellifera*, подвиды пчел, *A. m. caucasica*, *A. m. carpathica*, мтДНК, консервационная генетика.

Введение. Медоносная пчела *Apis mellifera* широко распространена по всему Старому Свету и подразделена на 30 подвидов. Каждый подвид пчел характеризуется собственным ареалом и уникальной приспособленностью к своей среде обитания. Среднерусская пчела *Apis mellifera mellifera*, серая горная кавказская пчела *Apis mellifera caucasica*, и карпатская пчела *Apis mellifera carpathica* являются наиболее распространенными подвидами в России и странах СНГ. Пчелы подвидов *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* широко распространены в южных регионах России и в странах вокруг Черного и

Средиземного морей. Подвиды пчел *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* приспособлены к обитанию горнолесных зонах Кавказских и Карпатских гор и характеризуются уникальными хозяйственно-полезными признаками, такими как спокойное поведение, высокая производительность меда и активность опылительной деятельности. Подвиды пчел *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* могут играть важную роль в сохранении локальных экотипов и биоразнообразия местных экосистем [1].

Естественные ареалы подвидов пчел *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* очень близки и

ИЛЬЯСОВ Рустем Абузарович – д.б.н., Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Колледж естественных наук и биоинженерии Инчхонский национальный университет,
e-mail: apismell@hotmail.com

НИКОЛЕНКО Алексей Геннадьевич – д.б.н., Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,
e-mail: a-nikolenko@yandex.ru

ТУКТАРОВ Варис Рафкатович – д.с.-х.н., Башкирский государственный аграрный университет,
e-mail: t.varis@mail.ru

ГОТО Кендзи, Башкирский государственный аграрный университет,
e-mail: cool.kendzi@gmail.com

ТАКАХАШИ Дзюн-ичи – д.б.н., Киотский Университет Сангё, e-mail: jit@cc.kyoto-su.ac.jp

КВОН Хюн Вук – д.б.н., Колледж естественных наук и биоинженерии Инчхонский национальный университет, Научно-исследовательский центр насекомых-переносчиков болезней Инчхонский национальный университет, e-mail: hwkwon@inu.ac.kr



Рис. 1. Географическая локализация точек отбора образцов пчел подвидов *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica*

расположены между кавказскими и карпатскими горами. Ареал кавказской пчелы охватывает территории южных регионов России, Грузии, Азербайджана и Армении, а карпатской пчелы – охватывает территории Австрии, Чехии, Словакии, Украины, Венгрии, Польши и Румынии. Современная территория распространения пчел подвидов *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* стала более обширной и включает соседние страны, такие как Турция, Белоруссия, Узбекистан и Болгария. Перекрывание ареалов распространения *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* привело к усилению процессов гибридизации и интрогрессия между этими [2].

Известно, что генофонд многих подвидов пчел, в том числе *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* находятся под угрозой исчезновения вследствие их гибридизации с другими подвидами пчел в пределах естественного ареала [3]. До настоящего времени полные мтДНК *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* не были изучены. В данной работе нами были определены и загружены в

Генбанк полные последовательности мтДНК *A. m. caucasica* (AP018404) and *A. m. carpathica* (AP018403). Результаты наших исследований могут в дальнейшем быть использованы в разработке методов генетической идентификации пчел подвидов *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica*.

Материалы и методы. Рабочие особи пчел, ранее идентифицированные с использованием морфометрического анализа [4] как подвид *A. m. caucasica* были отобраны в 2013 году с пасеки, расположенной в Сочинском районе Краснодарского края. Рабочие особи пчел, ранее идентифицированные с использованием морфометрического анализа как подвид *A. m. carpathica* были отобраны в 2011 году с пасеки, расположенной в Майкопском районе Республики Адыгея (рисунок 1).

Тотальную ДНК извлекали из торакса рабочих особей пчел, используя набор ДНК-ЭКСТРАН (СИНТОЛ, Россия). Нуклеотидные последовательности мтДНК *A. m. caucasica* и *A.*

Т а б л и ц а 1

Состав нуклеотидов полной последовательности мтДНК пчел
подвидов *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica*

Нуклеотиды	<i>A. m. caucasica</i> 16341 п.н.		<i>A. m. carpathica</i> 16336 п.н.	
	Число	%	Число	%
Аденин (А)	7067	43,2	7066	43,3
Цитозин (С)	1560	9,5	1562	9,6
Гуанин (G)	908	5,6	906	5,5
Тимин (Т)	6806	41,6	6800	41,6
Динуклеотид GC	2468	15,1	2468	15,1
Динуклеотид AT	13873	84,9	13866	84,9

Т а б л и ц а 2

Частота динуклеотидов в полной последовательности мтДНК пчел
подвидов *A. m. caucasica* / *A. m. carpathica*

2 позиция \ 1 позиция	А	С	G	Т
А	0,195 / 0,194	0,032 / 0,032	0,022 / 0,022	0,184 / 0,185
С	0,044 / 0,044	0,015 / 0,015	0,005 / 0,005	0,032 / 0,033
G	0,028 / 0,028	0,006 / 0,006	0,007 / 0,007	0,014 / 0,014
Т	0,166 / 0,166	0,043 / 0,043	0,022 / 0,022	0,186 / 0,185

m. carpathica были определены в факультете естественных наук Киотского Университета Сангё (Япония) с использованием технологии секвенирования Illumina Next Seq 500 (ILLUMINA, США), используя стандартный протокол для анализа мтДНК медоносной пчелы. Выявленные нуклеотидные последовательности мтДНК были загружены в базы данных DDBJ/GenBank под номерами доступа AP018404 для *A. m. caucasica* и AP018403 для *A. m. carpathica*. Фрагменты 1662186 прочтений ДНК *A. m. caucasica* и 1541213 прочтений ДНК *A. m. carpathica* были картированы и аннотированы с использованием веб-сервера MITOS и Geneious R9 (BIOMATTERS, Новая Зеландия).

МтДНК *Apis mellifera ligustica* (номер доступа GenBank NC_001566) была использована в качестве референсной последовательности. Белок-кодирующие гены, гены тРНК и рРНК мтДНК выравнивались и аннотировались с использованием компьютерных программ CLC

Genomics Workbench 11 (CLCbio, Дания), а также Unipro UGENE 1.28 (UNIPRO, Россия).

Результаты и обсуждения. Полные последовательности мтДНК пчел подвидов *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* составили 16341 п.н. и 16336 п.н., соответственно, что немного больше размера мтДНК *Drosophila yacuba* 16019 п.н. Мы определили долю нуклеотидов А, С, G и Т и наиболее важных пар GC и AT в мтДНК подвидов пчел. Среднее содержание GC и AT-нуклеотидов в мтДНК пчел подвидов *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* составляло 15,1% и 84,9%, соответственно (таблица 1).

Для сравнения, мтДНК плодовой мушки *Drosophila melanogaster* и других подвидов медоносных пчел также очень богаты AT. Это может быть связано с частыми заменами 5-метилцитозина и 6-метилгуанина в парах GC парами AT в ходе эволюции [5]. Были рассчитаны частоты всех динуклеотидов в полной последовательности мтДНК *A. m. caucasica* и *A. m.*

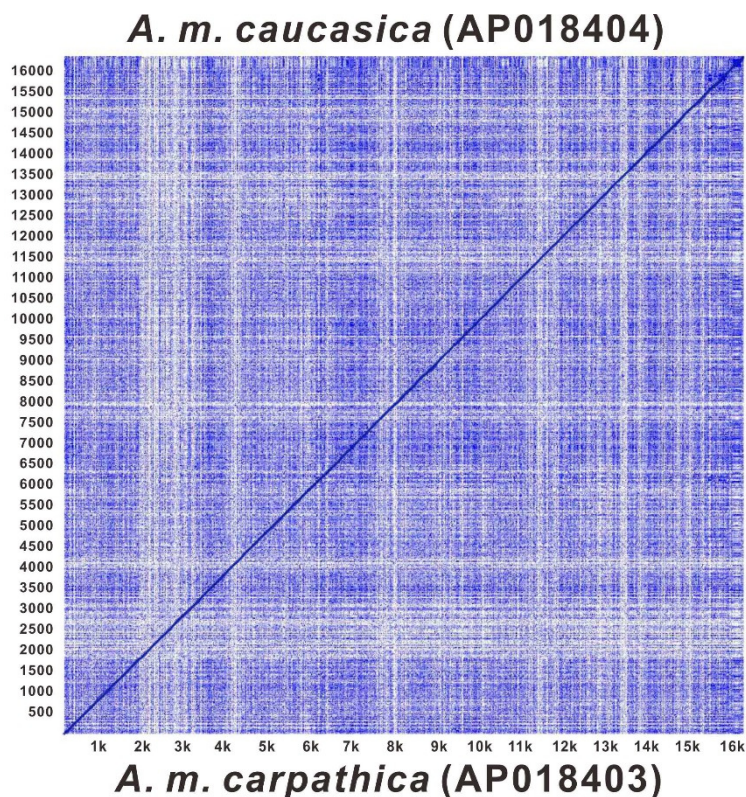


Рис. 2. Точечный график dot plot сравнения полной последовательности мтДНК пчел подвидов *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica*

carpathica, где самая низкая частота в обеих мтДНК была для CG (0,005), а самая высокая – для AA (0,195) (таблица 2). Наиболее часто встречающимися динуклеотидами были AA, TA, AT, TT, а самыми редкими динуклеотидами оказались CG, GC, GG.

Сравнительный анализ полной мтДНК *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* обнаружил 125 однонуклеотидных полиморфных сайтов (SNP) и показал 99,24% идентичности. Высокое сходство между полной мтДНК *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* может быть визуализировано точечным графиком dot plot, в котором непрерывная диагональная линия подтверждает высокий уровень идентичности между двумя последовательностями мтДНК (рисунок 2).

МтДНК *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* обладали высоким сходством с референсной последовательностью *A. m. ligustica* (NC_001566) и содержали 13 белок-кодирующих генов, 22 гена тРНК, 2 гена рРНК и АТ-богатую регуляторную область (таблица 3). Синтения всех сравниваемых мтДНК подвидов пчел не отличается - все подвиды медоносной пчелы имеют сходство в

физической ко-локализации генов в полной последовательности мтДНК.

Стартовыми кодонами белок-кодирующих генов мтДНК *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* являются ATG в 3 генах (ATP6, COX3, CYTB), ATA в 3 генах (COX1, ND3, ND4), ATT в 6 генах (COX2, ATP8, ND1, ND4L, ND5, ND6), ATC в 1 гене (ND2). Стоп-кодоном всех белок-кодирующих генов мтДНК пчел подвидов *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* является TAA.

Некоторые гены мтДНК *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica*, такие как гены ND2 и тРНК-Cys, ATP6 и ATP8, COXI и тРНК-Leu, COXII и тРНК-Asp, перекрываются между собой. МтДНК *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* имеют по два гена для двух генов транспортной РНК (тРНК): тРНК-Ser и тРНК-Leu, но они не идентичны. Это гены изоакцепторных тРНК. Первый ген тРНК-Ser распознает кодон AGN с антикодоном TCT, расположенным на тяжелой цепи в положении (138-140), а второй ген тРНК-Ser распознает кодон UCN с антикодоном TGA, расположенным на тяжелой цепи в положении (12230-12232) относительно референсной последовательности

Т а б л и ц а 3

Расположение 37 генов в полной последовательности мтДНК пчел подвидов
A. m. caucasica и *A. m. saqrathica* относительно референсной
последовательности пчелы подвида *A. m. ligustica*

Тип	Ген	Цепь	Регион
Белок-кодирующие гены	ND2	тяжелая	502 - 1503
	COX1	тяжелая	1794 - 3359
	COX2	тяжелая	3618 - 4295
	ATP8	тяжелая	4444 - 4602
	ATP6	тяжелая	4584 - 5264
	COX3	тяжелая	5285 - 6064
	ND3	тяжелая	6185 - 6538
	ND5	легкая	6892 - 8556
	ND4	легкая	8644 - 9987
	ND4L	легкая	9991 - 10254
	ND6	тяжелая	10441 - 10944
	CYTB	тяжелая	11004 - 12155
	ND1	легкая	12302 - 13219
Гены тРНК	тРНК-Glu	тяжелая	1 - 66
	тРНК-Ser	тяжелая	116 - 178
	тРНК-Met	тяжелая	221 - 286
	тРНК-Gln	тяжелая	296 - 358
	тРНК-Ala	тяжелая	360 - 429
	тРНК-Ile	тяжелая	433 - 501
	тРНК-Cys	легкая	1503 - 1571
	тРНК-Tyr	легкая	1592 - 1659
	тРНК-Trp	тяжелая	1722 - 1793
	тРНК-Leu	тяжелая	3355 - 3424
	тРНК-Asp	тяжелая	4294 - 4362
	тРНК-Lys	тяжелая	4370 - 4438
	тРНК-Gly	тяжелая	6119 - 6184
	тРНК-Arg	легкая	6572 - 6638
	тРНК-Asn	тяжелая	6734 - 6802
	тРНК-Phe	легкая	6810 - 6878
	тРНК-His	легкая	8557 - 8624
	тРНК-Thr	тяжелая	10267 - 10344
	тРНК-Pro	легкая	10365 - 10432
	тРНК-Ser2	тяжелая	12201 - 12267
тРНК-Leu2	легкая	13220 - 13290	
тРНК-Val	легкая	14662 - 14731	
Гены рРНК	LrRNA	легкая	13291 - 14661
	SrRNA	легкая	14732 - 15517
Межгенные спейсеры	АТ-богатая область	тяжелая	15517 - 16343

Открытые рамки считывания в полной последовательности мтДНК пчел подвидов *A. m. caucasica* / *A. m. carpathica* относительно референсной последовательности пчелы подвида *A. m. ligustica*

№	Стартовая позиция	Конечная позиция	Размер, п.н.	Цепь	Стартовый кодон
1	1788 (тРНК-Трп)	3359 (тРНК-Leu)	1572 / 1572	тяжелая	АТС
2	2090 (COX1)	2434 (COX1)	345 / 345	тяжелая	АТТ
3	3989 (COX2)	4291 (COX2)	303 / 303	легкая	АТТ
4	5285 (COX3)	6064 (COX3)	780 / 780	тяжелая	АТГ
5	6892 (ND5)	8559 (тРНК-His)	1668 / 1668	легкая	АТС
6	10417 (тРНК-Pro)	10944 (ND6)	528 / 528	тяжелая	АТТ
7	12302 (ND1)	13225 (тРНК-Leu2)	924 / 924	легкая	АТА

A. m. ligustica (NC_001566). Первый ген тРНК-Leu распознает кодон UUR с антикодоном ТАА, расположенным на тяжелой цепи в положении (3388-3390), а второй ген тРНК-Leu распознает кодон CUN с антикодоном GAT, расположенным на легкой цепи в положении (13267-13269) относительно референсной последовательности *A. m. ligustica* (NC_001566). Очевидно, что это результат адаптивной эволюции пчел, где эти два гена тРНК-Ser и тРНК-Leu обеспечивают гарантированный синтез важных белков и пептидов.

Тяжелая цепь мтДНК пчел подвидов *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* содержит 9 белок-кодирующих генов (ND2, COX1, COX2, АТР8, АТР6, COX3, ND3, ND6, СУТВ), 14 генов тРНК (тРНК-Glu, тРНК-Ser, тРНК-Met, тРНК-Gln, тРНК-Ala, тРНК-Ile, тРНК-Трп, тРНК-Leu, тРНК-Asp, тРНК-Lys, тРНК-Gly, тРНК-Asn, тРНК-Thr, тРНК-Ser), а легкая цепь мтДНК содержит 4 белок-кодирующих гена (ND1, ND4, ND4L, ND5), 8 генов тРНК (тРНК-Cys, тРНК-Тур, тРНК-Arg, тРНК-Phe, тРНК-His, тРНК-Pro, тРНК-Leu, тРНК-Val) и 2 гена рРНК (LrRNA, SrRNA).

Пятнадцать сайтов рестрикции являются общими для мтДНК пчел подвидов *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica*. Уникальный сайт рестрикции XbaI в гене ND5 мтДНК был обнаружен только у *A. m. caucasica* и отсутствовал у *A. m. carpathica*. Сайт рестрикции XbaI (Т▼СТАГА) в гене ND5 мтДНК появился у

пчелы подвида *A. m. caucasica* в результате однонуклеотидной замены SNP 7830С>А относительно референсной последовательности *A. m. ligustica* (NC_001566), которая изменила последовательность с ТСТАГС на ТСТАГА.

Анализ *in silico* полных последовательностей мтДНК *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica*, выявил 7 открытых рамок считывания (ORF), которые потенциально могут быть транслированы (таблица 4). Эти открытые рамки считывания имеют разную длину, где самый большой имеет размер 1668 п.н. (позиция 6892-8559 относительно референсной последовательности *A. m. ligustica*), а самый короткий - 303 п.н. (позиция 3989-4291 относительно референсной последовательности *A. m. ligustica*) у обоих подвидов. Четыре из семи открытых рамок считывания расположены на тяжелой цепи мтДНК, а остальные три - на легкой цепи мтДНК.

Сравнительный анализ выровненной полной мтДНК *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* показал 125 полиморфных сайтов, 30 из которых - инсерции, 40 - делеции, 37 - транзиции, 18 - трансверсии. Известно, что в процессе эволюции в мтДНК чаще возникают транзиции, чем трансверсии. Соотношение транзиций к трансверсиям в мтДНК медоносной пчелы составляет 2,05, что очень близко к соотношению 2,06 у плодовой мушки *D. melanogaster* [6].

Между нуклеотидными последовательностями полной мтДНК *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* было обнаружено 27 транзиций, 6 транс-

версий и 1 делеция, что привело к различиям 34 аминокислотных остатках в продуктах трансляции 10 генов. Так, *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* по гену ND2 различаются заменами 3 аминокислот, по гену COX1 - заменой 1 аминокислотного остатка, по гену COX2 - заменами 2 аминокислотных остатков, по гену COX3 - заменами 3 аминокислотных остатков, по гену ND3 - заменой 1 аминокислотного остатка, по гену ND5 - заменами 4 аминокислотных остатков, по гену ND4 - заменами 9 аминокислотных остатков, по гену ND6 - заменами 5 аминокислотных остатков, по гену CYTB - заменами 2 аминокислотных остатков, по гену ND1 - заменами 5 аминокислотных остатков. Вероятно, данные замены аминокислотных остатков не сильно изменяют конформации белков, а являются только результатами адаптивной эволюции к конкретным условиям среды обитания *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica*.

В мтДНК *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* были обнаружены два повторяющихся мотива с последовательностью ААТТААТТ, которая повторяется 23 раза, и последовательностью ААТАААТТ, которая повторяется 50 раз. Известно, что повторяющиеся мотивы в большинстве геномов эукариот могут повторяться до сотен раз. Значение повторяющихся мотивов в мтДНК до конца не выяснено, но предполагается, что они выполняют как структурную, так и функциональную роли. Кроме того, возможно, повторяющиеся мотивы вовлечены в регуляцию изменчивости мтДНК и экспрессии генов.

АТ-богатая регуляторная область мтДНК вовлечена в контроль транскрипции и инициации репликации у медоносной пчелы. Пониженное содержание GC является одной из отличительных особенностей АТ-богатой регуляторной области. Данная регуляторная область мтДНК медоносной пчелы содержит 96% АТ и находится между генами малой рибосомальной РНК (SrRNA) и транспортной РНК тРНК-Ser. АТ-богатая регуляторная область мтДНК характеризуется наличием поли-Т участков, [ТА(А)]_n-подобных участков, ТАТА мотивов, которые могут быть вовлечены в регуляцию инициации репликации генов. АТ-богатая регуляторная область мтДНК у пчелы подвидов

A. m. ligustica имеет размер 826 п.н., у пчелы подвида *A. m. caucasica* - 832 п.н., у пчелы подвида *A. m. carpathica* - 849 п.н.

Помимо АТ-богатой регуляторной области, мтДНК *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* содержат межгенные спейсерные последовательности с суммарным размером около 813 п.н., которые распределены по 24 регионам и имеют вариацию размеров от 1 до 192 п.н. Самый большой межгенный спейсер *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* (192 п.н.) расположен между генами тРНК-Leu (UUR) и COX2 (положение 3425-3617 относительно референсной последовательности *A. m. ligustica*). Для сравнения, межгенные спейсерные последовательности мтДНК пчелы вида *Apis cerana* имеют общий размер 705 п.н., которые распределены по 22 регионам и имеют вариацию размеров от 1 до 231 п.н. Самый большой межгенный спейсер *Apis cerana* (231 п.н.) расположен между генами транспортных РНК - тРНК-Met и тРНК-Gln [7].

Таким образом, молекулярно-генетические методы являются надежными и информативными инструментами для анализа мтДНК медоносной пчелы. Использование маркеров мтДНК при определении подвидов пчел представляется многообещающим методом современной селекции. Молекулярно-генетические инструменты позволяют выявлять скрытый полиморфизм в геноме медоносной пчелы. Чистые линии медоносных пчел могут быть успешно использованы при селекции для создания устойчивых стабильных популяций. На данный момент большинство популяций *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* не исследованы с применением молекулярно-генетических методов. Результаты данной работы могут стать основой для дальнейших генетических исследований популяций пчел и определения особенностей молекулярной эволюции подвидов *A. mellifera*. Возможно, что опубликованные нуклеотидные последовательности полной мтДНК *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* позволят разработать новые стратегии сохранения подвидов *A. mellifera*. Разработка методов молекулярно-генетической дифференциации кавказской *A. m. caucasica* и карпатской *A. m. carpathica* пчел позволит сохранить чистые линии этих подвидов в пределах их естественного

ареала. Надеемся, что данная статья повысит интерес к изучению и сохранению подвидов пчел *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica*.

Благодарности. Работа была проведена при поддержке гранта Национального исследовательского фонда Кореи, финансируемого правительством Кореи (№ 2016R1A2B3011742) (National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (MSIP) (No. 2016R1A2B3011742)), при поддержке Совместной исследовательской программы развития сельского хозяйства и технологий (Cooperative Research Program for Agriculture Science and Technology Development) (номера проектов: PJ012285 и PJ012526), а также стипендии для научных исследований докторов наук Инчхонского национального университета, Инчхон, Южная Корея (postdoctoral fellowships of Incheon National University, Incheon, South Korea).

ЛИТЕРАТУРА

1. Natsopoulou M.E., McMahon D.P., Doublet V., Frey E., Rosenkranz P., Paxton R.J. The virulent, emerging genotype B of Deformed wing virus is closely linked to overwinter honeybee worker loss // *Scientific Reports*. 2017. V. 7. P. 1-9. DOI 10.1038/s41598-017-05596-3.
2. Kukrer M., Kence M., Kence A. Genetic evidences for the impact of anthropogenic factors on honey bee diversity. *BioRxiv*. 2017. V. 1. P. 1-28. DOI 10.1101/154195.
3. Péntek-Zakar E., Oleksa A., Borowik T., Kusza S. Population structure of honey bees in the Carpathian Basin (Hungary) confirms introgression from surrounding subspecies // *Ecology and Evolution*. 2015. V. 5(23). P. 5456-5467. DOI 10.1002/ece3.1781.
4. Алпатов В.В. Породы медоносной пчелы. М.: Издательство Московского общества испытателей природы. 1948. 183 с.
5. Crozier R.H., Crozier Y.C. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization // *Genetics*. 1993. V. 133(1). P. 97-117. DOI 10.1111/j.1365-2583.1993.tb00131.x.
6. Seplyarskiy V.B., Kharchenko P., Kondrashov A.S., Bazykin G.A. Heterogeneity of the transition/transversion ratio in *Drosophila* and *Hominidae* genomes // *Molecular Biology and Evolution*. 2012. V. 29(8). P. 1943-1955. DOI 10.1093/molbev/mss071.
7. Tan H.W., Liu G.H., Dong X., Lin R.Q., Song H.Q., Huang S.Y., Yuan Z.G., Zhao G.H., Zhu X.Q. The complete mitochondrial genome of the Asiatic cavity-nesting honeybee *Apis cerana* (Hymenoptera: Apidae) // *PLoS One*. 2011. V. 6(8). P. e23008. DOI 10.1371/journal.pone.0023008.

References

1. Natsopoulou M.E., McMahon D.P., Doublet V., Frey E., Rosenkranz P., Paxton R.J. The virulent, emerging genotype B of Deformed wing virus is closely linked to overwinter honeybee worker loss // *Scientific Reports*. 2017. V. 7. P. 1-9. DOI 10.1038/s41598-017-05596-3.
2. Kukrer M., Kence M., Kence A. Genetic evidences for the impact of anthropogenic factors on honey bee diversity. *BioRxiv*. 2017. V. 1. P. 1-28. DOI 10.1101/154195.
3. Péntek-Zakar E., Oleksa A., Borowik T., Kusza S. Population structure of honey bees in the Carpathian Basin (Hungary) confirms introgression from surrounding subspecies // *Ecology and Evolution*. 2015. V. 5(23). P. 5456-5467. DOI 10.1002/ece3.1781.
4. Alpatov W.W. The races of honeybees. Moscow: Moscow Society of Naturalists. 1948. 143 p.
5. Crozier R.H., Crozier Y.C. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization // *Genetics*. 1993. V. 133(1). P. 97-117. DOI 10.1111/j.1365-2583.1993.tb00131.x.
6. Seplyarskiy V.B., Kharchenko P., Kondrashov A.S., Bazykin G.A. Heterogeneity of the transition/transversion ratio in *Drosophila* and *Hominidae* genomes // *Molecular Biology and Evolution*. 2012. V. 29(8). P. 1943-1955. DOI 10.1093/molbev/mss071.
7. Tan H.W., Liu G.H., Dong X., Lin R.Q., Song H.Q., Huang S.Y., Yuan Z.G., Zhao G.H., Zhu X.Q. The complete mitochondrial genome of the Asiatic cavity-nesting honeybee *Apis cerana* (Hymenoptera: Apidae) // *PLoS One*. 2011. V. 6(8). P. e23008. DOI 10.1371/journal.pone.0023008.


**MITOCHONDRIAL GENOMES OF CAUCASIAN *A. M. CAUCASICA*
AND CARPATHIAN *A. M. CARPATHICA* HONEYBEES**

© **R. Ilyasov^{1,3}, A. Nikolenko³, V. Tuktarov⁴, Goto Kenji⁴,
Takahashi Jun-ichi⁵, Kwon Hyung Wook^{1,2}**

¹ Division of Life Sciences, Major of Biological Sciences, Incheon National University,
119 Academy-ro, Yeonsu-gu, 22012, Incheon, South Korea

² Convergence Research Center for Insect Vectors, Incheon National University,
119 Academy-ro, Yeonsu-gu, 22012, Incheon, South Korea

³ Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Centre of RAS,
71, prospect Octyabrya, 450054, Ufa, Russian Federation

⁴ Bashkir State Agrarian University,
34, prospect Octyabrya, 450001, Ufa, Russian Federation

⁵ Kyoto Sango University,
603-8555, Kyoto Prefecture, Kyoto, Japan

The complete mitochondrial genome sequence of honeybee subspecies *A. m. caucasica* (16341 bp) and *A. m. carpathica* (16336 bp) has been analyzed for the first time. Both mitochondrial genome sequences contained 13 protein-coding genes, 22 transfer RNA genes, 2 ribosomal RNA genes, and 1 AT-rich region. The overall composition of nucleotides in mitochondrial DNA (mtDNA) in *A. m. caucasica* / *A. m. carpathica* is - A (43,2 / 43,3%), C (9,5 / 9,6%), G (5,6 / 5,5%), and T (41,6 / 41,6%). The 9 CDS, and 14 тPHK genes are located on the heavy strand for both sequences. Four CDS, 2 rRNA genes, and 8 тPHK genes are located on the light strand for both sequences. Results of this research can be useful for further phylogenetic and population genetic studies in honeybees.

Key words: *Apis mellifera*, honeybee subspecies, *A. m. caucasica*, *A. m. carpathica*, mtDNA, conservation genetics.

УДК 66.099+615+615.9

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-4-3-44-50

**ИЗУЧЕНИЕ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ И ТОКСИЧНОСТИ НАНОСТРУКТУР
ФЕРУЛОВОЙ КИСЛОТЫ С ГИДРОКСИПРОПИЛИРОВАННЫМ
БЕТА-ЦИКЛОДЕКСТРИНОМ****© М.А. Капустин, А.С. Чубарова, В.П. Курченко, Л.Н. Журихина,
В.Г. Цыганков, А.М. Бондарук**

В ходе проведенного исследования разработан эффективный метод получения наноструктур комплексов включения феруловой кислоты (ФА) с 2-гидроксипропил бета-циклодекстрином (HPBCD), исследована термическая стабильность и проведена токсиколого-гигиеническая оценка полученных наноструктур. Из полученных данных следует, что при получении наноструктур ФА с HPBCD наиболее эффективный процесс образования комплексов происходит при использовании комбинированного метода соиспарения с последующей лиофилизацией. С использованием методов термического анализа показано, что в результате наноструктурирования происходит смещение температурных границ основных этапов деструкции этих соединений и снижается скорость их протекания, в связи с чем, можно сделать заключение о стабилизации ФА в составе наноструктур комплексов включения с HPBCD. В результате термического анализа полученных образцов наноструктур клатратных комплексов, для каждого образца установлены стадии термического разложения в условиях программируемого нагрева от 20 °С до 600 °С со скоростью 5 °С*мин⁻¹ (ТГ/ДТГ) их температурные интервалы, убыль массы и скорость протекания окислительной термодеструкции. Проведены исследования токсичности препарата наноструктур ФА с HPBCD (соотношение 1:2) в остром, подостром и хроническом экспериментах на тест-культуре инфузории *Tetrahymena pyriformis*. Методом пробит-анализа летальности инфузорий в остром и подостром экспериментах, а также динамики угнетения генеративной функции протист при действии препарата наноструктур ФА с HPBCD в хроническом эксперименте, рассчитаны параметры острой, подострой и хронической токсичности в отношении данного тест-объекта. Оценка токсичности наноструктур комплексов включения ФА с HPBCD (соотношение 1:2) в остром и подостром экспериментах на *Tetrahymena pyriformis* показала, что препарат относится к 5 классу опасности (является неопасным соединением). По результатам оценки в подостром эксперименте изученный препарат относится к 4 классу опасности (является неопасным соединением). В хроническом эксперименте изученный препарат относится к 3 классу опасности (является умеренно опасным соединением). При этом лимитирующим параметром явилась зона хронического действия ($Z_{chr} = 4,50$). В связи с тем, что отнесение исследуемого объекта к

КАПУСТИН Максим Александрович, Белорусский государственный университет,
e-mail: maximkapustin84@gmail.com

ЧУБАРОВА Анна Сергеевна – к.б.н., Белорусский государственный университет,
e-mail: chubarova.hanna@gmail.com

КУРЧЕНКО Владимир Петрович – к.б.н., Белорусский государственный университет,
e-mail: kurchenko@tut.by

ЖУРИХИНА Лидия Николаевна – к.м.н., Научно-практический центр гигиены,
e-mail: 509.196@mail.ru

ЦЫГАНКОВ Василий Георгиевич – к.м.н., Научно-практический центр гигиены,
e-mail: vgz@tut.by

БОНДАРУК Алла Михайловна – к.м.н., Научно-практический центр гигиены,
e-mail: pitanie_b@rspch.by

классу опасности производится по параметру, значение которого соответствует наиболее высокому классу опасности, то по результатам токсиколого-гигиенической оценки на *Tetrahymena pyriformis* препарат наноструктур комплексов включения FA с HPBCD (соотношение 2:1) относится к 3 классу опасности.

Ключевые слова: наноструктуры, наноконплексы, циклодекстрин, феруловая кислота, термостабильность, токсичность, инфузории.

Вещества растительного происхождения, относящиеся к полифенольным, терпеновым, фенилпропаноидным соединениям, обладают широким спектром биологических активностей [1–6]. Эти биологически активные соединения обнаружены в составе растительного сырья, входящего в рецептуры лекарственных препаратов, хорошо зарекомендовавших себя в комплексной терапии различных заболеваний [2, 3, 5, 7]. В связи с этим, в последнее время биологически активные соединения растительного происхождения все чаще применяются в составе биологически активных добавок к пище, а также в качестве активных компонентов продуктов функционального, профилактического и лечебного питания [2–4].

В настоящее время при разработке рецептур продуктов функционального питания и пищевых добавок первоочередной стоит проблема, касающаяся объединения в их составе биологически активных соединений с кардинально-разнящимися физико-химическими свойствами, так как это сопряжено с определенными трудностями, в частности: объединение в составе одного препарата жирорастворимых и водорастворимых соединений, термостабильных и термолабильных веществ, стабильных и нестабильных к окислению субстанций. Одним из перспективных решений указанной проблемы представляется использование в составе лекарственных препаратов и функциональных продуктов питания не нативных биологически активных соединений или растительных экстрактов, а наноструктурированных композиций этих субстанций с циклическими олигосахаридами – циклодекстринами [8].

В качестве основы для создания предложенных наноструктурированных комплексов может выступать как нативный бета-циклодекстрин (β -CD), так и его производное – 2-гидроксипропил бета-циклодекстрин (HPBCD).

Циклодекстрины представляют собой уникальные природные наноструктуры, снабженные гидрофобной внутренней полостью, и гидрофильной внешней поверхностью, так называемые молекулярные контейнеры, которые способны удерживать во внутренней полости неполярные, неионизированные молекулы вещества «гостя». Взаимодействие циклодекстрина с молекулами вещества «гостя», например БАВ, приводит к образованию наноструктур комплексов включения, что придает гидрофобным молекулам вещества «гостя» уникальное свойство растворяться в водной фазе, а также снижает скорость их окисления и фотодеструкции, гидролиза активных компонентов, уменьшает вероятность стерических перегруппировок [8, 9].

Среди природных биологически активных веществ растительного происхождения особого внимания заслуживают соединения фенилпропаноидного ряда, как наиболее широко распространенные вторичные метаболиты растений, и среди них – феруловая кислота (FA), обладающая выраженными антиоксидантными, антирадикальными, противоаллергическими и гепатопротекторными свойствами, однако нестабильная при фото- и термовоздействии и обладающая низкой растворимостью в водных системах [10].

Для модификации физико-химических свойств FA целесообразно создание наноструктур комплексов включения FA с циклодекстринами и использование таких наноструктурированных форм в функциональных продуктах питания и биологически активных добавках различного назначения.

Цель исследования: разработать эффективный метод получения наноструктур комплексов включения FA с HPBCD, исследовать их термическую стабильность и провести токсико-

колого-гигиеническую оценку полученных наноструктур.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования был взят препарат транс-феруловой кислоты (Fluka). В работе использовали 2-гидроксипропил бета-циклодекстрин (HPBCD, М.в. = 1385, г/моль, «Sigma»).

Комплексы включения FA с HPBCD были получены методом сорастирания с высушиванием при температуре 40 °С (GR) и методом соиспарения с последующей лиофилизацией (EVAP) [8].

Анализ состава полученных комплексов проводили с использованием ВЭЖХ системы Agilent 1100/1200, оборудованной диодно-матричным детектором, на обратно-фазной колонке Zorbax SB-C18 (3.5 мкм, 3.0x150 мм).

Определение изменения термостабильности FA при образовании наноструктур комплексов включения проводили методом термического анализа с использованием термоаналитической системы MettlerToledo (Швейцария).

Определение параметров острой, подострой и хронической токсичности наноструктур комплексов включения FAc HPBCD: ЛД₁₆, ЛД₅₀, ЛД₈₄, К_{кумулятив}, проводили на стерильной культуре инфузории *Tetrahymena pyriformis* в стационарной фазе роста, поддерживаемой в стандартной питательной среде при 25 °С. Длительность острого эксперимента составила 5 часов, при проведении эксперимента по исследованию подострой токсичности – 24 ч, при исследовании хронической токсичности – в течение всего жизненного цикла. Исследование токсичности комплексов проводили в трехкратной повторности в разное время с двумя параллельными пробами. Эффект токсического действия оценивали по альтернативному состоянию «жизнь – смерть». По результатам оценки средней смертельной дозы и кумулятивных свойств устанавливали класс токсичности исследуемых веществ в остром эксперименте.

Результаты и обсуждение. Из полученных данных следует, что при получении наноструктур FAc HPBCD наиболее эффективный процесс образования комплексов происходит при

использовании комбинированного метода соиспарения с последующей лиофилизацией.

Анализ полученного препарата методом ВЭЖХ показал, что содержание FA в наноструктурах комплексов включения с HPBCD составило 65,1 мг/г и 32,5 мг/г при молярных соотношениях FA:HPBCD 1:2 и 1:4соответственно.

В результате термического анализа полученных образцов наноструктур клатратных комплексов, для каждого образца установлены стадии термического разложения в условиях программируемого нагрева от 20° С до 600° С со скоростью 5 °С*мин⁻¹ (ТГ/ДТГ) их температурные интервалы и убыль массы.

Из анализа полученных кривых ТГ и ДТГ следует, что HPBCD содержит небольшое количество связанной влаги – 4,37%. При нагреве от 25 °С до 105 °С наблюдаются соответствующий пик потери массы на кривых ДТГ. Максимальная скорость окислительной деструкции HPBCD наблюдается при температуре 338,0°С и составляет 1,63 мг*мин⁻¹. Также для образца HPBCD характерно наличие дополнительного пика потери массы, с максимумом скорости происходящем на 328,80°С и составляющим 1,21 мг*мин⁻¹. Остановка реакции термодеструкции для HPBCD наблюдается при 520,46°С (кривые ТГ и ДТГ выходят на плато), остаточная зольность составляет 3,21%.

На кривой ДТГ FA присутствуют два основных пика потери массы. Температура максимальной скорости окислительной деструкции FA составляет 245,04°С, а скорость – 0,76 мг*мин⁻¹. Второй пик потери массы находится в диапазоне температур 437–521 °С. Температура максимальной скорости потери массы в этом диапазоне составляет 500,72 °С, а скорость – 0,14 мг*мин⁻¹. Остановка реакции термодеструкции для FАнаблюдается при 521,09°С, остаточная зольность составляет 2,94%.

Анализ кривых ТГ и ДТГ образца наноструктур комплексов включения HPBCDi FA, полученных комбинированным методом соиспарения с последующей лиофилизацией показал, что в результате образования наноструктур комплексов включения изменился характер кривой ДТГ. Так, в температурном диапазоне 270,32 – 385,22 °С появляются новые пики при

температуре 320 °С и 324 °С и наблюдается отсутствие пика при температуре 245,04 °С характерного для FA, что свидетельствует о стабилизации и повышении устойчивости FA к окислительной термодеструкции в составе наноструктур комплексов включения с HPBCD. Также на кривой наблюдается смещение пика основной потери массы образца из диапазона температур 274,95 – 384,88 °С, характерного для HPBCD в область 270,32 – 385,22 °С. При этом на ДТГ образца также отсутствует пик разложения FA при температуре 500,72 °С, а пик, характерный для HPBCD при температуре 486,94 °С – практически не смещается.

Анализ кривых ТГ и ДТГ образца наноструктур комплексов включения FAиHPBCD, полученных методом сорастирания при молярном соотношении 1:2 показал, что при получении наноструктур методом сорастирания происходит менее эффективное образование комплексов включения, по сравнению с образцом, полученным комбинированным методом. Так на кривой ДТГ в случае образца, полученного методом сорастирания, отсутствуют пики потери массы при температурах 320, 325 и 330,29 °С. Для образца, полученного методом сорастирания, на кривой ДТГ, по сравнению с образцом физической смеси этих веществ наблюдается смещение пика потери массы из диапазона 180,21 – 275,00 °С в диапазон 194,94 – 275,06 °С, что свидетельствует о незначительной степени образовании наноструктур. Также на кривой ДТГ образца, полученного методом сорастирания присутствует пикосновной потери массы в диапазоне температур 275,06 – 384,94 °С, а в случае образца физической смеси аналогичный пик находится в диапазоне температур 275,00 – 384,99 °С, что свидетельствует о практически идентичных процессах, протекающих при окислительной термодеструкции образца физической смеси и образца, полученного методом сорастирания, что позволяет сделать вывод о неэффективности метода сорастирания для получения наноструктур комплексов включения FA и HPBCD.

Таким образом, с использованием методов термического анализа проведен анализ измене-

ния характера протекания окислительной термодеструкции FA в результате образовании наноструктур с HPBCD. Показано, что в результате наноструктурирования происходит смещение температурных границ основных этапов деструкции этих соединений и снижается скорость их протекания, в связи с чем, можно сделать заключение о стабилизацииFA в составе наноструктур комплексов включения с HPBCD.

При исследовании токсичности комплекса FAc HPBCD (молярное соотношение 1:2) в остром и подостром экспериментах по 100 000 инфузорий в стационарной фазе роста вносили в 1 мл среды инкубации, содержащей препарат наноструктур комплексов включения в концентрациях 2, 5, 10, 20, 40, 50, 80 мг/мл.

Время экспозиции при определении **острой токсичности** составляло 5 часов. Полученные результаты показали, что одноклеточные организмы в присутствии комплекса в концентрации 2 мг/мл и 5 мг/мл не отличались от таковых в контрольных пробах. В концентрации исследуемого комплекса 10 мг/мл наблюдали снижение численности популяции на 10 – 15% по сравнению с контрольным уровнем. В концентрации 40 мг/мл наблюдали летальность действия препарата на культуру инфузорий на уровне 33%, в концентрации 50 мг/мл – 38%, в концентрации 80 мг/мл – 82 – 90%.

