

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный педагогический
университет имени И.Н. Ульянова»



Научно-исследовательский центр фундаментальных и прикладных
проблем биоэкологии и биотехнологии



**МАТЕРИАЛЫ
II МЕЖДУНАРОДНОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ
КОНФЕРЕНЦИИ**

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПО ПРИОРИТЕТНЫМ НАПРАВЛЕНИЯМ БИОЭКОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ

30 апреля 2019 г.

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Ульяновский государственный педагогический университет
им. И.Н. Ульянова»

Фундаментальные и прикладные исследования по приоритетным направлениям биоэкологии и биотехнологии

Сборник материалов
II Всероссийской научно-практической конференции
с международным участием

Чебоксары 2019

УДК 57
ББК 28
Ф94

Рецензенты: **Соловьев Алексей Вячеславович**, канд. биол. наук, заместитель директора по науке и общим вопросам, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии НИЦ ФППББ, доцент кафедры биологии и химии ФГБОУ ВО «УлГПУ им. И.Н. Ульянова»
Беззубенкова Ольга Евгеньевна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии НИЦ ФППББ, доцент кафедры биологии и химии ФГБОУ ВО «УлГПУ им. И.Н. Ульянова»
Коняев Игорь Сергеевич, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий НИЦ ФППББ, доцент кафедры биологии и химии ФГБОУ ВО «УлГПУ им. И.Н. Ульянова»
Куклина Наталья Григорьевна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий НИЦ ФППББ ФГБОУ ВО «УлГПУ им. И.Н. Ульянова»
Маслеников Андрей Викторович, канд. биол. наук, заведующий лабораторией экологии и проблем биоразнообразия НИЦ ФППББ, доцент кафедры биологии и химии ФГБОУ ВО «УлГПУ им. И.Н. Ульянова»

Редакционная коллегия: **Антонова Елена Ивановна**, главный редактор, д-р биол. наук, директор НИЦ ФППББ, профессор кафедры биологии и химии ФГБОУ ВО «УлГПУ им. И.Н. Ульянова»

Ленгесова Наталья Анатольевна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории морфологии НИЦ ФППББ, доцент кафедры биологии и химии ФГБОУ ВО «УлГПУ им. И.Н. Ульянова»

Дизайн обложки: **Фирсова Надежда Васильевна**, дизайнер

Ф94 **Фундаментальные и прикладные исследования по приоритетным направлениям биоэкологии и биотехнологии:** сборник материалов II Всерос. науч. конф. с межд. участ. (Ульяновск, 30 апреля 2019 г.) / гл. ред. Е. И. Антонова. – Чебоксары: ИД «Среда», 2019. – 100 с.

ISBN 978-5-6042955-2-6

В сборнике представлены статьи участников II Международной научно-практической конференции с международным участием «Фундаментальные и прикладные исследования по приоритетным направлениям биоэкологии и биотехнологии». В материалах сборника приведены результаты теоретических и прикладных изысканий представителей научного и образовательного сообщества в области биологии и медицины.

ISBN 978-5-6042955-2-6
DOI 10.31483/a-57

УДК 57
ББК28

© ФГБОУ ВО «Ульяновский
государственный педагогический
университет им. И.Н. Ульянова», 2019
© ИД «Среда», 2019

Предисловие

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ульяновский государственный педагогический университет имени И.Н. Ульянова» представляет сборник материалов по итогам II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием **«Фундаментальные и прикладные исследования по приоритетным направлениям биоэкологии и биотехнологии»**.

В сборнике представлены статьи, посвященные исследованиям биоэкологии и биотехнологии. В публикациях нашли отражение результаты теоретических и прикладных изысканий представителей научного и образовательного сообщества в области биологии и медицины.

По содержанию публикации разделены на основные направления:

1. Молекулярная биология (молекулярная генетика, геновая инженерия, микробиология, медицинская микробиология, биомедицина, геномика, транскриптомика, протеомика, разработка ПЦР-тест-систем, филогенетика, иммуногенетика, микробиологический синтез ферментов и др.)
2. Клеточные технологии (растений, животных, человека)
3. Клеточная биология, цитология, гистология, анатомия и физиология
4. Биохимия и токсикология (биохимические, иммунологические, токсикологические исследования)
5. Экология и проблемы биоразнообразия (фаунистика, флористика, биогеография, систематика, таксономия и др.)
6. Педагогические аспекты образования по направлению Биотехнология

Авторский коллектив сборника представлен широкой географией: городами России (Белгород, Москва, Омск, Самара, Саратов, Ульяновск, Челябинск, Якутск) и Республики Беларусь (Минск).