При исследовании подострой токсичности (время экспозиции – 24 ч) наноструктур комплексов включения FAcHPBCD(молярное соотношение 1:2) наблюдали усиление токсического эффекта по ЛД₁₆, ЛД₅₀ и ЛД₈₄ по сравнению с таковыми в остром эксперименте. Так, в пробах, содержащих 40 мг/мл комплекса, летальность действия препарата на культуру простейших составляла 35 – 39%, а в концентрации 50 мг/мл – 55%.

При исследовании хронической токсичности наноструктур комплексов включения FAcHPBCD (молярное соотношение 1:2) популяция *T. Pyriformis* культивировалась на протяжении жизненного цикла в питательных средах, с содержанием препарата 2, 5, 15, 30, 60 мг/мл.

Полученные данные показали, что при изучении хронической токсичности комплекса FAc

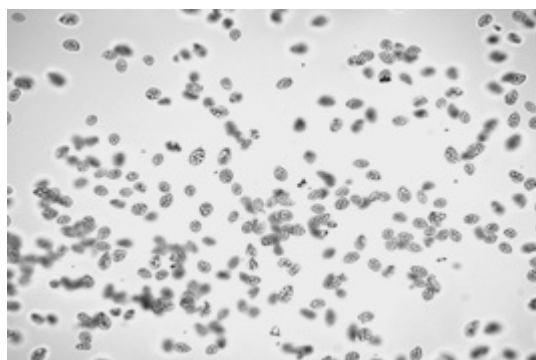


Рисунок 1 А

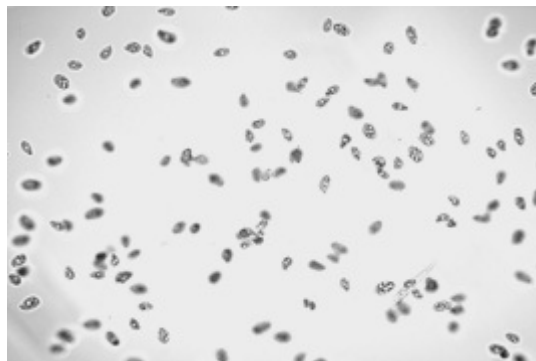


Рисунок 1 Б

Рис. 1. Фотографии популяции *Tetrahymena pyriformis* в фазе замедленного роста.

А. культивирование в питательной среде (контроль), фотография под микроскопом при увеличении 100х.

Б. культивирование в питательной среде, содержащей препарат в концентрации 2,0 мг/мл, фотография под микроскопом при увеличении 100х (время экспозиции – 72 ч)

НРВСД на тест-объекте *T. pyriformis* в концентрации 2 мг/мл наблюдается статистически достоверная стимуляция роста популяции в лаг-фазе на 30% относительно контрольного уровня. Через 48 ч инкубации численность инфузорий снижается обратно до контрольного уровня. В фазе замедленного роста и стационарной фазе численность популяции составляет 95% и 91% от контроля соответственно ($p < 0,05$). При содержании в среде культивирования комплекса FAcНРВСД 5 мг/мл через 24 ч инкубации численность простейших не имела статистически достоверных различий относительно контроля. Через 48 ч и 72 ч содержание инфузорий снизилось до 72% относительно контрольного уровня, через 96 ч – до 66% по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

При увеличении содержания комплекса в среде культивирования тест-объекта *T. pyriformis*

до 15 мг/мл отмечается угнетение роста популяции на протяжении ее жизненного цикла по сравнению с контрольным уровнем. Так, в лаг-фазе содержание простейших составляло 80% от контроля, в логарифмической фазе – 56%, в фазе замедленного роста – 51%, в стационарной фазе – 37% ($p < 0,05$).

Внесение в среду культивирования комплекса в концентрации 30 мг/мл вызвало более выраженное статистически достоверное снижение численности инфузорий относительно контроля: на 45% в лаг-фазе, на 64% в логарифмической фазе и на 87% в фазе замедленного роста. Через 96 ч наблюдается гибель популяции.

При внесении в среду культивирования комплекса в максимальной изученной концентрации – 60 мг/мл, – отмечается резкое угнетение роста популяции по сравнению с контролем через 24 ч (на 85%) и 48 ч (на 97%) ($p < 0,05$). Через 72 ч инкубации наблюдается 100% гибель популяции *T. pyriformis*. Фотографии популяции *T. pyriformis* в фазе замедленной скорости роста (время экспозиции – 72 ч) в контрольной пробе и в питательной среде с внесением препарата в концентрации 2,0 мг/мл представлены на рисунке 1А и 1Б, соответственно.

Методом пробит-анализа летальности инфузорий в остром и подостром экспериментах, а также динамики угнетения генеративной функции протист при действии препарата наноструктур в хроническом эксперименте, рассчитаны параметры острой, подострой и хронической токсичности в отношении данного тест-объекта. Результаты расчетов приведены в таблице 1.

Таким образом, оценка токсичности наноструктур комплексов включения FAc НРВСД (соотношение 1:2) в остром и подостром экспериментах на *Tetrahymena pyriformis* показала, что препарат относится к 5 классу опасности (является неопасным соединением). По результатам оценки в подостром эксперименте изученный препарат относится к 4 классу опасности (является неопасным соединением). В хроническом эксперименте изученный препарат относится к 3 классу опасности (является умеренно опасным соединением). При этом лимитирующим параметром явилась зона хронического действия ($Z_{chr} = 4,50$). В связи с тем, что отнесение исследуемого объекта к классу опасности произв-

Т а б л и ц а 1

Параметры токсичности препарата наноструктур комплексов включения FA и HPBCD (молярное соотношение 1:2) по результатам оценки на *Tetrahymenapyriformis*

Показатель токсичности	Значение величины токсичности	Показатель класса опасности
Острая токсичность		
ЛД ₁₆ , мг/мл	21,72 ± 0,81	–
ЛД ₅₀ , мг/мл	50,90 ± 0,54	5
ЛД ₈₄ , мг/мл	80,09 ± 1,38	–
Подострая токсичность		
ЛД ₁₆ , мг/мл	18,96 ± 1,88	–
ЛД ₅₀ , мг/мл	42,27 ± 0,82	–
ЛД ₈₄ , мг/мл	65,58 ± 0,59	–
Ккум _{acuta}	0,83	4
Хроническая токсичность, в логарифмической фазе роста (48 ч)		
ЕД ₁₆ , мг/мл	0,4	–
ЕД ₅₀ , мг/мл	21,05 ± 0,04	–
ЕД ₈₄ , мг/мл	41,65	–
Хроническая токсичность, в стационарной фазе роста (96 ч)		
ЕД ₁₆ , мг/мл	2,0	–
ЕД ₅₀ , мг/мл	11,30 ± 0,02	–
ЕД ₈₄ , мг/мл	20,5	–
Ккум _{chr}	0,54	4
Z _{chr}	4,50	3

одится по параметру, значение которого соответствует наиболее высокому классу опасности, то по результатам токсиколого-гигиенической оценки на *Tetrahymenapyriformis* препарат наноструктуркомплексов включения FAcHPBCD (соотношение 1:2) относится к 3 классу опасности.

Заключение. Разработанный метод получения наноструктур FA с HPBCD при комбинировании элементов метода соиспарения и лиофилизации позволяет получать целевой продукт в лабораторных и промышленных масштабах. Оптимальным соотношением для получения наноструктур FA с HPBCD является молярное соотношение компонентов 1:2. При таком соотношении увеличивается эффективность включе-

ния FAcHPBCD состав комплексов. Термический анализ наноструктур комплексов включения показал, что при образовании наноккомплексов FAcHPBCD происходит стабилизация FA и значительно смещаются границы окислительной термодеструкции этого соединения. По результатам токсиколого-гигиенических исследований, проведенных на стерильной культуре *Tetrahymenapyriformis*, полученные наноструктуры относятся по результатам острой и подострой токсичности к неопасным соединениям, а по результатам хронической токсичности – к группе соединений, обладающих умеренной токсичностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mazza G. Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects, Volume 1. Lancaster, Penn: Technomic publishing company, 1998. 480 p.
2. Yadav S.K. Nanotechnology: A Spark to the Use of Plant Origin Bioactive Compounds in Therapeutics // Single Cell Biol. 2015. Vol. 4, № 1. P. 108–109.
3. Bekele G. Isolation and Characterization of Bioactive Compounds from Medicinal Plants of Ethiopia – A Review // Curr. Trends Biomedical Eng. & Biosci. 2017. Vol. 7, № 5. P. 1–4.
4. Sasidharan S. Extraction, Isolation and Characterization of Bioactive Compounds from Plants' Extracts // Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med. 2011. Vol. 8, № 1. P. 1–10.
5. Iqbal A., Aqil F., Owais M. Modern Phytomedicine: Turning Medicinal Plants into Drugs. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2006. – 384 p.
6. Quan V. Vuong Utilisation of Bioactive Compounds from Agricultural and Food Production Waste. Boca Raton, FL: CRC Press, 2017. 414 p.
7. Razzaghi-Abyaneh M. Antifungal metabolites from plants. Berlin; New York: Springer, 2013. 461 p.
8. Капустин М.А. Методы получения наноккомплексов биологически активных веществ с циклическими олигосахаридами, анализ их физико-химических свойств и использование в пищевом производстве // Труды Белорусского государственного университета. 2016. Т. 11, ч. 1. С. 73–100.
9. Manoj M.N., Dinesh M.S., Parag V.J. The Cyclodextrins: A Review // Journal of Current Pharmaceutical Research. 2012. Vol. 10, № 1. P. 1–6.
10. Kumar N., Pruthi V. Potential applications of ferulic acid from natural sources // Biotechnology Reports. 2014. Vol. 4. P. 86–93.


**STUDY OF FERULIC ACID/HYDROXYPROPYLATED BETA-CYCLODEXTRIN
NANOSTRUCTURES THERMOSTABILITY AND TOXICITY**

© M.A. Kapustin¹, A.S. Chubarova¹, V.P. Kurchenko¹, L.N. Zhurihina²,
V.G. Cigankov², A.M. Bondaruk²

¹ Belarusian State University,
4, prospekt Nezavisimosti, 220030, Minsk, Republic of Belarus
² Scientific and Practical Center of Hygiene,
8, ulitsa Akamenichnaja, 220072, Minsk, Republic of Belarus

In the course of the research, an effective method for nanostructures of inclusion complexes of ferulic acid (FA) with 2-hydroxypropyl beta-cyclodextrin (HPBCD) obtaining was developed, thermal stability of nanostructures was studied, and a toxicological-hygienic assessment was carried out. From the obtained data it follows that for the preparation of nanostructures of FA with HPBCD the most efficient process of complex formation occurs with the use of a combined method of co-precipitation followed by lyophilization. Using the methods of thermal analysis, it was shown that as a result of nanostructures formation, the temperature boundaries of the main stages of these compounds destruction, shifts and rates of decomposition decrease, so that it can be concluded that FA stabilizes in the nanostructured form of inclusion complexes with HPBCD. As a result of the thermal analysis of the obtained samples of clathrate complexes nanostructures, the stages of thermal decomposition under conditions of programmable heating from 20 ° C to 600 ° C with a speed of 5 ° C * min⁻¹ (TG / DTG), temperature intervals, rates of oxidative thermal destruction were determined. The toxicity studies of a FA with HPBCD nanostructures preparation (ratio 1: 2) in acute, subacute and chronic experiments on test culture of infusoria *Tetrahymena pyriformis* have been carried out. The parameters of acute, subacute and chronic toxicity with respect to this test object were calculated by the method of probit analysis of infusorians mortality in acute and subacute experiments, as well as the dynamics of suppression of protists generative function under the action of the FA with HPBCD nanostructures preparation in a chronic experiment. The toxicity assessment of the FA with HPBCD inclusion complexes nanostructures (ratio 1: 2) in acute and subacute experiments on *Tetrahymena pyriformis* showed that the drug belongs to the 5-th danger class (it is a non-hazardous compound). Based on the results of the evaluation in the subacute experiment, the studied drug belongs to the 4-th class of danger (it is a non-hazardous compound). In a chronic experiment, the drug studied is classified as hazard class 3 (a moderately hazardous compound). The limiting parameter was the zone of chronic action ($Z_{chr} = 4.50$). Due to the fact that the assignment of the investigated object to the hazard class is carried out according to the parameter, the value of which corresponds to the highest hazard class, according to the results of the toxicological-hygienic evaluation on *Tetrahymena pyriformis*, the preparation of the FA inclusion complexes with HPBCD nanostructures (ratio 2: 1) refers to 3 class of danger.

Key words: nanostructures, nanocomplexes, cyclodextrin, ferulic acid, thermal stability, toxicity, infusoria.

УДК: 638.123.52

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-4-3-51-56

ОЦЕНКА ЧИСТОПОРОДНОСТИ ПОПУЛЯЦИИ *APIS MELLIFERA MELLIFERA* L. НА ТЕРРИТОРИИ ЗАКАЗНИКА АЛТЫН-СОЛОК

© М.Д. Каскинова, А.Р. Гатауллин, М.В. Хасанов, Р.А. Ильясов,
Хюн Вук Квон, А.Г. Николенко

Охрана генофонда темной лесной пчелы (*Apis mellifera mellifera*) на Южном Урале возложена на федеральный заповедник Шульган-таш и заказник РБ Алтын-Солок. Эти ООПТ находятся на территории Бурзянского района, характеризуются горным рельефом и обширными лесными массивами. Мониторинг генетической сохранности бурзянской популяции медоносной пчелы при помощи ДНК-маркеров ведётся нами с 1999 года. Ранее оценку подвидовой принадлежности медоносных пчел из заказника Алтын-Солок проводили в трех населенных пунктах, и для всех семей была подтверждена принадлежность к подвиду *A.m.mellifera*. Высокий уровень смертности бортевых семей в зимовку 2016-2017 потребовал проведение дополнительного анализа. Цель данной работы – анализ подвидовой принадлежности пчел из заказника Алтын-Солок при помощи девяти SSR маркеров. В исследовании были использованы рабочие пчелы из 45 бортевых семей, расположенных в 20 кварталах заказника Алтын-Солок. В качестве сравнительных групп были использованы выборки *A.m.mellifera* из Бурзянского района РБ (N = 389), собранные в период с 1999 по 2015 гг., и пчелы из Республики Адыгея (*A.m.carnica*, N=15), Краснодарского края (*A.m.caucasica*, *A.m.carpatica*, N=42) и Закарпатской области Украины (*A.m.carpatica*, N=15). В четверти исследуемых семей был выявлен аллель Q локуса COI-COII мтДНК, т.е. зафиксирован залёт роёв либо искусственная подсадка в борти семей южных подвидов. Интрогрессия на уровне ядерной ДНК варьировала от 0.019 до 0.342 (при допустимой интрогрессии 0.100). Лишь в 11 из 20 кварталов доля генофонда эволюционной ветви M превышала требуемый уровень чистопородности 0.900. Для сохранения генофонда темной лесной пчелы на территории заказника рекомендуется исключить из дальнейшего разведения гибридные семьи. Семьи из кварталов №33, 40, 14, 53, 39, 52 и 81 представляют собой ценный племенной материал для дальнейшей селекционной работы.

Ключевые слова: *Apis mellifera mellifera* L., заказник Алтын-Солок, SSR анализ, локус COI-COII.

Введение. Гибридизация подвидов медоносной пчелы является одной из основных причин роста смертности пчелиных семей. Первоначально известный случай полной замены абори-

КАСКИНОВА Миляуша Дамировна, Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,
e-mail: kaskinovamilyausha@mail.ru

ГАТАУЛЛИН Алмаз Рашитович, Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,
e-mail: angelooss@mail.ru

ХАСАНОВ Марат Вафиевич, Дирекция по особо охраняемым природным территориям Республики Башкортостан, e-mail: dir02@inbox.ru

ИЛЬЯСОВ Рустем Абузарович – д.б.н., Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Колледж естественных наук и биоинженерии Инчхонский национальный университет,
e-mail: apismell@hotmail.com

КВОН Хюн Вук – д.б.н., Инчхонский национальный университет, e-mail: hwkwon@inu.ac.kr

НИКОЛЕНКО Алексей Геннадьевич – д.б.н., Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,
e-mail: a-nikolenko@yandex.ru

генной популяции темной лесной пчелы на итальянскую пчелу *A.m.ligustica* в Германии [1] побудил ученых и пчеловодов заняться поиском и сохранением чистопородных популяций пчел. Уникальные локальные экотипы *A.m.mellifera* были выявлены во Франции [2], Дании [3], Швеции [4]. На территории России популяции *A.m.mellifera* были обнаружены на территории Пермского края (вишерская и южно-прикамская популяции), РБ (бурзянская и татышлинская) и Республики Удмуртия (камбарская) [5].

Охрана генофонда темной лесной пчелы на Южном Урале возложена на заповедник федерального значения Шульган-таш и заказник регионального значения Алтын-Солок, которые входят в состав комплексного биосферного резервата Башкирский Урал. Эти ООПТ находятся на территории Бурзянского района, характеризуются горным рельефом и обширными лесными массивами. Принадлежность популяции медоносной пчелы из заповедника Шульган-Таш к подвиду *A.m.mellifera* при помощи генетических маркеров была подтверждена еще в 2000 году [6]. С тех пор ведется мониторинг данной популяции на чистопородность при помощи SSR маркеров и анализа полиморфизма локуса COI-COII мтДНК. Ранее оценку подвидовой принадлежности медоносных пчел из заказника Алтын-Солок ранее проводили в трех населенных пунктах: Старое Акбулатово, Акбулатово и Гадельгареево [7]. Для всех семей из этих населенных пунктов была подтверждена принадлежность к подвиду *A.m.mellifera*.

Зимовка 2016-2017 крайне негативно сказалась на численности бортовых семей обсуждаемых ООПТ, что заставило нас провести предварительный, оценочный экспресс-анализ ситуации. Целью данной работы был анализ подвидовой принадлежности бортовых семей из 20 кварталов заказника Алтын-Солок.

Материалы и методы. В исследовании были использованы рабочие пчелы из 45 семей, обитающих в бортях и колодах на территории заказника Алтын-Солок. В качестве сравнительных групп были использованы выборки *A.m.mellifera* из Бурзянского района РБ (N = 389), собранные в период с 1999 по 2015 гг. В качестве выборки эволюционной ветви С

были использованы пчелы из Республики Адыгея (*A.m.carnica*, N=15), Краснодарского края (*A.m.caucasica*, *A.m.carpatica*, N=42) и Закарпатской области Украины (*A.m.carpatica*, N=15). Выделение ДНК проводили набором реактивов ДНК-ЭКСТРАН-2 фирмы Синтол. Исследование включало ПЦР-анализ локуса COI-COII мтДНК и SSR локусов Ap243, 4a110, A24, A8, A43, A113, A88, Ap049, A28. Смесь ПЦР включает 17 мкл дистиллированной воды, 2 мкл магниевого буфера, 0,4 мкл dNTP (10 мкМ), 0,6 мкл F- и R- праймера (2 ОЕ) и 0,3мкл Taq-полимеразы (silex.ru). Режим ПЦР локуса COI-COII: 3 мин 94°C, 30 циклов с денатурацией 30 сек при 94°C, отжигом 30 сек при 49 °C, элонгацией 60 сек при 72 °C и конечной элонгацией 3 мин при 72°C. Режим ПЦР SSR локусов: 5 мин 94°C, затем 25 циклов с денатурацией 30 сек при 94°C, отжигом 30 сек при 55 °C, элонгацией 60 сек при 72 °C и конечной элонгацией 7 мин при 72°C.

Вычисления показателей генетического разнообразия производили при помощи пакета программ FSTAT ver.2.9.3.2. Для оценки уровня интрогрессии генофонда эволюционной ветви С была использована программа Structure 2.3.4 с заданным числом кластеров от 1 до 5. Количество предполагаемых популяций (K) рассчитывали в онлайн-сервисе Structure Harvester. Анализ был выполнен при помощи модели Admixture с указанием информации о географической локализации выборок (LocPrior) и с Burnin Period и MCMC равных 10 000 и 100 000 повторов соответственно.

Результаты и обсуждение. Из 45 исследуемых семей в 11 был выявлен аллель Q локуса COI-COII мтДНК, характерный для пчел из эволюционной ветви С. В среднем частота аллеля RQQ составила 0.756 (таб.1). Факты интрогрессии генофонда ветви С на уровне митохондриального генома на охраняемой территории Бурзянского района ранее регистрировалась лишь единично [8,9]. В 2016 году также были обнаружены завезённые на лето гибридные семьи в с. Старосубхангулово, которое не входит в состав охраняемой зоны, но тем не менее располагается не далеко от нее [7].

Появление семей южных подвидов (аллель Q) в бортях ООПТ, зафиксированное нами,

Т а б л и ц а 1

Уровни интрогрессии южных геномов линии С в выборке из заказника Алтын-Солок

№ квартала	N	ядНК		мтДНК	
		Доля С	Доля М	Доля С	Доля М
33	6	0.076	0.924	0.00	1.00
40	4	0.025	0.975	0.00	1.00
14	2	0.037	0.963	0.00	1.00
11	1	0.176	0.824	0.00	1.00
133	3	0.190	0.810	0.00	1.00
59	1	0.229	0.771	0.00	1.00
37	2	0.09	0.901	0.50	0.50
24	4	0.203	0.797	0.80	0.20
21	2	0.029	0.971	0.50	0.50
23	2	0.057	0.943	0.50	0.50
13	2	0.205	0.795	0.50	0.50
53	2	0.105	0.895	0.00	1.00
39	2	0.019	0.981	0.00	1.00
52	1	0.034	0.966	0.00	1.00
9	1	0.035	0.965	1.00	0.00
81	1	0.076	0.924	0.00	1.00
83	1	0.219	0.781	1.00	0.00
84	1	0.342	0.658	1.00	0.00
88	2	0.093	0.907	0.50	0.50
х	5	0.160	0.840	0.00	1.00
Среднее	45	0.120	0.880	0.244	0.756

Примечание: х – неизвестный квартал

возможно лишь двумя путями: залётом роёв с сопредельных территорий либо посадкой южных семей непосредственно в борти и колоды. В любом случае, четвёртая часть семей, представляющих чужеродный загрязняющий генофонд, является «неподъёмной», губительной для естественной бурзянской популяции.

Интрогрессия на уровне ядерной ДНК в исследуемой выборке варьировала от 0.019 до 0.342 (таб.1). Лишь в 11 из 20 кварталов доля генофонда эволюционной ветви М превышала 0.90, т.е. пчелиные семьи ещё сохраняли свою чистопородность.

На рисунке 1 представлены уровни интрогрессии линии С в исследуемых кварталах. Не смотря на то, что в большинстве кварталов доля интрогрессии не превышала 0.1, наиболее

гибридные семьи как на уровне яДНК, так и на уровне мтДНК, находятся на границе с заповедником Шульган-Таш.

В таблице 2 показана динамика интрогрессии генофонда эволюционной ветви С в бурзянской популяции с 1999 по 2017 годы. Как видим, анализ микросателлитных локусов ядерной ДНК также показал усиление процесса гибридации: мы наблюдаем непрерывный рост генетического загрязнения популяции по годам, при этом в исследуемой выборке из заказника Алтын-Солок был зафиксирован максимальный уровень интрогрессии (табл. 2).

Таким образом, для сохранения генофонда темной лесной пчелы на территории заказника крайне важно не использовать для дальнейшего разведения гибридные семьи, произвести в них



Рис. 1. Локализация выборок и уровни интрогрессии линии С в семьях *Apis mellifera* L. в заказнике Алтын-Солок

Т а б л и ц а 2

Показатели генетического разнообразия и уровни интрогрессии генофонда эволюционной ветви С в бурзянской популяции *Apis mellifera mellifera*

Год	Число семей	Fis	He	Уровень интрогрессии С
1999	18	0.225	0.271	0.054
2004	40	0.214	0.268	0.056
2008	157	0.151	0.382	0.077
2009	78	0.021	0.258	0.087
2013	50	0.043	0.392	0.095
2015	48	-0.033	0.262	0.060
2017	45	0.188	0.395	0.120

замену метки либо вывезти эти семьи с территории Бурзянского района. Семьи из кварталов № 33, 40, 14, 53, 39, 52 и 81 представляют собой ценный племенной материал для дальнейшей селекционной работы.

Первым этапом в сохранении и распространении генофонда популяции является подробный мониторинг ситуации в ООПТ. Более надежные результаты можно получить при помощи генетических маркеров. Вторым этапом

является отбраковка и замена семей, имеющих значительный уровень интрогрессии как на уровне митохондриального генома, так и на уровне ядерной ДНК. Данные меры позволят получить чистопородный массив для дальнейшей селекции на хозяйственно-полезные признаки.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-44-020648 р_поволжье_а с использованием ресурсов ЦКП УФИЦ РАН и ЦКП "Коллекция насекомых ИБГ УФИЦ РАН".

ЛИТЕРАТУРА

1. Jensen A.B., Palmer K.A., Boomsma J.J., Pedersen B.V. Varying degrees of *Apis mellifera ligustica* introgression in protected populations of the black honeybee, *Apis mellifera mellifera*, in northwest Europe // *Molecular Ecology*. 2005. V. 14. P. 93–106.
2. Strange J.P., Garnery L., Sheppard W.S. Persistence of the Landes ecotype of *Apis mellifera mellifera* in southwest France: confirmation of a locally adaptive annual brood cycle trait // *Apidologie*. V. 2007. V. 38. P. 259 – 267.
3. De la Rua P., Jaffe R., Dall'Olio R., Munoz I., Serrano J. Biodiversity, conservation and current threats to European honeybees // *Apidologie*. 2009. V. 40. P. 263–284.
4. Ruottinen L., Berg P., Kantanen J., Kristensen T.N., Præbel A. Status and Conservation of the Nordic Brown Bee: Final report // *NordGen*. 2014. 42p.
5. Ильясов Р.А., Поскряков А.В., Петухов А.В., Николенко А.Г. Молекулярно-генетический анализ пяти сохранившихся резерватов темной лесной пчелы *Apis mellifera mellifera* Урала и Поволжья // *Генетика*. 2016. Т.52 (8). С. 931–942. (Ilyasov R.A., Poskryakov A.V., Petukhov A.V., Nikolenko A.G. Molecular Genetic Analysis of Five Extant Reserves of Black Honeybee *Apis mellifera mellifera* in the Urals and the Volga Region // *Russian Journal of Genetics*. 2016. V. 52. №8. P. 828–839.)
6. Николенко А.Г., Саттаров В.Н., Косарев М.Н., Юмагузин Ф.Г. Генетические исследования бурзянской бортовой пчелы // *Генетические аспекты сохранения биологического разнообразия*. Уфа: БГУ, 2000. С. 71 – 76.
7. Каскинова М.Д., Ильясов Р.А., Поскряков А.В., Косарев М.Н., Шарипов А.Я., Николенко А.Г. Оценка чистопородности семей темной лесной пчелы бурзянской популяции // *Пчеловодство*. 2016. №6. С.20 – 23. (Kaskinova M.D., Ilyasov R.A., Poskryakov A.V., Kosarev M.N., Sharipov A.Y., Nikolenko A.G. The assessment of breed of the dark european bees colonies from the Burzyan population // *Bee journal*. 2016. №6. P.20 – 23.)
8. Николенко А.Г., Поскряков А.В. Полиморфизм локуса COI-COII митохондриальной ДНК медоносной пчелы *Apis mellifera* L. на Южном Урале // *Генетика*. 2002. Т.38. №4. С. 458 – 462. (Nikolenko A.G., Poskryakov A.V. Polymorphism of Locus COI-COII of Mitochondrial DNA in the Honeybee *Apis mellifera* L. from the Southern Ural Region // *Russian Journal of Genetics*. 2002. V.38. № 4. P. 364–368.)
9. Ильясов Р.А., Петухов А.В., Поскряков А.В., Николенко А.Г. Локальные популяции *Apis mellifera mellifera* L. на Урале // *Генетика*. 2007. Т.43. №6. С.855 – 858. (Ilyasov R. A., Petukhov A. V., Poskryakov A. V., Nikolenko A. G. Local Honeybee (*Apis mellifera mellifera* L.) Populations in the Urals // *Russian Journal of Genetics*. 2007. V. 43. №6. P. 709–711.)



THE PUREBREDNESS ESTIMATION OF *APIS MELLIFERA MELLIFERA* L. POPULATION IN THE ALTYN-SOLOK CONSERVANCY AREA

© M.D. Kaskinova¹, A.R. Gataullin¹, M.V. Khasanov², R.A. Ilyasov^{1,3},
Hyung Wook Kwon³, A.G. Nikolenko¹

¹ Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Centre of RAS,
71, prospect Octyabrya, 450054, Ufa, Russian Federation

² Directorate for Specially Protected Natural Territories of the Republic of Bashkortostan,
120, Kharkov ulitsa, 450078, Ufa, Russian Federation

³ Incheon National University,
119 Academy-ro, Yeonsu-gu, 22012, Incheon, South Korea

In the southern Urals, the official protection of the gene pool of the dark forest bee (*Apis mellifera mellifera*) is entrusted to the Shulgan-Tash federal conservancy area and the Altyn-Solok regional conservancy area, which are part of the integrated biosphere reserve of the Bashkir Urals. These protected areas are located on the territory of the Burzyan district, characterized by mountainous terrain and extensive forest areas. Genetic monitoring of the Burzyan population of honey bees with the help of DNA markers has been conducted by our laboratory since 1999. Since then, this population has been monitored for purebreeding. Earlier, an assessment of the honeybee subspecies from the Altyn-Solok was conducted in three localities. It was confirmed that these colonies belong to the *A.m.mellifera*. The high mortality rate of bee colonies in the winter of 2016-2017 required additional analysis. The aim of this study is to analyze the purebredness of *A.m.mellifera* population in the Altyn-Solok with the help of nine SSR markers. In this study we used worker bees from 45 colonies. As outgroups were used *A.m.mellifera* samples from the Burzyan district of the Republic of Bashkortostan (N=389), collected from 1999 to 2015, and bees from the Republic of Adygea (*A.m.carnica*, N=15), Krasnodar Krai (*A.m.caucasica*, *A.m.carpatica*, N=42) and the Zakarpattia Oblast of Ukraine (*A.m.carpatica*, N=15). In a quarter of the studied colonies, the allele Q of the locus COI-COII mtDNA was identified, i.e. recorded a swarm or importation of southern honeybee subspecies. The introgression at the level of nuclear DNA ranged from 0.019 to 0.342 (with an allowable introgression of 0.100). Only in 11 out of 20 quarters the share of the gene pool of the evolutionary branch M exceeded the required level of purebredness 0.900. To conserve the gene pool of a dark forest bee, it is recommended to exclude hybrid colonies from further breeding. Colonies from quarters № 33, 40, 14, 53, 39, 52 and 81 are valuable breeding material for further breeding work.

Key words: *Apis mellifera mellifera* L., the Altyn Solok, SSR analysis, COI-COII locus.

УДК 581.1

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-4-3-57-63

ОСОБЕННОСТИ ФЕНОТИПА, МЕТАБОЛИЗМА, НАКОПЛЕНИЯ И РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЦИТОКИНИНОВ У *ENT3* МУТАНТА АРАБИДОПСИСА В НОРМЕ И ПРИ ДЕФИЦИТЕ МИНЕРАЛЬНОГО ПИТАНИЯ

© А.В. Коробова, Б.Р. Кулуев, Г.Р. Кудоярова, С.Ю. Веселов

Трансмембранный переносчик *ENT3* растений арабидопсиса способен обеспечивать поглощение клетками рибозида зеатина. Целью данной работы было выявить, участвует ли указанный транспортер в регуляции распределения цитокининов на уровне растения, тем самым влияя на выполнение этими гормонами рост регулирующей функции. Для этого были использованы растения арабидопсиса, мутантные по переносчику *ENT3* (*ent3*) и исходные – *Columbia* (*COL*). Мутантные растения проявили повышенную способность к доставке рибозида зеатина в побег при добавлении этого гормона в питательный раствор Хогланда-Арнона, что свидетельствует в пользу участия переносчика *ENT3* в поглощении зеатинрибозида клетками корней, препятствуя оттоку его из корней в побег. Разбавление питательного раствора Хогланда-Арнона оптимальной концентрации в 10 раз приводило к снижению накопления цитокининов в корнях как у *COL*, так и у *ent3* растений, указывая на отсутствие значительного влияния работы транспортера на перераспределение цитокининов в условиях дефицита минерального питания. Удлинение корней происходило в соответствии с известным ингибирующим влиянием цитокининов на этот процесс: корни *ent3* мутанта содержали меньше цитокининов и были длиннее, чем у *COL*, при этом дефицит минерального питания активировал удлинение корней обоих генотипов параллельно со снижением концентрации цитокининов в них. Таким образом, сравнение концентрации цитокининов и их распределения между побегом и корнем у растений с мутацией по гену, кодирующему *ENT3* транспортер, способный переносить цитокинины через клеточные мембраны внутрь клеток, и исходных растений *COL* показало участие этого переносчика в регуляции накопления цитокининов в корнях и их оттока из корня в побег на фоне оптимального питания, тем самым обеспечивая цитокинин-зависимую регуляцию удлинения корней растений арабидопсиса.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, *ENT3*, цитокинины, мембранный транспорт, удлинение корней.

Регуляция уровня и распределения цитокининов на фоне внешних воздействий играет важную роль в адаптации растений к изменению условий обитания. Снижение содержания этих гормонов в побегах растений было зарегистрировано при дефиците воды [1], а также при

недостатке элементов минерального питания [2]. Поскольку цитокинины необходимы для роста побега [3], снижение их уровня при стрессовых воздействиях способствует торможению роста побега и тем самым освобождает ресурсы для защиты растений от стресса (в частности,

КОРОБОВА Алла Владимировна, Уфимский институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, e-mail: muksin@mail.ru

КУЛУЕВ Булат Разяпович, Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, e-mail: kuluev@bk.ru

КУДОЯРОВА Гюзель Радомесовна, Уфимский институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, e-mail: guzel@anrb.ru

ВЕСЕЛОВ Станислав Юрьевич, Башкирский государственный университет, e-mail: veselov.stanislav5@yandex.ru

способствуя активации роста корней, на которые цитокинины действуют противоположным образом, ингибируя их удлинение [4] и накопление массы [5]. Механизмы регуляции содержания цитокининов при изменении условий обитания достаточно разнообразны. Так, активация цитокининоксидазы, катализирующей распад этих гормонов, послужила причиной снижения содержания цитокининов у растений пшеницы при разбавлении питательного раствора [2]. Возрастание уровня нитратов в питательной среде повышало уровень цитокининов за счет стимуляции экспрессии *IPT*-генов, контролирующих синтез цитокининов, в корнях растений кукурузы [6] и в листьях арабидопсиса [7]. Важную роль в регуляции уровня цитокининов в побеге играет процесс транспорта этих гормонов из корней. Несмотря на то, что экспрессия *IPT*-генов была зарегистрирована не только в корнях, но и побегах растений арабидопсиса [7], снижение способности корней экспортировать цитокинины приводило к уменьшению содержания этих гормонов в побегах [8], что подтверждает важную роль корней в обеспечении побега цитокининами. В этих экспериментах нарушение распределения цитокининов между побегом и корнем было обусловлено мутацией гена, кодирующего АВС-переносчик, обеспечивающий выход этих гормонов из клеток, способствуя тем самым их загрузке в ксилему. Наряду с АВС транспортерами, переносить цитокинины через мембрану могут также ENT-переносчики, которые транспортируют рибозиды (в частности, цитокининов [9]). Считается, что, в отличие от АВС-белков, ENT транспортеры обеспечивают поглощение цитокининов клетками, а не их выход из них. Однако функция этих переносчиков изучена еще довольно слабо. В данной работе было проведено сравнительное изучение содержания эндогенных и распределения экзогенных цитокининов, а также экспрессии *IPT*-генов, активности цитокининоксидазы и фенотипа *ent3* мутанта и растений его исходного генотипа COL, которые росли в нормальных условиях и на фоне дефицита минерального питания. Цель работы состояла в выявлении особенностей распределения цитокининов и фенотипа *ent3* мутанта, что должно было стать подтверждением участия

ENT3 переносчика в транспорте цитокининов и в выполнении этими гормонами их регуляторной функции.

Материалы и методы. Объектом исследования служили растения арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* [L.] Heynh.) экотипа Columbia (COL) и мутанта по переносчику рибозидов *ent3*. После стратификации на влажной фильтровальной бумаге в чашках Петри в течение 3 дней при температуре 4°C семена переносили в 100-миллилитровые сосуды с песком, насыщенным раствором Хогланда–Арнона, разбавленного в 10 раз, и выращивали в климатической камере (MLR-350H, “Sanyo”, Япония) при температуре 23°/19°C (день/ночь), 80% относительной влажности воздуха, освещенности 120 мкмоль/(м² с) ФАР и 16-часовом фотопериоде. Данная концентрация макросолей была выбрана в предварительных экспериментах по степени накопления массы растениями. Разбавленный в 10 раз раствор Хогланда–Арнона использовали в течение всего эксперимента, далее в статье он будет упоминаться как «раствор Хогланда–Арнона». Растения ежедневно получали 3 мл раствора Хогланда–Арнона и дистиллированную воду по весу сосудов для поддержания оводненности песка на уровне 60% от полной влагоемкости. Для оценки поглощения растениями экзогенного цитокинина, 3-недельные растения помещали в лунки планшета, в дне которых были просверлены отверстия. Планшеты плавали на поверхности аэрирующегося питательного раствора Хогланда–Арнона (5-литровые контейнеры), в который через неделю добавляли зеатинрибозид до конечной концентрации $4 \cdot 10^{-7}$ М. Для исследования влияния дефицита минерального питания на содержание цитокининов и удлинение корней через 4 недели после начала прорастивания семян на свету песок промывали пятикратным объемом оптимальным питательным раствором и разбавленным дополнительно в 10 раз. Фиксацию тканей на цитокинины проводили через 1 и 5 суток после добавления зеатинрибозид и промывания песка, соответственно. Определение активности цитокининоксидазы и уровень транскриптов генов изопентенилтрансфераз проводили у 5-недельных растений, выращенных в песке.

Фитогормоны экстрагировали из побегов и корней растений с помощью 80%-ного этилового спирта. Цитокинины из аликвоты водного остатка концентрировали на картридже C18 (Waters, USA), спиртовой элюат упаривали и наносили на тонкослойную пластину для хроматографического разделения, как описано [10]. Зеатин, его рибозид и нуклеотид, положение которых определяли по поглощению ультрафиолета метчиками, элюировали фосфатным буфером (pH=7.2-7.4). Количественное определение ИУК, АБК и цитокининов проводили с помощью иммуноферментного анализа с использованием специфических антител к гормонам. Антитела к зеатинрибозиду обладают перекрестной реактивностью к зеатину, а также к его нуклеотиду и по этой причине были использованы для определения и этих разновидностей цитокининов. Для подтверждения надежности результатов иммуноанализа ранее проводили сравнение данных иммуноанализа с результатами физико-химических методов хромато-масс-спектрометрии [10].

Активность цитокининоксидазы определяли, как описано ранее [2]. Листья гомогенизировали в 0.1 М имидазольном буфере (pH 7.1) и центрифугировали при 12000 g в течение 30 мин. Для отделения гормонов от высокомолекулярной фракции к супернатанту добавляли равный объем насыщенного сульфата аммония, суспензию вновь центрифугировали и осадок ресуспендировали в 0.1 М имидазоле (pH 7.1). 30 нг цитокинина изопентениладенина (ИП) добавляли в качестве субстрата к смеси, которую затем инкубировали в течение 3 ч при 37°C. К каждому образцу добавляли холодный этанол до конечной концентрации 60% (по объему), осадок выдерживали при 4°C в течение 40 мин и затем центрифугировали при 5000 g в течение 10 мин. Снижение количества ИП в результате распада определяли при помощи иммуноанализа. Отсутствие превращения ИП в зеатин или дигидрозеатин подтверждали с помощью иммуноанализа с использованием соответствующих антител. Присутствие имидазола и Cu^{2+} ускоряло распад ИП. Этот тест свидетельствует, что падение уровня ИП было связано с его превращением в неиммунореактивный аденозин в результате

реакции, катализируемой цитокининоксидазой. ПЦР с детекцией результатов в реальном времени. РНК выделяли из корней и листьев растений исходного экотипа и мутанта *ent3* при помощи тризола. Тотальную РНК обрабатывали RQ1 ДНКазой, свободной от РНКаз ("Promega"; <http://www.promega.com/>), затем проводили обратную транскрипцию, используя олиго (dT) праймер и M-MuLV-обратную транскриптазу ("NEB", США). Для количественного анализа транскриптов генов, кодирующих изопентенилтрансферазу (AtIPT1, AtIPT3, AtIPT5 и AtIPT7), мы использовали описанные ранее праймеры [7]. ОТ-ПЦР в реальном времени проводили в термоциклере Rotor-Gene™ 6000 ("Corbett Research", Австралия) в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green. В качестве внутреннего контроля использовали ген «домашнего хозяйства» арабидопсиса AtACT2 (At3g18780).

Эксперименты проводили 3 раза по 3–20 повторений (n) в каждом из них. Существенную (при $p < 0.05$) разницу между средними рассчитывали при помощи t-теста или двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA.

Результаты. Сравнение концентрации цитокининов в побегах и корнях растений арабидопсиса обоих генотипов показало, что наиболее существенное отличие заключалось в пониженной концентрации цитокининов в корнях мутантных растений по сравнению с исходными. Так, у растений, выращенных на жидкой питательной среде, суммарная концентрация зеатина, его рибозид и нуклеотида составляла $21,6 \pm 2,5$ и $38,2 \pm 4,0$ нг/г сырой массы в корнях *ent3* и COL, соответственно. Эта особенность проявлялась и при выращивании растений в песке.

Измерение активности цитокининоксидазы в побегах и корнях не выявило различий между мутантом и растениями исходного генотипа, и, следовательно, пониженный уровень цитокининов, зарегистрированный в корнях *ent3* растений, не мог быть следствием более активного распада цитокининов (рис. 1).

РТ-ПЦР анализ транскриптов IPT-генов не выявил понижения экспрессии генов, контролирующих синтез цитокининов, в корнях мутанта по сравнению с растениями исходного генотипа,

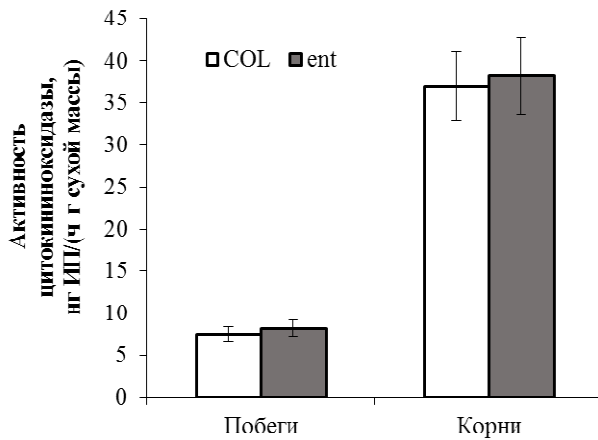


Рис. 1. Активность цитокининоксидазы в побегах и корнях 5-недельных мутантных по гену переносчика рибозидов азотистых оснований ENT3 (*ent*) и исходных (COL) растений арабидопсиса (n = 3)

Т а б л и ц а 1

Уровень транскриптов генов *IPT1*, *IPT3*, *IPT5* и *IPT7* в побегах и корнях 5-недельных мутантных по гену переносчика рибозидов азотистых оснований *ENT3* (*ent*) и исходных (COL) растений арабидопсиса; представлены значения экспрессии данных генов относительно уровня транскриптов актина (n = 3)

Ген	Побеги		Корни	
	COL	<i>ent</i>	COL	<i>ent</i>
<i>IPT1</i>	213 ± 25	298 ± 31	287 ± 30	300 ± 33
<i>IPT3</i>	421 ± 45	590 ± 64	435 ± 44	560 ± 55
<i>IPT5</i>	387 ± 40	548 ± 58	658 ± 67	823 ± 80
<i>IPT7</i>	249 ± 27	367 ± 36	434 ± 45	432 ± 45

что не позволяет объяснить сниженный уровень этих гормонов в корнях *ent3* по сравнению с COL растениями ингибированием синтеза цитокининов (табл. 1).

Эксперименты со введением рибозидов зеатина в гидропоническую культуру показали (рис. 2), что уровень цитокининов у обработанных экзогенным гормоном растений был выше в корнях растений исходного генотипа (46 и 37 нг на г сырой массы корней у растений COL и *ent3*, соответственно) и в побегах мутанта (24 и 31 нг на г сырой массы побега у растений COL и *ent3*, соответственно). В побегах обработка экзоген-

ным цитокинином наиболее заметно сказывалась на содержании рибозидов зеатина, доля которого по сравнению с контролем (необработанными экзогенным цитокинином растениями) возросла от 23 % (у контрольных растений обоих генотипов) до 50 % от суммы всех измеренных цитокининов в случае COL и до 65 % в случае *ent3*.

Разбавление питательного раствора приводило к снижению концентрации цитокининов в корнях растений обоих генотипов (рис. 3). Доля рибозидов зеатина при этом понижалась в побегах примерно от 30 до 20 % от суммы всех измеренных форм цитокининов у растений обоих генотипов.

Разбавление питательного раствора сопровождалась активацией удлинения корней: у растений COL на разбавленном растворе они были на 22 % длиннее, чем в контроле, у растений *ent3* – на 14 % (рис. 4). На обоих фонах минерального питания корни растений *ent3* были длиннее, чем у COL.

Обсуждение. Хотя способность ENT транспортеров обеспечивать поглощение клетками рибозидов цитокининов известна [9], сведений об их участии в распределении цитокининов в растении и в выполнении цитокининами их рост-регулирующей функции мало. Они сводятся к данным о пониженной чувствительности к экзогенным рибозидам цитокининов у мутанта по гену, кодирующему этот переносчик, и о супрессии фенотипического проявления признака повышенной концентрации цитокининов (укорочения корней) у гибридов от скрещивания растений с повышенной экспрессией *AtIPT8* гена и мутанта *ent3*.

Полученные нами результаты указывают на роль ENT3 транспортера в регуляции уровня цитокининов в корнях растений. Эксперименты с поглощением экзогенного рибозидов зеатина выявили пониженную способность мутанта к накоплению экзогенного цитокинина в корнях и повышенную - к его транспорту в побег. На это указывает как более низкий уровень накопления цитокининов в корнях, так и повышенный уровень этих гормонов в побегах обработанных экзогенным цитокинином растений (по сравнению

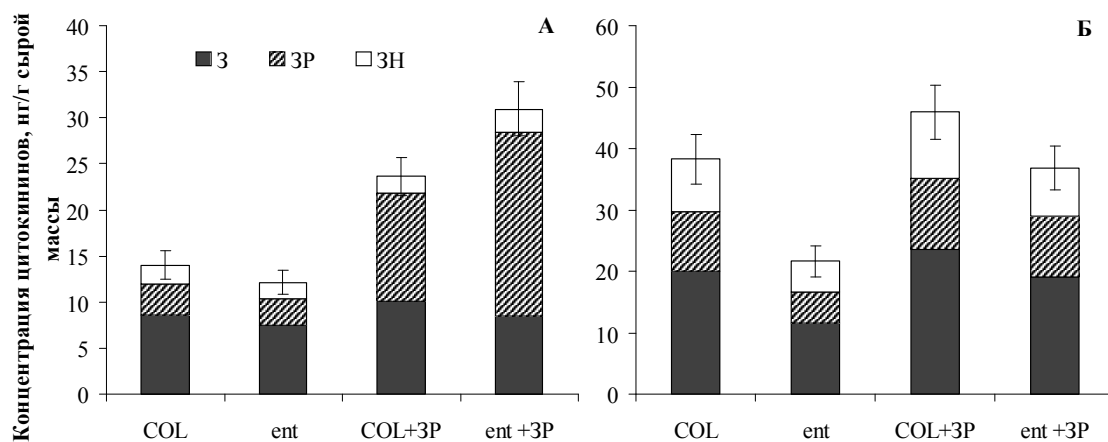


Рис. 2. Концентрация зеатина (З), зеатинрибозида (ЗР) и зеатиннуклеотида (ЗН) в побегах (А) и корнях (Б) 4-недельных мутантных по гену переносчика рибозидов азотистых оснований ENT3 (ent) и исходных (COL) растений арабидопсиса через сутки после добавления зеатинрибозида в питательный раствор (Col+3P, ent+3P) до конечной концентрации $4 \cdot 10^{-7}$ М (n = 3)

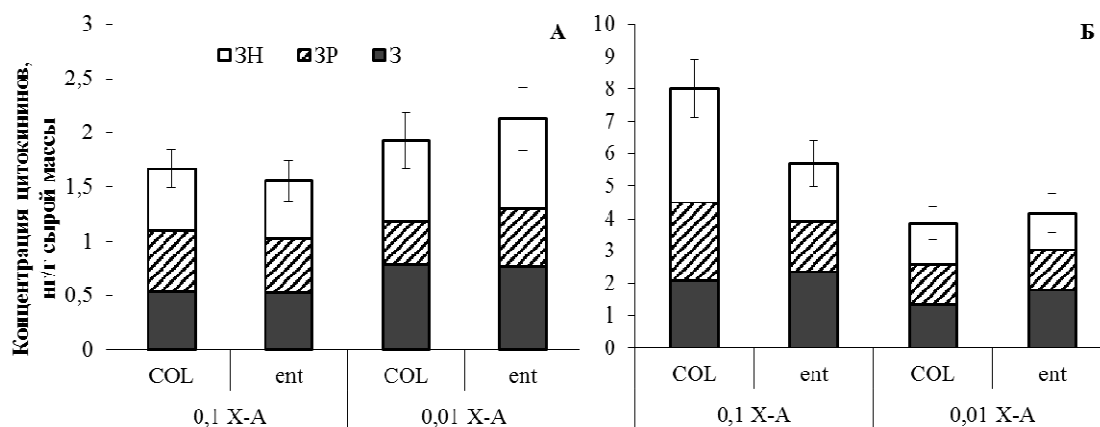


Рис. 3. Концентрация зеатина (З), зеатинрибозида (ЗР) и зеатиннуклеотида (ЗН) в побегах (А) и корнях (Б) 5-недельных мутантных по гену переносчика рибозидов азотистых оснований ENT3 (ent) и исходных (COL) растений арабидопсиса через 5 суток после переноса растений с оптимальной (0,1 X-A) на разбавленную (0,01 X-A) питательную среду Хогланда-Арнона (n = 3)

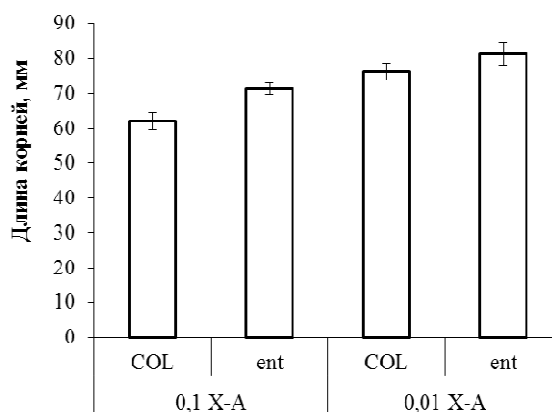


Рис. 4. Длина корней 5-недельных мутантных по гену переносчика рибозидов азотистых оснований ENT3 (ent) и исходных (COL) растений арабидопсиса через 7 суток после переноса растений с оптимальной (0,1 X-A) на разбавленную (0,01 X-A) питательную среду Хогланда-Арнона (n = 20)

с растениями исходного генотипа). Свидетельством более высокого уровня оттока в побег рибозида зеатина, введенного в питательный раствор, является более значительное увеличение доли этой формы цитокининов в побегах мутанта, которая возрастала до 65 % (у COL растений уровень накопления достигал лишь 50 % от общего содержания всех изученных форм цитокининов).

Ранее нами было показано, что отток экзогенного зеатина в побег возрастает при снижении его вторичного активного поглощения клетками корней под влиянием протонофора [10]. По аналогии можно интерпретировать наши результаты как свидетельство того, что мутация по гену транспортера рибозидов цитокининов снижает способность корней поглощать этот гормон, способствуя, тем самым, повышению его оттока в побег.

Таким образом, влияние ENT на транспорт цитокининов в побег имеет противоположную направленность по сравнению с ABC транспортерами. Если последние способствуют ксилемному транспорту цитокининов, обеспечивая их поступление в побег и снижая их накопление в корнях, ENT3 транспортер, наоборот, снижает их доставку в побег, обеспечивая поглощение рибозида цитокининов клетками корней.

Реакция на дефицит минерального питания была одинаковой у растений обоих генотипов. Как у *ent3*, так и у COL мы зарегистрировали снижение концентрации цитокининов в корнях, что сопровождалось ускорением их удлинения. Сходство в реакции мутанта и растений исходного генотипа на разбавление питательного раствора свидетельствует о том, что мембранный транспорт рибозидов цитокининов не играет существенной роли в реакции на дефицит минерального питания. Об этом косвенно свидетельствует снижение доли рибозида зеатина, зарегистрированное нами в побегах растений обоих генотипов (с 30 до 20 % от суммы всех измеренных цитокининов). Эти наши результаты соответствуют данным литературы о повышении чувствительности к рибозиду цитокинина на фоне дефицита нитратов, что может быть косвенным свидетельством понижения уровня этих форм цитокининов.

Корни *ent3* мутанта были длиннее, чем у COL, при этом дефицит минерального питания

активировал их удлинение. Эта реакция соответствовала исходному более низкому уровню цитокининов у мутанта и снижению концентрации гормонов в корнях на фоне дефицита минерального питания, поскольку цитокинины известны своим ингибирующим влиянием на удлинение корней [4] (более длинные корни характерны для растений с пониженным уровнем цитокининов в корнях [3]). Ранее были изучены биохимические особенности *ent3* растений, которые испытывали дефицит азотного питания. Мы впервые изучили ростовую реакцию этого мутанта на дефицит минерального питания. Хотя она оказалась такой же, как и у растений исходного генотипа, более длинные корни, выявленные у мутанта по сравнению с растениями исходного генотипа как на фоне достаточного минерального питания, так и его дефицита, свидетельствует о существенной роли ENT3 транспортера в регуляции роста уровня цитокининов в корнях и скорости их роста.

Таким образом, сравнение концентрации цитокининов и их распределения между побегом и корнем у растений с мутацией по гену, кодирующему ENT3 транспортер, способный переносить цитокинины через клеточные мембраны внутрь клеток, и исходных растений COL показало участие этого переносчика в регуляции накопления цитокининов в корнях и их оттока из корня в побег в на фоне оптимального питания, тем самым обеспечивая цитокинин-зависимую регуляцию удлинения корней растений арабидопсиса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kudoyarova G.R., Vysotskaya L.B., Cherkozyanova A., Dodd I.C. Effect of partial rootzone drying on the concentration of zeatin type cytokinins in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) xylem sap and leaves // J. Exp. Bot. 2007. V. 58. P. 161–168.
2. Vysotskaya L.B., Korobova A.V., Veselov S.Yu., Dodd I.C., Kudoyarova G.R. ABA mediation of shoot cytokinin oxidase activity: assessing its impacts on cytokinin status and biomass allocation of nutrient deprived durum wheat // Funct. Plant Biol. 2009. V. 36. P. 66–72.
3. Werner T., Motyka V., Laucou V., Smets R., van Onckelen H., Schmülling T. Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity // Plant Cell. 2003. V. 15. P. 2532–2550.

4. Ivanov V.B., Filin A.N. Cytokinins regulate root growth through its action on meristematic cell proliferation but not on the transition to differentiation // *Funct. Plant Biol.* 2018. V. 45. P. 215-221.

5. Korobova A.V., Vysotskaya L.B., Vasinskaya A.N., Kuluev B.R., Veselov S.Yu., Kudoyarova G.R. Dependence of Root Biomass Accumulation on the Content and Metabolism of Cytokinins in Ethylene-Insensitive Plants // *Russ. J. Plant Physiol.* 2016. Vol. 63. P. 597–603.

6. Takei K., Takahashi T., Sugiyama T., Yamaya T., Sakakibara H. Multiple routes communicating nitrogen availability from roots to shoots: a signal transduction pathway mediated by cytokinin // *J. Exp. Bot.* 2002. V. 53. P. 971-977.

7. Miyawaki K., Matsumoto-Kitano M., Kakimoto T. Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate // *Plant J.*

2004. V. 37. P. 128–138.

8. Zhang, K., Novak, O., Wei, Z., Gou, M., Zhang, X., Yu, Y., Yang, H., Cai, Y., Strnad, M., and Liu, C.-J. *Arabidopsis* ABCG14 protein controls the acropetal translocation of root-synthesized cytokinins // *Nat. Commun.* 2014. V. 5. P. 3274.

9. Hirose N., Makita N., Yamaya T., Sakakibara H. Functional characterization and expression analysis of a gene, *OsENT2*, encoding an equilibrative nucleoside transporter in rice suggest a function in cytokinin transport // *Plant Physiol.* 2005. V. 138. P. 196–206.

10. Kudoyarova G.R., Korobova A.V., Akhiyarova G.R., Arkhipova T.N., Zaytsev D.Yu., Prinsen E., Egutkin N.L., Medvedev S.S., Veselov S.Yu. Accumulation of cytokinins in roots and their export to the shoots of durum wheat plants treated with the protonophore carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) // *J. Exp. Bot.* 2014. V. 65. P. 2287-2294.

PLANT PHENOTYPE, METABOLISM, ACCUMULATION AND DISTRIBUTION OF CYTOKININS IN THE *ENT3* MUTANT *ARABIDOPSIS* UNDER OPTIMAL AND DEFICIENT MINERAL NUTRITION

© A.V. Korobova¹, B.R. Kuluev², G.R. Kudoyarova¹, S.Yu. Veselov³

¹ Ufa Institute of Biology, Ufa Research Centre, Russian Academy of Sciences, 69, prospect Octyabrya, 450054, Ufa, Russian Federation

² Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Centre of RAS, 71, prospect Octyabrya, 450054, Ufa, Russian Federation

³ Bashkir State University, 32, ulitsa Zaki Validi, 450076, Ufa, Russian Federation

The transmembrane transporter *ENT3* of *Arabidopsis* plants is able to provide the uptake of zeatin riboside by cells. The aim of this study was to investigate whether the transporter is involved in regulating the distribution of cytokinins on plant level, thereby affecting the performance of growth regulatory function by these hormones. To this end, mutant *Arabidopsis* plants without functional *ENT3* carriers (*ent3*) and their parent genotype - *Columbia* (*COL*) were used. The mutant plants showed an increased ability to deliver zeatin riboside to shoots after adding this hormone to Hoagland-Arnon nutrient solution suggesting involvement of *ENT3* in the uptake of zeatin riboside by root cells, thereby preventing its outflow from roots to shoots. Ten times dilution of the nutrient solution with optimum concentration of ions resulted in reduced accumulation of cytokinins both in *COL* and *ent3* roots, indicating no significant effect of the transporter on cytokinin distribution within plant under nutrient deficiency. Root elongation occurred according to the known inhibitory effect of cytokinins on the process: the *ent3* roots contained less cytokinins and were longer than in *COL*, whereas the deficiency of mineral nutrition activated elongation of roots of both genotypes in parallel with reduced cytokinin concentration in them. Thus, comparing the concentration of cytokinins and their distribution between the shoots and roots in plants of parent genotype *COL* and those with the mutation in the gene encoding for *ENT3* transporter revealed the involvement of the carrier in the regulation of cytokinin accumulation in the roots and their outflow from root to shoot on the background of optimal nutrition, thereby providing a cytokinin-dependent regulation of root elongation of *Arabidopsis* plants.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, *ENT3*, cytokinins, membrane transport, root elongation.

УДК 615.322:582.547.1:581.47

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-4-3-64-69

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ЖИДКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ ДЛЯ ВНУТРЕННЕГО ПРИМЕНЕНИЯ НА ОСНОВЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ – ПЛОДЫ АРОНИИ ЧЕРНОПЛОДНОЙ (*FRUCTUS ARONIAE MELANOCARPAE*)

© А.А. Кочукова, А.Н. Саньков, А.А. Шмыгарева, А.В. Пантюхин

На сегодняшний день ассортимент лекарственных средств, получаемых из плодов аронии черноплодной ограничен всего двумя наименованиями. В связи с этим, получение препаратов в виде жидких лекарственных форм из плодов аронии черноплодной актуальны. В работе приведены исследования по получению настойки из плодов аронии черноплодной. В качестве экстрагента для получения настойки из плодов аронии черноплодной обосновано использование раствора этилового спирта 70%. Усовершенствована технология получения настойки методом перколяции и обоснована технологическая схема получения настойки из плодов аронии черноплодной.

В ходе исследования была адаптирована методика количественного определения суммы антоцианов в пересчете на цианидин-3О-глюкозид в плодах аронии черноплодной для количественного определения действующих веществ в лекарственном препарате «Настойка аронии черноплодной», полученном из лекарственного растительного сырья аронии черноплодной. Количественное определение, применяемое в работе, основано на использовании метода спектрофотометрии при аналитической длине волны 534 нм. Достоверность полученных исследований подтвердили статистической обработкой полученных данных.

Ключевые слова: *Fructus Aroniae melanocarpae*, антоцианы, настойка аронии черноплодной, спектрофотометрия.

Введение. Значительная часть населения Земли применяет для лечения и профилактики заболеваний препараты растительного происхождения - сборы, экстракты, индивидуальные вещества, выделенные из растений. Во многих странах четверть применяемых лечебных средств - это препараты на основе биологически активных веществ растений. В Российской Федерации лекарственные средства растительного происхождения составляют около половины от общего ассортимента аптек [1].

По официальным данным Федеральной службы государственной статистики за 2017 г

болезнями, характеризующиеся повышенным кровяным давлением страдают около 1399,4 тыс. человек [2].

Поэтому профилактика и длительное лечение гипертонической болезни с помощью растительных препаратов, способных оказывать более мягкий эффект и применяться длительно, является как никогда актуальным.

Одним из перспективных в этом плане видов лекарственного растительного сырья являются плоды аронии черноплодной (*Fructus Aroniae melanocarpae*) (род *Fructuum Aroniae melanocarpae*). В Государственном

КОЧУКОВА Анна Александровна – к.б.н., Оренбургский государственный медицинский университет, e-mail: Annet512@rambler.ru

САНЬКОВ Анатолий Николаевич – к.м.н., Оренбургский государственный медицинский университет, e-mail: a.n.sankov@mail.ru

ШМЫГАРЕВА Анна Анатольевна – д.фарм.н., Оренбургский государственный медицинский университет, e-mail: a.shmygareva@mail.ru

ПАНТЮХИН Андрей Валерьевич – д.фарм.н., Смоленский государственный университет, e-mail: pav74@yandex.ru

реестре лекарственных средств, плоды относятся к фармакологическим группам «Витамины и витаминоподобные средства» и «Общетонизирующие средства и адаптогены» [3]

Плоды аронии содержат до 10% углеводов (глюкозу, сахарозу, фруктозу), полисахариды, группу флавоноидов, обладающих Р-витаминной активностью (до 2000 мг %) (рутин, гесперидин, свободный кверцетин), аскорбиновую кислоту (до 110 мг%), каротиноиды (до 500 мг%), витамины Е, РР, В2, антоцианаты, органические кислоты (лимонная, яблочная), дубильные вещества (до 0,5%), аминокислоты, микроэлементы (молибден, марганец, медь, йод, магний, железо). В мякоти плодов обнаружено до 40% йода (на сухую мякоть без семян) пектины 0,48% [4].

Благодаря составу биологически активных веществ лекарственные препараты из плодов аронии черноплодной (*Fructus Aroniae melanocarpaе*) способны оказывать гипотензивное действие, уменьшать проницаемость и ломкость кровеносных капилляров, участвовать в окислительно-восстановительных процессах, следовательно, предотвращать развитие гипертонических кризов, усиливать секрецию желудочного сока, что особенно важно в пожилом возрасте [5].

Несмотря на то, что плоды аронии черноплодной широко используются в народной медицине, зарегистрированных в Государственном реестре лекарственных средств препаратов всего лишь два (Арония+С - таблетки и Кедровит - элексир) и используются они как поливитаминное и общетонизирующее средства соответственно [6].

Изучением получения полифенолов и экстрактов из сырья, содержащего антоцианы в своих работах занимались П.Б. Лубсандоржиева, Л.П. Рубчевская, Л.А. Карцова и И.И. Тыняна, где обосновано использование подкисленных водных растворов этанола (20-50%) для экстракции антоцианов и последующего их количественного определения [7].

К тому же водные экстракты не устойчивы при хранении и подвержены микробной порче, что послужило основанием выбора лекарственной формы в виде настойки.

В связи с этим адаптация методик получения водно-спиртового извлечения (настойки) из плодов аронии черноплодной и количественное определение содержания группы действующих веществ в полученной лекарственной форме на данный момент являются актуальными.

Цель исследования - обоснование технологии получения жидких лекарственных форм (водно-спиртовых извлечений) для внутреннего применения на основе лекарственного растительного сырья плоды аронии черноплодной (*fructus Aroniae melanocarpaе*); усовершенствование количественного определения суммы антоцианов в пересчете на цианидин-3О-глюкозид в полученных лекарственных формах.

Материал и методы исследования. Объект исследования – плоды аронии черноплодной (*fructus Aroniae melanocarpaе*).

Электронные спектры измеряли на спектрофотометре «UNICO - 2800» в кюветах с толщиной слоя 10 мм.

Экстрагирование плодов аронии черноплодной проводили методом перколяции из навесок одной и той же выборки сырья, при одинаковых условиях, соотношение сырьё – экстрагент 1:10. В качестве экстрагента использовали спирт этиловый 40 % и 70 %.

Перколяция. Метод перколяции включает три последовательно протекающие стадии: намачивание сырья (набухание сырья), настаивание, собственно перколяция. Экстракция осуществлялась с использованием лабораторного перколятора [8, 9].

Результаты и обсуждение. На основании проведенных исследований были получены настойки методом перколяции с использованием спирта в концентрации 40 и 70 %. Извлечения представляли собой жидкость темно-вишневого цвета, а при отстаивании образовывался незначительный осадок, в настойке на 70 % спирте его было в два раза больше.

В результате количественного определения действующих веществ в водно-спиртовых извлечениях установили, что в максимальное содержание суммы антоцианов содержится в извлечениях на 70 % растворе спирта этилового

Содержание суммы антоцианов в пересчете на цианидин-3О-глюкозид в образцах настоек плодов аронии черноплодной

№ п/п	Используемый экстрагент для настаивания	Содержание суммы антоцианов в пересчете на цианидин-3О-глюкозид, %	Выход антоцианов по отношению к их содержанию в исходном сырье, %
1	40 % спирт этиловый	1,13±0,001	68,32
2	70 % спирт этиловый	1,22±0,002	73,76

(Таблица 1). Таким образом, нами обосновано использование в качестве экстрагента раствора этилового спирта в концентрации 70 % для получения настоек из плодов аронии черноплодной.

С целью разработки нормативного документа исследовали и обосновали использование методики количественного определения суммы антоцианов в пересчете на цианидин-3О-глюкозид изучены УФ-спектры полученных настоек и УФ-спектр количественного определения в плодах аронии по фармакопейной методике. Исследование УФ-спектров показало, что электронные спектры настоек плодов аронии черноплодной (рисунок 1) совпадают со спектрами извлечения из плодов аронии черноплодной (рисунок

2). В длинноволновой области электронного спектра водно-спиртового извлечения плодов аронии черноплодной наблюдается четкий максимум поглощения при 534±2 нм (рис. 1), который характерен и для спектра раствора, полученного из плодов по стандартной методике количественного определения суммы антоцианов в сырье аронии черноплодной.

Следовательно, в качестве аналитической длины волны может быть использовано значение 534 нм, а стандартным образцом может служить цианидин-3О-глюкозид, причем в случае отсутствия стандарта в расчетной формуле может быть использовано теоретическое значение удельного показателя поглощения ($A_1^{1\%} = 100$).

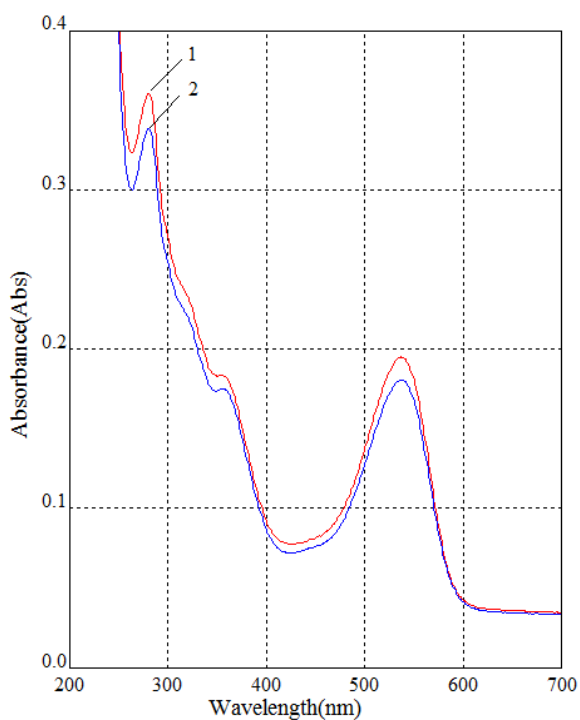


Рис. 1. Электронные спектры водно- спиртового извлечения плодов аронии черноплодной 70 % спиртом этиловым (1) и 40 % спиртом этиловым (2)

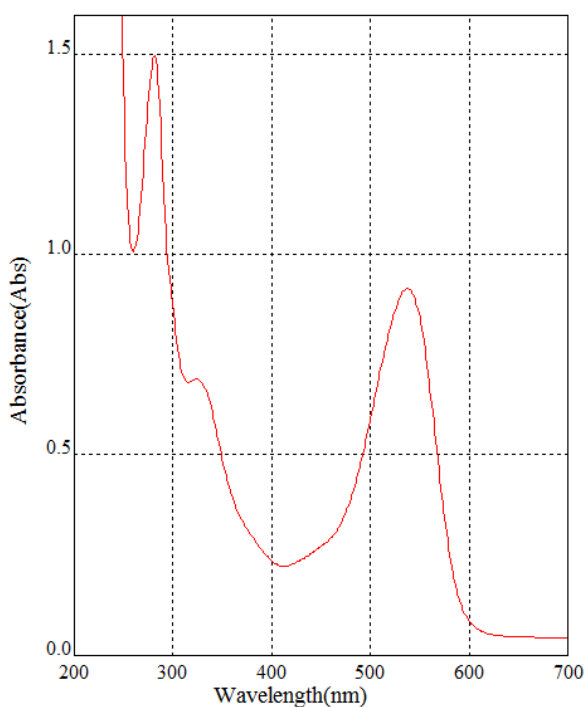


Рис. 2. Электронный спектр количественного определения антоцианов в пересчете на цианидин-3О-глюкозид в плодах аронии черноплодной

Результаты статистической обработки проведенных опытов показывают, что ошибка единичного определения суммы антоцианов в пересчете на цианидин-3О-глюкозид в настойке аронии с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 3,4\%$ и $3,7\%$ соответственно для настойки на 40 % и 70 % спирте.

Метрологические характеристики метода количественного определения суммы антоцианов в пересчете на цианидин-3О-глюкозид в настойке аронии черноплодной представлены в таблице 2.

Методика количественного определения в цельном сырье. В коническую колбу на 100 мл помещали 1,0 г измельченных свежих плодов (точная навеска) добавляют 30 мл спирта 96 %, содержащего кислоту хлористоводородную (100 мл спирта 96 % + 1 мл кислоты хлористоводородной концентрированной) и экстрагируют 120 мин при комнатной температуре при постоянном перемешивании. Полученный раствор фильтровали через бумажный фильтр в колбу темного стекла (раствор А). 1 мл полученного раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводили объем тем же растворителем до метки и перемешивали (раствор Б). затем измеряли оптическую плотность (А) раствора Б на спектрофотометре при длине волны 534 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали растворитель.

Содержание суммы антоцианов в пересчете на цианидин-3О-глюкозид в абсолютно сухом сырье в процентах вычисляли по формуле:

$$x = \frac{A \cdot 30 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{ см}}^{1\%} \cdot a \cdot 1 \cdot (100 - W)}$$

Где А – оптическая плотность раствора Б; а – масса навески сырья, г; $A_{1\text{ см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения цианидин-3О-глюкозида при длине волны 534 нм, равный 100; W – влажность сырья, %. Влажность сырья 13,8 % (определяли по методике ОФС.1.5.3.0007.15 «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов») [9]. По требованию ФС содержание действующих веществ должно быть не менее 4 %.

Методика получения водно-спиртового извлечения стандартная в соответствии с требованиями ОФС.1.4.1.0019.15 «Настойки» [9].

Водно-спиртовое извлечение проводили методом перколяции. В качестве экстрагента использовали спирт этиловый 40 и 70 %, как наиболее распространенные в зарегистрированных препаратах настоек из лекарственного растительного сырья.

Измельченные плоды аронии черноплодной в соотношении 1 к 1 заливали порцией экстрагента и для набухания сырья оставляли на 4 часа. Затем сырье заливали экстрагентом до образования «зеркала», и настаивали 48 часов. По истечении двух суток проводили собственно перколяцию со скоростью, не превышающей 1/24 части используемого объема перколятора за 1 час. Перколирование заканчивали получением пяти объемов вытяжки по отношению к массе загруженного сырья.

Методика количественного определения в настойках. 1 мл настойки помещали в мерную колбу на 25 мл и доводили до метки спиртом 96 %, содержащим кислоту хлористоводородную (100 мл спирта 96 % + 1 мл кислоты хлористоводородной концентрированной) (раствор А). 1 мл полученного раствора А помещали в мерную

Т а б л и ц а 2

Метрологические характеристики методики количественного определения содержания суммы антоцианов в пересчете на цианидин-3О-глюкозид в настойках аронии черноплодной

Настойка	n	f	\bar{X}	S	P, %	t (P,f)	ΔX	E, %
на 40 % спирте этиловом	11	10	1,13	0,0173	95	2,23	$\pm 0,0386$	$\pm 3,4$
на 70 % спирте этиловом	11	10	1,22	0,0202	95	2,23	$\pm 0,0452$	$\pm 3,7$

колбу вместимостью 25 мл, доводили объем тем же растворителем до метки и перемешивали (раствор Б). затем измеряли оптическую плотность раствора Б (А) на спектрофотометре при длине волны 534 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали растворитель.

Содержание суммы антоцианов в пересчете на цианидин-3О-глюкозид в настойке в процентах вычисляли по формуле:

$$x = \frac{A \cdot 25 \cdot 25}{100 \cdot 1 \cdot 1}$$

Где А – оптическая плотность раствора Б; $A_{1\text{ см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения цианидин-3О-глюкозида при длине волны 534 нм, равный 100.

Таким образом, в ходе исследования была обоснована целесообразность использования 70 % спирта этилового для получения настойки из плодов аронии черноплодной, так как выход биологически активных веществ при экстракции 70 % спиртом этиловым на 5,44 % выше по отношению к исходному сырью, чем экстракция 40 % спиртом этиловым.

Адаптирована методика количественного определения суммы антоцианов в пересчете на цианидин-3О-глюкозид в плодах аронии черноплодной для количественного определения действующих веществ в настойке аронии черноплодной.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кудашев А. Н. Фитопрепараты в ассортименте аптек / А. Н. Кудашев // Фармацевтическое обозрение. - 2002. - №2. - С. 10-13;
2. Здравоохранение в России. 2017: Стат.сб./Росстат. - М., 3-46 2017. – 170 с.;
3. Государственный реестр лекарственных средств. Официальное издание: в 2 т.- М.: Медицинский совет, 2009. - Т.2, ч.1 - 568 с.; ч.2 - 560 с.;
4. Фармакогнозия: учебник / Самылина И.А., Яковлев Г.П. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. - 976 с.: ил.;
5. Антоцианы и антиоксидантная активность плодов некоторых представителей рода Rubus / Н.Ю. Колбас и др. // Вести НАН Беларуси. Сер. биологические науки. – 2012. – № 1. – С. 5-10;
6. Государственный реестр лекарственных

средств: электрон. дан. Режим доступа URL: <http://www.grls.rosminzdrav.ru> (дата обращения 17.03.2018)

7. Тыняная И.И. Разделение, концентрирование и анализ антоцианов и бетацианинов в экстрактах растительного сырья с применением оптических и хроматографических методов: диссертация на соискание учёной степени кандидата химических наук. Белгород, 2015 г.

8. Инновационные технологии и оборудование фармацевтического производства. Учебник в 2-х т. Т.2 / Н.В. Меньшутина, Ю.В. Мишина, С.В. Алвес и др.; под ред. Н.В. Меньшутинной. М.: Изд-во БИНОМ, 2013. 480 с.;

9. Государственная фармакопея Российской Федерации: Вып. 2. / МЗ РФ. 13-е изд. - М.: Медицина, 2015. 1004 с.

References

1. Kudashev A. N. Fitopreparaty v assortimente aptek / A. N. Kudashev // Farmaceuticheskoe obozrenie. - 2002. - №2. - s. 10-13;
2. Zdravooxranenie v Rossii. 2017: Stat.sb./Rosstat. - M., z-46 2017. – 170 s.;
3. Gosudarstvennyj reestr lekarstvennyx sredstv. Oficialnoe izdanie: v 2 t.- M.: Medicinskij sovet, 2009. - t.2, ch.1 - 568 s.; ch.2 - 560 s.;
4. Farmakognoziya: uchebnik / Samylyna I.A., Yakovlev G.P. - M.: GEOTAR-Media, 2013. - 976 s.: il.;
5. Antociany i antioksidantnaya aktivnost plodov nekotoryx predstavitelej roda rubus / N.Yu. Kolbas i dr. // vesti NAN Belarusi. Ser. biologicheskie nauki. – 2012. – № 1. – s. 5-10;
6. Gosudarstvennyj reestr lekarstvennyx sredstv: ehlektron. dan. Rezhim dostupa URL: <http://www.grls.rosminzdrav.ru> (data obrashcheniya 17.03.2018);
7. Tynyanaya I.I. Razdelenie, koncentrirovaniye i analiz antocianov i betacianinov v ekstraktax rastitelnogo syrya s primeneniem opticheskix i xromatograficheskix metodov: dissertaciya na soiskaniye uchyonoy stepeni kandidata ximicheskix nauk. Belgorod, 2015 g.
8. Innovacionnye tekhnologii i oborudovanie farmaceuticheskogo proizvodstva. Uchebnik v 2-h t. Т.2 / N.V. Men'shutina, YU.V. Mishina, S.V. Alves i dr.; pod red. N.V. Men'shutinoj. M.: Izd-vo BINOM, 2013. 480 s.;
9. Gosudarstvennaya farmakopeya Rossijskoj Federacii: Vyp. 2. / MZ RF. 13-e izd. - M.: Medicina, 2015. 1004 s.



DEVELOPMENT OF TECHNOLOGY OF LIQUID DOSAGE FORMS FOR INTERNAL USE ON THE BASIS OF MEDICINAL PLANT RAW MATERIALS-FRUITS OF ARONIAE MELANOCARPAE (*FRUCTUS ARONIAE MELANOCARPAE*)

© А.А. Kochukova¹, А.Н. Sankov¹, А.А. Shmygareva¹, А.В. Pantyukhin²

¹Orenburg state medical University,
6, ulitsa Sovetskaya, Orenburg, Russian Federation

²Smolensk State University,
4, ulitsa Przhevalskogo, 214000, Smolensk, Russian Federation

To date, the range of medicines derived from the fruits of *Aronia melanocarpa* is limited to only two names. In this regard, the preparation of drugs in the form of liquid dosage forms from the fruits of *Aronia melanocarpa* are relevant more than ever. The paper presents research on the preparation of a tincture from fruits of *Aronia melanocarpa*. As the extractant to obtain the tinctures of the fruits of *Aronia melanocarpa* justified the use of ethanol 70%. Improved technology of producing tinctures by percolation and justifies the flowchart of tinctures from of *Aronia melanocarpa*.

The study was adapted method for the quantitative determination of the amount of anthocyanins in terms of cyanidin-3O-glucoside in the fruits of chokeberry for the quantitative determination of active substances in medicinal preparation "Tincture of *Aronia melanocarpa* " is derived from medicinal plant raw material of *Aronia melanocarpa*. The quantitative determination used in the work is based on the use of the spectrophotometry method at an analytical wavelength of 534 nm. The results of quantitative research are presented in the form of electronic spectra.

Reliability of the received researches was confirmed by statistical processing of the received data.

Key words: *Fructus Aroniae melanocarpae*, anthocyanins, *Aronia melanocarpa* tincture, spectrophotometry.

УДК: 577.215.3

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-4-3-70-74

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *GSTT* И *GSTM* ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТА

© Т.Г. Кутлина, Я.В. Валова, Д.О. Каримов, Г.Ф. Мухаммадиева, Н.Ю. Хуснутдинова, Д.А. Смолянкин, Э.Ф. Репина, А.Б. Бакиров

С целью изучения экспрессии генов *GSTT* и *GSTM* в гепатоцитах через 24 и 72 часа после затравки СС14 в разных дозах, был проведен эксперимент на крысах массой 170 – 190 грамм.

Кратность экспрессии гена *GSTM* при 24 часовом воздействии плавно повышалась до дозы 0,25 г/кг, в последующих дозах наблюдается ее понижение. При 72 часовом воздействии в интервале от 0 г/кг до 0,5 г/кг наблюдалось понижение уровня экспрессии. На промежутке от 0,25 г/кг до 0,5 г/кг произошло резкое ее повышение, и, начиная с дозы 0,5 г/кг, она снижалась. Транскрипционная активность гена *GSTT* при 72 часовом воздействии колебалась в диапазоне от -1,90 до 1,37. Похожая картина наблюдалась и при 24 часовом эксперименте. При изучении кратности экспрессии *GSTT* в печени крыс мы наблюдали тенденцию к повышению экспрессии в зависимости от дозы, что, скорее всего, обусловлено повышением концентрации свободных радикалов, которые, в свою очередь, приводят к фосфорилированию NRF2, после этого он соединяется с промотором *GSTT* и активирует его экспрессию, которая необходима для детоксикации и метаболизма ксенобиотиков.

Ключевые слова: химические и лекарственные повреждения печени, тетрахлорметан, экспрессия, глутатион-S-трансферазы, окислительный стресс.