Среди образовательных учреждений выделяются следующие группы: университеты и институты России (Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Научно-исследовательский институт морфологии человека, Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина, Омский государственный педагогический университет, Самарский госу-

дарственный технический университет, Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского, Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова, Ульяновский государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова, Южно-Уральский государственный гуманитарно-педагогический университет, Южно-Уральский государственный университет (НИУ), и Республики Беларусь (Белорусский государственный медицинский университет), и других учреждения (Ульяновская областная клиническая больница).

Участники конференции представляют собой разные уровни образования и науки: доктора и кандидаты наук ведущих вузов страны, профессора и доценты, аспиранты, магистранты, студенты, преподаватели вузов.

Редакционная коллегия выражает глубокую признательность нашим уважаемым авторам за активную жизненную позицию, желание поделиться уникальными разработками и проектами, публикацию в сборнике материалов по итогам проведенной конференции **«Фундаментальные и прикладные исследования по приоритетным направлениям биоэкологии и биотехнологии»**, содержание которого не может быть исчерпано. Ждем Ваши публикации и надеемся на дальнейшее сотрудничество.

доктор биологических наук, директор НИЦ ФППББ,
профессор кафедры биологии и химии
ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный
педагогический университет им. И.Н. Ульянова»
Антонова Е.И.

Оглавление

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ (МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА, ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ, МИКРОБИОЛОГИЯ, МЕДИЦИНСКАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ, БИОМЕДИЦИНА, ГЕНОМИКА, ТРАНСКРИПТОМИКА, ПРОТЕОМИКА, РАЗРАБОТКА ПЦР-ТЕСТ-СИСТЕМ, ФИЛОГЕНЕТИКА, ИММУНОГЕНЕТИКА, МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ ФЕРМЕНТОВ И ДР.)

- Антонова Е.И., Соловьев А.В., Баранов А.В., Хамбикова А.В.* Профиль микроРНК в плазме крови в аспекте развития подходов ранней диагностики меланомы 7
- Коняев И.С., Куклина Н.Г., Кузнецова В.А., Григорьева К.Н.* Инфекции мочеполовых путей девушек подросткового возраста при беременности 12
- Куклина Н.Г., Кузнецова В.А., Шубина К.О., Хакимова Г.Ф.* Нозокомиальные инфекции кровотока пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии 17
- Соловьев А.В., Пятаева Ю.А., Баранов А.В., Хамбикова А.В.* Молекулярно-генетическая дифференциация подтипов герпеса HHV-6 21

КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ (РАСТЕНИЙ, ЖИВОТНЫХ, ЧЕЛОВЕКА)

- Антонова Е.И., Костина О.М., Волкова Е.С., Бармина С.А., Хамбикова А.В., Федорова С.В., Ленгесова Н.А., Сихарулидзе С.В.* Культуры гепатоцитов как модельная тест-система для оценки цитотоксичности гепатотоксикантов и гепатопротекторов 27
- Масленников А.В., Сорокина С.С., Филиппова С.С.* Редкий охраняемый вид скабиоза исетская (*Scabiosa isetensis* L.) как объект клеточных технологий 34
- Ханды М.Т., Томилова С.В.* Растения Арктики как объект клеточных технологий 37

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ, ЦИТОЛОГИЯ, ГИСТОЛОГИЯ, АНАТОМИЯ И ФИЗИОЛОГИЯ

- Антонова Е.И., Федорова С.В., Калиновская О.В., Соловьев А.В., Костина О.М., Вакулова Е.С.* Морфологические показатели эмбрионов на критические периоды эмбриогенеза в условиях интоксикации 4-фенилпиперидином 42
- Башук В.В., Павлова Т.В., Марковская В.А.* Гериаτρические аспекты в изучении эритроцитов 50
- Башук В.В., Павлова Т.В., Марковская В.А., Нестеров А.В.* Старение сосудов: клиничко-морфологические параллели 57