Введение. Токсическое поражение печени в настоящее время привлекает особое внимание многих исследователей, в связи с растущим загрязнением окружающей среды и ростом промышленности. Развитие данного патологического состояния обусловлено несколькими

группами этиологических факторов: - интоксикацией гепатотропными веществами (тетрахлорметан, бензол), лекарственными препаратами (парацетамол, антидепрессанты, противовоспалительные средства, тетрациклин и др.), этанолом и его суррогатами. Токсические

КУТЛИНА Татьяна Георгиевна, Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека,
e-mail: tanya.kutlina.92@mail.ru

ВАЛОВА Яна Валерьевна, Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека, Башкирский государственный университет, e-mail: Q.juk@yandex.ru

КАРИМОВ Денис Олегович – к.м.н., Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека,
e-mail: karimovdo@gmail.com

МУХАММАДИЕВА Гузель Фанисовна – к.б.н., Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека, e-mail: ufniimt@mail.ru

ХУСНУТДИНОВА Надежда Юрьевна, Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека,
e-mail: hnyu@yandex.ru

СМОЛЯНКИН Денис Анатольевич, Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека,
e-mail: Smolyankin.denis@yandex.ru

РЕПИНА Эльвира Фаридовна – к.м.н., Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека,
e-mail: e.f.repina@bk.ru

БАКИРОВ Ахат Бариевич – д.м.н., Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека,
e-mail: fun@uniimteR.ru

агенты приводят к развитию печеночной недостаточности, опухолям, гепатитам и циррозу [1].

Тетрахлорметан (CCl_4 , четыреххлористый углерод) является одним из наиболее хорошо изученных гепатотропных ядов. Отравление экспериментальных животных CCl_4 по биохимическим показателям и морфологической характеристике близки к острым поражениям печени различной этиологии наблюдаемых у человека. Характер поражения печени зависит от количества и концентрации вводимого ТХМ и продолжительности проводимого эксперимента. Гепатотоксический эффект обусловлен аутокаталитическим переокислением микросомальных липидов, возникающем вследствие воздействия свободных радикалов, образуемых при метаболизме этого соединения в эндоплазматическом ретикулуме гепатоцитов. Процесс окисления липидов ведет к распаду внутриклеточных мембран митохондрий, лизосом, высвобождению активных ферментов, денатурации белков с последующей гибелью клетки [2]. В ответ на повреждение происходит активизация антиоксидантной системы (АОС) клетки, в том числе системы глутатионов.

Глутатион-S-трансферазы (GSTs) - семейство метаболических изоферментов эукариотической и прокариотической фазы II, они наиболее известны своей способностью катализировать конъюгацию восстановленной формы глутатиона (GSH) к ксенобиотическим субстратам с целью детоксикации. Семейство GST состоит из трех надсемейств: цитозольного, митохондриального и микросомального. GSTs – ключевой компонент второй фазы детоксикации ксенобиотиков. Описаны несколько изоформ глутатион-S-трансфераз (A1, M1, P1, T1 и др.). Гены, которые кодируют белки глутатион-S-трансферазной активности (*GSTT*, *GSTP* и *GSTM*), известные как ферменты 2-й фазы детоксикации ксенобиотиков [3]. Гены *GSTT*, *GSTM* и *GSTP* кодируют различные типы глутатион-S-трансфераз – T1, M1 и P1. Глутатион-S-трансферазы активно участвуют в детоксикации ряда ксенобиотиков путем их связывания с глутатионом и играют ключевую роль в обеспечении устойчивости клеток к перекисному окислению липидов, свободным радикалам, алкилированию белков и

мутаций ДНК. Экспрессия генов *GST* имеет тканеспецифические особенности: так, *GSTM* выявляется во многих тканях, в том числе в лимфоидных органах и лимфоцитах, фермент также обнаружен в клетках печени [4]. *GSTT* экспрессируется только в эритроцитах и печени, поэтому возможна его связь через общие метаболические пути с развитием ТГ [5].

Целью настоящей работы явилось исследование количественной экспрессии генов *GSTT* и *GSTM* в печени крыс в норме и при экспериментальном токсическом гепатите (ЭТГ).

Материал и методы. Токсический гепатит у белых крыс вызывали путем введения тетрачлорметана (ТХМ) в виде 50%-ного масляного раствора в дозе 0,125 - 4 г/кг массы животного подкожно, однократно. Печень декапитированных крыс подвергали исследованию спустя 24 и 72 часа после затравки. Животным контрольной группы подкожно вводили оливковое масло. Всего в опытах использовано 84 белых беспородных крыс (12 крыс в контрольной группе и 72 – в экспериментальной) с массой 170 – 190 г. При уходе за животными, питании и проведении экспериментов руководствовались базисными нормативными документами: Рекомендациями комитета по экспериментальной работе с использованием животных при Минздраве России, рекомендациями ВОЗ, рекомендациями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей. Кусочки печени сразу после декапитации и вскрытия замораживали жидким азотом и заливали Extract RNA (ЗАО «Евроген»). Для определения функционального состояния печени нами было применено определенное количество методик: экстракция тотальной РНК тризоловым методом, обратная транскрипция и ПЦР-амплификация в режиме реального времени на приборе Rotor Gene (QIAGEN). Изучение экспрессии генов в печени крыс в норме и при ХТГ проводили методом ПЦР в режиме реального времени с использованием олигонуклеотидных специфичных праймеров ЗАО «Евроген», содержащего интеркалирующий краситель SYBR Green. Статистические данные, полученные в опытах, обрабатывали с помощью

критерия (t) Стьюдента и однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) [6].

Результаты. При анализе экспрессии гена GSTM при введении ТХМ получились следующие результаты. При 24 часовом воздействии кратность экспрессии плавно повышалась на промежутке от 0 г/кг до 0,25 г/кг (-0,45; 2,63; 4,38; $F=4,78$; $p=0,001$). В интервале от 0,25 г/кг до 0,5 г/кг наблюдается понижение экспрессии (4,38; 2,31). Затем, на промежутке от 0,5 г/кг до 1 г/кг изменение экспрессии практически не наблюдается (2,31; 2,02). При увеличении дозировки от 1 г/кг до 4 г/кг происходит изменение кратности экспрессии в сторону снижения (2,02; 0,71; -0,56).

Противоположные результаты получились при анализе кратности экспрессии того же гена при 72 часовом воздействии ТХМ с дозировкой до 0,5 г/кг. В интервале от 0 г/кг до 0,5 г/кг наблюдалось понижение уровня экспрессии (-0,45; -1,34; -4,15; $F=6,15$; $p=0,001$). На промежутке от 0,25 г/кг до 0,5 г/кг произошло резкое ее повышение (-4,15; 1,32) и начиная с дозы 0,5 г/кг экспрессия снижалась (1,32; 0,86; -0,52; -4,30). Особенно резкое ее понижение наблюдается в промежутке от 2 г/кг до 4 г/кг (-0,52; -4,30).

Как видно на данном графике, значимых различий в экспрессии гена GSTT при 72 часовом эксперименте не наблюдалось. Кратность экспрессии колебалась в диапазоне от -1,90 до 1,37. Начиная с дозировки 0,5 г/кг и до 4 г/кг происходило плавное ее понижение с минимальным значением в дозе 4 г/кг крысы (-1,90; $F=1,38$; $p=0,25$).

Похожая картина наблюдалась и при 24 часовом эксперименте. Здесь в промежутке от 0 до 1 г/кг происходило плавное увеличение кратности экспрессии с максимальным ее значением при дозе 1 г/кг (3,47; $F=2,28$; $p=0,06$). В дальнейшем прослеживалось незначительное снижение экспрессии с 3,47 при дозе 1 г/кг до 1,12 при 4 г/кг.

Обсуждение. Острый токсический гепатит характеризуется массивным центрлобулярным некрозом гепатоцитов, что приводит к тяжелым нарушениям функции печени. Неблагоприятный прогноз обусловлен тяжестью печеночного повреждения, быстротой развития

характерных морфологических нарушений, не оставляющих времени для полноценной реализации репаративных функций, а также развитием полиорганной недостаточности. Патогенетическая основа формирования тканевых печеночных и полиорганных повреждений — провоспалительные цитокины [7].

Окислительный стресс вызван дисбалансом между образованием активных форм кислорода и процессами их детоксикации. Активные формы кислорода, такие как пероксиды и свободные радикалы могут оказывать токсическое действие на многие части клетки - белки, липиды и ДНК. Выраженный окислительный стресс может привести к апоптозу и некрозу. В ответ на окислительный стресс клетка активирует механизмы защиты, которые включают индукцию антиоксидантных ферментов и ферментов детоксикации, в том числе происходит активация ядерного эритроидного связывающего фактора-2 (NRF2), который связывается с промоторами антиоксидантного элемента ответа (ARE) и активирует их транскрипцию [8, 9]. Неактивный Nrf2 сохраняется в цитоплазме в связи с актин-связывающим белком Keap1. При воздействии на клетки окислительного стресса Nrf2 фосфорилируется при взаимодействии с протеинкиназой C, фосфатидилинозитол-3-киназой и MAP-киназами. После фосфорилирования Nrf2 транслоцирует в ядро, связывается с промоторами ARE и трансктивирует антиоксидантные ферменты и ферменты детоксикации, такие как глутатион-S-трансфераза, ферменты системы цитохрома P450, NAD (P) H-хинон-оксидоредуктаза, оксигеназа и супероксиддисмутаза [10].

При изучении кратности экспрессии GSTT в печени крыс мы наблюдали, что максимум этой экспрессии наблюдается при дозах 1 и 2 г/кг, тогда как при увеличении дозы до 4 г/кг экспрессия данного гена не повышается, что мы связываем с метаболической депрессией в гепатоцитах, которая обусловлена декомпенсацией АОС, вследствие чего гепатоциты теряют свою синтетическую функцию и не могут синтезировать глутатион-трансферазы. При наблюдении данного показателя через 72 часа после затравки выраженных изменений не наблюдается, что, по-видимому, объясняется тем, что произошла

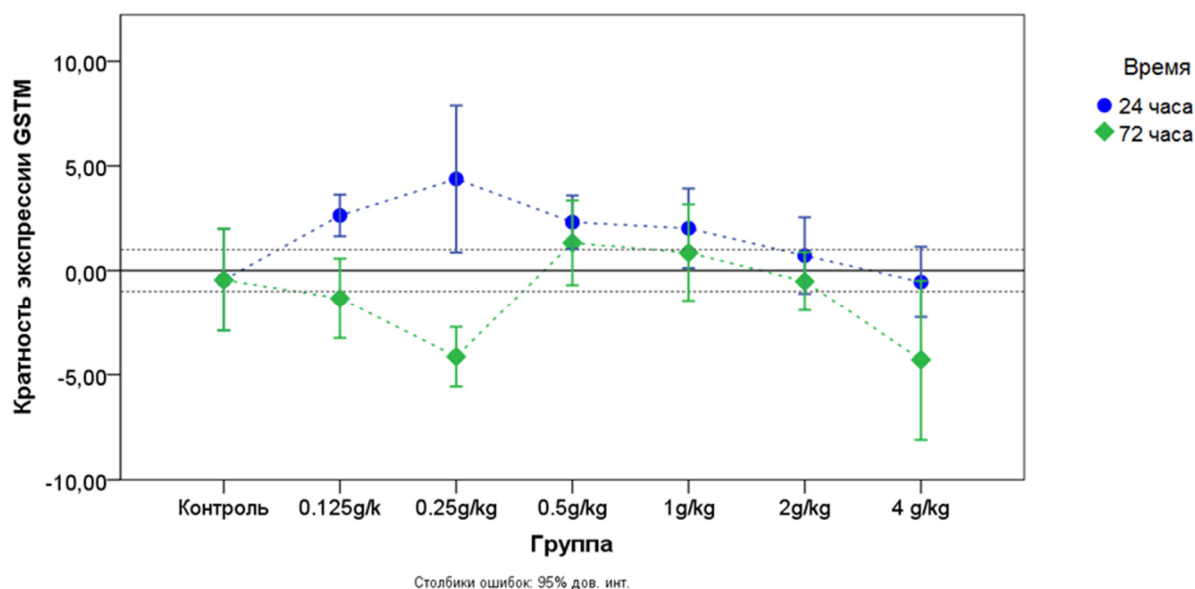


Рис. 1. Кратность экспрессии гена GSTM при 24 и 72 часовых воздействиях с увеличением дозы от 0 до 4 г/кг

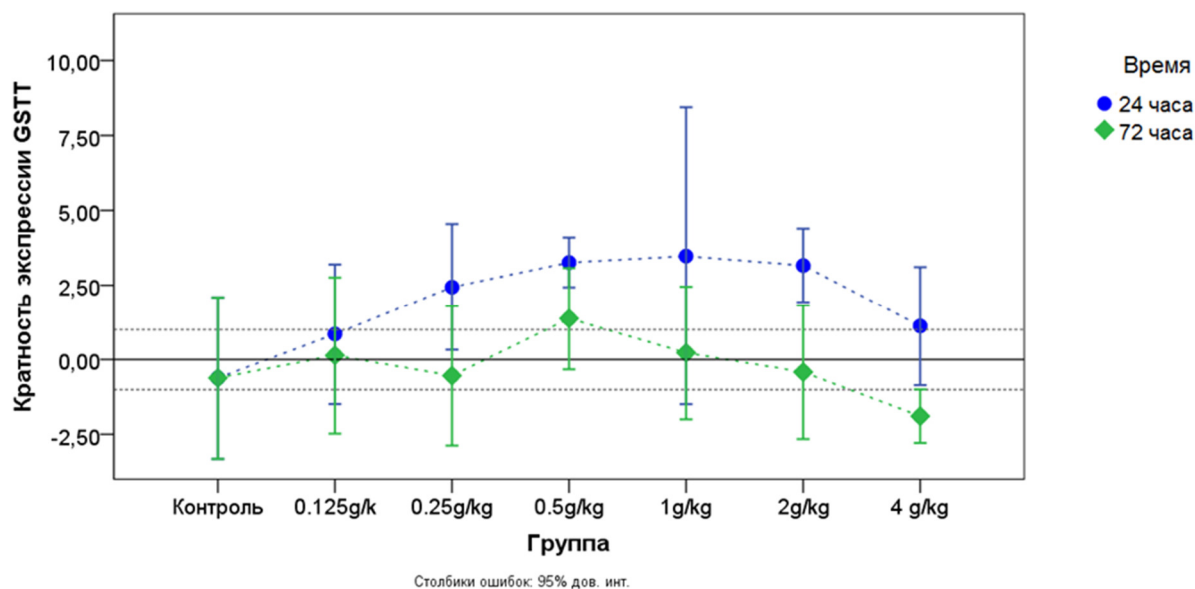


Рис. 2. Кратность экспрессии гена GSTT при 24 и 72 часовых воздействиях с увеличением дозы от 0 до 4 г/кг

детоксикация метаболитов тетраклорметана и необходимости в повышении экспрессии глутатион-трансфераз нет.

Изучая кратность экспрессии *GSTM* мы наблюдали повышение экспрессии при относительно малых дозах тетраклорметана (0,125 – 1 г/кг). Максимум при 0,25 г/кг. По-видимому, истощение данного механизма детоксикации наблюдается быстрее и при дозах 2 и 4 г/кг кратность экспрессии не превышает данные показатели в контроле.

Интересно отметить, что при анализе экспрессии этого гена через 72 часа после затравки наблюдалась обратно пропорциональная зависимость, то есть, чем выше была экспрессия на первые сутки, тем ниже она стала на третьи. Данное обстоятельство можно объяснить подавлением экспрессии этого гена после максимального ее повышения в первые сутки.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare that there is no conflict of interests.

ЛИТЕРАТУРА

1. Садовникова, И. И. Циррозы печени. Вопросы этиологии, патогенеза, клиники, диагностики, лечения // Российский медицинский журнал. — 2003. — Т. 5, № 2. С. 37-42.
2. Белякин, С. А., Бобров А. Н. Смертность от цирроза печени как индикатор уровня потребления алкоголя в популяции // Вестник Российской военно-медицинской академии. — 2009. — Т. 3. — С. 189-194.
3. Constandinou C., Henderson N., Iredale J. P. Modeling liver fibrosis in rodents // Methods Mol Med. — 2005. — Vol. 117. — P. 237-250.
4. Hayashi H., Sakai T. Animal models for the study of liver fibrosis: new insights from knockout mouse models // Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. — 2011. — Vol. 300(5). — P. 729-738.
5. Mullen K. D., McCullough A. J. Problems with animal models of chronic liver disease: suggestions for improvement in standardization // Hepatology. — 1989. — № 9. — P. 500-503.
6. Скуратов А. Г. Экспериментальное моделирование токсического повреждения печени // Проблемы здоровья и экологии. — 2011. — Т. 30 - № 4. — С. 27-33.
7. Скуратов А. Г. Тетрахлорметановая модель гепатита и цирроза печени у крыс // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. — 2012. — № 9. — С.74-83.
8. Осипов Б. Б., Скуратов А. Г. Экспериментальный СС14-индуцированный цирроз печени у крыс // Проблемы и перспективы развития современной медицины: сб. науч. ст. IV Респ. науч.-практ. конф. с междунар. участием студентов и молодых ученых, Гомель, 19-20 апреля 2012 года: в 4-х т. — Гом. гос. мед. ун-т. — Гомель: ГомГМУ, 2012. — Т. 3. — С. 108-110.
9. Bernacchi A.S. Carbon tetrachloride-induced liver injury in the rabbit // British Journal of Experimental Pathology. — 1983. — P. 261-267.
10. Мышкин В.А., Ибатуллина Р.Б., Бакиров А.Б. Поражение печени химическими веществами. — Уфа, «Гилем», 2007. — 177 с.



ANALYSIS OF EXPRESSION OF *GSTT* AND *GSTM* GENES IN TOXIC HEPATITIS
IN EXPERIMENTAL CONDITIONS

© T.G. Kutlina¹, Ya.V. Valova^{1,2}, D.O. Karimov¹, G.F. Mukhammadiyeva¹, N.Yu. Khusnutdinova¹,
D.A. Smolyankin¹, E.F. Repina¹, A.B. Bakirov¹

¹ Ufa Research Institute of Occupational Medicine and Human Ecology,
94, ulitsa Stepana Kuvykina, 450106, Ufa, Russian Federation

² Bashkir State University,
32, ulitsa Zaki Validi, 450076, Ufa, Russian Federation

In order to study the expression of *GSTT* and *GSTM* genes in hepatocytes 24 and 72 hours after seeding with *CC14* in different doses, an experiment was performed in rats weighing 170-190 grams.

The multiplicity of expression of the *GSTM* gene at 24 hour exposure gradually increased to a dose of 0,25 g/kg, in subsequent doses a decrease was observed. At 72 hours exposure in the range from 0 g/kg to 0,5 g/kg, a decrease in the level of expression was observed. At an interval of 0,25 g/kg to 0,5 g/kg, a sharp increase occurred, and, starting at a dose of 0,5 g/kg, it decreased. The transcriptional activity of the *GSTT* gene at a 72-hour exposure ranged from -1,90 to 1,37. A similar picture was observed with a 24-hour experiment.

Key words: chemical and medicinal liver damage, carbon tetrachloride, expression, glutathione-S-transferase, oxidative stress.

ЛИПОФИЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ КОРНЕЙ КУПЫРЯ ЛЕСНОГО *ANTHRISCUS SYLVESTRIS* (L.) HOFFM

© Я.П. Лебедев, Р.М. Баширова, Р.Г. Фархутдинов

Изучен состав гексанового экстракта высушенных корней купыря лесного *Anthriscus sylvestris*. Корни двухлетних растений были заготовлены в первой декаде мая, в фазу отрастания. Биологически активные соединения *A. sylvestris* экстрагировали в течение 2 суток при комнатной температуре метанолом, затем метанольную фракцию отделяли и далее проводили экстракцию сырья гексаном.

Экстракт исследовали методом газовой хроматографии, на газовом хроматографе Trace 1310 ГХ с масс-селективным детектором Thermo ISQ. В экстракте идентифицированы латифолон, апиол, жирные кислоты, фалькаринон, антрисцин, ашантин. Дезоксиподофиллотоксин (антрисцин), ашантин и фалькаринон представляют интерес как противоопухолевые соединения.

Учитывая легкость введения *A. sylvestris* в культуру в условиях Южного Урала, целесообразно отрабатывать технологию получения препаративных форм обнаруженных соединений.

Ключевые слова: *Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm купырь лесной, антрисцин (деоксиподофиллотоксин), ашантин, латифолон, ингибитор топоизомеразы, фалькаринон (панаксинон).

Последние годы возросла потребность в лигнансодержащем сырье, необходимом для производства противоопухолевых и противовирусных препаратов для лечения лимфомы, острого миелолейкоза, а также саркомы Капоши, ассоциированной с ВИЧ-инфекцией [1]. Особый интерес представляют арилтетралиновые лигнаны *Podophyllum peltatum* [2], сырье которого дефицитно. Как альтернативный источник лигнанов рассматривается купырь лесной *Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm – представитель семейства *Apiaceae* [3, 4].

Купырь применяется в народной медицине многих стран [5, 6]. Листья добавляют в салаты, корни используют в качестве специи с гвоздичным ароматом [7]. Эфирное масло из *A. sylvestris* используют для ароматизации пищевых продуктов, напитков и парфюмерных изделий. В народной медицине водные экстракты соцветий ис-

пользуют в качестве мочегонных и тонизирующих средств. Растение богато такими ароматическими соединениями, как п-кумол и эвгенол, содержит также стигмастерол [8].

Ведутся эксперименты по использованию корня купыря для лечения рака предстательной железы [9]. Препараты корней *A. sylvestris* используют в китайской и корейской медицине в терапии астмы, ларингита и как противоопухолевое, антиагрегантное, противовирусное средство [10].

Фармакологические эффекты *A. sylvestris* связывают как с наличием арилтетралиновых лигнанов - ингибиторов топоизомеразы, так и флавоноидов, производных лютеолина [4]. Ранее нами в метанольном экстракте корней *A. sylvestris* были идентифицированы антрисцин, ятеин и фалькаринон [11].

ЛЕБЕДЕВ Яков Петрович, Башкирский государственный университет, e-mail: yakoff_88@mail.ru
 БАШИРОВА Раиса Минниуловна – к.б.н., Башкирский государственный университет,
 e-mail: BashirovaRM@mail.ru
 ФАРХУТДИНОВ Рашид Габдулхаевич – д.б.н., Башкирский государственный университет,
 e-mail: frg2@mail.ru

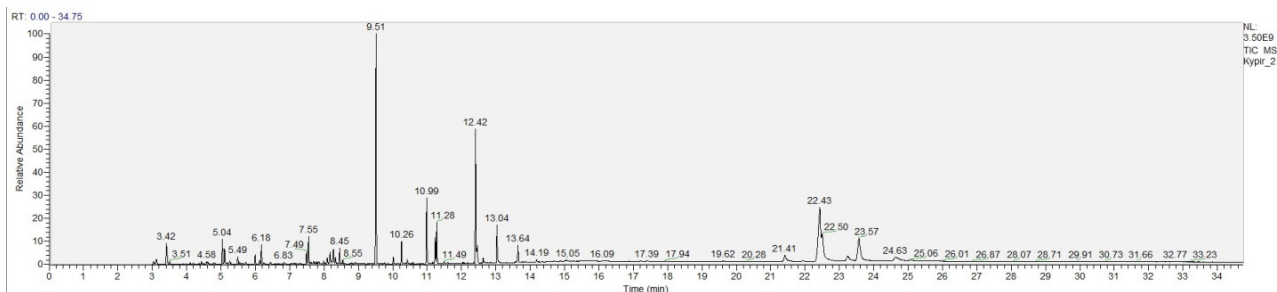


Рис. 1. Хроматограмма гексанового экстракта корней *Anthriscus sylvestris*

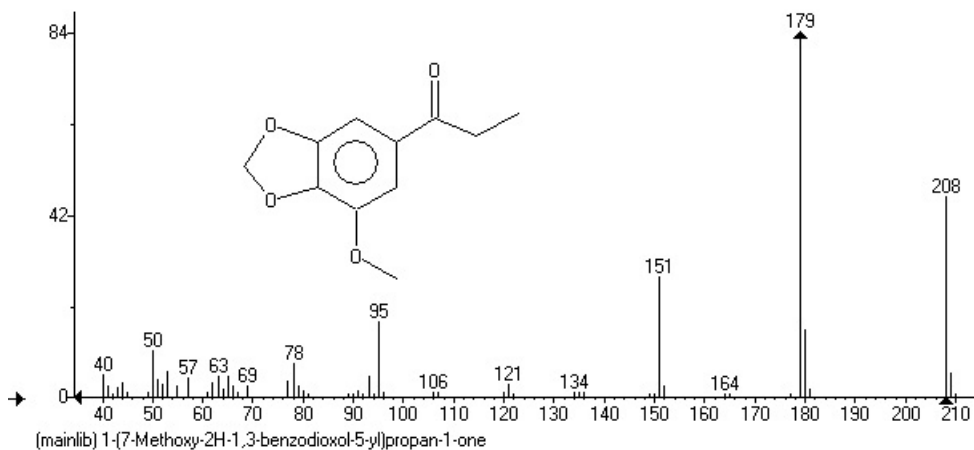


Рис. 2. Масс-спектр латифолона (крокатона)

Поскольку максимальное содержание лигнанов (антрисцина, ятеина, ангелоил подофиллотоксина) в корнях купыря наблюдается ранней весной: [12], нами изучен состав гексанового экстракта корней *A. sylvestris*, заготовленных в фазе отрастания. Образцы для анализа отобраны в Кармаскалинском районе республики Башкортостан.

Высушенные корни размалывали и экстрагировали в течение 2 суток при комнатной температуре метанолом, затем метанольную фракцию отделяли и далее проводили экстракцию сырья гексаном. Соотношение сырье-экстрагент (1:10).

Полученный экстракт исследовали методом газовой хроматографии, на газовом хроматографе Trace 1310 GX с масс-селективным детектором Thermo ISQ. Условия анализа приведены [11].

Результаты исследований. Хроматограмма экстракта корней купыря приведена на рис.1.

В гексановом экстракте идентифицированы латифолон (рис. 2), апиол, жирные кислоты, фалькаринон, антрисцин, ашантин, γ -ситостерол.

Латифолон (s.крокатон) характерен для растений семейства Apiaceae (гладыша *Laserpitium latifolium* L. 1, лазурника *Laser trilobum* (L.) BORKH. ex G.GAERTN., *Thapsia garganica* L., *Ferula heuffelii* Griseb. ex Neuffel).

Из идентифицированных соединений наибольший практический интерес представляют два лигнановых соединения (антрисцин и ашантин) и полиацетиленовое соединение (фалькаринон), обладающие противоопухолевой активностью.

Антрисцин (D-PTOX (дезоксиподофиллотоксин s. гернандин) содержится также в таких растениях, как *Bridelia scleroneura* (семейство Phyllanthaceae), *Hernandia peltata* Meisn (семейство Hernandiaceae).

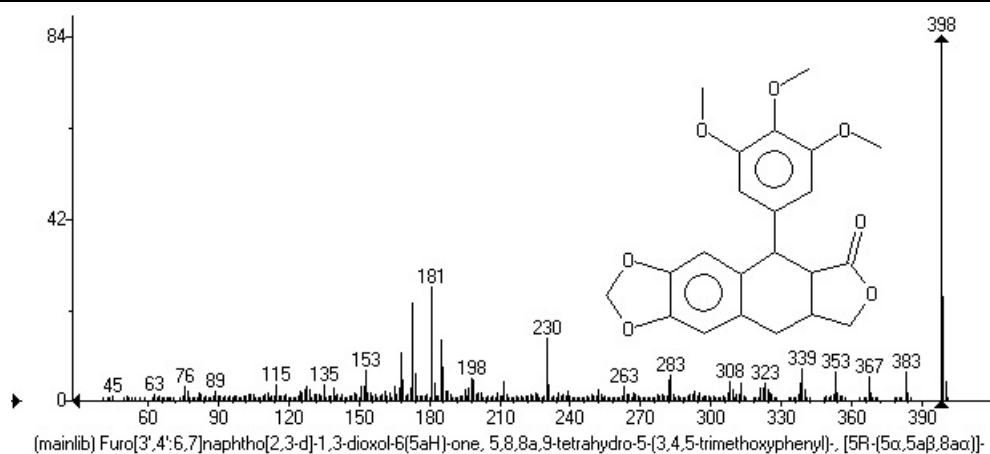


Рис. 3. Масс-спектр антрисцина

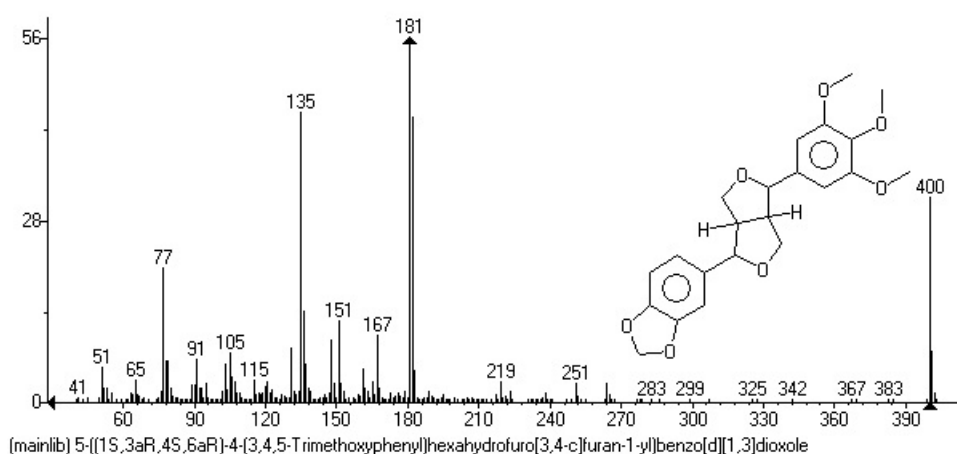


Рис. 4. Масс-спектр ашантина

Антрисцин вызывает некроз клеток опухолей легких линии NCI-H322 [13]. D-PTOX ингибирует рост клеток глиобластомы U-87 MG и SF126 в наномолярных диапазонах [14]. Показана эффективность лигнанов в подавлении ангиогенных каскадов при развитии злокачественных опухолевых процессов. Жаропонижающее и обезболивающее действие экстрактов купыря связывают со способностью D-PTOX блокировать активность циклооксигеназы-2, катализирующей первый этап синтеза простагландинов в цикле арахидоновой кислоты и 5-липоксигеназы, тормозящей синтез лейкотриенов ЛТВ4-ЛТЕ4. Такого рода соединения используют при лечении больных бронхиальной астмой.

Ашантин характерен для бутонов *Magnolia biondii* Ralp. и *Magnolia stellata*. В экстракте

корней купыря лесного *A. sylvestris* обнаружен впервые.

Ашантин представляет интерес с фармакологической точки зрения как антагонист фактора активации тромбоцитов, и, как соединение, подавляющее трансформацию неопластических клеток, вызванных эпидермальным фактором роста [15].

Обсуждение результатов. Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о наличии в корне купыря противоопухолевых соединений, среди которых особенно значимы лигнаны. Впервые из корней купыря выделен неолигнан – ашантин, представляющий интерес как потенциальное противоопухолевое и антиагрегантное соединение.

Ранее нами проводилось определение состава соединений, содержащихся в метанольных экстрактах корней купыря. Ашантин не был обнаружен. Видимо, гексан более эффективен как экстрагент. На зависимость результатов определения лигнанов от степени гидрофильности экстрагента указывают Айрес и Лойке [16].

Учитывая легкость введения купыря в культуру, целесообразно обрабатывать технологию получения препаративных форм обнаруженных соединений.

Агротехника выращивания *A. sylvestris* не столь затратна как выращивание *P. hexandrum*. Как рудеральное растение он легко вводится в культуру. Растение скороплодно и позволяет получать значительную вегетативную массу уже в первый год культивирования.

ЛИТЕРАТУРА

- Gordaliza M., Garcia P., Del Corral J.M. et al. Podophyllotoxin: distribution, sources, applications and new cytotoxic derivatives // *Toxicon*. 2004; 44:p.441–459.
- Жигунов О.Ю., Лебедев Я.П., Баширова Р.М. Фенольные соединения корней *Podophyllum peltatum* L., интродуцированного в республике Башкортостан // Фенольные соединения: свойства, активность, инновации: Сб. науч. статей по материалам X Межд. симпозиума «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты», Москва, 14-19 мая 2018 г. М.: ИФР РАН, – 2018.с.269-273
- Баширова Р.М., Мустафин А.Г. Потенциальные источники подофиллотоксина в Башкирской флоре // *Известия УНЦ РАН*, 2016, №2. С.69-82
- Velescu B.S., Anuta V., Nitulescu et al. Pharmaceutical assesment of Romanian crops of *Anthriscus sylvestris* (Apiaceae). // *Farmacia*, 2017, Vol. 65, 6. P. 824-831
- Robertsdottir A. R. Cow Parsley *Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm. // *Icelandic Herbs and Their Medicinal Uses*. North Atlantic Books (US).2016.p.290
- Edible Apiaceae: Dill, Cumin, Parsley, Celery, Anise, Chervil, Fennel, Caraway, Carrot, Asafoetida, Coriander, Centella asiatica, Parsnip // Source Wikipedia, Books Llc General Books, 2010, p.168
- Milovanović M., Banjac N., Radović B. V. Functional Food: rare herbs, seeds and vegetable oils as sources of flavors and phytosterols. Review article // *J. of Agricultural Sciences UDC*: Vol. 54. No 1, 2009 P. 80-93
- Milovanovic M., Picuric J., K., Vucelic R. B., et al. Antioxidant effects of *Anthriscus sylvestris* in lard // *J. Am.Oil. Chem. Soc.*1996,73(6), pp.773-776.
- Cho Hyo-Jin; Yu Sun-Nyoung; Kim Kwang-Youn et al. Screening and Purification of an Anti-Prostate Cancer Compound, Deoxypodophyllotoxin, from *Anthriscus sylvestris* Hoffm // *J. of Life Science*. 2009. Vol.19, № 1, p.9-14
- Jeong G. S., O. K. Kwon, B. Y. Park, et al. Lignans and coumarins from the roots of *Anthriscus sylvestris* and their increase of caspase-3 activity in HL-60 cells // *Biol. Pharm. Bull.* 2007. 30, pp.1340-1343.
- Лебедев Я.П., Баширова Р.М., Ибрагимов Р.И., Мустафин А.Г. Противоопухолевые соединения купыря лесного (*Anthriscus sylvestris* Hoffm) // *Мед. вестник Башкортостана*. 2016. Т. 11, № 5(65), с.77-80
- Koulman, A.; Hendrawati, O.; Batterman, S. et. al. The Seasonal Variations of Lignan Profiles in *Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm. *Planta Med.* 2007,73, P. 112, doi:10.1055/s-2007-986894
- Wu M., Jiang Zhenzhou, Huaqin D. et al. Deoxypodophyllotoxin triggers necroptosis in human non-small cell lung cancer NCI-H460 cells // *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2013. Vol. 67, N 8, pp. 701-706
- Guerram M., Jiang Z.Z., Sun L. et al. Antineoplastic effects of deoxypodophyllotoxin, a potent cytotoxic agent of plant origin, on glioblastoma U-87 MG and SF126 cells // *Pharmacol Rep.* 2015, Vol. 67.N2. pp. 245-252
- Lee C.J., Jang J.H., Lee J.Y., et al. Aschantin targeting on the kinase domain of mammalian target of rapamycin suppresses epidermal growth factor-induced neoplastic cell transformation // *Carcinogenesis*. 2015 36(10):p.1223-1234
- Ayres D.C., Loike J.O. Lignans: Chemical, Biological and Clinical Properties (Chemistry and Pharmacology of Natural Products). Cambridge University Press. 2008. P. 101-102.



**LIPOPHYLIC COMPOUNDS OF PARSLEY CHERVIL
ANTHRISCUS SYLVESTRIS (L.) HOFFM. ROOTS**

© Ya.P. Lebedev, R.M. Bashirova, R.G. Farkhutdinov

Bashkir State University,
32, ulitsa Zaki Validi, 450076, Ufa, Russian Federation

The composition of the hexane extract of the dried roots of the fodder of cow parsley chervil *Anthriscus sylvestris* forest was studied. The roots of biennial plants were harvested in the first decade of May, during the phase of growth. Biologically active compounds were extracted for 2 days at room temperature with methanol, then the methanol fraction was separated and further extraction of the raw material with hexane was carried out.

The extract was examined by gas chromatography, GC Trace 1310 mass selective detector Thermo ISQ. The extract of cow parsley cow parsley found a number of anticancer and antiviral compounds: latifolone, deoxypodophyllotoxin (anthriscin), aschantin and falcarinon (panaxynone).

Given the ease of administration *A. sylvestris* in culture in the conditions of Southern Urals, it is advisable to develop the technology of formulation of the compounds detected.

Key words: *Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm, wild chervil; anthriscin (deoxypodophyllotoxin); aschantin, latifolone, topoisomerase inhibitor, falcarinon (panaxinone).

УДК 59.088

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-4-3-80-85

IDENTIFICATION AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF SOUTHEASTERN USA EARTHWORM SPECIES USING 16S rDNA AND COI SEQUENCES

© Yu. Leontieva, A. Nalian, G. Damoff, A. Martynova-Van Kley

Earthworms are important soil inhabitants beneficially influencing soil structure, composition, and properties. *Diplocardia* is the native North American earthworm genus with the greatest number of species, widely distributed through the southern states of the USA. However, this genus has received little phylogenetic attention and a genetic library has not been developed for it. Currently, the most reliable method for identification of *Diplocardia* species is through tedious exploration of internal anatomy under a light microscope. This method requires training and experience and it is not able to determine juvenile specimens. Because the number of diagnostic features is small, and these are highly variable, morphological determination of *Diplocardia* is not always consistent or reliable. Molecular markers may provide more reliable characters for distinguishing taxa and easier and more reliable *Diplocardia* species determination.

This research focusses on resolving phylogenetic relationships among the species of the genus *Diplocardia*, using sequences of 16S ribosomal DNA and cytochrome *c* oxidase subunit I (COI). Sequence data from 16S rDNA were analyzed separately and in combination with morphological characters (33 total for each specimen). Distance based (neighbor joining) and character based (Bayesian) approaches were used to resolve phylogenetic relationships among *Diplocardia* species. We found that COI had a low signal for solving phylogenetic relationships within *Diplocardia* species but 16S rDNA was able to resolve most phylogenetic relationships for *Diplocardia* species and allowed positive identification of the sampled *Diplocardia* species.

Key words: *Diplocardia*, molecular markers, phylogenetic relationships among the species.

Introduction.

Soil invertebrates greatly influence the physical, chemical, and biological characteristics of soil, and in most temperate terrestrial ecosystems earthworms make the greatest contribution. Following the classification of Jamieson (1988), earthworms (phylum Annelida) belong to Subclass Oligochaeta, with over 5355 described species distributed worldwide except in regions of extreme climate, such as deserts or the arctic. Most oligochaetes are natural inhabitants of forests, grasslands and agricultural ecosystems, but some are semi-aquatic. They are bilaterally symmetrical, externally (and internally) segmented, coelomate, hermaphrodite invertebrates

with a closed vascular system and cuticular respiration [1, 2].

Earthworm genera native to North America are organized into the following taxa: *Komarekinona* (family Komarekionidae), *Lutodrilus* (family Lutodrilidae), *Sparganophilus* (family Sparganophilidae), *Diplocardia* (family Acanthodrilidae) along with *Bimastos* and *Eisenoides* (family Lumbricidae). The present research focused on the genus *Diplocardia*, the most species-rich native North American earthworm genus *Diplocardia*, with over 45 described species. The taxonomy of the family *Acanthodrilidae* is recognized as the most controversial in comparison to other Oligochaeta families [1].

LEONTIEVA Yulia Aleksandrovna, Stephen F. Austin State University, e-mail: yulia.leon@gmail.com

NALIAN Armen Georgievich – Ph.D., Stephen F. Austin State University, e-mail: armen.nalian@gmail.com

DAMOFF George A. – Ph.D., Stephen F. Austin State University, e-mail: gdamoff@gmail.com

MARTYNOVA-VAN KLEY Alexandra Valentinovna – Ph.D., Stephen F. Austin State University, e-mail: avankley@sfasu.edu

With the increase in intercontinental travel and commerce, anthropochorous earthworms have been widely disseminated with foreign plants, by animals and as bait for fishermen. Numerous publications have chronicled the invasion of exotic earthworm species into North America [1, 4]. Exotic invasive earthworm species remain in a high state of flux in North America and most other industrialized areas of the world. There are only a few places where earthworm invasions are less likely such as deserts and soils concealed under permanent ice. Exotic (also known as peregrine, non-native) species often affect soil characteristics differently from native species. Non-native invasive earthworm species may change the structure of microbial communities, decrease microbial biomass, and transmit plant and animal pathogens. When exotic earthworms initially invade a soil already inhabited by native species, they may coexist or immediately dominate, or, over time some or all of the native populations may recover and become dominant [1].

Identification of Oligochaeta species is challenging and not always successful [1-3]. It is often impossible to identify even the family of a specimen by observing external features. Identification of *Diplocardia* species is particularly difficult. Presently, identification of *Diplocardia* species is only by morphological methods that require significant skill and experience and are unreliable for juvenile and partial specimens. It is not possible to identify species using only external features; specimens must be dissected and examined microscopically. Since many of *Diplocardia* species are 2-3 mm in diameter, some even less than 1 mm there are "inherent difficulties involved in identifying diplocardian species" [3].