Ерофеева Л.М., Дорохович Г.П. Морфологическая характеристика паховых лимфатических узлов обезьян в различные сроки после сочетанного воздействия антиортостатической гипокинезии и гипергравитации..... 63

Михеева Н.А., Терентюк Г.С., Михеев В.А. Влияние золотых наночастиц на концентрацию активных форм кислорода в синхронизированных по стадиям клеточного цикла опухолевых клетках 67

Шибкова Д.З., Шилкова Т.В., Ефимова Н.В. Отдаленные цитогенетические эффекты неионизирующего электромагнитного излучения у потомства облученных животных 71

БИОХИМИЯ И ТОКСИКОЛОГИЯ (БИОХИМИЧЕСКИЕ, ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ, ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ)

Безгоднов А.В., Колобков Е.В. Эффективность предпосевной обработки семян препаратом *MicroBionic* против семенной и аэрогенной инфекции 75

Заболотских В.В. Исследования токсичности аэрополлютантов городской среды..... 81

ЭКОЛОГИЯ И ПРОБЛЕМЫ БИОРАЗНООБРАЗИЯ (ФАУНИСТИКА, ФЛОРИСТИКА, БИОГЕОГРАФИЯ, СИСТЕМАТИКА, ТАКСОНОМИЯ И ДР.)

Белецкая Е.Я., Чибис С.П., Кротова Л.А., Шелонцев В.А. Изучение влияния химических соединений на морфологические и популяционные признаки пшеницы мягкой 86

ПЕДАГОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ОБРАЗОВАНИЯ ПО НАПРАВЛЕНИЮ БИОТЕХНОЛОГИЯ

Антонова Е.И., Ленгесова Н.А., Соловьев А.В., Беззубенкова О.Е. Научно-исследовательский центр как база формирования компетенций магистров направления подготовки 06.04.01 Биология профиля образовательной программы «Биотехнология с основами нанотехнологий».... 94

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

Антонова Елена Ивановна

д-р биол. наук, профессор, директор

Соловьев Алексей Вячеславович

канд. биол. наук, заместитель директора,

старший научный сотрудник, доцент

Баранов Александр Валерьевич

бакалавр биол. наук, младший научный сотрудник

Хамбикова Анастасия Владимировна

бакалавр биол. наук, младший научный сотрудник

Научно-исследовательский центр фундаментальных и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова»
г. Ульяновск, Ульяновская область

ПРОФИЛЬ МИКРОРНК В ПЛАЗМЕ КРОВИ В АСПЕКТЕ РАЗВИТИЯ ПОДХОДОВ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ МЕЛАНОМЫ

Аннотация: в данной работе авторами рассматривается важная особенность развития меланомы кожи – это слабая ответная реакция организма или её полное отсутствие, из-за чего меланома зачастую стремительно прогрессирует. Основной проблемой диагностики заболевания является отсутствие верифицированных маркеров для своевременного выявления заболевания. В настоящем исследовании представлены первичные результаты анализа профилей 5-ти отобранных микроРНК в образцах плазмы пациентов с диагнозом меланома и здоровых пациентов для выявления потенциальных диагностических биомаркеров.

Ключевые слова: меланома, биомаркеры плазмы, микроРНК.

Меланома кожи многие годы является одной из трудно решаемых проблем онкологии, темп роста которой стремительно растет. Ежегодный прирост заболеваемости по данным Национального института рака (США) составляет 3–5% в год, то есть больше, чем при других злокачественных опухолях [2; 5; 9]. Важность ранней диагностики данного заболевания обуславливается высокой агрессивностью развития, ранним метастазированием опухоли, поражением большей доли лиц молодого и среднего трудоспособного возраста (около 35% человек в возрасте от 35 до 54 лет) и отсутствием удовлетворительных результатов лечения [1; 13].

Исследования последних десятилетий показали, что важными участниками в контроле многих клеточных процессов являются микроРНК, представляющие собой класс коротких некодирующих РНК. МикроРНК за счет обратимой инактивации или деградации мРНК мишеней могут пост-транскрипционно подавлять экспрессию генов [5]. Изменения профиля экспрессии микроРНК обнаружены при развитии большинства

злокачественных опухолей, причем микроРНК могут выступать в роли онкогенов, опухолевых супрессоров и являться драйверами злокачественной трансформации [7].