Several investigations have used molecular data to reveal phylogenetic relationships between taxa including classes and species of phylum Annelida. To determine taxonomic closeness, different molecular markers were used: 16S rDNA, 18S rDNA, and the amino acid sequence of elongation factor-1 α (EF-1 α). Marker 16S rDNA is more variable compare to 18S rDNA and may be used to examine population-level differences. Marker EF-1 α is considered to have a slow evolutionary rate and was used by some researchers to determine relationships between distantly-related taxa, for example,

Vestimentifera (tube worms) and phylum Annelida. Elucidation of the relationships within some Oligochaeta taxa was based on the nucleotide sequence of the mitochondrial gene COI. Several phylogenetic analyses of Oligochaeta taxa included a combination of several molecular markers (for instance nuclear 18S, 28S rDNA, mitochondrial 12S rDNA, and COI) and morphological features [10].

Materials and methods. *Field sampling and preservation:* Earthworm specimens were obtained by hand-sorting *in situ* from soils collected in the Southeast USA, in the states of Alabama, Florida, Louisiana, Mississippi, and Texas. Tissue samples for DNA extraction were clipped from the posterior segments of living specimens and directly preserved in 95% ethanol. The remaining part of each specimen was fixed in 4% formalin and identified microscopically based on morphological characteristics.

DNA extraction: Earthworm specimens preserved in 95% ethanol were longitudinally dissected along the intestine. The intestine was rinsed with distilled water to remove soil particles. Muscle tissue of the clean worm samples was reduced to small (2-3 mm) fragments. Genomic DNA was isolated according to the manufacturer's instructions from 25 mg tissue samples using the DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Inc.). The purified DNA was collected (200ul, ~ 15ng/ul) and stored at -70°C.

DNA amplification: For PCR amplification of the 16S rDNA, the forward primer was 5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3' and the reverse was 5'-CCGGTYTGAATCCAGATCAYGT-3'. Amplification mixtures for the gene fragments had 12.5 μ l of JumpStart™ Taq ReadyMix™ (Sigma-Aldrich), 1 μ l of each 10 μ M primer (forward and reverse), 1 μ l of DNA template, and 8.5 μ l of sterile distilled water (total volume is 25 μ l). The expected size of the amplified DNA fragment was 550 bp. The amplification reactions consisted of 1 cycle of initial denaturation at 95°C for 4 min, 30 cycles of denaturation at 95°C for 1 min, annealing at 48 °C for 1 min, elongation at 72°C for 1 min. A final elongation cycle at 72°C for 5 min was followed by the end of the process at 4°C. The PCR products were checked by 1% Agarose Gel Electrophoresis (at 90V for 45 min.).

The forward PCR primer for the *COI* gene was 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3' and the reverse was 5'-GGTCAACAAATCA TAAAGATATTGG-3' [7]. The expected size of amplified DNA fragments was 700 bp. Amplification mixtures and PCR conditions were the same as for 16S rDNA amplification.

Sequencing: Automated fluorescent DNA sequencing of the amplified 16S rDNA and COI fragments was performed by Amplicon Express Inc. (Washington State, 99163). All samples were sequenced in two directions.

Sequence assembling and Gene Bank submission: The sequences were assembled, evaluated, and edited in Staden Package programs (Pregap4 and Gap4). The origin of the assembled and edited sequences was verified by Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), and the resulting sequences were submitted to the Gen Bank database at NCBI by Sequin software. The DNA sequences of the COI gene were translated to protein sequences with the EMBOSS program [8] with the invertebrate mitochondrial code and verified by BLAST.

Removing closely related sequences: To simplify the analysis the resulting phylogenetic trees, the 100% identical and 99% similar sequences were grouped in separate files. The sequences of *Diplocardia*, submitted to NCBI, were obtained from the database in FASTA format. Using BLASTclust (BLAST software package) high-similarity sequences from the database (99% threshold similarity and 90% threshold of length) sequences from the file were grouped together. Only one sequence from each group was chosen for the further analysis. The number of the sequences in each group was marked in the brackets after each sequence (Figures 1, 2).

Phylogenetic Analysis: To construct a meaningful phylogenetic tree, an appropriate nucleotide substitution model was chosen prior to analysis. MODELTEST was used to select the model which best fit the data. The program evaluated 56 models by completing two tests: hierarchical likelihood ratio tests (hLRTs) and Akaike information criterion (AIC). Both tests showed that the General Time Reversible model with gamma parameter (GTR+I+G) best fit 16S rDNA data, and that the transversal model (TVM+I+G) best fit COI nucleotide data.

The sequences submitted to NCBI were used for the phylogenetic analysis. Multiple sequence alignment was performed by the ClustalW and Muscle programs [9]. Multiple sequence alignment of 16S rDNA was done in Muscle with a profile of the published alignment of 16S rDNA of Megascolecidae, corrected with the accepted secondary structure of 16S rDNA [10]. After aligning, the profile was removed, so the alignment of sequences of interest was received. The ambiguous ends of the alignment were removed. The alignment was saved in FASTA and NEXUS formats for further analysis.

Phylogenetic trees with 16S rDNA and COI gene were calculated in MrBayes. Bayesian analyses were carried out using 475 bp sequences (including gaps) of the 16S rDNA of the chosen 24 in-group sequences using *Diplocardia* and four out-group sequences using *Amyntas diffringens*. Trees were viewed and analyzed in TreeView.

Results and discussion. A total of 86 samples of earthworms were collected from Texas, Alabama, Mississippi, and Florida. All specimens were identified to genus and species by G. A. Damoff using locally relevant key [2, 3]. DNA was successfully extracted from most of the specimens. More than 160 DNA samples of 16S rDNA and COI gene were sequenced, assembled, edited and submitted to GenBank.

Analysis of COI gene sequences translated to protein sequences did not provide meaningful phylogenetic trees because of high similarities between the species and the lack of phylogenetic information. Only 16S rDNA region and COI gene sequences were used for further analysis.

In order to determine phylogenetic relationships between taxa within *Diplocardia*, *Amyntas diffringens* was chosen as an outgroup.

A phylogenetic tree of 16S rDNA (Figure 1) showed five main clades not including the outgroup: first, *D. pettiboneae*, second, *D. komareki*, third, *D. eiseni*, and an undescribed *Diplocardia* species, fourth, 5 representatives of *D. caroliniana*, and fifth, a clade comprising *D. longiseta*, *D. farmvilensis*, *D. rugosa*, *D. smithi*, *D. ornata*, *D. sylvicola*, *D. conoyeri*, *D. fuscata*, *D. meansi*, *D. hulberti* and a juvenile *Diplocardia* specimen for which we were unable to obtain a morphological identification. The

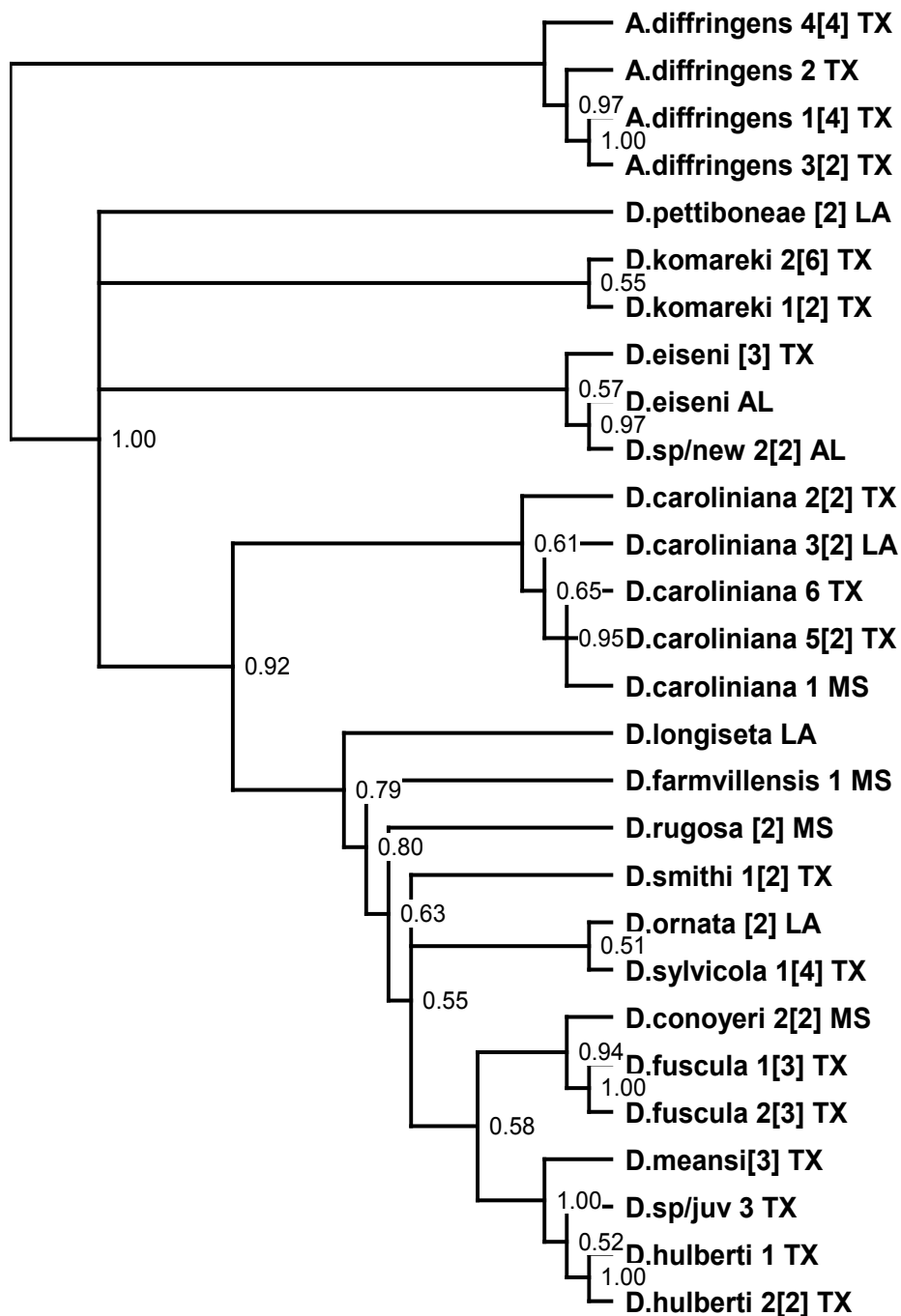


Fig. 1. Bayesian inference of 16S rDNA with the time reversible substitution model. *A. diffringens* was the outgroup. The reliability of the tree's branches is estimated by the probabilities values (up to 1.00). Number of generations was 2000000. The numbers in brackets are the numbers of the identical specimens; the numbers with no brackets are the order numbers of the specimen. Two-letter abbreviations refer to the US state of origin for the samples

first three clades (*D. pettiboneae*, *D. komareki*, *D. eiseni*) were distinct from other species in both morphology and 16S rDNA sequences. In fact, on a neighbor-joining tree (data not shown) they formed one separate clade. All *D. caroliniana* species collected from different states formed a separate clade, which means that their 16S rDNA is distinguishable from others. The

neighbor-joining tree (not shown) had the same topology as the 16S rDNA tree in Figure 1.

Representatives of the same species were not always grouped in the same clade in the COI gene tree (Figure 2) like they were for 16S rDNA tree and several nodes were shown as polytomies. The reason is that on the multiple alignment of nucleotide

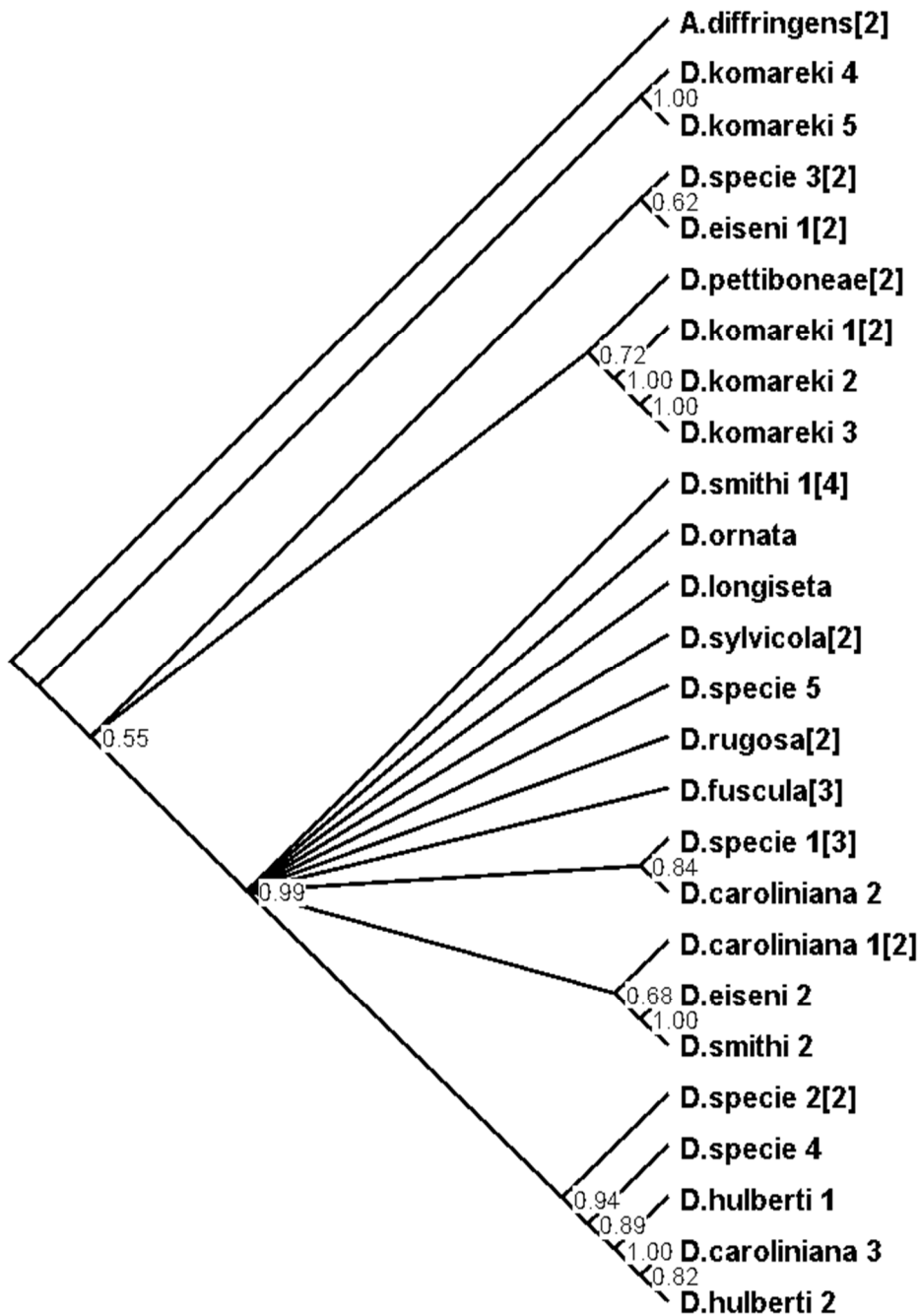


Fig. 2. Bayesian inference of COI gene of *Diplocardia*. *A. diffringens* was the outgroup. The reliability of the tree's branches is estimated by the probabilities values (up to 1.00). Number of generations was 1000000. The numbers in brackets are the numbers of the identical specimens; the numbers with no brackets are the order numbers of the specimen

COI sequences (not shown) only each third nucleotide position of the DNA sequences was different, and only these positions were taken into account to calculate the tree. This is the main reason why the tree based on the COI gene does not provide sufficient information about the relationships among *Diplocardia* species. It is possible to conclude that

the COI gene is too conservative to reflect phylogeny at the level of species for these taxa.

Accordingly, 16S rDNA may be used as a marker for identifying *Diplocardia* species, while the COI gene might be useful to solve the phylogenetic problems at higher taxonomic levels. Further investigation of other possible molecular markers is needed.

REFERENCES

1. Edwards, C. A. & Bohlen, P. J. Biology and ecology of earthworms. Chapman & Hall, London (1996).
2. Reynolds, J.W. The earthworms of Tennessee (Oligochaeta). IV. Megascolecidae with notes on distribution and a key to the species in the state. *Megadrilogica* 3(7):117–129 (1978).
3. Gates, G. E. More on the earthworm genus *Diplocardia*. *Megadrilogica* 3, 1-48 (1977).
4. Bohlen, P., Scheu, S., Hale, C., McLean, M., Migge, S., Groffman, P. & Parkinson, D. Non-native invasive earthworms as agents of change in northern temperate forests. *Frontiers in Ecology and the Environment* 2, 427-435 (2004).
5. Saitou, N. & Nei, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4, 406-425 (1987).
6. Felsenstein, J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. (2005).
7. Pop, A. A., Wink, M. & Pop, V. V. Use of 18S, 16S rDNA and cytochrome c oxidase sequences in earthworm taxonomy (Oligochaeta, Lumbricidae): The 7th international symposium on earthworm ecology. Cardiff, Wales. 2002. *Pedobiologia* 47, 428-433 (2003).
8. Rice, P., Longden, I. & Bleasby, A. EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in Genetics*. 16, 276-277 (2000).
9. Edgar, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32, 1792-1797 (2004).
10. Jamieson B. G. M., Tillier S., Tillier A., Justine J.-L., Ling E., James S., McDonald K. & Hugall A. F. Phylogeny of the Megascolecidae and Crassicitellata (Annelida, Oligochaeta): combined versus partitioned analysis using nuclear (28S) and mitochondrial (12S, 16S) rDNA. *Zoosystema* 24 (4): 707-734. (2002).



УДК 577:663.551.6

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-4-3-86-93

**ПОЛУЧЕНИЕ ПРОТИВОГРИБНОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ БАКТЕРИЙ
PSEUDOMONAS AUREOFACIENS ПРИ РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ПОСЛЕСПИРТОВОЙ БАРДЕ**

© А.А. Лукаткин, А.С. Лукаткин

Утилизация основного отхода производства этилового спирта из зернового сырья – послеспиртовой барды – является серьезной экологической и экономической проблемой. Решение этой проблемы возможно посредством выращивания бактерий (в т. ч. относящихся к роду *Pseudomonas*) на среде, в основе своей имеющей жидкую фракцию послеспиртовой барды (ЖФПСБ), с последующим использованием культуральной жидкости для обработки растений с целью защиты от фитопатогенов. Целью работы было изучение условий культивирования бактерий *Pseudomonas aureofaciens* на жидкой фракции послеспиртовой барды, способствующих получению максимальной биомассы в условиях лабораторного эксперимента. В работе исследовали накопление биомассы бактериями *Pseudomonas aureofaciens*, вносимой на среду, содержащую ЖФПСБ (ОАО «Мордовспирт»). Культивирование проводили в статических условиях и на термостатируемой качалке при температуре 28 °С в течение 27 ч. В ходе эксперимента варьировали начальную величину рН среды (от 4,3 до 8,0), концентрации вносимых солей (от 0,5 до 1,5 г/л K_2HPO_4 и от 0,1 до 0,5 г/л MgSO_4) и скорость перемешивания среды (от 100 до 220 об/мин). Выявлено, что наибольшая биомасса *Pseudomonas aureofaciens* формировалась через 19 – 23 ч (в зависимости от варьирования других параметров культивирования). Для максимального роста и образования биомассы бактериями наилучшей является среда с начальным рН 7,0 и с добавлением 1,5 г/л K_2HPO_4 . Показано, что для максимального образования биомассы бактерий необходимо создание динамических условий. Оптимальная скорость перемешивания, вне зависимости от рН культуральной среды, составила 150 об/мин. В варианте с рН 7,0 и скоростью перемешивания 150 об/мин наблюдался максимальный выход биомассы при уменьшении длительности культивирования до 19 ч, что может способствовать экономии энергозатрат. Полученную культуральную жидкость можно использовать для получения биопрепарата с высокой антифунгальной активностью, которым в дальнейшем можно обрабатывать почву с целью увеличения полезной микрофлоры, а также растения и семена – для защиты от фитопатогенных грибов.

Ключевые слова: *Pseudomonas aureofaciens*, культивирование, биомасса, послеспиртовая барда, рН среды, минеральные соли, скорость перемешивания.

В настоящее время острой экологической проблемой является утилизация отходов и побочных продуктов, образующихся при производстве этилового спирта из зернового сырья – послеспиртовой барды, углекислоты, отработанных дрожжей, эфиральдегидной фракции и сивушных масел. Выход барды, основного отхода спиртовой промышленности, составляет

0,12 м³ на 1 дал выработанного спирта. Химический состав барды, представляющей водную суспензию влажностью 93–95%, зависит от вида и качества исходного сырья и принятой технологии спирта, поэтому изменяется в значительных пределах. Она утилизируется с большими энергетическими затратами и представляет опасность для окружающей среды вследствие

ЛУКАТКИН Андрей Александрович – к.б.н., Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарева, e-mail: ussr1960@yandex.ru

ЛУКАТКИН Александр Степанович – д.б.н., Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарева, e-mail: aslukatkin@yandex.ru

низкого значения рН (4,3 и ниже), высокого содержания нуклеиновых кислот [1]. Сейчас известны технологии утилизации послеспиртовой барды с получением кормовых дрожжей, упаренной обессоленной барды на корм скоту, кормового витамина В₁₂, глутаминовой кислоты, глутамата натрия, глутамата калия, бетаина нейтрального, глицерина [2]. Однако эти технологии экономически затратны и касаются в основном твердой фракции барды. Основную часть барды составляет жидкая фракция, для утилизации которой требуются большие затраты. Поэтому в настоящее время остается актуальной разработка технологий, позволяющих кардинальным способом решить проблему утилизации жидкой фракции послеспиртовой барды (ЖФПСБ).

Одним из таких технологических подходов могло бы стать выращивание бактерий на среде, в основе своей имеющей ЖФПСБ, с последующим использованием культуральной жидкости для внесения на поля орошения, либо обработки растений с целью защиты от фитопатогенов. Бактерии рода *Pseudomonas* – интересная группа микроорганизмов с позиции биологического контроля почвенных фитопатогенов [3]. Они обладают рядом полезных для растений свойств, способствуют улучшению роста и развития растений, продуцируют антифунгальные метаболиты или гидролитические ферменты, разрушающие клеточные стенки грибов [4].

В связи с этим целью работы явилось изучение условий культивирования бактерий *Pseudomonas aureofaciens* на жидкой фракции послеспиртовой барды, способствующих получению максимальной биомассы в условиях лабораторного эксперимента.

Материалы и методы исследования. Исходным материалом служили бактерии *Pseudomonas aureofaciens*, выращиваемые на скошенном питательном агаре следующего состава, г/л: глюкоза – 5; пептон – 5; дрожжевой экстракт – 3; агар – 18, рН 7.0.

Посевным материалом служила суточная культура бактерий *Ps. aureofaciens*, выращенная на среде следующего состава, г/л: глюкоза – 20;

пептон – 5; дрожжевой экстракт – 10; рН 7.0. Полученным инокулятом в концентрации 10% засеивали колбы Эрленмейера объемом 250 мл со 100 мл ЖФПСБ, произведенной в ОАО «Мордовспирт». Состав барды, %: вода – 93, сухие вещества – 7 (в т.ч. растворимые сухие вещества – 2.7, углеводы – 0.4, пентозаны – 0.4, гемицеллюлозы – 1.7, целлюлоза – 0.7, азот – 0.2, зола – 0.6, жир – 0.5).

Культивирование проводили в статических условиях и на термостатируемой качалке при 100–220 об/мин в течение 27 ч при температуре 28 °С. Отбор проб проводили через 2 ч культивирования и затем каждые 2 ч, начиная с 17 ч культивирования бактерий. В ходе культивирования определяли сухую массу бактерий весовым методом.

В первой серии опытов определяли влияние начального рН субстрата на образование бактериальной биомассы. Культуру бактерий выращивали в статическом режиме на ЖФПСБ в колбах Эрленмейера. Значения рН составляли 4.3; 5.0; 6.0; 6.5; 7.0; 7.5; 8.0 единиц. Доведение рН до требуемой величины осуществляли концентрированным водным раствором аммиака.

Во второй серии опытов определяли влияние скорости перемешивания среды на рост культуры клеток *Ps. aureofaciens*. Культивирование осуществляли на ЖФПСБ с начальными значениями рН 4.3 и 7.0 в статических условиях и на термостатируемой качалке при 100, 150, 180, 220 об/мин.

В третьей серии опытов определяли влияние добавок минеральных солей к барде для улучшения роста *Pseudomonas aureofaciens*. Выращивание культуры проводили в статических условиях в колбах Эрленмейера объемом 250 мл со 100 мл ЖФПСБ (рН 4.3 и 7.0) с добавлением 0.5, 1.0, 1.5 г/л КН₂РО₄ и 0.1, 0.3, 0.5 г/л MgSO₄.

Все результаты получены не менее чем в двух последовательных опытах, каждый из которых состоял из пяти повторностей. Результаты обрабатывали статически по общепринятым в биологии методам. Сравнение вариантов опытов проводили при 5% уровне значимости по t–критерию Стьюдента. В таблицах представлены средние значения из всех опытов с их стандартными ошибками.

Динамика биомассы бактерий *Pseudomonas* при культивировании на ЖФПСБ с различным начальным значением рН, г/л

Время культивирования, часы	рН барды, ед. рН						
	4,3	5,0	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
0	1,50±0,10	1,50±0,10	1,50±0,10	1,50±0,10	1,50±0,10	1,50±0,10	1,50±0,10
2	4,20±0,13	4,12±0,13	4,16±0,13	6,40±0,19	6,46±0,19	5,85±0,17	5,76±0,17
17	4,20±0,13	4,70±0,14	4,44±0,13	7,82±0,24	7,62±0,23	6,14±0,18	5,99±0,18
19	5,00±0,14	5,14±0,15	6,86±0,21	8,94±0,27	7,70±0,23	6,80±0,21	7,01±0,20
21	6,06±0,18	8,60±0,27	8,00±0,24	12,88±0,39	15,38±0,46	12,34±0,39	11,65±0,35
23	6,12±0,18	7,36±0,22	8,10±0,24	11,62±0,35	15,74±0,45	12,56±0,39	12,03±0,39
25	4,68±0,14	6,58±0,19	8,60±0,26	6,86±0,21	8,60±0,26	9,11±0,28	10,11±0,30
27	2,68±0,10	2,26±0,10	2,72±0,10	3,46±0,10	5,86±0,17	6,45±0,18	6,34±0,19

Результаты и обсуждение. Рост бактерий в значительной степени зависит от рН субстрата, поэтому на первом этапе проводили подбор оптимального начального рН для образования биомассы *Ps. aureofaciens*, варьируя его значение от 4.3 (рН нативной послеспиртовой барды) до 8.0 (табл.1). В динамике культивирования бактерий на ЖФПСБ наблюдали двухфазную реакцию – быстрое увеличение биомассы на первой стадии культивирования и резкое её падение во второй половине культивирования. При этом сроки наступления пикового значения биомассы *Ps. aureofaciens* варьировали в зависимости от рН. Так, при культивировании бактерий на барде с начальным рН 4.3, 7.0, 7.5 и 8.0 пик образования биомассы отмечен через 23 ч роста; при рН 5.0 и 6.5 – через 21 ч, а при рН 6.0 – спустя 25 ч.

Максимальная биомасса (в 10,6 раз превышающая начальное значение биомассы клеток) образовалась на среде с рН 7.0. Смещение рН среды в кислую сторону привело к прогрессирующему уменьшению роста бактерий. При рН среды 6.5 уровень биомассы *Ps. aureofaciens* был на 17% меньше, чем при рН 7.0. Минимальные значения получены на среде с рН 4.3 (на 29% меньше, чем при культивировании бактерий на среде с начальным рН 5.0). При смеще-

нии рН в щелочную зону также отмечено снижение образуемой биомассы относительно нейтрального рН. Так, через 23 ч роста на среде с начальным рН 7.5 биомасса в 8,4 раза превысила начальное значение, но была на 21 % меньше, чем при рН 7.0. При рН среды 8.0 наблюдали снижение уровня биомассы по сравнению с предыдущей серией опыта: пик, отмеченный через 23 ч роста бактерии *Pseudomonas*, показал количество образуемой массы на 24% меньшее, чем при рН 7.0.

Во всех вариантах опыта отмечено максимальное увеличение биомассы к 21–23 ч роста бактерий, при дальнейшем культивировании наблюдалось снижение уровня, что могло происходить вследствие исчерпания источников питания, а также из-за недостатка кислорода при увеличении плотности бактериальной взвеси.

Таким образом, максимальный рост *Ps. aureofaciens* отмечен на ЖФПСБ с рН, доведенным до 7.0, т.е. это значение является оптимальным для данного вида бактерий. В то же время возможно выращивание культуры бактерий на немодифицированной барде, без введения дополнительных реагентов. Поэтому в последующих экспериментах использовали среду с двумя значениями исходного рН: близким к оптимальному (7.0) или рН нативной барды (4.3).

Динамика биомассы бактерий рода *Pseudomonas* при культивировании на ЖФПСБ с pH 4,3 и 7,0 в статических и динамических условиях, г/л

Время культивирования, часы	Динамические условия				Статические условия
	100 об/мин	150 об/мин	180 об/мин	220 об/мин	
Среда с pH 4,3					
0	1,50±0,10	1,50±0,10	1,50±0,10	1,50±0,10	1,50±0,10
2	3,08±0,10	11,72±0,40	2,50±0,02	4,10±0,10	4,20±0,13
17	3,86±0,10	13,16±0,40	6,02±0,20	5,00±0,10	4,20±0,13
19	4,58±0,10	13,88±0,40	7,31±0,20	4,96±0,10	5,00±0,14
21	7,04±0,40	13,90±0,40	8,25±0,20	4,94±0,10	6,05±0,18
23	9,08±0,50	14,82±0,40	10,35±0,50	6,12±0,20	6,12±0,18
25	8,08±0,40	13,28±0,40	7,08±0,20	5,90±0,10	4,68±0,14
27	7,16±0,40	5,78±0,20	6,08±0,20	4,70±0,10	2,68±0,10
Среда с pH 7,0					
0	1,50±0,10	1,50±0,10	1,50±0,10	1,50±0,10	1,50±0,10
2	2,80±0,10	9,90±0,50	3,10±0,10	5,64±0,20	6,46±0,19
17	3,50±0,10	11,78±0,60	9,52±0,30	9,62±0,50	7,62±0,23
19	7,10±0,20	15,00±0,80	12,28±0,40	13,28±0,50	7,70±0,23
21	7,02±0,20	12,10±0,60	12,00±0,40	12,30±0,50	15,38±0,46
23	4,24±0,10	6,36±0,30	11,50±0,30	11,30±0,40	15,74±0,45
25	4,06±0,10	4,48±0,20	10,86±0,30	10,36±0,40	8,60±0,26
27	4,00±0,10	3,78±0,10	8,60±0,40	8,26±0,30	5,86±0,17

Поскольку лимитирование роста бактерий на ЖФПСБ могло происходить из-за истощения запасов кислорода в среде, изучали влияние скорости перемешивания на рост *Ps. aureofaciens*. В этих опытах использовали четыре режима: 100, 150, 180 и 220 об/мин, сравнивая их с культивированием в статических условиях.

Выращивание бактерий на ЖФПСБ с pH 4,3 в динамических условиях показало пик образования биомассы, как и в статическом режиме, к 23 ч культивирования (табл. 2). При этом в большинстве вариантов с динамическим режимом выращивания наблюдали повышенный рост бактерий. Так, при 100 об/мин уровень микробной массы был на 33 % больше, чем при культивировании в статическом режиме. Максимальный выход биомассы наблюдали при

150 об/мин – в 2,4 раза больше, чем при культивировании в статических условиях. Дальнейшее увеличение скорости вращения колб несколько уменьшило прирост относительно 150 об/мин.

Таким образом, как видно из полученных данных, для максимального накопления биомассы *Ps. aureofaciens* при культивировании на ЖФПСБ с начальным pH 4,3 оптимальная скорость перемешивания составила 150 об/мин. Увеличение и снижение числа оборотов привело к снижению уровня биомассы, что может быть связано в первом случае с инактивацией чувствительных к окислению белков и образованием активированных форм кислорода, а во втором случае – с низкой растворимостью кислорода в среде [5].

Динамика содержания биомассы бактерий *Pseudomonas* при культивировании на ЖФПСБ с рН 4,3 и 7,0 с добавлением фосфорнокислого калия

Время культивирования, часы	Концентрация однозамещенного фосфорнокислого калия, г/л			
	Контроль	0,5	1,0	1,5
Среда с рН 4,3				
0	1,50±0,10	1,50±0,10	1,50±0,10	1,50±0,10
2	4,20±0,13	3,90±0,12	4,20±0,13	4,47±0,14
17	4,20±0,13	4,10±0,13	4,30±0,13	4,62±0,14
19	5,00±0,14	3,85±0,13	4,70±0,13	4,78±0,14
21	6,05±0,18	5,13±0,14	5,37±0,14	5,73±0,15
23	6,12±0,18	6,27±0,18	7,20±0,22	7,70±0,22
25	4,68±0,14	5,56±0,15	6,85±0,20	6,62±0,20
27	2,68±0,10	5,47±0,15	6,10±0,20	6,30±0,20
Среда с рН 7,0				
0	1,50±0,10	1,50±0,10	1,50±0,10	1,50±0,10
2	6,46±0,19	3,96±0,12	4,67±0,14	4,95±0,14
17	7,62±0,23	14,52±0,44	15,22±0,44	15,74±0,44
19	7,70±0,23	14,90±0,44	16,40±0,46	16,83±0,47
21	15,38±0,45	15,74±0,45	17,84±0,49	17,66±0,49
23	15,74±0,45	16,70±0,47	19,21±0,55	19,55±0,56
25	8,60±0,26	16,14±0,46	13,50±0,43	12,80±0,42
27	5,86±0,17	5,63±0,15	5,40±0,15	6,74±0,16

При росте бактерий *Ps. aureofaciens* на ЖФПСБ с начальным рН 7,0 в статических условиях максимум биомассы наблюдался к 21–23 ч роста. Во всех режимах культивированию в динамических условиях пик образования биомассы наблюдался через 19 ч роста. При 100 об/мин количество образованной массы *Ps. aureofaciens* было в 2 с лишним раза меньше по сравнению со статическими условиями. При увеличении скорости вращения качалки до 150 об/мин наблюдалось максимальное образование биомассы, на 9% большее, чем при статических условиях. Увеличение числа оборотов до 180 об/мин и особенно до 220 об/мин привело к снижению уровня биомассы по сравнению с предыдущим вариантом.

Анализируя полученные данные, можно отметить, что в варианте с доведением рН до 7,0 и скорости перемешивания 150 об/мин наблюдался максимальный выход биомассы. В данном варианте время культивирования уменьшалось до 19 часов, что может способствовать значительной экономии энергозатрат.

На следующем этапе работы проводили глубинное культивирование бактерий на ЖФПСБ в статическом режиме, для изучения влияния различных концентраций K_2HPO_4 и MgSO_4 на динамику роста *Ps. aureofaciens*. Эти соли содержат важнейшие для метаболизма макроэлементы, и при их дополнительном введении в барду можно ожидать улучшения роста культуры (поскольку в исходной фракции барды содержание минеральных веществ очень низкое).

Динамика содержания биомассы бактерий *Pseudomonas* при культивировании на ЖФПСБ с рН 4,3 и 7,0 с добавлением сернокислого магния

Время культивирования, часы	Концентрация сернокислого магния, г/л			
	контроль	0,1	0,3	0,5
Среда с рН 4,3				
0	1,50±0,10	1,50±0,10	1,50±0,10	1,50±0,10
2	4,20±0,13	5,10±0,14	5,10±0,14	5,80±0,16
17	4,20±0,13	5,60±0,14	5,60±0,14	6,70±0,17
19	5,00±0,14	5,80±0,16	6,40±0,17	8,30±0,23
21	6,05±0,18	7,50±0,20	7,80±0,21	8,90±0,24
23	6,12±0,18	7,20±0,20	7,30±0,20	8,80±0,24
25	4,68±0,14	6,90±0,19	6,10±0,17	8,00±0,22
27	2,68±0,10	6,80±0,18	6,60±0,17	7,30±0,20
Среда с рН 7,0				
0	1,50±0,10	1,50±0,10	1,50±0,10	1,50±0,10
2	6,46±0,19	6,55±0,20	6,20±0,20	6,46±0,20
17	7,62±0,23	7,37±0,23	7,45±0,23	7,02±0,22
19	7,70±0,23	8,53±0,25	8,65±0,25	8,41±0,25
20	15,38±0,45	8,76±0,26	8,84±0,26	8,61±0,25
21	15,74±0,45	9,88±0,31	9,85±0,31	9,70±0,31
22	8,60±0,26	9,33±0,31	9,30±0,31	9,26±0,31
23	5,86±0,17	8,56±0,29	8,42±0,29	8,15±0,28

При культивировании бактерий на среде с рН 4,3 максимальное образование биомассы во всех вариантах опыта отмечено через 23 ч культивирования (табл. 3). Добавление K_2HPO_4 прогрессирующе повышало рост бактерий, и максимальная биомасса *Ps. aureofaciens* наблюдалась на среде с добавлением 1,5 г/л K_2HPO_4 , на 21% больше, чем в контрольном варианте (без добавления соли).

При культивировании *Ps. aureofaciens* на ЖФПСБ с начальным рН 7,0 и добавлением K_2HPO_4 наибольшая биомасса также образовывалась через 23 ч роста во всех вариантах. Повышение концентрации соли в среде способствовало увеличению биомассы – на 6, 22 и 24 % к контролю при 0,5, 1,0 и 1,5 г/л K_2HPO_4 , соответственно. Аналогично варианту при рН 4,3,

можно видеть резкое падение биомассы при более длительном (25 и 27 ч) культивировании *Ps. aureofaciens* на ЖФПСБ без внесения K_2HPO_4 и с внесением соли. Очевидно, это указывает на исчерпание запасов К и/или Р в среде и подтверждает наше предположение о недостаточном для роста бактерий количестве К и/или Р в нативной барде, требующее ее модификации.

Анализ полученных данных показывает, что для получения большей биомассы бактерии *Ps. aureofaciens* в состав ЖФПСБ необходимо добавлять K_2HPO_4 в количестве 1,0 – 1,5 г/л.

Эффективность внесения MgSO_4 в состав среды оказалась невысокой (табл. 4). В отличие от опыта с добавлением K_2HPO_4 к ЖФПСБ, которое приводило к существенному возрастанию биомассы *Ps. aureofaciens*, дополнительное

обогащение среды Mg и S усиливало рост бактерий только на среде с pH 4.3, но не с pH 7.0. Поэтому внесение MgSO₄ в среду выращивания *Ps. aureofaciens* для увеличения выхода биомассы не требуется.

Все классифицированные воздействия на микроорганизмы разделены на три основные группы: 1) влияние параметров культивирования (температура культивирования среды, pH, состав питательной среды), 2) химические и биологические воздействия (рост–ингибирующие концентрации различных химических веществ, и т.д.), 3) механическое воздействие (влияние перемешивания). В нашей работе исследованы эффекты каждой группы на образование биомассы бактерией *Pseudomonas aureofaciens*.

Выявлено, что для образования максимальной биомассы бактерии *Ps. aureofaciens* на среде, в основе содержащей ЖФПСБ, необходимо доводить начальный pH до 7.0 ед. Однако с целью уменьшения затрат на доведение pH возможно использовать нативную барду с pH 4.3. Для увеличения биомассы необходимо перемешивание, поскольку аэробная ферментация требует достаточной концентрации кислорода в культуральной среде. Большое количество работ, посвященных влиянию условий перемешивания на конкретные микроорганизмы, указывают на увеличение размеров клеток *E. coli*, *Bacillus cerea*, *Staphylococcus epidermidis* с повышением скорости перемешивания [5]. Наши данные показали, что при росте бактерий *Ps. aureofaciens* на среде с pH 4,3 наилучший вариант скорости вращения – 150 об/мин; при увеличении числа оборотов биомасса снижается..

Данные, полученные в ходе проведенной работы, показали принципиальную возможность использования ЖФПСБ для выращивания бактерий *Ps. aureofaciens* с целью накопления максимальной биомассы. Полученную культуральную жидкость можно использовать для получения биопрепарата, которым в дальнейшем можно обрабатывать почву с целью

увеличения полезной микрофлоры, а также растения и семена – для защиты от фитопатогенных грибов [4].

ЛИТЕРАТУРА

1. Антипов С.Т., Журавлев А.В. Послеспиртовая зерновая барда. Технология переработки // Производство спирта и ликероводочных изделий. 2005. № 4. С.9 – 11.
2. Олийничук С.Т., Кошель М.И., Каранов Ю.А. Утилизация мелассной послеспиртовой барды и очистка стоков // Техника и технология. 2006. №2. С. 42 – 43.
3. Логинов О.Н., Мелентьев А.И., Силищев Н.Н., Бойко Т.Ф., Галимзянова Н.Ф., Свешникова Е.В. Роль бактерий-антагонистов фитопатогенов в защите сельскохозяйственных растений от болезней. Уфа: Гилем, 2001. 66 с.
4. Лукаткин А.А., Ибрагимова С.А., Ревин В.В. Исследование антифунгальных свойств *Pseudomonas aureofaciens* 2006 // Вестник Оренбургского государственного университета. 2009. № 6. С.211 – 213.
5. Henzler H.-J. Particle stress in bioreactors // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2000. V.67. P.35 – 82.

References

1. Antipov S.T., Zhuravlev A.V. Post-alcohol cereal draff. Processing technology // Production of alcohol and alcoholic beverages. 2005. № 4. С.9 – 11.
2. Oliinichuk S.T., Koshel M.I., Karanov Yu.A. Utilization of the molasses after-alcohol draff and treatment of effluents // Engineering and technology. 2006. № 2. Pp. 42 – 43.
3. Loginov O.N., Melentiev A.I., Silishchev N.N., Boyko T.F., Galimzyanova N.F., Sveshnikova E.V. The role of bacteria – phytopathogens antagonists in agricultural plants protecting from diseases. Ufa: Gilem, 2001. 66 p.
4. Lukatkin A.A., Ibragimova S.A., Revin V.V. Investigation of *Pseudomonas aureofaciens* 2006 antifungal properties // Bulletin of the Orenburg State University. 2009. № 6. P.211 – 213.
5. Henzler H.-J. Particle stress in bioreactors // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2000. V.67. P.35 – 82.



CREATION OF ANTIFUNGAL PREPARATION ON THE BASIS OF *PSEUDOMONAS AUREOFACIENS* BACTERIA CULTIVATED ON THE POST-ALCOHOL DRAFF UNDER DIFFERENT PARAMETERS OF CULTIVATION

© A.A. Lukatkin, A.S. Lukatkin

Mordovia State University,
26a, ulitsa Ulyanova, 430032, Saransk, Russian Federation

Utilization of post-alcohol draff, main waste of ethyl alcohol production from grain raw materials, is a serious environmental and economic problem. This problem can be solved by growing bacteria (including those belonging to genus *Pseudomonas*) in a medium with a liquid fraction of the post-alcohol draff (LFPAD), followed by cultural liquid use for plants treatment to defense against phytopathogens. The aim of this work was to study the parameters of *Pseudomonas aureofaciens* bacteria cultivation on LFPAD, which help to obtain the maximum biomass in laboratory experiment. Accumulation of *Pseudomonas aureofaciens* biomass was studied in bacteria, applied into LFPAD containing medium. Bacteria cultivation was carried out under static conditions and on a thermo-regulated shaker at 28 ° C for 27 hours. The following parameters were varied during the experiment: (1) initial pH of the medium (from 4.3 to 8.0), (2) concentration of added salts (0.5 to 1.5 g/l KH_2PO_4 and 0.1 to 0,5 g/l MgSO_4), and (3) medium mixing rate (from 100 to 220 rpm). It was revealed that largest biomass of *Pseudomonas aureofaciens* was formed after 19 - 23 hours cultivation (depending on variation of other parameters). The best medium in which the maximum growth and bacterial biomass formation occurred was LFPAD with initial pH 7.0 supplemented with 1.5 g/l KH_2PO_4 . It is shown that medium mixing conditions are necessary for the maximum bacterial biomass formation. The optimum mixing rate was 150 rpm, regardless of medium pH. In a variant with pH 7.0 and mixing rate of 150 rpm, there was a maximum biomass yield with a reduced (19 h) cultivation time, which would save energy costs. The resulting cultural liquid can be used to produce a biopreparation with a high antifungal activity, which can be used for soil treatment to increase the beneficial microflora, as well as plants and seeds treatment, to protect against phytopathogenic fungi.

Key words: *Pseudomonas aureofaciens*, cultivation, biomass, post-alcohol draff, medium pH, mineral salts, mixing rate.

УДК 57.575.577.2.27. 61.616-006.04.618.1.11

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-4-3-94-98

РОЛЬ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНА *IL23R* В ПАТОГЕНЕЗЕ РАКА ЯИЧНИКОВ

© Э.Т. Мингажева, Д.С. Прокофьева, А.Х. Нургалиева, Д.Д. Сакаева,
Р.Р. Фаисханова, И.Р. Гилязова, Э.К. Хуснутдинова

Рак яичников (РЯ) является одной из наиболее распространенных злокачественных новообразований органов репродуктивной системы. Согласно современным представлениям о канцерогенезе, немаловажную роль в развитии РЯ играют нарушения в генах, белковые продукты которых вовлечены в иммунный ответ и воспаление. В настоящей работе представлен сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов *rs7517847* и *rs10889677* в гене *IL23R* среди больных РЯ и здоровых женщин из Республики Башкортостан. В результате проведенного исследования не выявлено ассоциаций аллелей *G* полиморфного локуса *rs7517847* и *C* полиморфного варианта *rs10889677* с риском развития РЯ у женщин из данного региона.

Ключевые слова: риск развития рака яичников, ген рецептора интерлейкина-23, однонуклеотидные полиморфные варианты.

Рак яичников остается одной из самых агрессивных и тяжело поддающихся лечению Онкопатологий репродуктивной сферы у женщин. В 2016 г. в России РЯ был зарегистрирован у 14 000 женщин, и более 7 000 случаев заболевания закончились летальным исходом. Похожая ситуация складывается и в Республике Башкортостан. Кроме того, в последние годы наблюдается тенденция к омоложению данного вида рака, так чаще стали диагностировать заболевание в группе женщин в возрасте до 30 лет. Высокая смертность женщин с данным диагнозом обусловлена диагностированием рака яичников

на поздних стадиях развития (III-IV), когда заболевание приобретает характер диссеминированного, что, в свою очередь, приводит к увеличению риска рецидивов. На первом году после установления диагноза погибает около 22% больных [1].

Злокачественные новообразования яичников относятся к многофакторным патологиям. Одним из важных факторов риска РЯ является генетическая предрасположенность. Возникновение и развитие РЯ в первую очередь связаны с мутациями в генах *BRCA1* и *BRCA2*, белковые продукты которых являются ключевыми участ-

МИНГАЖЕВА Эльвира Тагировна, Башкирский государственный университет,
e-mail: elvira.f91@mail.ru

ПРОКОФЬЕВА Дарья Симоновна – к.б.н., Башкирский государственный университет,
e-mail: dager-glaid@yandex.ru

НУРГАЛИЕВА Альфия Хаматьяновна – к.б.н., Башкирский государственный университет,
e-mail: alfiyakh83@gmail.com

САКАЕВА Дина Дамировна – д.м.н., Республиканский клинический онкологический диспансер,
e-mail: d_sakaeva@mail.ru

ФАИСХАНОВА Рания Разяповна, Республиканский клинический онкологический диспансер,
e-mail: rancho111@mail.ru

ГИЛЯЗОВА Ирина Ришатовна – к.б.н., Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,
e-mail: gilyasova_irina@mail.ru

ХУСНУТДИНОВА Эльза Камилевна – д.б.н., Башкирский государственный университет, Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, e-mail: elzakh@mail.ru

никами сигнального пути клетки в ответ на воздействие ионизирующей радиации [2]. Однако, нарушения в этих высокопенетрантных генах объясняют не более 15% всех случаев заболевания, большая часть РЯ связана с мутациями в генах со средней и низкой пенетрантностью [3]. Немаловажную роль в процессе опухолевого роста играют цитокины, являющиеся регуляторными молекулами иммунной системы и посредниками межсистемных взаимодействий, но до настоящего времени нет единого мнения о степени их участия в канцерогенезе яичников [4].

Интерлейкин-23 (IL-23) и его рецептор (IL-23R) играют важную роль в дифференцировке Т-хелперов 17 типа (Th17), которые считаются посредниками воспалительного процесса и канцерогенеза. В гене *IL23R*, локализованном на коротком плече первой хромосомы (1p31.3), известно несколько однонуклеотидных полиморфных вариантов, ассоциированных с риском развития злокачественных новообразований различной этиологии [5]. В интронной области гена *IL23R* известна замена *T>G* (*rs7517847*). Наличие аллеля *G* оказывает влияние на длину мРНК и формирование белкового продукта. Полиморфный локус *rs10889677 C>A* расположенный в 3'-нетранслируемом регионе, приводит к увеличению сродства с микроРНК *let-7f*, тем самым способствуя высокой транскрипции гена *IL23R*, как *in vitro*, так и *in vivo* [6].

Целью данной работы явилось изучение ассоциации полиморфных вариантов *rs7517847*, *rs10889677* гена *IL23R* с риском развития рака яичников у женщин из Республики Башкортостан.

Материалы и методы исследования. Материалом для исследования послужили образцы ДНК женщин с установленным диагнозом «рак яичников» (*n*=263) и женщин без онкологических заболеваний на момент забора крови (*n*=284) в возрасте 17-87 лет из Республики Башкортостан. Забор периферической венозной крови проводился сотрудниками Республиканского клинического онкологического диспансера МЗ РБ (г. Уфы). Все больные раком яичников подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

По этническому составу группа больных раком яичников не однородна: русские – 48.6%, татары – 33.9%, украинцы – 5.1%, башкиры – 3.6%, чувашаи – 2.8%, другие этнические группы – 2.2%, метисы – 3.6%. Контрольная группа соответствует группе больных РЯ: русские – 55.7%, татары – 32.6%, башкиры – 3.8%, чувашаи – 1.9%, украинцы – 1.2%, другие этнические группы – 1.9%, метисы – 2.7%.

Геномную ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции [7]. Генотипирование образцов ДНК проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Последовательности праймеров для амплификации полиморфных локусов были следующие: для *rs7517847* F:5'- ACCAC-CTTGTCTGAAAATG -3' и R: 5'-CTAGG AGACAGCCCATAAAG -3', для *rs10889677* F:5'-ACCATGTAAGAATT CCCGGG -3' и R:5'-CATGAGGCGTCCACATAATG-3' («Синтол», Россия). Для определения нуклеотидных замен методом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов проводили гидролиз амплифицированных фрагментов рестриктазами *StuI* и *MnII* («Thermo Scientific», Германия) при температуре 37°C в течение 12 часов. Результаты ПДРФ-анализа оценивали методом электрофореза в 7%-ном полиакриламидном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием и визуализацией в проходящем ультрафиолетовом свете.

Результаты и их обсуждение. В настоящем исследовании нами проведен анализ полиморфного варианта *rs7517847* в гене *IL23R* в группе больных РЯ и контрольной группе. Идентификация аллелей выполнена методом ПДРФ -анализа. ПЦР-продукт длиной 303 п.н. под воздействием эндонуклеазы рестрикции *StuI* в случае отсутствия изменения расщепляется на два фрагмента длиной 194 п.н. и 109 п.н. (рис. 1).

Анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного локуса *rs7517847* гена *IL23R* среди больных РЯ и контроля показал, что в группе пациентов чаще встречается гетерози-

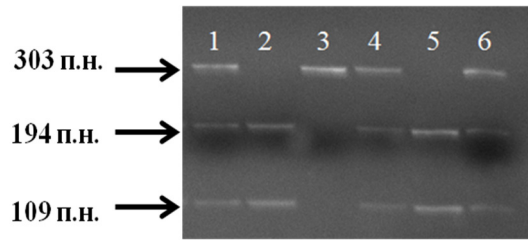


Рис. 1. Электрофореграмма рестриционного анализа (*StuI*) полиморфного варианта *rs7517847* в гене *IL23R*. Дорожки 1,4,6 – генотип *TG*; 2,5– генотип *TT*; 3 – генотип *GG*

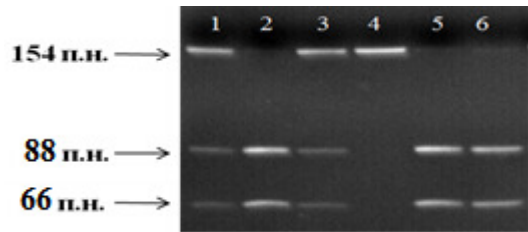


Рис. 2. Электрофореграмма рестриционного анализа (*MnII*) полиморфного варианта *rs10889677* в гене *IL23R*. Дорожки 1,3 – генотип *CA*; 2,5,6– генотип *CC*; 4 – генотип *AA*

готный генотип *GT* (50.2%), что незначительно отличается от частоты встречаемости данного генотипа среди здоровых индивидов (45.1%). Гомозиготные генотипы *TT* и *GG* в группе больных РЯ обнаружены с частотами 25.9% и 24% соответственно. Среди здоровых лиц генотип *TT* встречался с частотой 32%, а генотип *GG* – 22.9%. Частоты встречаемости аллелей *T* и *G* среди пациенток и здоровых доноров также отличались незначительно: аллель *T* был выявлен с частотами 51% и 54.6%, аллель *G* – 49% и 45.4% соответственно. В результате проведенного анализа не выявлено статистически значимых различий в распределении частот аллелей и генотипов полиморфного локуса *rs7517847* в гене *IL23R* между больными РЯ и контрольной группой ($p > 0.05$) (табл. 1).

Кроме того, нами проведено изучение полиморфного локуса *rs10889677* в гене *IL23R* среди больных РЯ и здоровых индивидов. В результате воздействия эндонуклеазы рестрикции *MnII* аллель *C* расщепляется на два фрагмента длиной 88 п.н и 66 п.н. Длина фрагмента, содержащего аллель *A*, составляет 154 п.н. (рис. 2).

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного варианта *rs10889677* в гене *IL23R* между больными раком яичников и контрольной группой оказалось примерно одинаковым и статистически значимо не различалось

($p > 0.05$). Распространенный аллель *C* встречался с частотой 64.4% и 64.8% среди пациентов и здоровых лиц соответственно. Частота редкого аллеля *A* составила 35.6% и 35.2% между изучаемыми группами. Среди генотипов чаще встречались гомозиготный генотип *CC* (случаи – 37.6%, контроль – 41.6%) и гетерозиготный генотип *CA* (больные – 53.6%, здоровые индивиды – 45.8%). Частота гомозиготного по редкому аллелю генотипа *AA* была незначительно выше в контрольной группе (12.3%) по сравнению с больными РЯ (8.7%) (табл. 1).

Наши результаты лишь частично согласуются с выводами, полученными некоторыми авторами при исследовании данных полиморфных локусов, что, вероятно, связано с наличием существенных различий в распределении частот аллелей и генотипов между разными популяциями и регионами мира. Наши данные согласуются с результатами, полученными Zhang с соавт. (2010), где также не было обнаружено статистических значимых различий в распределении частот аллелей и генотипов полиморфного варианта *rs7517847* среди больных РЯ и здоровых доноров [8]. Тем не менее, в некоторых исследованиях показано влияние данного полиморфного локуса на патогенез аутоиммунных и воспалительных заболеваний, а также злокачественных новообразований. Так, в исследовании

Т а б л и ц а 1

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов *rs7517847* и *rs10889677* в гене *IL23R* у больных раком яичников и здоровых женщин

Генотипы и аллели	Больные РЯ, n (%)	Контроль, n (%)	χ^2	P	OR (95% CI)
<i>rs7517847</i>					
TT	68(25.9)	91 (32)	2.62	0.27	0.74(0.51-1.07)
GT	132 (50.2)	128 (45.1)			1.23 (0.88-1.72)
GG	63 (24)	65 (22.9)			1.06 (0.71-1.58)
T	268 (51)	310 (54.6)	1.44	0.23	0.86(0.68-1.10)
G	258 (49)	258 (45.4)			1.16(0.91-1.47)
<i>rs10889677</i>					
CC	99 (37.6)	119 (41.9)	3.96	0.14	0.84 (0.59-1.15)
CA	141(53.6)	130 (45.8)			1.37 (0.96-1.92)
AA	23(8.7)	35 (12.3)			0.68 (0.39-1.19)
C	339 (64.4)	368 (64.8)	0.01	0.910	0.99 (0.77-1.26)
A	187 (35.6)	200(35.2)			1.01 (0.79-1.30)

Атег с соавторами при изучении роли полиморфного варианта *rs7517847* гена *IL23R* в патогенезе гепатоцеллюлярной карциномы у египтян, было установлено, что аллель *G* и гомозиготный генотип *GG* намного чаще встречаются среди пациентов по сравнению со здоровыми индивидами [9]. Литературные данные, оценивающие роль полиморфного варианта *rs10889677* в гене *IL23R* при канцерогенезе, остаются противоречивыми. В работе Zhang с соавт. было показано, что аллель *C* данного полиморфного локуса значительно чаще встречается среди пациентов с диагнозом «рак яичников» по сравнению с женщинами из контрольной группы [8]. Аналогичные результаты были получены в исследовании Dong с соавторами при изучении роли вышеуказанного полиморфного варианта у пациентов с раком желудка [10]. Однако в некоторых работах было установлено, что индивиды с гетерозиготным генотипом *CA* или гомозиготным генотипом *CC*, напротив, менее подвержены риску развития солидных опухолей [6,11].

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об отсутствии вклада полиморфных вариантов *rs7517847* и *rs10889677* в гене *IL23R* в патогенез рака яичников у женщин из Республики Башкортостан.

Исследование поддержано программой развития биоресурсных коллекций ФАНО.

ЛИТЕРАТУРА

1. Каприн АД, Старинский ВВ, Петрова ГВ. // Злокачественные новообразования в России в 2016 году (заболеваемость и смертность)./М.: МНИОИ им. П.А. Герцена. филиал ФГБУ «ФМИЦ им. П.А. Герцена» Минздрава России. 2018.250 с.
2. Lalwani N., Prasad S.R., Vikram R. et al. Histologic, molecular, and cytogenetic features of ovarian cancers: implications for diagnosis and treatment. // Radiographics 2011;31(3): 625–46. doi: 10.1148/rg.313105066.
3. Neff R. T., Senter L., Salani R. BRCA mutation in ovarian cancer: testing, implications and treatment considerations //Therapeutic advances in medical oncology. – 2017. – Т. 9. – №. 8. – С. 519-531.
4. Charbonneau B, Goode EL, Kalli KR, et al. The immune system in the pathogenesis of ovarian cancer. // Crit Rev Immunol. 2013;33(2):137-64.
5. Parham, C.; Chirica, M.; Timans, J.; et al. A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta 1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R// Immunol. 2002. 168.P.5699-5708.
6. Zheng J, Jiang L, Zhang L, Yang L, Deng J, You Y, Li N, Wu H, Li W, Lu J, Zhou Y Functional genetic variations in the IL-23 receptor gene are associated with risk of breast, lung and nasopharyngeal cancer in Chinese populations. // Carcinogenesis. 2012 Dec;33(12):2409-16. doi: 10.1093/carcin/bgs307
7. Mathew C. C. The isolation of high molecular weight eucariotic DNA // Methods in molecular biology. 1984. V.2.-P.31–34.

8. Zhang Z, Zhou B, Zhang J, et al. Association of interleukin-23 receptor gene polymorphisms with risk of ovarian cancer// *Cancer genetics and cytogenetics*. 2010. 196(2).P.146-152
9. Amer T, El-Baz R, Mokhtar AR, et al. Genetic polymorphisms of IL-23R (rs7517847) and LEP (rs7799039) among Egyptian patients with hepatocellular carcinoma.//*Arch Physiol Biochem*. 123(5). P.279-285. doi: 10.1080/13813455. 2017.1320680.
10. Dong K, Xu Y, Yang Q, Shi J, Jiang J, Chen Y, Song C, Wang K. Associations of Functional MicroRNA Binding Site Polymorphisms in IL23/Th17 Inflammatory Pathway Genes with Gastric Cancer Risk. //*Mediators Inflamm*. 2017;2017:6974696. doi: 10.1155/2017/6974696.
11. Zhou S, Ruan Y, Yu H, Chen Y, Yao Y, Ma Y, Gao Y. Functional IL-23R rs10889677 genetic polymorphism and risk of multiple solid tumors: a meta-analysis.//*PLoS One*. 2013 Nov 20;8(11):e80627. doi: 10.1371/journal.pone.0080627.



THE ROLE OF ALLELES OF IL23R GENE IN THE PATHOGENESIS OF OVARIAN CANCER

© E.T. Mingajeva¹, D.S. Prokofyeva¹, A.Kh. Nurgalieva¹, D.D. Sakaeva²,
R.R. Faishanova², I.R. Gilyazova³, E.K. Khusnutdinova^{1,3}

¹ Bashkir State University,
32, ulitsa Zaki Validi, 450076, Ufa, Russian Federation

² Republic Clinical Oncology Center,
73/1, prospect Octyabrya, 450054, Ufa, Russian Federation

³ Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center,
71, prospect Octyabrya, 450054, Ufa, Russian Federation

Ovarian cancer (OC) is one of the most common malignant neoplasms of the organs of the reproductive system. According to modern representations about carcinogenesis, an important role in the development of the OC is played by disorders in the genes, the protein products of which are involved in the immune response and inflammation. This article presents a comparative analysis of the frequency distribution of alleles and genotypes of polymorphisms rs7517847 and rs10889677 in the IL23R gene among patients with OC and healthy women from the Republic of Bashkortostan. As a result of the study, no associations of G allele of IL23R rs7517847 and C allele of IL23R rs10889677 with a risk of development of OC in women from this region were found.

Key words: risk of ovarian cancer, interleukin-23 receptor gene, single nucleotide polymorphisms.

УДК 575.162

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-4-3-99-106

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ПОЛИМОРФНЫХ ЛОКУСОВ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ В РАЗВИТИИ ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЕГКИХ

© Л.А. Никитина, А.М. Хузиахметова, Л.Я. Бородина, П.М. Алексеев, Р.А. Давыдов,
Х.К. Аминев, А.С. Карунас, М.М. Юнусбаева

Проведен анализ полиморфных вариантов генов цитокинов *rs1800629 TNFA (-308G>A)*, *rs16944 IL1B (-511C>T)*, *IL1RN (VNTR)* и *IFNG (VNTR)* у больных туберкулезом легких и здоровых индивидов Республики Башкортостан. Проанализированы ассоциации полиморфизмов генов-кандидатов с заболеванием и выявлены генетические маркеры развития осложнений. В результате проведенного исследования полиморфных локусов генов цитокинов *IL1B (rs16944)*, *TNFA (rs1800629)*, *IL1RN (VNTR)* и *IFNG (VNTR)* можно заключить, что аллельные варианты гена *IFNG* вносят вклад в развитие туберкулеза легких. Выявлена ассоциация аллеля *IFNG*15* с риском развития туберкулеза легких.

Ключевые слова: туберкулез легких, генетический полиморфизм, цитокины.

Туберкулез (ТБ) - инфекционное заболевание, вызываемое *Mycobacterium tuberculosis*, преимущественно поражающее дыхательные пути человека. По данным Всемирной организации здравоохранения в 2016 году в мире зарегистрировано более 10,4 миллиона новых случаев ТБ и более 1,7 миллиона смертей. В Российской Федерации, согласно данным ВОЗ, в 2016 году зарегистрировано 78121 новых случаев ТБ, из которых 47 000 случаев приходится на туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя (МЛУ ТБ) [1].

Развитие и течение туберкулезного процесса во многом зависят от вирулентности и массивности туберкулезной инфекции, а также состояния макроорганизма, т.е. способности адекватно реагировать на внедрение возбудителя. Острота течения заболевания, деструкция легочной ткани и развитие кахексии в большей степени зависят от воспалительных процессов, контролируемых организмом хозяина, чем непосредственно от микобактерий и их продуктов. Ключевая роль в борьбе с туберкулезной инфекцией принадлежит клеткам иммунной си-

НИКИТИНА Лилия Алексеевна, Башкирский государственный педагогический университет им. М. Акмуллы, e-mail: liliya.nikitina.bio@gmail.com

ХУЗИАХМЕТОВА Алина Маратовна, Башкирский государственный университет, e-mail: aimurmuralina@yandex.ru

БОРОДИНА Лилия Явдатовна, Республиканский клинический противотуберкулезный диспансер, e-mail: liliboro@mail.ru

АЛЕКСЕЕВ Павел Михайлович, Башкирский государственный медицинский университет, e-mail: pasha93xp@gmail.com

ДАВЫДОВ Ростислав Алексеевич, Башкирский государственный медицинский университет, e-mail: davy00@list.ru

АМИНЕВ Ханиф Киямович – д.м.н, Башкирский государственный медицинский университет, e-mail: professor_aminev@mail.ru

КАРУНАС Александра Станиславовна – д.б.н., Институт биохимии и генетики Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук, e-mail: molgen@anrb.ru

ЮНУСБАЕВА Миляуша Мусиевна – к.б.н., Институт биохимии и генетики Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук, e-mail: milyausha_ufa@mail.ru

стемы и выделяемым ими цитокинам, таким как *IFN γ* , *TNFA*, интерлейкины [2]. Дисбаланс в работе иммунитета, проявляющийся в системе цитокинов и их рецепторов, может стать причиной неэффективности проводимой химиотерапии и развития осложнений. Сила и эффективность иммунного ответа во многом зависят от генетических особенностей макроорганизма. Тот факт, что не у каждого человека, в организм которого попадают *M. tuberculosis*, развивается заболевание, говорит о существовании наследственной предрасположенности к ТБ. Туберкулез является многофакторным заболеванием, в развитии которого, помимо инфекционного агента, принимают участие множество генетических и внешнесредовых факторов. В настоящее время большое внимание уделяется исследованию генетических основ подверженности к ТБ, определению ассоциации полиморфизмов генов-кандидатов с заболеванием в различных популяциях, а также характеристике их функциональной значимости в развитии ТБ и его осложнений. В связи с этим особый интерес представляет изучение полиморфизма генов цитокинов, участвующих в механизмах миграции клеток и регуляции межклеточных взаимодействий у больных ТБ, а также поиск генетических маркеров развития осложнений.

Цель исследования: анализ ассоциации полиморфных локусов генов цитокинов *TNFA* (-308G>A, *rs1800629*), *IL1B* (-511C>T, *rs16944*), *IL1RN* (*VNTR*) и *IFNG* (*VNTR*) с развитием туберкулеза легких.

Материалы и методы. В исследовании были использованы образцы ДНК больных ТБ неродственных индивидов, проходивших стационарное лечение в ГБУЗ Республиканском клиническом противотуберкулезном диспансере (г. Уфа). Формирование выборок проводилось на основании разработанных критериев включения-исключения, в соответствии с этическими нормами, с обязательным получением информированного согласия испытуемых. Критерии включения в выборку больных были следующие: наличие легочной формы туберкулеза; подтвержденное бактериовыделением; отсутствие ВИЧ инфекции в анамнезе. Выборка больных туберкулезом включала в себя 329 человек,

из них 240 мужчин (72,9%) и 89 женщин (27,1%) в возрасте $46 \pm 12,5$ лет. Критериями включения образцов ДНК в контрольную выборку были отсутствие ТБ в анамнезе и родства между индивидами. Контрольная группа включала 149 человек и соответствовала выборке больных по возрасту, полу и этнической принадлежности.

Генотипирование. ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции. Полиморфные варианты *rs1800629 TNFA* (-308G>A), *rs16944 IL1B* (-511C>T), *IL1RN* (*VNTR*) и *IFNG* (*VNTR*) анализировали при помощи полимеразной цепной реакции с использованием локуспецифичных праймеров. Для определения нуклеотидных замен методом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов проводили гидролиз амплифицированных фрагментов соответствующей рестриктазой. Последовательности праймеров, размеры амплифицируемых фрагментов, названия рестриктаз описаны ранее [3–5].

Для проверки соответствия наблюдаемого распределения частот генотипов теоретически ожидаемому равновесному распределению по закону Харди - Вайнберга использовался критерий χ^2 . При сравнении частот аллелей и генотипов в группах больных и контроля применялся критерий χ^2 для таблиц сопряженности 2×2 с поправкой Йейтса на непрерывность. В случае наличия статистически значимых отличий в исследуемых выборках проводилась оценка показателя отношения шансов (odds ratio, OR) и его 95% доверительного интервала (95% CI).

Результаты и обсуждение. Проведено исследование распределения частот аллелей и генотипов полиморфных локусов генов цитокинов *rs1800629 TNFA* (-308G>A), *rs16944 IL1B* (-511C>T), *IL1RN* (*VNTR*) и *IFNG* (*VNTR*) у больных ТБ и здоровых доноров Республики Башкортостан (табл.).

Анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов *rs16944* гена *IL1B*, *rs1800629* гена *TNFA* и *VNTR* полиморфизма гена *IL1RN* у больных ТБ и в контроле не выявил статистически значимых различий ($p > 0,05$).

Анализ *VNTR*-полиморфизма, $(CA)_n$ повторы в первом интроне гена *IFNG*, у больных ТБ и здорового контроля идентифицировал пять

Т а б л и ц а 1

Распределение частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов генов цитокинов *IL1B* (*rs16944*), *TNFA* (*rs1800629*), *ILRN* (*VNTR*) и *IFNG* (*VNTR*) у больных туберкулезом и здоровых доноров

Генотип, аллель	Контроль частота, % (абс. кол-во)	Больные ТБ частота, % (абс. кол-во)	ТБ без ЛУ частота, % (абс. кол-во)	МЛУ частота, % (абс. кол-во)	ШЛУ частота, % (абс. кол-во)
<i>IL1B rs16944 (-511C/T)</i>					
CC	35,5 (48)	40,1 (132)	36,4 (51)	39,0 (23)	45,4 (59)
CT	49 (66)	47,4 (156)	47,9 (67)	54,2 (32)	43,8 (57)
TT	15,5 (21)	12,4 (41)	15,7 (22)	6,8 (4)	10,8 (14)
N	135	329	140	59	130
C	60 (162)	63,2 (420)	60,4 (169)	66,1 (78)	67,3 (175)
T	40 (108)	36,1 (238)	39,6 (111)	33,9 (40)	32,7 (85)
N	270	658	280	118	260
<i>TNFA rs1800629 (-308G/A)</i>					
GG	79,7 (110)	72,6 (225)	76,2 (96)	74, (43)	68,3 (86)
GA	18,8 (26)	25,8 (80)	22,2 (28)	25,9 (15)	29,4 (37)
AA	1,4 (2)	1,6 (5)	1,6 (2)	0	2,4 (3)
N	138	310	126	58	126
G	89,1 (246)	85,5 (530)	87,3 (220)	87,1 (101)	82,9 (209)
A	10,9 (30)	14,5 (90)	12,7 (32)	12,9 (15)	17,1 (43)*
N	276	620	252	116	252
<i>ILRN (VNTR)</i>					
1/1	61,0 (91)	53,1 (170)	55,1 (76)	52,6 (30)	51,2 (64)
1/2	31,5 (47)	33,4 (107)	31,9 (44)	24,6 (14)	39,2 (49)
1/3	0,6 (1)	4,0 (13)	5,8 (8)	5,3 (3)	1,6 (2)
2/2	5,3 (8)	8,7 (28)	7,2 (10)	15,8 (9)*	7,2 (9)
2/3	0 (0)	0,6 (2)	0	1,8 (1)	0,8 (1)
3/3	1,3 (2)	0	0	0	0
N	149	320	138	57	125
*1	77,2 (230)	71,8 (460)	73,9 (204)	67,5 (77)	71,6 (179)
*2	21,1 (63)	25,7 (165)	23,2 (64)	28,9 (33)	27,2 (68)
*3	1,7 (5)	2,3 (15)	2,9 (8)	3,5 (4)	1,2 (3)
N	298	640	276	114	250
<i>IFNG (VNTR)</i>					
11/11	14,0 (19)	8,3 (27)	8,7 (12)	3,4 (2)	10,1 (13)
11/12	2,2 (3)	4,0 (13)	7,2 (10)	1,7 (1)	1,6 (2)
11/13	1,5 (2)	2,1 (7)	2,2 (3)	1,7 (1)	3,1 (4)
11/14	2,2 (3)	2,4 (8)	3,6 (5)	0	2,3 (3)
11/15	0	1,5 (5)	1,4 (2)	1,7 (1)	0,8 (1)
12/12	50,7 (69)	31,2 (102)	26,1 (36)*	42,4 (25)	31,8 (41)*
12/13	2,2 (3)	10,1 (33)	10,1 (14)*	6,8 (4)	11,6 (15)*
12/14	2,2 (3)	6,4 (21)	8,0 (11)	8,5 (5)	3,9 (5)
12/15	0	3,1 (10)	2,9 (4)	3,4 (2)	3,1 (4)
13/13	11,8 (16)	16,5 (54)	15,9 (22)	11,9 (7)	18,6 (24)
13/14	8,8 (12)	1,5 (5)	0,7 (1)	5,1 (3)	0,8 (1)
13/15	2,9 (4)	3,4 (11)	4,3 (6)	3,4 (2)	2,3 (3)
14/14	1,5 (2)	6,1 (20)	5,1 (7)	6,8 (4)	7,0 (9)
14/15	0	1,2 (4)	1,4 (2)	1,7 (1)	0,8 (1)
15/15	0	2,1 (7)	2,2 (3)	1,7 (1)	2,3 (3)
N	136	327	138	59	129
*11	16,9 (46)	13,3 (87)	15,9 (44)	5,9 (7)	14,0 (36)
12	54,0 (147)	43,0 (281)	40,2 (111)	52,5 (62)	41,9 (108)*
13	19,5 (53)	25,1 (164)	24,6 (68)	20,3 (24)	27,5 (71)
*14	8,1 (22)	11,9 (78)	12,0 (33)	14,4 (17)	10,9 (28)
15	1,5 (4)	6,7 (44)	7,2 (20)	6,8 (8)*	5,8 (15)*
N	272	654	276	118	258

Примечание к таблице: жирным шрифтом выделены статистически значимые ассоциации, полученные после поправки на множественность сравнений, N — объем выборки; * - достоверность различий показателей по сравнению с их значениями у здоровых доноров (p<0,05)

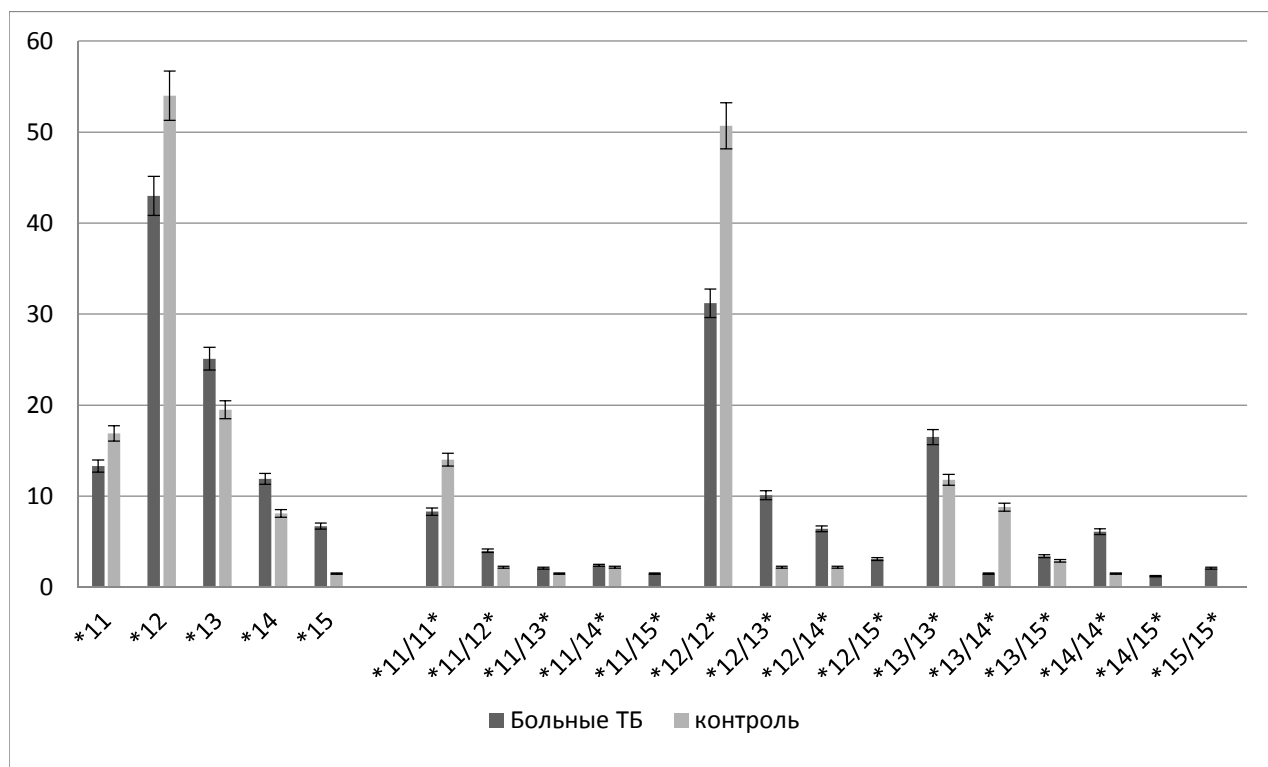


Рис. 1. Распределение частот аллелей и генотипов VNTR полиморфизма гена IFNG у больных ТБ и в контрольной группе.

аллельных вариантов: *IFNG*11*, *IFNG*12*, *IFNG*13*, *IFNG*14* и *IFNG*15*, содержащих 11, 12, 13, 14 и 15 (CA)_n повторов, соответственно, и 15 из 21 возможных генотипов (табл.). В обеих группах наиболее частыми оказались генотипы *IFNG*12/12* и *IFNG*13/13*, что согласуется с многочисленными популяционно-генетическими данными о преимущественном распространении генотипа *IFNG*12/12* [4, 6]. Наиболее представленный в обеих группах генотип *IFNG*12/12* встречался с частотой 31,2% у больных ТБ и 50,7% в контрольной группе ($p=0,0001$, $OR=0,44$, $95\%CI$ 0,29-0,66). Вторым по частоте встречаемости был генотип *IFNG*13/13*, частота которого составляла 16,5% у больных ТБ и 11,8% в контрольной группе ($p>0,05$). Также обращает на себя внимание статистически значимо высокая частота генотипа *IFNG*12/13* (10,1%) у больных ТБ по сравнению с контролем (2,2%). Риск развития ТБ у носителей данного генотипа *IFNG*12/13* составил 4,99 ($p=0,007$, $95\%CI$ 1,49-16,51). Следующими по частоте встречаемости в контрольной группе были генотипы *IFNG*11/11* (14%) и *IFNG*13/14* (8,8%), тогда как в группе больных ТБ частота данных

генотипов достигала 8,3% ($p>0,05$) и 1,5% ($p=0,0004$, $OR=0,16$, $95\%CI$ 0,06-0,46), соответственно. Остальные генотипы встречались гораздо реже, их частоты колебались от 0,0% до 6,4% в исследованных группах больных ТБ и контроля.

Из пяти обнаруженных аллелей, наиболее часто выявлялись: *IFNG*12* – в 43% случаях у больных ТБ и в 54% случаях у здоровых индивидов ($p=0,002$, $OR=0,64$, $95\%CI$ 0,48-0,85), и *IFNG*13*, частота встречаемости которого у пациентов составила 25,1%, а в контроле – 19,5% ($p>0,05$) (табл.). Третьим по частоте встречаемости оказался аллель *IFNG*11* (больные – 13,3%, контроль – 16,9%) ($p>0,05$). Аллельный вариант *IFNG*15*, содержащий (CA)₁₅ повторов гена *IFNG*, встретился у 44 больных ТБ (6,7%) и лишь у четырех здоровых индивидов (1,5%). Риск развития ТБ у носителей аллеля *IFNG*15* составил 4,83 ($p=0,002$, $95\%CI$ 1,72-13,58). В целом, стоит отметить тенденцию увеличения (CA)_n повторов в группе больных ТБ по сравнению с контролем: частота аллелей *IFNG*13*, *IFNG*14* и *IFNG*15* превышает таковые в контрольной группе (рис.).

Учитывая клинико-рентгенологические данные и чувствительность микобактерий (МБТ) туберкулеза к лекарственным препаратам больные были разделены на три группы в соответствии с данными о лекарственной устойчивости возбудителя (табл.):

- группа больных ТБ без ЛУ (туберкулез без лекарственной устойчивости возбудителя), в группу вошли пациенты, выделяющие МБТ, чувствительные к лекарственным препаратам;

- группа МЛУ ТБ (туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя), в которую вошли пациенты, выделяющие МБТ с устойчивостью только к изониазиду, рифампицину и стрептомицину и/или этамбутолу;

- группа ШЛУ ТБ (туберкулез с широкой лекарственной устойчивостью возбудителя), в которую вошли пациенты, выделяющие МБТ, устойчивые к изониазиду, рифампицину, стрептомицину и/или этамбутолу, к одному из аминокликозидов и фторхинолону.

Как показано в таблице из 329 больных ТБ более 57,4% больных (189 человек) имели антибиотикорезистентные формы туберкулеза: 17,9% (59 человек) имели МЛУ ТБ, 39,5% (130 человек) - ШЛУ ТБ. Туберкулез без лекарственной устойчивости возбудителя (ТБ без ЛУ) встречался у 42,6% больных (140 человек).

Анализ распределения частот аллелей и генотипов *rs16944* гена *IL1B* не выявил достоверных отличий при сравнении исследуемых групп больных ТБ без ЛУ, МЛУ ТБ, ШЛУ ТБ с группой контроля ($p > 0,05$) (табл.).