Внеклеточные опухоль-специфичные микроРНК могут использоваться в качестве биомаркеров, что позволит расширить объём диагностической информации.

Следует отметить, что в различных литературных источниках часто приводятся разрозненные сведения об уровнях экспрессии микроРНК в крови и тканях при меланоме, даются разные предположения об их роли в диагностике заболевания [11]. С нашей точки зрения важным при изучении микроРНК в качестве маркеров меланомы учитывать профиль нескольких типов маркеров одновременно (по крайней мере, трёх).

Перечень исследуемых нами микроРНК обусловлен во многом результатами, отраженным в ранее проведенных исследованиях [8], где показано, что hsa-miR-149-3p; hsa-miR-150-5p; hsa-miR-193a-3p являются наиболее перспективными для выявления заболевания. Дополнительно к списку исследуемых микроРНК нами были отобраны hsa-miR-21-5p и hsa-miR-155-5p.

Так, hsa-miR-21-5p участвует в регуляции уровней PTEN, PDCD4, BTG2 и связана с различными патологическими состояниями организма, развитием онкологии и т. д. Данный тип микроРНК может обнаруживаться в различных внеклеточных жидкостях (плазма, сыворотка и пр.). Повышенная регуляция может способствовать росту опухоли, метастазированию и инвазии, уменьшать чувствительность к химиотерапии. Высокий уровень экспрессии hsa-miR-21-5p является негативным предиктором выживания при различных формах рака.

Молекулы hsa-miR-155 играют важную роль в различных физиологических и патологических процессах. Принимает участие в подавлении вирусных инфекций и роста злокачественных образований и т. д. Ценным является то, что данный тип микроРНК может передаваться посредством экзосом. Высвобождаемые из опухоли экзосомные микроРНК играют решающую роль в перепрограммировании микроокружения опухоли. Также прежде было отмечено, что экзосомная hsa-miR-155 участвует в контроле ангиогенеза при меланоме [14].

МикроРНК hsa-miR-105-5p принимает участие в пролиферации клеток, процессах онкогенеза, инвазиях, механизмах снижения чувствительности к некоторым лекарственным препаратам (при повышении концентрации микроРНК эти процессы подавляются). Данный тип микроРНК ассоциирован с процессами образования и развития злокачественных опухолей [16].

К настоящему времени известно, что hsa-miR-150 связана с RISC (РНК-индуцированный комплекс сайленсинга) посредством РНК-интерференции; выполняются функции в гемопоэзе, регуляция генов, которые понижают уровень экспрессии продуктов, принимающих участие в дифференциации стволовых клеток (mirbase.org).

Большую роль в процессе клеточной миграции играет hsa-miR-149-3p [6].

MiR-193a-3p является членом семейства miR-193, экспрессия которого связана с мутационным статусом BRAF в тканях меланомы [15].

Исследование выполнено на базе Научно-исследовательского центра фундаментальных и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «УлГПУ им. И.Н. Ульянова».

Материалом для исследования послужили образцы плазмы крови пациентов ГУЗ Областной онкологический диспансер г. Ульяновска, Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» (г. Санкт-Петербург). Образцы венозной крови были собраны от 14 человек, 7 из которых имели подтвержденный диагноз. Информация об обследуемых пациентах представлена в таблице 1.

Таблица 1

Данные об исследуемых группах пациентов

<i>Группа с подтвержденным диагнозом</i>				<i>Контрольная группа</i>		
№	Пол	Возраст	Диагноз	№	Пол	Возраст
П 1	М	69	Меланома кожи	К 1	М	69
П 2	Ж	42	Узловая эпителиоидно-клеточная меланома кожи	К 2	М	59
П 3	Ж	37	Меланома кожи	К 3	Ж	58
П 4	Ж	71	Меланома кожи	К 4	Ж	33
П 5	М	68	Меланома кожи передней брюшной стенки	К 5	М	48
П 6	Ж	45	Меланома кожи левой голени	К 6	Ж	39
П 7	Ж	68	Меланома кожи левой голени	К 7	Ж	39