Анализ полиморфного локуса *rs1800629* гена *TNFA* выявил достоверное повышение аллеля *rs1800629*A* (17,1%) в группе больных ШЛУ ТБ по сравнению с контролем (10,9%) ($p = 0,05$, $OR = 1,68$, $95\%CI$ 1,02-2,79). Увеличение частоты аллеля *rs1800629*A* обусловлено относительно высокой представленностью гетерозиготных носителей данного полиморфизма в группе больных ШЛУ ТБ (29,4%) по сравнению с контрольной выборкой (10,9%). Ранее нами была показана ассоциация аллеля *rs1800629*A* гена *TNFA* с инфильтративным ТБ в Башкортостане [7]. Полученные нами результаты анализа полиморфного локуса *rs1800629* гена *TNFA* у

больных ТБ и здоровых доноров позволяют заключить, что аллель *rs1800629*A* можно рассматривать в качестве генетического маркера повышенного риска развития ШЛУ ТБ.

Анализ распределения частот аллелей *VNTR* полиморфизма гена *IL1RN* не выявил достоверных различий между различными группами больных ТБ и контролем ($p > 0,05$). Среди больных МЛУ ТБ статистически значимо чаще встречается частота генотипа *IL1RN*2/2* (15,8%) по сравнению с контрольной группой (5,3%) ($p = 0,03$, $OR = 3,30$, $95\%CI$ 1,21-9,05). Однако полученные результаты в дальнейшем не были учтены по причине малочисленности носителей данного генотипа.

Значимая ассоциация развития ТБ была обнаружена с *VNTR* полиморфизмом гена *IFNG*. При сравнении распределения частот аллелей *VNTR* полиморфизма гена *IFNG* в трех группах пациентов (ТБ без ЛУ, МЛУ, ШЛУ ТБ) с контрольной выборкой обнаружено увеличение частоты аллеля *IFNG*15* во всех группах больных. Так, частота аллеля *IFNG*15* среди больных ТБ без ЛУ составляла 7,2% ($p = 0,002$, $OR = 5,23$, $95\%CI$ 1,77-15,52), среди больных МЛУ ТБ - 6,8% ($p = 0,01$, $OR = 4,87$, $95\%CI$ 1,44-16,51), ШЛУ ТБ - 5,8% ($p = 0,01$, $OR = 4,14$, $95\%CI$ 1,35-12,63), тогда как в контрольной группе данный показатель достигал лишь 1,5%. Частота аллеля *IFNG*12*, наоборот, достоверно чаще встречается в группе контроля (54%) по сравнению с больными ТБ без ЛУ (40,2%) ($p = 0,002$, $OR = 0,57$, $95\%CI$ 0,41-0,80) и ШЛУ ТБ (41,9%) ($p = 0,007$, $OR = 0,61$, $95\%CI$ 0,43-0,86). При сравнении частоты встречаемости аллеля *IFNG*12* в группах больных МЛУ ТБ и здоровых доноров нами не выявлено статистически значимых различий ($p > 0,05$). Как видно из таблицы, в группе больных ТБ без ЛУ и ШЛУ ТБ генотип *IFNG*12/12* встречался статистически значимо реже, чем в контрольной группе. Среди больных ТБ без ЛУ частота генотипа *IFNG*12/12* составляла 26,1% ($p = 0,0001$, $OR = 0,34$, $95\%CI$ 0,21-0,57), среди больных ШЛУ ТБ - 31,8% ($p = 0,002$, $OR = 0,45$, $95\%CI$ 0,27-0,75) против 50,7% в контроле, соответственно. В то же время по сравнению с группой контроля генотип *IFNG*12/13* достоверно чаще встречался среди больных ТБ. Частота

данного генотипа у больных ТБ без ЛУ достигала 10,1% (($p=0,01$, $OR=5,00$, $95\%CI$ 1,40-17,83), у больных ШЛУ ТБ - 11,6% (($p=0,005$, $OR=5,83$, $95\%CI$ 1,65-20,67) против 2,2% в контроле.

Обобщая результаты исследования, можно сделать вывод о влиянии *VNTR*-полиморфизма гена *IFNG* на развитие и тяжесть туберкулезного процесса. Как видно на рисунке, у больных ТБ наблюдается тенденция к увеличению $(CA)_n$ повторов по сравнению с контролем. Согласно работе Pravica V. с соавт. увеличение $(CA)_n$ повторов гена *IFNG* коррелирует с понижением продукции интерферона γ [6]. Более того, известно, что микросателлитные $(CA)_n$ повторы, содержащие более двенадцати единиц повторов, являются чрезвычайно полиморфными и могут выступать в роли цис-регуляторов транскрипции [8]. Более того, наличие микросателлитных повторов может приводить к образованию Z-формы ДНК, тем самым препятствуя движению РНК-полимераз и модулируя уровень экспрессии генов [9]. Можно предположить, что увеличение микросателлитных $(CA)_n$ повторов в первом интроне гена *IFNG* коррелирует с недостаточной продукцией $IFN\gamma$, что приводит к неспособности организма ограничивать рост и размножение внутриклеточных патогенов. Данное предположение подтверждаются исследованиями [10], где было показано, что у больных туберкулезом легких продукция $IFN\alpha$ и $IFN\gamma$ значительно снижена, причем наиболее — у больных, выделяющих лекарственно устойчивые МБТ [11], хотя в сыворотке крови больных туберкулезом уровень $IFN\alpha$ повышается.

Таким образом, проведенный анализ полиморфных вариантов генов цитокинов *IL1B* (*rs16944*), *TNFA* (*rs1800629*), *IL1RN* (*VNTR*) и *IFNG* (*VNTR*) у больных ТБ и здорового контроля демонстрирует немаловажную роль цитокинов в сопротивляемости организма туберкулезной инфекции. Установлено, что аллельные варианты гена *IFNG* вносят вклад в развитие и течение туберкулезного процесса. Обнаружена ассоциация аллеля *IFNG*15* с риском развития тяжелых деструктивных форм ТБ с широкой лекарственной устойчивостью возбудителя. Отмечена тенденция увеличения частоты гетерози-

готного генотипа и аллеля *rs1800629*А* гена *TNFA* у больных ШЛУ ТБ.

Благодарности: Работа поддержана грантом РФФИ № 17-44-020697 p-а.

ЛИТЕРАТУРА

1. Всемирная организация здравоохранения/данные стран по туберкулезу. 2018. <http://www.who.int/tb/country/data/profiles/ru/>
2. Уразова О.И., Новицкий В.В., Чурина Е.Г. Цитокиновый статус у больных туберкулезом легких с множественной лекарственной устойчивостью // Российский иммунологический журнал. 2011, Т.5 (14), № 3-4. С. 244-253. <https://elibrary.ru/item.asp?id=22367111>
3. Ribeiro, M. S. M., Pacheco, R. B. A., Fischer, R. G., & Macedo, J. M. B. Interaction of *IL1B* and *IL1RN* polymorphisms, smoking habit, gender, and ethnicity with aggressive and chronic periodontitis susceptibility // Contemporary Clinical Dentistry. 2016. С. 349–356. URL://<http://doi.org/10.4103/0976-237X.188560>
4. Saha A, Dhir A, Ranjan A, Gupta V, Bairwa N, Bamezai R. Functional *IFNG* polymorphism in intron 1 in association with an increased risk to promote sporadic breast cancer // Immunogenetics.2005. <https://doi.org/10.1007/s00251-005-0783-5>
5. Umapathy D, Krishnamoorthy E, Mariappanadar V, Viswanathan V, Ramkumar KM. Increased levels of circulating (TNF- α) is associated with (-308G/A) promoter polymorphism of TNF- α gene in Diabetic Nephropathy. Int J Biol Macromol. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.078>
6. Pravica V, Asderakis A, Perrey C, Hajeer A, Sinnott PJ, Hutchinson IV. In vitro production of *IFN-gamma* correlates with *CA* repeat polymorphism in the human *IFN-gamma* gene Eur J Immunogenet. 1999. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2370.1999.00122.x>
7. Bikmaeva AR, Sibiriak SV, Valiakhmetova DKh, Khusnutdinova EK. [Polymorphism of the tumor necrosis factor alpha gene in patients with infiltrative tuberculosis and from the Bashkortan populations]. Mol Biol (Mosk). 2002 Sep-Oct;36(5):784-7. Russian. PubMed PMID: 12391840. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12391840>
8. Sharma, S., Rathored, J., Ghosh, B., & Sharma, S. K.. Genetic polymorphisms in TNF genes and tuberculosis in North Indians //BMC Infectious Diseases. 2010. URL://<http://doi.org/10.1186/1471-2334-10-165> (дата обращения 11.04.18).
9. Dib C, Fauré S, Fizames C, Samson D, Drouot N, Vignal A, Millasseau P, Marc S, Hazan J, Seboun E, Lathrop M, Gyapay G, Morissette J, Weissenbach J. A

comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature*. 1996. С. 152-154 DOI:10.1038/380152a0

10. Доржиев А. Б. Иммунопатогенетические аспекты развития устойчивости к антибактериальным препаратам у больных туберкулезом легких и возможные пути ее преодоления Научная библиотека диссертаций и авторефератов disserCat. 2006. <http://www.dissercat.com/content/immunopatogeneticheskie-aspekty-razvitiya-ustoichivosti-k-antibakterialnym-preparatam-u-boln#ixzz5CLg2znrk>

11. Новицкий В.В., Стрелис А.К., Уразова О.И., Воронкова О.В., Ткаченко С.Б., Синицына В.А., Филлюк О.В., Земляная Н.А., Шилько Т.А., Есимова И.Е., Перевозчикова Т.В. Особенности функциональной активности лимфоцитов крови у больных туберкулезом легких // *Иммунология*. 2006. № 2. С. 76–79. <https://elibrary.ru/item.asp?id=9431971>

References

1. World Health Organization/ Tuberculosis country profiles. 2018 <http://www.who.int/tb/country/data/profiles/ru/>

2. Urazova O.I.1, Novitsky V.V.1, Churina E.G.1. Cytokine status in patients with pulmonary tuberculosis with multiple drug resistance // *Russian journal of immunology*. 2011, Т.5 (14), № 3-4. С. 244-253 <https://elibrary.ru/item.asp?id=22367111>

3. Ribeiro, M. S. M., Pacheco, R. B. A., Fischer, R. G., & Macedo, J. M. B. Interaction of IL1B and IL1RN polymorphisms, smoking habit, gender, and ethnicity with aggressive and chronic periodontitis susceptibility // *Contemporary Clinical Dentistry*. 2016. С. 349–356. URL://<http://doi.org/10.4103/0976-237X.188560>

4. Saha A, Dhir A, Ranjan A, Gupta V, Bairwa N, Bamezai R. Functional IFNG polymorphism in intron 1 in association with an increased risk to promote sporadic breast cancer // *Immunogenetics*. 2005. <https://doi.org/10.1007/s00251-005-0783-5>

5. Umapathy D, Krishnamoorthy E, Mariappanadar V, Viswanathan V, Ramkumar KM. Increased

levels of circulating (TNF- α) is associated with (-308G/A) promoter polymorphism of TNF- α gene in Diabetic Nephropathy. *Int J Biol Macromol*. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.078>

6. Pravica V, Asderakis A, Perrey C, Hajeer A, Sinnott PJ, Hutchinson IV. In vitro production of IFN-gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-gamma gene *Eur J Immunogenet*. 1999. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2370.1999.00122.x>

7. Bikmaeva AR, Sibiriak SV, Valiakhmetova DKh, Khusnutdinova EK. Polymorphism of the tumor necrosis factor alpha gene in patients with infiltrative tuberculosis and from the Bashkorstan populations]. *Mol Biol (Mosk)*. 2002 Sep-Oct;36(5):784-7. Russian. PubMed PMID: 12391840. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12391840>

8. Sharma, S., Rathored, J., Ghosh, B., & Sharma, S. K.. Genetic polymorphisms in TNF genes and tuberculosis in North Indians // *BMC Infectious Diseases*. 2010. URL://<http://doi.org/10.1186/1471-2334-10-165> (дата обращения 11.04.18).

9. Dib C, Fauré S, Fizames C, Samson D, Drouot N, Vignal A, Millasseau P, Marc S, Hazan J, Seboun E, Lathrop M, Gyapay G, Morissette J, Weissenbach J. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature*. 1996. С. 152-154 DOI:10.1038/380152a0

10. Dorzhiev A. B. Immunopathogenetic aspects of development of resistance to antibacterial drugs in patients with pulmonary tuberculosis and possible ways to overcome it Scientific library of dissertations and abstracts disserCat. 2006. <http://www.dissercat.com/content/immunopatogeneticheskie-aspekty-razvitiya-ustoichivosti-k-antibakterialnym-preparatam-u-boln#ixzz5CLg2znrk>

11. Novitskiy V.V.1, Strelis A.K.1, Urazova O.I.1, Voronkova O.V.1, Tkachenko S.B.2, Sinitsyna V.A.1, Filinyuk O.V.1, Zemlyanaya N.A.1, Shilko T.A.1, Esimova I.E.1, Perevozchikova T.V. The features of blood lymphocyte functional activity in pulmonary tuberculosis patients // *Immunology*. 2006. № 2. С. 76–79. <https://elibrary.ru/item.asp?id=9431971>

ASSOCIATION OF CYTOKINE GENES POLYMORPHISMS
WITH PULMONARY TUBERCULOSIS

© L.A. Nikitina¹, A.M. Khuziakhmetova², L.Ya. Borodina³, P.M. Alekseev⁴,
R.A. Davyidov⁴, H.K. Aminev⁴, A.S. Karunas⁵, M.M. Yunusbaeva^{1,5}

¹ Bashkir State Pedagogical University M. Akmullah,
3a, ulitsa Oktyabrskoy Revolyutsii, 450008, Ufa, Russian Federation

² Bashkir State University,
32, ulitsa Zaki Validi, 450076, Ufa, Russian Federation

³ Republican Clinical Antituberculous Dispensary,
4, ulitsa S.Agisha, 450080, Ufa, Russian Federation

⁴ Bashkir State Medical University,
3, ulitsa Lenina, 450077, Ufa, Russian Federation

⁵ Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Centre,
Russian Academy of Sciences,
71, prospect Octyabrya, 450054, Ufa, Russian Federation

We analyzed the polymorphic variants of cytokine genes rs1800629 TNFA (-308G> A), rs16944 IL1B (-511C> T), IL1RN (VNTR) and IFNG (VNTR) in pulmonary tuberculosis patients and healthy control in the Republic of Bashkortostan. We analyzed the association of candidate genes polymorphism with the disease and revealed genetic markers for the development of complications. This study confirms a significant association of *VNTR IFNG* gene with pulmonary tuberculosis. We identified the association of the allele *IFNG*15* with the risk of development of pulmonary tuberculosis.

Key words: pulmonary tuberculosis, gene polymorphism, cytokine.

УДК 581.1

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-4-3-107-114

**НАКОПЛЕНИЕ И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ НЕОРГАНИЧЕСКИХ ИОНОВ В ТКАНЯХ ОРГАНОВ
ГАЛОФИТА *SUAEDA ALTISSIMA*(L.)PALL. В УСЛОВИЯХ ЗАСОЛЕНИЯ**

© Ю.В. Орлова, О.В. Майорова, Л.А. Халилова, Н.А. Мясоедов,
О.И. Неделева, Л.Г. Попова, Ю.В. Балнокин

Эугалофиты в условиях засоления способны накапливать ионы Na^+ и Cl^- до концентраций, значительно превышающих таковые в почвенных растворах. Неорганические ионы рассматриваются как «дешевые осмотики», снижающие водный потенциал вакуолярного сока и позволяющие растению поглощать воду даже в условиях отсутствия транспирации. В работе исследовано содержание Na^+ , K^+ и Cl^- в органах (корень, корневая шейка, стебель, лист) галофита *Suaeda altissima*(L.)Pall. в условиях засоления, а также распределение этих ионов по тканям. Растения выращивали в питательном растворе, содержащем NaCl в разных концентрациях (3, 100, 250, 500, 750 мМ). Повышение концентрации соли в питательном растворе приводило к увеличению содержания Na^+ и Cl^- во всех органах. Ионов Na^+ в стебле и листе накапливалось значительно больше, чем в корне. Ионов Cl^- больше всего содержалось в корневой шейке, немного меньше этого иона было в стеблях и листьях, меньше всего Cl^- накапливалось в корне. Содержание K^+ в побеге снижалось, а в корне не сколько возрастало при увеличении концентрации NaCl в питательном растворе. Методом рентгеновского микроанализа продемонстрировано дифференциальное распределение элементов Na, Cl и K по тканям разных органов *S. altissima*. В корне, во всех вариантах опыта, элементов K и Cl в больше всего оказалось в протопластах клеток коры, эпидермы и клеток центрального цилиндра. Na был преимущественно локализован в апопласте этих тканей, как при низких, так и высоких концентрациях NaCl в питательном растворе. В корневой шейке Na и Cl были найдены в сильно утолщенных клеточных стенках волокон либриформа, в стенках и просветах сосудов ксилемы, а также в наружных слоях перидермы. В отсутствие засоления в клетках перидермы и сердцевины вместо натрия накапливался калий. В побеге элементы Na и Cl были локализованы преимущественно в сердцевине стебля и водоносной паренхиме листа, что может указывать на защитную функцию этих тканей. В целом, клетки всех органов и тканей *S. altissima*, накапливая натрий и хлор, сохраняли жизнеспособность в условиях сильного засоления. Обсуждается организация транспортных потоков ионов в системе целого растения у *S. altissima*.

ОРЛОВА Юлия Викторовна – к.б.н., Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН,
e-mail: orl-jul@mail.ru

МАЙОРОВА Ольга Викторовна, Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, e-mail: oli-ifr.ran@mail.ru

ХАЛИЛОВА Людмила Абдулгалиевна – к.б.н., Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, e-mail: lhalilova@mail.ru

МЯСОЕДОВ Николай Александрович – к.б.н., Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, e-mail: aridland@mtu-net.ru

НЕДЕЛЯЕВА Ольга Игоревна, Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН,
e-mail: olga.nedelyaeva@yandex.ru

ПОПОВА Лариса Геннадьевна – д.б.н., Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН,
e-mail: lora_gp@mail.ru

БАЛНОКИН Юрий Владимирович – д.б.н., Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Московский Государственный университет им. М. В. Ломоносова, e-mail: balnokin@mail.ru

Ключевые слова: X-гау микроанализ, распределение элементов, ионы Na^+ , K^+ и Cl^- , галофиты, апопласт, солеустойчивость, *Suaeda altissima*.

Введение. Эугалофиты характеризуется интенсивным ростом при высоком содержании Na^+ и Cl^- в надземных органах. Особенностью этих растений является градиентное распределение ионов в системе почва-корень-побег [1,2]. Накопление Na^+ и Cl^- приводит к повышению осмотического давления вакуолярного сока, что снижает его водный потенциал, и обеспечивает поглощение воды даже в отсутствие транспирации [3]. Высокое содержание Na^+ и Cl^- в побегах галофитов предполагает значительные нетто-потоки этих ионов в восходящем направлении. Дифференциальное распределение Na^+ и Cl^- в тканях надземных органов происходит в соответствии с потребностью растения поддерживать осмотические градиенты и избегать накопления Na^+ и Cl^- в активно метаболизирующих частях растения. В растениях транспорт ионов может происходить от клетки к клетке, как по симпласту, так и с участием ионных каналов и транспортеров, а также по апопласту [1]. При транспорте по апопласту клеток эпидермы и коры боковых корней ионы могут быстро доставляться в надземные органы, минуя эндодермальную барьер [4].

В нашей работе мы исследовали распределение ионов Na^+ , Cl^- и K^+ в органах и тканях соленакпливающего галофита *Suaeda altissima* при разных уровнях засоления питательного субстрата.

Материалы и методы. Растения *Suaeda altissima*(L.) Pall. выращивали в условиях водной культуры в питательном растворе Робинсона и Даунтона [5], в который был добавлен NaCl в конечных концентрациях 3, 100, 250, 500 или 750 мМ. Из сухого растительного материала органов растений (корень, корневая шейка, стебель, лист), выращенных при разных концентрациях NaCl в питательном растворе, получали водные экстракты, в которых измеряли содержание Na^+ , K^+ и Cl^- с помощью пламенного фотометра. Распределение ионов по тканям органов изучали с помощью рентгеновского микроанализа, совмещенного со сканирующей электронной микроскопией (СЭМ). Для каждого варианта эксперимента было проанализировано не

менее 3-х поперечных срезов органов, взятых от разных растений, и не менее 3-х локальных зон на срезе для каждой ткани.

Результаты. Было исследовано содержание Na^+ , K^+ и Cl^- в вегетативных органах *S. altissima* (корень, стебель, лист), а также в корневой шейке (переходная зона между главным корнем и стеблем) при возрастающих концентрациях NaCl в питательном растворе в диапазоне 3 – 750 мМ (рис. 1). С повышением наружной концентрации соли содержание ионов Na^+ и Cl^- во всех органах и корневой шейке возрастало, содержание K^+ в побеге снижалось, а в корнях возрастало. Самое высокое содержание Na^+ наблюдалось в листьях (760 ммоль kg^{-1} сырой массы) и стеблях (680 ммоль kg^{-1} сырой массы) при 750 мМ NaCl в питательном растворе. Несколько меньше накапливалось Na^+ в корневой шейке и существенно меньше в корнях. Растения *S. altissima* аккумулировали также ионы Cl^- . Содержание Cl^- превышало содержание Na^+ в корнях и корневой шейке при всех концентрациях NaCl в питательной среде. Самое высокое содержание Cl^- было обнаружено в корневой шейке (около 700 ммоль kg^{-1} сырой массы при 750 мМ NaCl), немного меньше этого иона было в стеблях и листьях. Меньше всего Cl^- накапливалось в корнях (340 ммоль kg^{-1} сырой массы при 750 мМ NaCl).

Исследование поперечных срезов органов с помощью сканирующего электронного микроскопа, совмещенного с рентгеноспектральным микроанализатором, выявило распределение элементов Na , Cl и K в тканях органов *S. altissima* (рис. 2-6).

Все три элемента были неравномерно распределены по тканям корня, корневой шейки, стебля и листа *S. altissima*. Особенно отчетливо это выявилось при высокой концентрации NaCl в питательном растворе (750 мМ). Элементное картирование поперечного среза бокового корня с типичным первичным анатомическим строением показало, что содержание Na , Cl и K в коре и эпидерме выше, чем в центральном цилиндре. При этом натрий обнаруживался в большей степени в клеточных стенках, чем в протопластах,

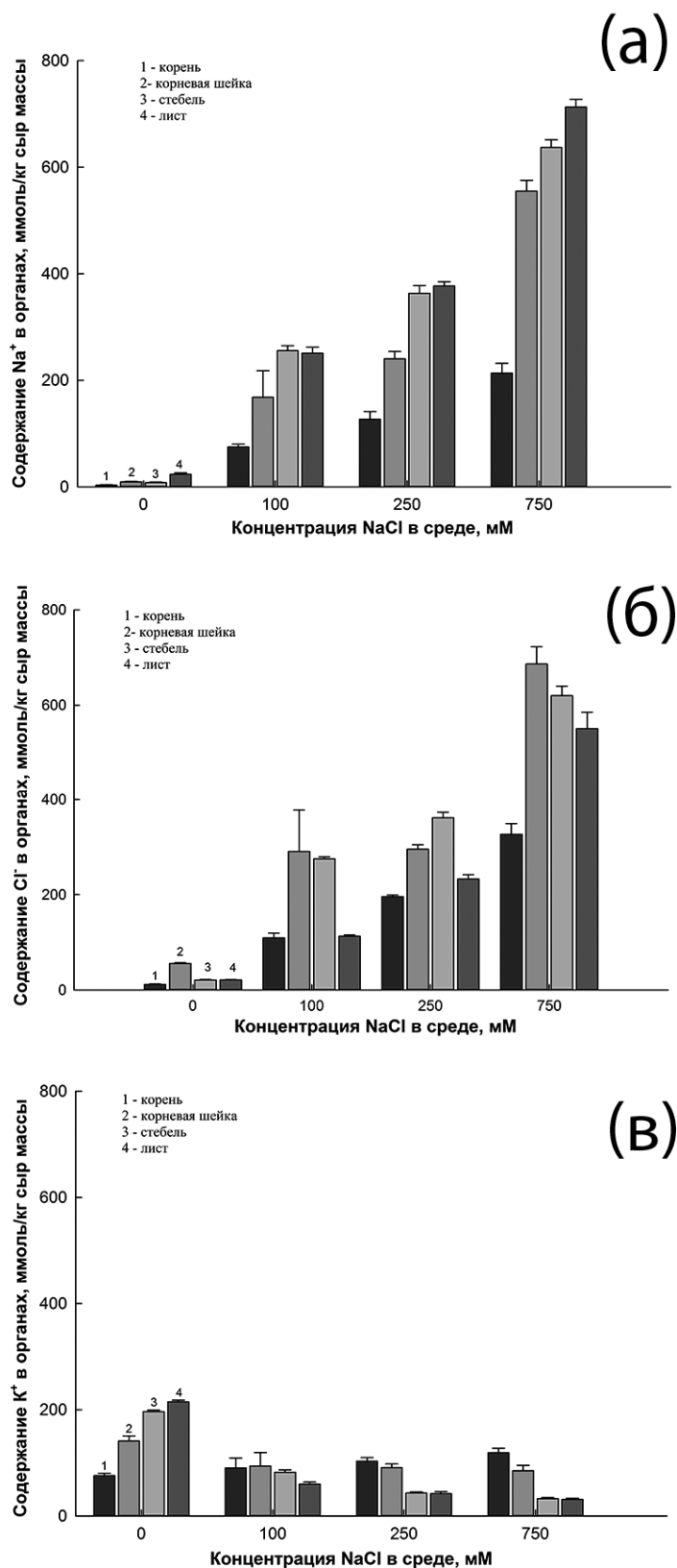


Рис. 1. Содержание ионов Na^+ (а), Cl^- (б), K^+ (в) в органах *S. altissima* в зависимости от концентрации NaCl в среде. На графиках представлены средние значения и их стандартные ошибки

несмотря на высокий уровень засоления питательного раствора (750 мМ NaCl) (рис. 2). Хлора и калия, наоборот, было больше в протопластах и меньше в клеточных стенках. В стеле корня натрий содержался преимущественно в стенках ксилемных сосудов, а хлор и калий обнаружили как в стенках, так и в просветах сосудов.

Корень и стебель разделены переходной зоной – гипокотилем, по длине которого происходит постепенное изменение проводящей системы от корневого к стеблевому строению [6]. Картирование элементов проводили в базальной части гипокотилия (для топографического обозначения этой зоны используют термин «корневая шейка»).

На поперечном срезе большая часть центральной зоны корневой шейки занята механическими клетками либриформа и сосудами вторичной ксилемы (рис. 3-4). Na, Cl и K находились в сильно утолщенных клеточных стенках волокон либриформа (рис. 4), а также в стенках и просветах сосудов ксилемы.

По мере повышения уровня засоления содержание Na и Cl в этих тканях возрастало. Na и Cl в больших количествах присутствовали также в наружных слоях перидермы (вторичная покровная ткань, состоящая из феллогена, феллемы и феллодермы) (рис. 3). Особенно много в перидерме содержалось Cl. В центре корневой шейки расположены сосуды первичной ксилемы, однако при переходе от корня к стеблю на этом месте появляются паренхимные клетки сердцевинны, и объем, занимаемый этой тканью, постепенно увеличивается. Для этих клеток было характерно высокое содержание Cl и Na при засолении. Содержание калия также было более высоким в перидерме и сердцевине, чем в области, содержащей проводящие элементы. Способность клеток перидермы и сердцевинны накап-

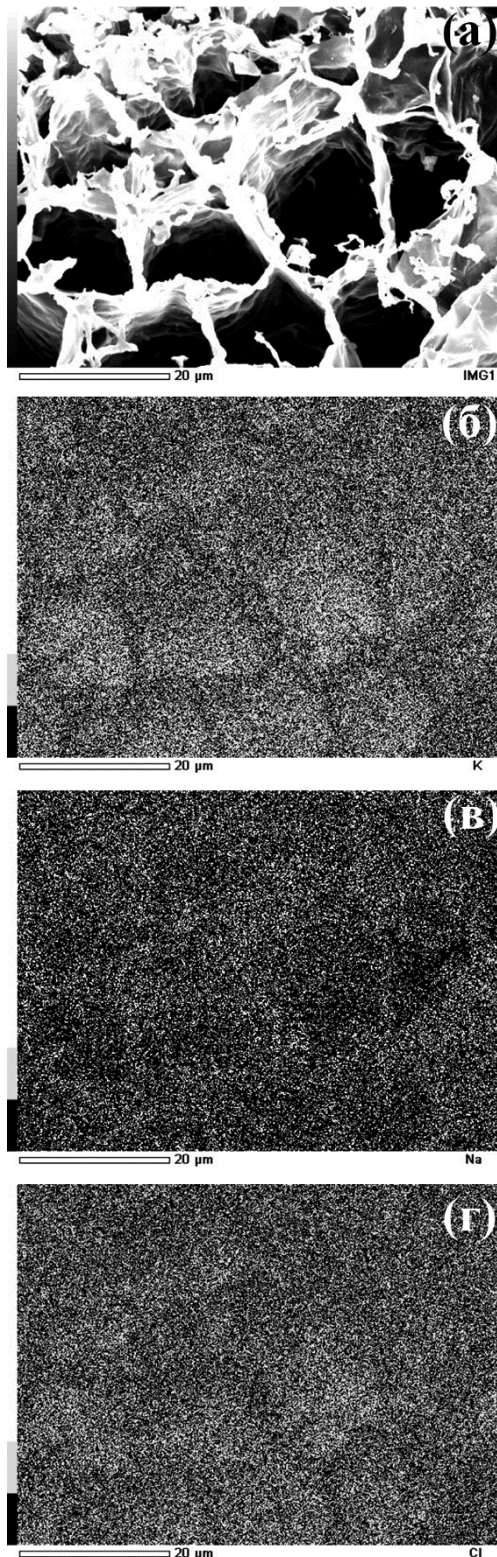


Рис. 2. Картирование элементного состава (Na, Cl и K) поперечного среза корня *S. altissima* (клетки коры) с помощью рентгеновского микроанализа, совмещенного с СЭМ. Растения выращены в условиях водной культуры, содержащей 750 мМ NaCl. (а) – изображение СЭМ, (б) – изображение K, (в) – изображение Na, (г) – изображение Cl

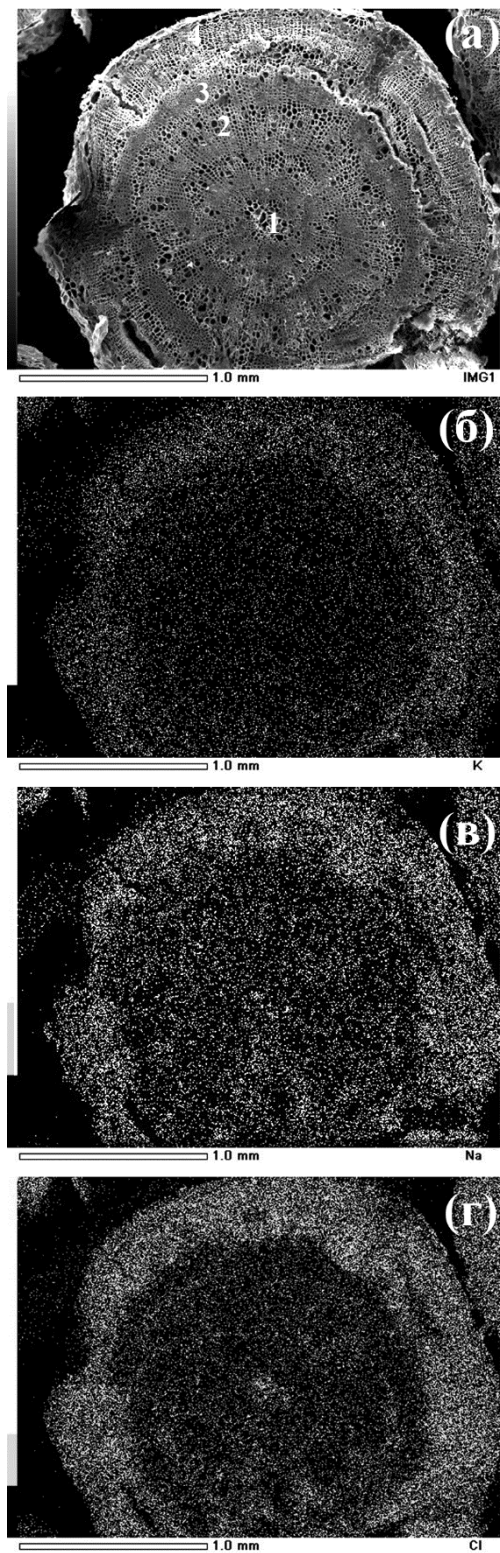


Рис. 3. Картирование элементного состава (Na, Cl и K) поперечного среза корнерневой шейки *S. altissima* с помощью рентгеновского микроанализа, совмещенного с СЭМ. Растения выращены в условиях водной культуры, содержащей 750 мМ NaCl. (а) – изображение СЭМ, (б) – изображение K, (в) – изображение Na, (г) – изображение Cl. 1 – сердцевина, 2 – сосуды вторичной ксилемы, 3 – волокна либриформа, 4 – перидерма

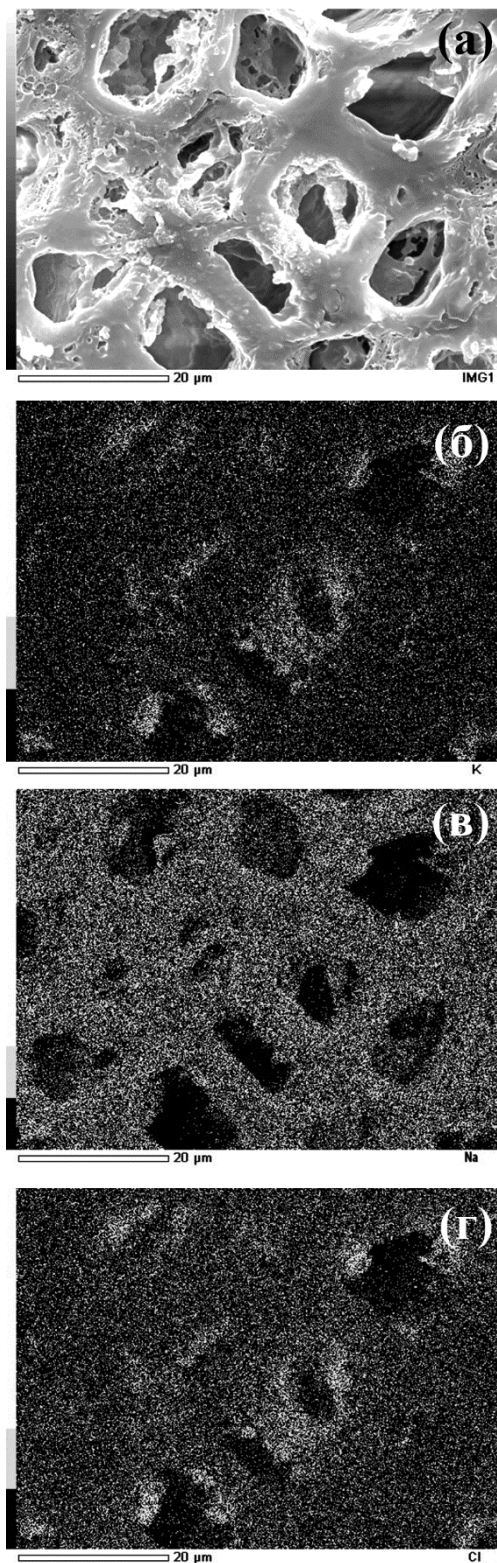


Рис. 4. Картирование элементного состава (Na, Cl и K) поперечного среза корнерневой шейки *S. altissima* (волокна либриформа) с помощью рентгеновского микроанализа, совмещенного с СЭМ. Растения выращены в условиях водной культуры, содержащей 750 мМ NaCl. (а) – изображение СЭМ, (б) – изображение K, (в) – изображение Na, (г) – изображение Cl

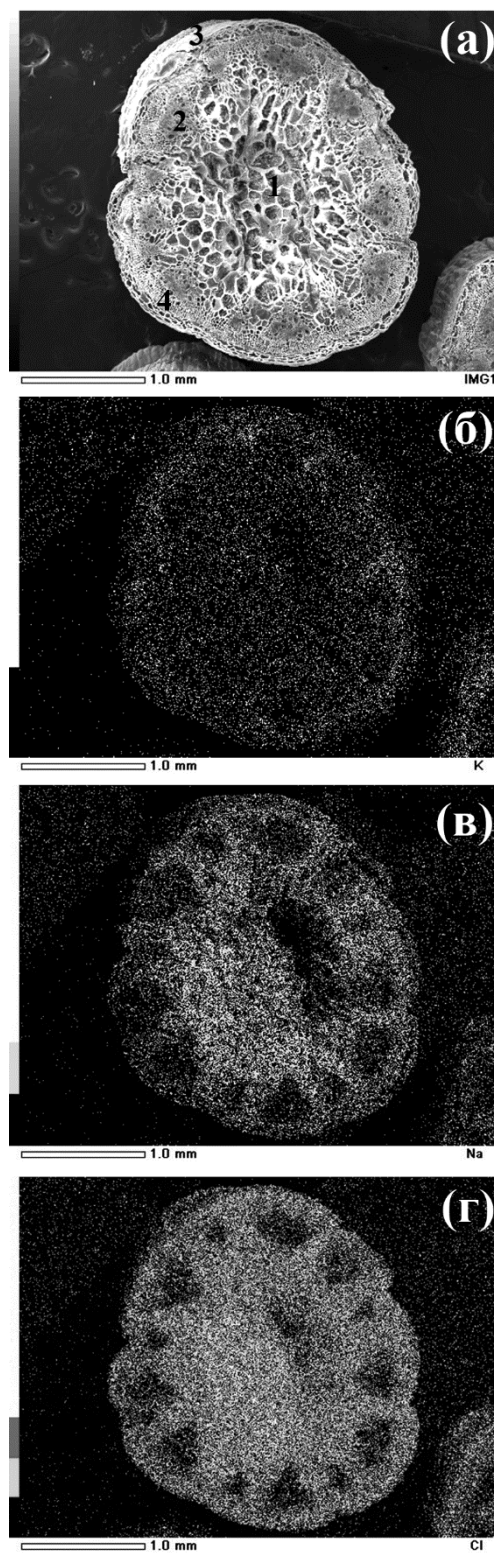


Рис. 5. Картирование элементного состава (Na, Cl и K) поперечного среза стебля *S. altissima* с помощью рентгеновского микроанализа, совмещенного с СЭМ. Растения выращены в условиях водной культуры, содержащей 750 мМ NaCl. (а) – изображение СЭМ, (б) – изображение K, (в) – изображение Na, (г) – изображение Cl. 1 – сердцевина, 2 – проводящий пучок, 3 – покровные ткани, 4 – первичная кора

ливать К особенно хорошо видна в отсутствие NaCl в питательном растворе (данные не приведены).

Крупными хорошо вакуолизированными паренхимными клетками сердцевины представлена значительная часть объема стебля *S. altissima* (рис.5).

По периферии стебля расположены проводящие пучки, снаружи к которым примыкают первичная кора и эпидерма. В стебле при всех уровнях засоления питательного раствора больше всего элементов Na, Cl и K находилось в клетках сердцевины, несколько меньше в покровных тканях и коре.

Игольчатой формы листья *S. altissima* имели типичное коронарно-сведоидное анатомическое строение (рис. 6). У растений, выращенных при низких значениях NaCl в питательном растворе, натрия больше всего было в хлоренхимной обкладке и наружных тканях листа (мезофилл + эпидерма) (данные не приведены).

При 750 мМ NaCl в питательном растворе самое высокое содержание Na было найдено также в хлоренхимной обкладке и в водоносной паренхиме. Содержание Cl в водоносной паренхиме растений, выращенных как при высокой, так и при низкой концентрациях NaCl, существенно превышало таковое в других тканях. Меньше всего Cl было обнаружено в мезофилле и эпидерме. Распределение K по тканям листа имело такое же распределение, как Cl. Исключение составила хлоренхимная обкладка, обнаружившая при 750 мМ NaCl наименьшее содержание калия.