Забор крови осуществляли в вакуумные пробирки с ЭДТА (более 1 мл). Непосредственно сразу после взятия крови образцы центрифугировали при 4°C в течение 10 минут при 1900 x g. Далее отбирали плазму в стерильные пробирки типа Эппендорф на 1,5 мл и хранили её при температуре -80°C. Для проведения одного анализа требовалась плазма крови объемом 200 мкл. В качестве экзогенного контроля добавляли синтетическую микроРНК cel-miR-39-3p. Объем контроля составлял 2 мкл 0,05 мкМ раствора на 200 мкл плазмы. Для выделения miRNA из плазмы крови использовали набор mirVana miRNA Isolation Kit (Ambion / Thermo Scientific). Для проведения обратной транскрипции использовали набор TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific). Для проведения ПЦР в реальном времени использовали смесь TaqMan Fast Advanced Master Mix (Thermo Scientific), набор для детекции микроРНК TaqMan™ Advanced miRNA Assay (Thermo Scientific) hsa-miR-21-5p, hsa-

miR-149-3p, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-193a-3p. Постановку каждой пробы производили в трех повторностях с расчетом среднего значения. Для всех образцов была выбрана величина порогового значения $C_t = 0,1$ (программа qPCRsoft 3.0).

Расчет относительного уровня проводился по методу $\Delta\Delta C_t$ [10].

Статистическую обработку данных осуществляли, используя t-критерий Стьюдента, показатели считались значимыми при $p \leq 0,05$.

При анализе полученных данных в группе больных меланомой кожи было идентифицировано 3 из 5 исследуемых микроРНК – hsa-miR-21-5p, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-155-5p. Причиной отсутствия детекции hsa-miR-149-3p и hsa-miR-193a-3p может служить их малое содержание, то есть чувствительность тест-системы оказалась не достаточной, либо их полное отсутствие в образцах плазмы крови (таблица 2).

В обеих группах – контрольной и группе пациентов с меланомой – идентифицирована 1 из 5 исследуемых микроРНК – hsa-miR-21-5p. Показатель $\Delta C_{t_{cp}}$ данной микроРНК составил $-4,92 \pm 3,22$ в контрольной группе и $-3,37 \pm 3,11$ у пациентов с меланомой (таблица 2). Широкий разброс значений в обеих группах, высокое стандартное отклонение не позволяют рассматривать данный тип микроРНК в качестве информативной. Вероятно, различия в уровне данной микроРНК, в том числе у обследуемых внутри группы, связаны с другими факторами. Отсутствием детекции hsa-miR-149-3p и hsa-miR-193a-3p может быть связано с их малым содержанием в плазме крови и низкой чувствительностью тест-системы или полным отсутствием данных типов микроРНК в плазме. Отмечены высокие значения у hsa-miR-150-5p и hsa-miR-155-5p у пациентов с диагнозом меланома, по сравнению с контрольной группой (таблица 2).

Таблица 2

Показатели микроРНК в исследуемых группах

МикроРНК	Группа с подтвержденным диагнозом		Контрольная группа	
	$\Delta C_{t_{cp}}$	Коэффициент вариации	$\Delta C_{t_{cp}}$	Коэффициент вариации
hsa-miR-21-5p	$-3,37 \pm 3,11$	92,24%	$-4,92 \pm 3,22$	65,44%
hsa-miR-149-3p	не выявлено	-	не выявлено	-
hsa-miR-150-5p	$2,23 \pm 1,81$	81,14%	не выявлено	-
hsa-miR-155-5p	$5,99 \pm 2,49$	41,63%	не выявлено	-
hsa-miR-193a-3p	не выявлено	-	не выявлено	-
Примечания: $p \leq 0,05$ – критерий Стьюдента				

Таким образом, было установлено, что особую ценность для диагностики меланомы представляют hsa-miR-150-5p и hsa-miR-155-5p. Данные микроРНК вовсе не были выявлены в плазме в контрольной группе, тогда как относительная концентрация (RQ) относительно экзогенного контроля составила 129,32 и 7,11, соответственно. МикроРНК hsa-miR-149-3p, hsa-miR-193a-3p и hsa-miR-21-5p пока рассматриваются как неинформативные в плане диагностики меланомы. Следует отметить, что предыдущие исследования Фогли с соавторами [8] показали повышение уровня hsa-miR-149-3p у пациентов с меланомой, что не было продемонстрировано нашими исследованиями.

Необходимо проведение дальнейших исследований с большим числом обследуемых, что позволит соотнести профиль отдельных микроРНК с конкретными данными пациентов, в том числе выявить корреляцию профиля микроРНК со стадией заболевания. Перспективным является включение дополнительных микроРНК в перечень исследуемых, а также повышение чувствительности используемой тест-системы.

Список литературы

1. Барчук А.С. Хирургическое лечение меланомы // Практическая онкология. – 2001. – №4. – С. 30–36.
2. Белякова Н.И. Факторы риска и диагностика метастатического поражения регионарных лимфатических узлов у больных меланомой кожи туловища и конечностей / Н.И. Белякова, Э.А. Жаврид, М.С. Абрамович [и др.] // Онкологический журнал. – 2008. – Т. 2, №3. – С. 31–37.
3. Швецова Ю.И. Анализ экспрессии микроРНК при меланоме кожи / Ю.И. Швецова, Н.В. Палкина, М.Б. Аксененко [и др.] // Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. – 2014. – Т. 2, №3. – С. 43–46.
4. Almeida M.I. MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers / M.I. Almeida, R.M. Reis, G.A. Calin // Mutation Research. – 2011. – №1–2, vol. 717. – P. 1–8.
5. Armstrong B.K. Cutaneous melanoma / B.K. Armstrong, A. Krickler // Cancer Surveys. – 1994. – Vol. 19–20. – P. 219–240.
6. Silva B.O. MicroRNA Profiling of the Effect of the Heptapeptide Angiotensin in A549 Lung Tumor Cells Reveals a Role for miRNA149–3p in Cellular Migration Processes / B.O. Silva, K.F. Lima, L.R. Gonçalves, M.B. Silveira Moraes K.C.M. // PLoS One. – 2016. – Vol. 11 (9). e0162094.
7. Farazi T.A. MicroRNAs in human cancer. / T.A. Farazi, I.H. Jessica, P. Morozov, T. Tuschl // Advances in Experimental Medicine and Biology. – 2013. – Vol. 774. – P. 1–20.
8. Fogli S. Identification of plasma microRNAs as new potential biomarkers with high diagnostic power in human cutaneous melanoma / S. Fogli, B. Polini, S. Carpi, B. Pardini, A. Naccarati, N. Dubbini, M. Lanza, M.C. Breschli, A. Romanini, P. Nieari // Tumor Biology. – 2017. – P. 1–8.
9. Jemal A. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975–2001, with a special feature regarding survival / A. Jemal, L.X. Clegg, E. Ward // Cancer. – 2004. – Vol. 101. – P. 3–27.
10. Livak K.J. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method / K.J. Livak, T.D. Schmittgen // Methods. – 2001. – Vol. 25, Is. 4. – P. 402–408.
11. Mitchell P.S. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection / P.S. Mitchell, R.K. Parkin, E.M. Kroh // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. – 2008. – Vol. 105. – P. 10513–10518.
12. Sozzi G. Potential biomarkers for lung cancer screening / G. Sozzi, M. Boeri // Translational Lung Cancer Research. – 2014. – Vol. 3, №3. – P. 139–148.
13. Varughese B.E. Genes and signaling pathways affecting the pathogenesis of melanoma / B.E. Varughese, R.S. Tarapore // Journal of Postdoctoral Research. – 2013. – Vol. 1. – P. 51–67.

14. Zhou X. Melanoma cell-secreted exosomal miR-155-5p induce proangiogenic switch of cancer-associated fibroblasts via SOCS1/JAK2/STAT3 signaling pathway / X. Zhou, T. Yan, C. Huang, Z. Xu, L. Wang, E. Jiang, H. Wang, Y. Chen, K. Liu, Z. Shao, Z. Shang // Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. – 2018. – Vol. 37. – P. 242.

15. Yong F.L., Law C.W., Wang C.W. Potentiality of a triple microRNA classifier: miR-193a-3p, miR-23a and miR-338-5p for early detection of colorectal cancer / F.L. Yong, C.W. Law, C.W. Wang // BMC Cancer. – 2013. – Vol. 13: 280.