Обсуждение. Исследование содержания и распределения ионов в органах и тканях *S. altissima* показало, что в целом клетки всех органов этого растения, сохраняя жизнеспособность в условиях сильного засоления, аккумулируют Na^+ и Cl^- . Способность растений сохранять при этом K^+ в клетках и поддерживать относительно высокие значения отношения K/Na свидетельствуют о способности растения эффективно поддерживать ионный гомеостаз [7]. Засоление приводило к снижению содержания K^+ в надземных органах *S. altissima*, однако в корнях содержание K^+ возрастало (до значений более, чем 200 ммоль kg^{-1} сырой массы) по мере увели-

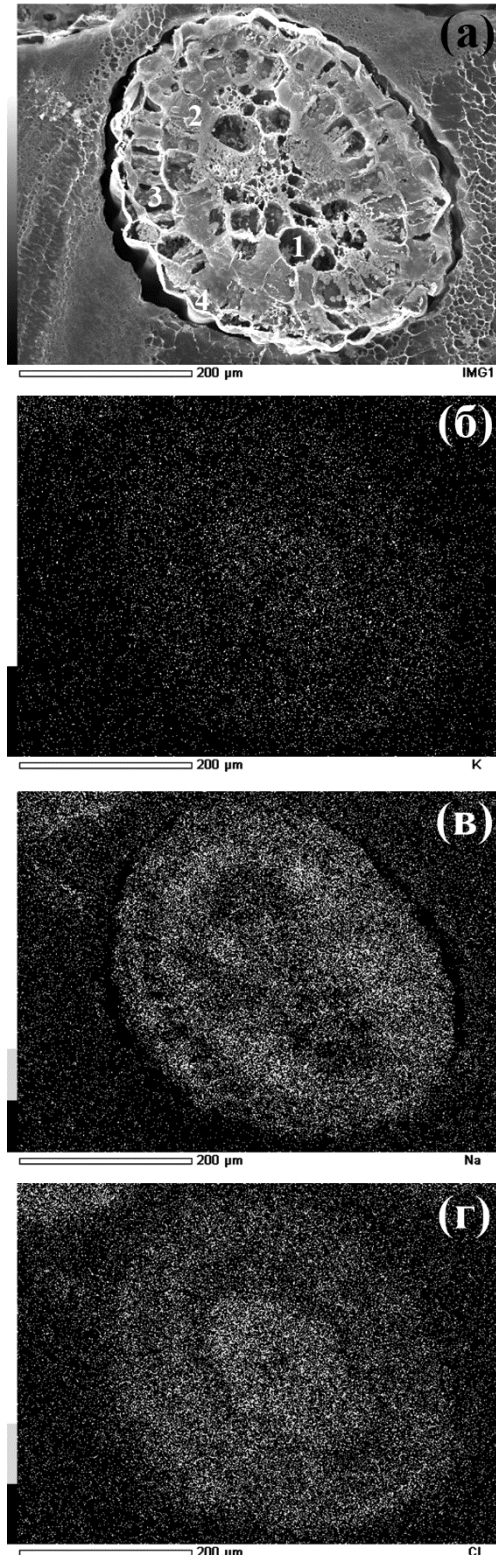


Рис. 6. Картирование элементного состава (Na, Cl и K) поперечного среза листа *S. altissima* с помощью рентгеновского микроанализа, совмещенного с СЭМ. Растения выращены в условиях водной культуры, содержащей 750 мМ NaCl. (а) – изображение СЭМ, (б) – изображение К, (в) – изображение Na, (г) – изображение Cl. 1 – водоносная паренхима, 2 – клетки обкладки, 3 – мезофилл, 4 – эпидермис

чения концентрации NaCl в питательном растворе. Рентгеновский микроанализ показал, что K, а также Cl, преимущественно локализованы в протопластах клеток коры, эпидермы и клеток центрального цилиндра корня во всех вариантах опыта, тогда как Na – в апопласте корня. С учетом этого реальные значения отношений K/Na в протопластах клеток корня *S. altissima* должны иметь более высокие значения, чем рассчитанное, по среднему содержанию этих элементов в корнях (0,5). У растений-галофитов высокие концентрации Na⁺ в наружной среде вызывают деполяризацию плазмалеммы, что приводит к утечке K⁺ из клеток через активированные деполяризацией каналы. Рост содержания K⁺ в клетках корня *S. altissima* по мере увеличения засоления может объясняться особенностями функционирования ион-транспортующих систем плазматической мембраны у этого галофита. В частности, высокая активность H⁺-АТФазы плазмалеммы клеток коры и эпидермы корня может поддерживать электрический потенциал на уровне, препятствующем потере ионов K⁺ клеткой [8]. Высокая активность H⁺-АТФазы обеспечивает также выведение Na⁺ из клетки с помощью Na⁺/H⁺ антипортера, что снижает концентрации этого токсического иона в цитоплазме и повышает в апопласте. Дальнейший транспорт Na⁺ в надземные органы, может осуществляться по апопласту, минуя эндодермальный барьер корня. Известно, что барьерные свойства эндодермы при росте растений на засоленном субстрате усиливаются [9]. Мы предположили, что у *S. altissima* в боковых корнях транспорт Cl⁻ и Na⁺ в аксиальном направлении осуществляется не только по ксилеме, т.е. путем, контролируемым эндодермой, но и по апопласту тканей, лежащих снаружи от эндодермы, т.е. по апопласту эпидермы и коры. При этом ионы Cl⁻ и Na⁺ из апопласта эпидермы и коры боковых корней, по-видимому, могут беспрепятственно проникать в ксилему главного корня, поскольку рост боковых корней осуществляется из перидикла главного корня, который расположен с внутренней стороны от эндодермы, и транспортироваться дальше в надземные органы.

Относительно высокое содержание Na⁺ и Cl⁻ в некоторых тканях, таких, например, как

сердцевина стебля и водоносная паренхима листа, может указывать на защитную функцию этих тканей. Депонирование Na⁺ и Cl⁻ в их клетках в условиях засоления может снижать содержание этих ионов в тканях, несущих высокую метаболическую нагрузку, и таким образом предотвращать токсическое действие этих ионов. Полученные данные свидетельствуют в пользу существенного вклада клеточных стенок эпидермы и коры корня в транспорт Na⁺ и Cl⁻ в надземные органы, а также в пользу того, что в стебле происходит ионная разгрузка ксилемы в клетки сердцевины. Преодолевшие эндодермальный барьер ионы движутся с транспирационным током в надземные органы, Cl⁻ и K⁺ преимущественно по сосудам ксилемы, Na⁺ по стенкам ксилемных сосудов и клеточным стенкам паренхимы центрального цилиндра. Наличие Cl⁻ и K⁺ в протопластах разных тканей корня и надземных органов свидетельствует о том, что транспорт Cl⁻ и K⁺ в корне в надземные органы происходит не только по апопласту, но и по симпласту. Ионы натрия продемонстрировали высокое «средство» к клеточным стенкам и стенкам ксилемных сосудов во всех исследованных органах. Вместе с тем, они были найдены в протопластах фотосинтезирующих тканей листа, хлоренхимной обкладки и мезофилла. *S. altissima* относится к C4 растениям. Na⁺ в этих тканях, возможно, выполняет роль противоиона для аспартата [10].

ЛИТЕРАТУРА

1. Балнокин Ю.В. Растения в условиях стресса. В: Физиология растений. Учебник для студентов вузов, Ермаков И.П. (ред.), 2-е изд., М.: Изд. центр «Академия». 2007. С. 510-585.
2. Головатый В.Г., Шамсутдинов Н.З., Худякова Х.К., Балнокин Ю.В., Горячева Н.Ю. Влияние доз азота, фосфора, калия и засоления на продуктивность галофитов// Агрехимия. 2007. № 6. С. 50-56.
3. Балнокин Ю.В., Котов А.А., Мясоедов Н.А., Хайлова Г.Ф., Куркова Е.Б., Луньков Р.В., Котова Л.М. Участие дальнего транспорта Na⁺ в формировании градиента водного потенциала в системе средокорень-лист у галофита *Suaeda altissima*. // Физиология растений. 2005. Т. 52. С. 549-557.
4. Faiyue B., Al-Azzawi M. J., Flowers T. J. A new screening technique for salinity resistance in rice (*Oryza*

sativa L.) seedlings using bypass flow // Plant Cell Environ. 2012. V. 35. P. 1099-1108.

5. Robinson S.P., Downton W.J.S. Potassium, sodium and chloride ion concentration in leaves and isolated chloroplasts of the halophyte *Suaeda australis* R. Br. // Austr. J. PlantPhysiol. 1985. V.12. P. 471 - 478.

6. Марков М. В., Юсуфова В. З. Начальные этапы развития корневых систем у трех видов недотрог *impatiens*. (Balsaminaceae) // Онтогенез. 2013. Т. 44. С. 280 - 286.

7. Балнокин Ю.Б. Ионный гомеостаз и солеустойчивость растений. М.: Наука.2012. 99 с.

8. Demidchik V., Maathuis F. Ion channels and plant stress responses. Heidelberg: Springer. 2010. P. 23-46.

9. Krishnamurthy P., Ranathunge K., Franke R., Prakash H.S., Schreiber L., Mathew M.K. The role of root apoplastic transport barriers in salt tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) // Planta.2009. V. 230. P.119-34.

10. Rosnow J. J., Edwards G. E., Roalson, E. H. Positive selection of Kranz and non-Kranz C4 phosphoenolpyruvate carboxylase amino acids in *Suaedoideae* (Chenopodiaceae) // Journal of Experimental Botany. 2014. 65(13). P. 3595 - 3607.



ACCUMULATION AND DISTRIBUTION OF INORGANIC IONS IN THE TISSUES OF HALOPHYTE *SUAEDA ALTISSIMA* (L.)PALL. IN THE CONDITIONS OF SALINIZATION

© Y.V. Orlova¹, O.V. Majorova¹, L.A. Khalilova¹, N.A. Myasoedov¹,
O.I. Nedelyaeva¹, L.G. Popova¹, Y.V. Balnokin^{1,2}

¹ Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences,
35, ulitsa Botanicheskaya, 127276, Moscow, Russian Federation

² Lomonosov Moscow State University,
1, Leninskie Gory, 119234, Moscow, Russian Federation

Under salinity euhalophytes accumulate in the vegetative organs a significant amount of inorganic ions (Na⁺, Cl⁻), to concentrations exceeding those in the soil solution. In this case, inorganic ions are considered as "cheap osmotics", which reduce the water potential of the vacuolar juice and allow the plant to soak up water even in the absence of transpiration. Accumulation of Na⁺, K⁺ and Cl⁻ in the organs (root, root neck, stem, leaf) of halophyte *Suaeda altissima* (L.) Pall was studied. The distribution of these ions in the different organ tissues of *Suaeda* under salinity was studied as well. Plants were grown in nutrient solution containing different NaCl concentrations (3, 100, 250, 500, 750 mm). Increased salt concentration in the nutrient solution led to the accumulation of Na⁺ and Cl⁻ in all *Suaeda* organs. Significant amounts of Na⁺ ions accumulated in the stem and leaf. Substantially less Na⁺ amount accumulated in the roots. The highest Cl⁻ content was detected in the root neck, less so in stems and leaves. The least Cl⁻ amount was accumulated in the roots. The content of K⁺ in the shoot decreased and in the root slightly increased with an increase in NaCl concentration in the nutrient solution. By the method of x-ray microanalysis the differential distribution of Na, Cl and K elements in *S. altissima* organ tissues under salinity was demonstrated. In the roots, K and Cl were mostly present in the protoplasts of cortex cells, epidermis cells and central cylinder cells under all experimental conditions. Sodium was mainly localized in the apoplast of these tissue cells, even at high NaCl concentrations in the nutrient solution. In the root neck, Na and Cl were detected in highly thickened cell walls of libriform fibers, in the walls and lumens of xylem vessels and in the outer periderm layers. In the absence of salinity, potassium instead of sodium accumulated in periderm and core cells. In the shoots, Na and Cl were predominantly localized in the core of stem and in the leaf water storage tissue, which may indicate the protective function of these tissues. In total, the cells of all *Suaeda* organs, accumulating sodium and chloride, maintained viability under high salinity. The organization of ion transport flows in the whole plant system in *S. altissima* is under discussion.

Key words: X-ray microanalysis, element distribution, Na⁺, K⁺ and Cl⁻, halophytes, apoplast, salt tolerance, *Suaeda altissima*.

УДК 581.1

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-4-3-115-120

РЕАЛИЗАЦИЯ ЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ ОКСИДА АЗОТА НА РАСТЕНИЯ ПШЕНИЦЫ ПРИ НАТРИЙ-ХЛОРИДНОМ ЗАСОЛЕНИИ

© А.А. Плотников, Д.Р. Масленникова, Ч.Р. Аллагулова, Ф.М. Шакирова

Проведено исследование влияния нитропруссид натрия (SNP – sodium nitroprusside), донора оксида азота (NO), в концентрации 200 мкМ на ростовые параметры проростков пшеницы, состояние их гормональной и антиоксидантной системы в нормальных условиях произрастания и при воздействии 2%-ного NaCl. Обработка SNP продемонстрировала рост-стимулирующий и защитный эффекты на растения пшеницы в нормальных условиях произрастания и при воздействии засоления, соответственно. Важный вклад в реализацию рост-стимулирующего и защитного действия NO вносит его способность оказывать влияние на состояние гормональной системы растений пшеницы, связанное с увеличением концентрации цитокининов в нормальных условиях произрастания и предотвращением снижения уровня этих фитогормонов в условиях засоления.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., оксид азота, нитропруссид натрия, фитогормоны, устойчивость, засоление, абиотический стресс.

Введение. В естественных условиях произрастания растения постоянно испытывают влияние негативных факторов среды разной природы, к которым они вынуждены приспосабливаться. С целью повышения устойчивости культурных растений к неблагоприятным условиям внешней среды, а также для увеличения их продуктивности общепринято использовать природные и синтетические регуляторы роста, сочетающие в себе свойства рост-стимуляторов и индукторов устойчивости растений. К таковым, в частности, относится оксид азота (NO) одним из доноров которого является нитропруссид натрия (sodium nitroprusside, SNP), [1; 2]. NO является внутриклеточной сигнальной молекулой, вовлекаемой в регуляцию широкого спектра физиологических процессов на всех

этапах жизненного цикла растений [1]. Выявлено, что NO участвует в регуляции прорастания семян и корнеобразования, гравитропизма [3], устьичных движений [4], цветения, созревания плодов и процессов старения. В литературе все больше сведений накапливается о способности NO повышать устойчивость растений к стрессовым факторам, например, засухе [5], засолению [2], нарушению температурного режима и другим неблагоприятным факторам внешней среды.

Цель данной работы посвящена сравнительному анализу влияния SNP при предпосевной обработке семян пшеницы и предобработке трех-суточных проростков этим препаратом, являющимся донором NO, на устойчивость растений к натрий-хлоридному засолению.

ПЛОТНИКОВ Антон Александрович, Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,

e-mail: plotnikov87@mail.ru

МАСЛЕННИКОВА Дилара Ренатовна – к.б.н., Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,

e-mail: dishaoil@mail.ru

АЛЛАГУЛОВА Чулпан Рифовна – к.б.н., Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,

e-mail: allagulova-chulpan@rambler.ru

ШАКИРОВА Фарида Миннихановна – д.б.н., Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,

e-mail: shakirova@anrb.ru

Материалы и методы. Объектом исследования служили растения мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Салават Юлаев. В работе использовали два варианта постановки опытов.

Первый вариант опытов. Семена после стерилизации 96%-ным этанолом промывали водопроводной водой, после чего часть семян выдерживали в течение 3-х ч в воде, а вторую часть подвергали предпосевной 3-часовой обработке 200 мкМ SNP, после чего семена проращивали в кюветах на смоченной водопроводной водой фильтровальной бумаге в климатокамере при 21-23°C, 16-ч фотопериоде и освещенности 15 кЛк в течение 4-х сут. Часть необработанных и не подвергнутых предпосевной обработке 200 мкМ SNP 4-х сут изолированных от эндосперма проростков переносили в стаканы с раствором 2%-ой сахарозы служили в качестве в качестве контрольных вариантов, а другую часть необработанных или предобработанных 200 мкМ SNP проростков подвергали воздействию 2%-ного NaCl в течение 5 ч.

Второй вариант опытов. Выращенные в кюветах на смоченной водопроводной водой фильтровальной бумаге в климатокамере при 21-23°C, 16-ч фотопериоде и освещенности 15 кЛк в течение 3-х суток проростки пшеницы изолировали от эндосперма, затем их перекладывали в стаканы на раствор 2%-ной сахарозы или смесь 2%-ной сахарозы и 200 мкМ SNP на 24 ч, после чего часть растений переносили на воду, а другую часть растений - на раствор 2%-ного NaCl на разные промежутки времени. Контролем служили необработанные SNP и не подвергнутые засолению проростки.

О росте проростков судили по их длине, сырой и сухой массе, а также по митотическому индексу (МИ) апикальной меристемы корней. Оценку показателей роста проводили в 3-х биологических повторах, в каждом варианте было по 30 проростков.

Для определения митотической активности клеток меристемы корней их апикальную часть фиксировали в уксусной кислоте с этанолом (1:3) в течение 4 ч. После фиксации растительный материал промывали дистиллированной водой и обрабатывали в течение 1 ч смесью пекти-

назы и целлюлазы в концентрации 5% при 37°C. Частоту митозов в 3000 клетках анализировали на окрашенных ацетокармином давленных препаратах. МИ рассчитывали как долю делящихся клеток от общего числа проанализированных клеток.

Количественную оценку свободных форм фитогормонов проводили с использованием иммуноферментного анализа (ИФА). Для этого навеску, состоящую из 10 проростков, растирали в жидком азоте и экстрагировали фитогормоны 80%-ным этанолом в течение 16 ч при 4°C. После центрифугирования в течение 10 мин при 18000 g супернатант упаривали в токе воздуха до водного остатка, в аликвоте которого определяли суммарное содержание иммунореактивных к сыворотке, полученной к цитокинину зеатинрибозиду, свободных форм цитокининов. Из оставшегося водного остатка абсцизовую (АБК) кислоту экстрагировали серным эфиром, метилировали их диазометаном и после упаривания сухой остаток растворяли в 80%-ном этаноле, в аликвоте которого определяли количество АБК. Процедура очистки и извлечения АБК, а также последовательность этапов иммуноанализа фитогормонов описаны ранее.

Генерацию O_2^- определяли акцепторным методом [6]. Для этого контрольные и опытные образцы, каждый из которых состоял из 10 проростков, инкубировали на растворе 0.025 мМ $CaCl_2$ при 30°C в течение 1 ч, после чего в раствор вносили 1 мл 10^{-3} М адреналина и через 15 мин реакцию превращения адреналина в адренехром в среде инкубирования проростков останавливали 0.05 н HCl. Оптическую плотность растворов измеряли при 490 нм.

Результаты и обсуждение. Сравнительный анализ влияния замачивания семян пшеницы в течение 3-х ч в растворе 200 мкМ SNP (опыт) на ростовые параметры 4-сут проростков выявил, что сама предпосевная предобработка SNP практически не повлияла на длину корней, однако побеги предобработанных SNP растений отличались заметно большими линейными размерами. Воздействие 2%-го NaCl в течение 5 ч также слабо повлияло на длину корней как необработанных, так и предобработанных NO растений,

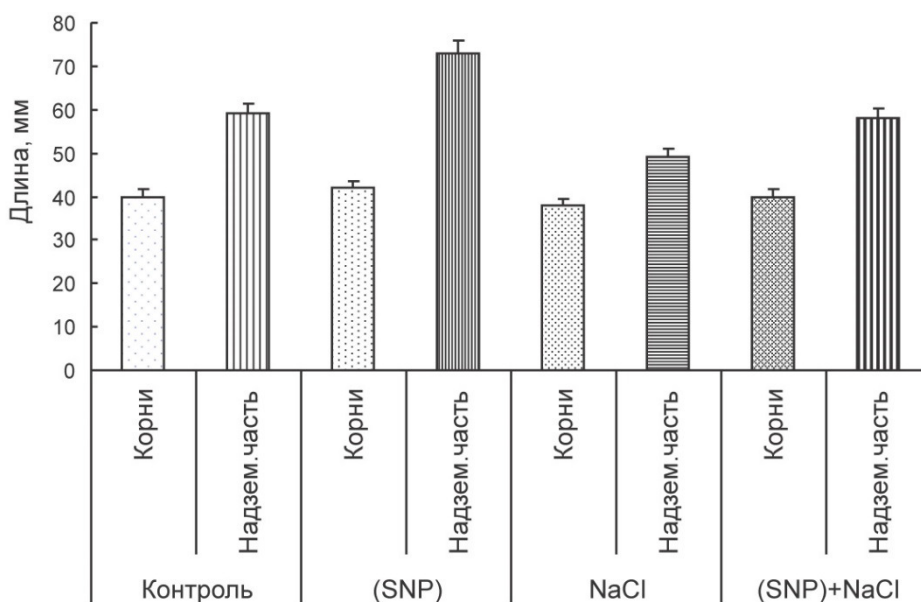


Рис. 1. Влияние 2%-ного NaCl в течение 5 ч на линейные размеры корней и побегов 4-сут необработанных и подвергнутых предпосевному 3-х часовому замачиванию семян в растворе 200 μ M SNP

при этом негативный эффект засоления проявился в торможении роста побегов, особенно заметное у необработанных NO проростков (рис. 1).

Анализ сырой и сухой массы проростков также выявил сочетание рост-стимулирующего и защитного эффекта в отношении засоления предпосевной обработки семян 200 μ M SNP, о чем судили по сырой и сухой массе проростков, как в нормальных условиях произрастания, так и при воздействии засоления, что согласуется с данными литературы [7, 8] (рис. 2).

В работе был проведен анализ эффективности применения и другого способа предобработки, а именно, 3-сут проростки пшеницы 24 ч инкубировали в растворе 2%-ной сахарозы в присутствии или отсутствии 200 μ M SNP, затем растения переносили на смесь сахарозы и 2%-ного NaCl на 5 ч, после чего перекладывали их на раствор 2%-ной сахарозы.

Данные, представленные на рис. 3, демонстрируют эффективность и этого способа предобработки 200 μ M SNP пшеницы. Так, 24-часовая предобработка 3-сут проростков SNP также способствует реализации и рост-стимулирующего, и защитного в отношении натрий-хлоридного засоления эффектов. Видно, что

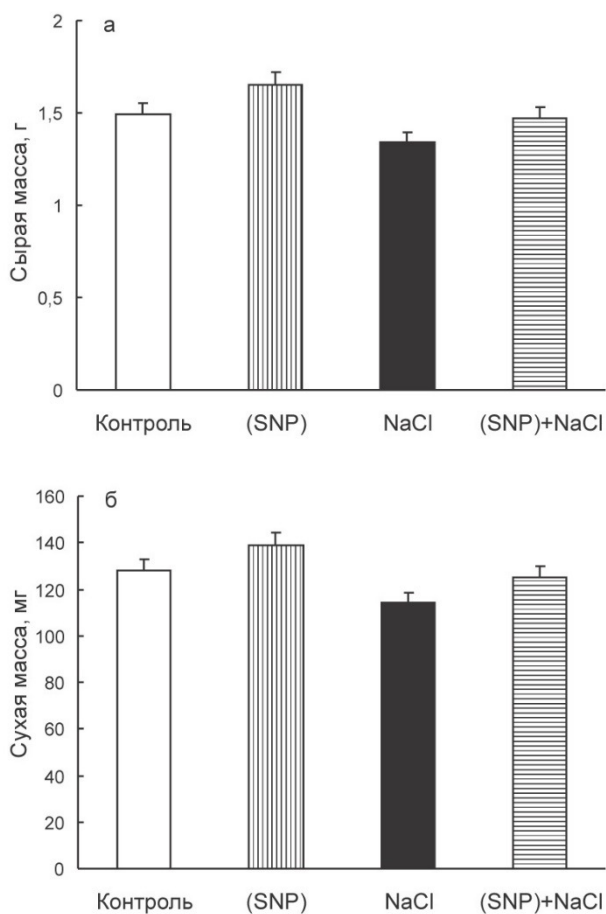


Рис. 2. Влияние 2%-ного NaCl в течение 5 ч на сырую (а) и сухую (б) сырую массу проростков 4-сут необработанных и подвергнутых предпосевному 3-х часовому замачиванию семян в растворе 200 μ M SNP

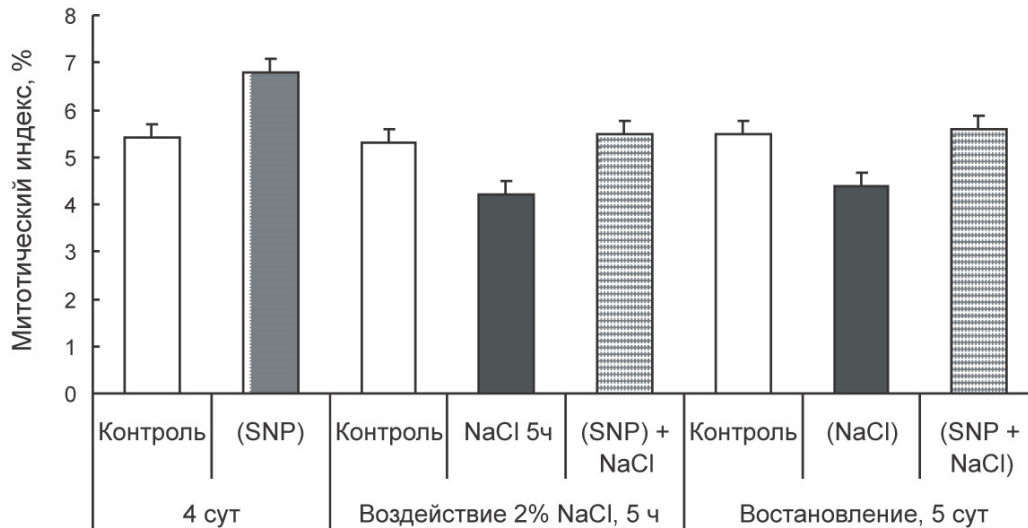


Рис. 3. Влияние 2%-ного NaCl на митотическую активность апикальной меристемы корней 4-сут необработанных и предобработанных в ходе 24 ч 200 μ M SNP проростков при воздействии 2%-ного NaCl в течение 5 ч и спустя 24 ч после стресса. Контролем служили необработанные SNP растения

24-часовая предобработка SNP стимулировала митотическую активность кончиков корней 4-сут проростков и способствовала поддержанию МИ в условиях 5-ти часового засоления, по крайней мере, на уровне контроля, а также ускорению восстановления деления клеток кончиков корней в пост-стрессовый период (рис. 3).

Известно, что ключевую роль в регуляции метаболизма растений играет гормональная система. Ранее нами было выявлено, что обработка 200 мкМ SNP, в оптимальной в стимуляции роста растений пшеницы концентрации, индуцирует почти двукратное накопление цитокининов на фоне отсутствия значимых изменений в

уровне абсцизовой кислоты (АБК) [2], что указывает в пользу важной роли эндогенных цитокининов в реализации физиологического действия NO на растения пшеницы в норме. В связи с этим нами был проведен сравнительный анализ коэффициентов отношений количественного уровня АБК к таковому цитокининов в корнях необработанных и предобработанных 200 мкМ SNP и подвергнутых натрий-хлоридному засолению в течение пяти часов, результаты которого приведены в таблице.

Полученные результаты демонстрируют сильно выраженный негативный эффект засоления на растения, о котором можно судить по коэффициентам отношений АБК к цитокининам. К характерным ответам растений к воздействию неблагоприятных факторов среды, в том числе засоления, относится быстрое и резкое накопление АБК и существенное снижение концентрации цитокининов с максимумом, приходящимся на 3 ч. Полученные данные свидетельствуют в пользу важной роли эндогенных цитокининов в реализации рост-стимулирующего эффекта SNP на проростки в нормальных условиях произрастания и защитного действия NO на растения, подвергнутых засолению.

В обычных условиях произрастания в растениях поддерживается баланс между продукцией активных форм кислорода (АФК) и их

Т а б л и ц а 1

Коэффициенты отношений содержания АБК к уровню цитокининов в корнях необработанных и предобработанных в течение 24 ч 200 мкМ SNP 4-сут проростков пшеницы в ходе воздействия засоления

Вариант опыта	1 ч	3 ч	5 ч
Контроль	6.40+0.3	7.40+0.3	7.06+0.3
2% NaCl	36.4+1.5	50.4+2.5	38.0+1.9
(SNP)+2 % NaCl	7.60+0.3	9.40+0.5	8.50+0.4

своевременной нейтрализации посредством активации антиоксидантных ферментов [9]. К характерным ответам растений на воздействие неблагоприятных факторов среды относится быстрое образование активных форм кислорода (АФК), в первую очередь, супероксид-радикала и последующее увеличение активности фермента супероксиддисмутазы (СОД), катализирующего реакцию дисмутации O_2^- в H_2O_2 [10]. Анализ концентрации O_2^- в необработанных и предобработанных 200 мкМ SNP в течение 24 ч 4-сут проростках пшеницы при воздействии 2% натрий-хлоридного засоления в течение 3 ч, результаты которого представлены на рис. 4, выявил более чем двукратное накопление супероксид-радикала относительно контроля, что демонстрирует сильно выраженный негативный эффект NaCl на растения. Предобработанные донором NO проростки и подвергнутые засолению, характеризовались существенно меньшим по уровню продукцией O_2^- что демонстрирует ярко выраженный защитный эффект оксида азота на рост растений в условиях стресса (рис. 4).

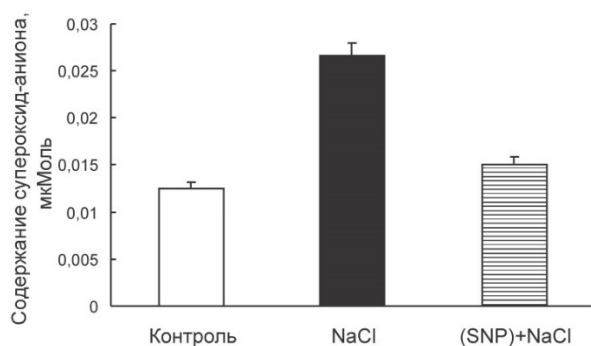


Рис 4. Влияние 2%-ного NaCl в течение 5 ч на концентрацию супероксид-аниона NO на 4-сут необработанные и предобработанные 200 мкМ SNP проростки пшеницы

Таким образом, совокупность полученных данных свидетельствует в пользу эффективности применения SNP с целью повышению устойчивости растений пшеницы к засолению среды.

Работа выполнена в рамках госзадания (№ темы АААА-А16-116020350029-1) с привлече-

нием приборного парка ЦКП «Биомика» (Отделение биохимических методов исследований и нанобиотехнологии РЦКП «Агидель») и УНУ «КОДИНК».

ЛИТЕРАТУРА

1. Мамаева А.С., Фоменков А.А., Носов А.В., Мошков И.Е., Мур Л.А. Холл М.А., Новикова Г.В. Регуляторная роль оксида азота у растений // Физиология растений. 2015. Т. 62. С. 459-474.
2. Масленникова Д.Р., Аллагулова Ч.Р., Федорова К.А., Плотников А.А., Авальбаев А.М., Шакирова Ф.М. Вклад цитокининов в реализацию рост-стимулирующего и протекторного действия оксида азота на растения пшеницы // Физиология растений. 2017. Т. 64. С. 355-362.
3. Hu X., Neill S. J., Tang Z., Cai W. Nitric oxide mediates gravitropic bending in soybean roots // Plant Physiol. // 2005. V. 137. P. 663-670.
4. Neill S., Barroso R., Bright J., Desikan R., Hancock J., Harrison J., Morris P., Ribeiro D., Wilson J. Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress // J. Exp. Bot. 2008. V. 59. P. 165-176.
5. Бояршинов А. В., Асафова Е. В. Стрессовые реакции листьев на обезвоживание: участие эндогенного NO и эффект нитропруссид натрия // Физиология растений. 2011. Т. 58. С. 891-897.
6. Bezrukova, M., Kildibekova, A., and Shakirova, F. WGA reduces the level of oxidative stress in wheat seedlings under salinity // Plant Growth Regul. 2008. V. 54. P. 195-201.
7. Zheng Ch., Jiang D., Liu F., Daia T., Liu W., Jing Q., Cao W. Exogenous nitric oxide improves seed germination in wheat against mitochondrial oxidative damage induced by high salinity // Environ. Exp. Bot. 2009. V. 67. P. 222-227.
8. Li X., Pan Y., Chang B., Wang Y., Tang Z. NO promotes seed germination and seedling growth under high salt may depend on EIN3 protein in Arabidopsis // Front. Plant Sci. 2016. V. 6. 1203.
9. Ahmad P., Sarwat M., Sharma S. Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants // J. Plant Biol. 2008. V. 51. P. 167-173.
10. Kaminska-Roitek E., Pukacki P. 2004. Effect of water deficit on oxidative stress and degradation of cell membranes in needles of Norway spruce (Picea abies) // Acta Physiol. Plant. V. 26. P. 431-442.



**REALIZATION OF PROTECTIVE ACTION OF NITRIC OXIDE ON WHEAT
PLANTS AT SODIUM-CHLORIDE SALTING**

© **A.A. Plotnikov, D.R. Maslenikova, Ch.R. Alagulova, F.M. Shakirova**

Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Centre of RAS,
71, prospect Octyabrya, 450054, Ufa, Russian Federation

The effect of sodium nitroprusside (SNP – sodium nitroprusside), donor of nitric oxide (NO) in concentration 250 μ M at two ways of processing on growth parameters of wheat germs, condition of their hormonal system, the content of endogenous NO in them, the activity of superoxide dismutase (SOD) in normal growth conditions and under the influence of 2% NaCl. A comparative analysis of the effect of SNP in both pretreatment regimens revealed an increase in stimulating and protective effects on wheat plants under normal growth conditions and under the influence of salinity, respectively. An important contribution to the realization of the growth-stimulating and protective effect of NO is made by its ability to influence the state of the hormonal system of wheat plants associated with the accumulation of cytokinin concentrations under normal growth conditions and preventing the decrease in the level of these phytohormones in conditions of salinization.

Key words: *Triticum aestivum* L., nitric oxide, sodium nitroprusside, phytohormones, resistance, growth rates – salinity.

ИЗВЕСТИЯ УФИМСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

2018. № 3(4)

ISSN 2222-8349

Свидетельство о регистрации СМИ ПИ № ФС77-41859 выдано 27 августа 2010 г. Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)

Научный журнал
Основан в 2010 году
Выходит 4 раза в год

Индекс в каталоге «Пресса России» 42156

18+

*Учредителем журнала является
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
Уфимский федеральный исследовательский центр
Российской академии наук (УФИЦ РАН)*

Главный редактор:

М.А. Ильгамов, чл.-корр. РАН

Редакционная коллегия:

В.А. Вахитов, д.б.н., Ю.В. Вахитова, чл.-корр. РАН, Д.А. Гайнанов, д.э.н.,
А.С. Гаязов, чл.-корр. РАО, Х.Н. Гизатуллин, чл.-корр. РАН,
У.М. Джемилев, чл.-корр. РАН, Е.Н. Dowell, professor, USA,
A.V. Kabanov, professor, USA, Т.К. Korpela, professor, Finland, А.Н. Лачинов, д.ф.-м.н.,
А.И. Мелентьев, д.б.н., Р.Р. Мулюков, чл.-корр. РАН, В.В. Напалков, чл.-корр. РАН,
Р.И. Нигматулин, академик, В.Н. Павлов, чл.-корр. РАН, А.В. Псянчин, д.г.н.,
В.Н. Пучков, чл.-корр. РАН, Г.С. Розенберг, чл.-корр. РАН,
В.М. Тимербулатов, чл.-корр. РАН, А.Г. Толстиков, чл.-корр. РАН,
А. Tropsha, professor, USA, С.Ф. Урманчеев, д.ф.-м.н., В.М. Фомин, академик,
Ф.Г. Хисамитдинова, д.ф.н., Э.К. Хуснутдинова, чл.-корр. РАО,
Г.Л. Шарипов, д.х.н., З.Х. Шигапов, д.б.н., Е.С. Шиховцева, д.ф.-м.н.,
М.С. Юнусов, академик, А.Б. Юнусова, д.и.н.

Адрес редакции: 450054, г. Уфа, проспект Октября, 71, каб. 207.

Телефон: (347) 284-64-33.

E-mail: izvestia@ufaras.ru

URL: <http://www.sciencerb.ru>

Ответственный секретарь: Н.В. Милицкая

Верстка: Т.И. Лукманов

Правила для авторов

В журнале «Известия Уфимского научного центра РАН» (далее Журнал) публикуются статьи по следующим научным направлениям:

- МАТЕМАТИКА и МЕХАНИКА
- ФИЗИКА
- ХИМИЯ
- БИОЛОГИЯ, БИОХИМИЯ и ГЕНЕТИКА
- МАТЕРИАЛОВЕДЕНИЕ
- НАУКИ о ЗЕМЛЕ
- ИСТОРИЯ, АРХЕОЛОГИЯ, ЭТНОЛОГИЯ
- ЭКОНОМИКА, СОЦИОЛОГИЯ, ФИЛОСОФИЯ
- ЯЗЫКОЗНАНИЕ и ЛИТЕРАТУРОВЕДЕНИЕ

Дополнительные рубрики:

- КНИЖНОЕ ОБОЗРЕНИЕ
- ИСТОРИЯ В ЛИЦАХ
- ПОРТРЕТ УЧЕНОГО
- ЮБИЛЕЙ
- ПАМЯТИ УЧЕНОГО
- ОФИЦИАЛЬНЫЙ РАЗДЕЛ

Порядок оформления статей. Объем для статей гуманитарного профиля – не более 10 страниц, для естественно-научных – не более 8 страниц, оформленных в соответствии с настоящими Правилами. Для обзорных статей допускается превышение указанного количества страниц.

В редакцию Журнала должны быть присланы в электронном виде по электронной почте текст статьи, сканированные копии Направления от организации, Экспертного заключения (образцы заполнения – на сайте Журнала). Название статьи, ФИО авторов, сведения об авторах, ключевые слова и по возможности аннотация на английском языке прилагаются отдельным файлом. Статьи могут быть представлены на русском или английском языках. Статья должна быть тщательно отредактирована. Сокращения слов не допускаются, кроме общепринятых. Аббревиатуры включаются в текст лишь после их первого упоминания с полной расшифровкой. В аббревиатурах использовать заглавные буквы. Все статьи направляются на рецензирование специалистам в данной области знаний.

Техническое оформление статей: Статья представляется в формате Microsoft Word. Допустимые расширения для файлов *.doc, *.rtf. Параметры страницы: А4, верх – 2 см, низ – 2 см, правое – 2 см, левое – 2 см; от края до колонтитула – 2 см. Шрифт Times New Roman. Кегль шрифта – 12. Межстрочный интервал 1,5. Отступ первой строки абзаца – 1,25. Все страницы должны иметь сквозную нумерацию. Кегль шрифта для аннотаций, ключевых слов и примечаний – 11.

Оформление ссылок на литературу. При оформлении библиографических ссылок, в том числе на электронные ресурсы удаленного доступа, следует придерживаться **ГОСТ Р 7.05.-2008**. Литература указывается по порядку цитирования в тексте. В научной статье количество ссылок на источники – не более 10. В обзорной статье количество ссылок на источники литературы не ограничено. Просьба авторам, по возможности, повторить список литературы, используя латинский алфавит (References). При этом статьи из журналов, имеющих переводные версии, необходимо приводить с указанием названия статьи на английском языке, журнала и выходных данных (том, номер, страницы). Для оптимизации навигации в сайтовом гипертексте в соответствии с рекомендациями Министерства образования и науки РФ по подготовке и оформлению научных статей в журналах, индексируемых в международных наукометрических базах данных, редакция рекомендует выделять нужные ссылки графически, шрифт – подчеркиванием. Гиперссылкой может стать любой элемент текста, включая изображение.

Оформление таблиц, формул, рисунков. Данные, представленные в таблицах, не должны дублировать данные рисунков и текста, и наоборот. Таблицы должны быть наглядными, иметь название и порядковый номер, заголовки должны точно соответствовать содержанию графа. На каждую таблицу должна быть сделана ссылка в статье. Все разъяснения, включая расшифровку аббревиатур, даются в сносках. Рисунки должны быть продублированы в виде отдельных файлов. Допустимые форматы – TIF и JPEG. Режим – градиент серого или битовый, разрешение не более 400 пикс/дюйм. Диаграммы – в EXCEL или WORD. Рисунки должны быть пронумерованы и подписаны. Ссылки на них в тексте обязательны. Подрисуночные подписи представить отдельным файлом с обозначением фамилии автора и названия статьи, указанием номера рисунка, с объяснением значения всех кривых, букв, цифр и других условных обозначений. В тексте статьи следует указать место, где следует разместить рисунок или таблицу, и порядковый номер.

Избыточность иллюстративного материала может повлечь за собой возвращение статьи авторам для доработки на предмет сокращения. Количество рисунков и таблиц должно соответствовать объему представляемой информации.

Формулы должны выполняться в математическом редакторе и в случае необходимости должны быть пронумерованы. Их длина не должна превышать 80 мм. Простые формулы требуется набирать в виде текста с соблюдением правил разбора математических выражений. Сложные формулы набирают в виде объектов редактора MS Equation 3.0. Настройки редактора формул: Full – 11pt; Subscript/Superscript – 7pt; Sub-subscript – 5pt; Symbol – 18pt; Sub-symbol – 12pt. Греческий, русский и цифры – прямо. Латинский – курсивом, за исключением устойчивых сочетаний cos, sin, const, max, min. Смешение символов из текстовых редакторов с символами из редактора формул не допускается. Масштаб формул не уменьшать, разбивка не умещающейся в строку мат. формулы на части по строкам осуществляется в первую очередь на знаках отношения между левой и правой частями формул (=, ≈, <, >, <=, >=): во вторую – на отточии, знаках сложения и вычитания; в третью – на знаке умножения в виде косоугольного креста. Знак, на котором формула разбивается при переносе, остается в конце строки и повторяется в начале следующей.

На титульной странице статьи указать: УДК, название статьи, ФИО авторов, представить аннотацию к статье не менее 250 слов, ключевые слова (не более 8 слов), далее – текст статьи. Образец оформления статьи – на сайте Журнала.

Подписано в печать 14.09.2018.
Формат А4, 208×280 мм. Бумага офсетная.
Гарнитура «Таймс» Печать цифровая.
Усл. п. л. 12,2. Уч.-изд. л. 13,9.
Тираж 50 экз. Заказ № _____
Свободная цена

Адрес издателя: 450098, Россия, РБ,
г. Уфа, бульвар Давлеткильдеева, д. 5/2

Отпечатано с готового оригинал-макета

Адрес: _____