16. Zhang J. MicroRNA-105 inhibits human glioma cell malignancy by directly targeting SUZ12 / J. Zhang, W. Wu, S. Xu, J. Zhang, J. Zhang, Q. Yu, Y. Jiao, Y. Wang, A. Lu, Y. You, J. Zhang, X. Lu // Tumor Biology. – 2017. – Vol. 39 (6). – P. 152–167.

Коняев Игорь Сергеевич

канд. биол. наук, доцент

Куклина Наталья Григорьевна

канд. биол. наук, старший научный сотрудник

Кузнецова Виктория Александровна

младший научный сотрудник

Григорьева Ксения Николаевна

студентка

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный
педагогический университет им. И.Н. Ульянова»
г. Ульяновск, Ульяновская область

ИНФЕКЦИИ МОЧЕПОЛОВЫХ ПУТЕЙ ДЕВУШЕК ПОДРОСТКОВОГО ВОЗРАСТА ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ

Аннотация: в данной работе авторами рассматриваются случаи инфекции мочеполовых путей у девушек подросткового возраста. Авторы отмечают влияние данных инфекций на детородную функцию. На фоне снижения социально-экономического уровня жизни населения, увеличения общей и гинекологической заболеваемости у девочек, ухудшения демографической ситуации проблема воспалительных заболеваний половых органов приобретает особую значимость.

Ключевые слова: инфекции мочеполовой системы, беременность, подростковый возраст, антибиотикочувствительность, микробиологический мониторинг внебольничных инфекций.

Инфекции мочевыводящих путей (ИМП) является частым сопутствующим осложнением беременности. Частота возникновения заболеваний во многом определяется патологией мочевого пузыря или уретры, почек (мочекаменная болезнь) до зачатия и других заболеваний [3]. Не маловажное значение на развитие и прогноз заболевания оказывает гормональный фон, увеличение давления матки на мочевые пути по мере увеличения сроков беременности, а также пограничные и патологические варианты течения беременности (многоводие, многоплодие, крупный плод) [4].

ИМП при беременности остается одной из острых проблем акушерства, урологии и нефрологии [2; 6].

Этиология ИМП достаточно хорошо изучена. Так, чаще возбудителями заболевания являются представители семейства Enterobacteriaceae, из которых доминирующим в структуре возбудителей внебольничной неосложненной ИМП у беременных является *Escherichia coli* (65–70%), реже *Klebsiella pneumonia* (до 10%), *Proteus mirabilis* (до 7%), *Staphylococcus* spp. (2%), *Enterococcus* spp. (до 5%). При осложненной ИМП доля грамотрицательных микробов снижается, чаще выделяются грамположительные кокки – *Staphylococcus aureus* и *saprophyticus*, *Enterococcus* spp. и др [1].

В данной работе проведено исследование, которое направлено на выявление распространенности инфекций мочеполовых путей у девочек подросткового возраста на основе микробиологического анализа биоматериала, взятого у пациенток ряда медицинских учреждений Ульяновской области. Исследовали видовой состав микроорганизмов, чувствительность и резистентность к 24 видам антибиотиков.

Биологический материал – моча и мазки из цервикального канала у беременных девочек в возрасте 16–18 лет.

Методы исследования – микробиологическая идентификация биоматериала проводилась согласно Приказу №535 от 22.04.1985 «Об унификации микробиологических исследований (бактериологических) методов исследования, применяемых в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» [5]. Видовую идентификацию проводили методом прямого профилирования бактериальных белков на времяпролетном масс-спектрометре MALDI TOF (Bruker Daltonics, Германия). Определение антибиотикочувствительности проводили согласно Клинических рекомендаций EUCAST 2018 диско-диффузионным методом.

Исследовано 23 образца биоматериала пациенток – 11 образцов мочи и 12 мазков из цервикального канала. Видовая идентификация микроорганизмов в исследуемом биоматериале пациентов показала, что наиболее часто встречающимися видами микроорганизмов во всех образцах являются *E. coli* (17,39%) и *E. faecalis* (13,04%) (таблица 1). Семь образцов биоматериала из 23 оказались стерильными – это 34,7%, что говорит об отсутствии у данных пациенток инфицированности патогенной микрофлорой.

Выявлено, что локализация микроорганизмов в разных образцах биоматериала также различается (таблица 2).

Все выделенные микроорганизмы были исследованы на чувствительность к антибиотикам (таблица 3).

Таблица 1

Распространённость микроорганизмов – возбудителей ИМП

№ п/п	Наименование микроорганизма	Кол-во (шт.)	% от общего числа
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	1	4,35
2	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1	4,35
3	<i>Pseudomonas monteilli</i>	1	4,35
4	<i>Enterobacter cloacae</i>	1	4,35
5	<i>Candida albicans</i>	2	8,69
6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	8,69
7	<i>Enterococcus faecalis</i>	3	13,04
8	<i>Escherichia coli</i>	4	17,39

Таблица 2

Распространённость микроорганизмов в биоматериале пациентов

№ п/п	Наименование микроорганизма	Моча		Мазки из цервикального канала	
		Кол-во (шт.)	% (от общего числа)	Кол-во (шт.)	% (от общего числа)
1.	<i>Staphylococcus aureus</i>	1	14,3	0	0
2.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	14,3	1	12,5
3.	<i>Pseudomonas monteilli</i>	1	14,3	0	0
4.	<i>Enterococcus faecalis</i>	2	28,6	1	12,5
5.	<i>Escherichia coli</i>	2	28,6	2	25
6.	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	0	0	1	12,5
7.	<i>Enterobacter cloacae</i>	0	0	1	12,5
8.	<i>Candida albicans</i>	0	0	2	25

Проведенные исследования на антибиотикочувствительность микроорганизмов показал, что выделенный штамм:

– *St. aureus* чувствителен (100%) к линезолиду, норфлоксацину и амикацину и устойчив (100%) к бензилпенициллину и цефокситину;

– *St. haemolyticus* чувствителен (100%) к оксигеллину, линезолиду, ципрофлоксацину, гентамицину и устойчив (100%) к эритромицину и ванкомицину;

– *Ps. monteilli* чувствителен (100%) к амикацину и устойчив (100%) к норфлоксацину, имипенему, пиперациллину, меропенему, цефепиму;

– *Ent. cloacae* чувствителен (100%) к норфлоксацину, амициллину и устойчив (100%) к тигециклину, цефтазидину, амикацину, цефепиму;

– *Can. albicans* чувствителен (50%) к нистатину и устойчив (100%) к клотримазолу, итраконазолу, флюконазолу, устойчив (50%) к амфотерицину В;

– *Kl. pneumonia* чувствителен (100%) к ампициллину, цефотаксиму, цефтазидиму, амикацину, чувствителен (50%) к цефепиму, устойчив (50%) к ципрофлоксацину;

– *Ent. faecalis* чувствителен (100%) к ампициллину, чувствителен (25%) к линезолиду и ципрофлоксацину, устойчив (100%) к эритромицину и ванкомицину;

– *E. coli* чувствителен (100%) к гентамицину, тигециклину, пиперациллину, сульфаметоксазолу, чувствителен (50%) к ципрофлоксацину, амикацину.

Полученные результаты исследований выявили сопряженность раннего наступления беременности (подростковый возраст) и инфицированностью мочеполовых путей патогенной микрофлорой.

По нашему мнению, необходимо проводить микробиологический мониторинг девочек подросткового возраста со стороны медицинских учреждений, особенно при наличии у них беременности.

По всей видимости учебно-образовательные учреждения должны более глубоко развивать здоровье сберегающие компетенции на уроках, внеклассной работе с подростками по информированию об опасной тенденции распространения инфицированности среди молодежи и возможных рисках для их здоровья.

Список литературы

1. Архипов Е.В. Инфекции мочевых путей у беременных: современные рекомендации по диагностике и лечению / Е.В. Архипов, О.Н. Сигитова // Вестник современной клинической медицины. – 2016. – №9 (6). – С. 109–114.
2. Гуртовой Б.Л. Инфекции мочевыводящих путей у беременных и родильниц / Б.Л. Гуртовой, А.И. Емельянова, О.А. Пустотина // Трудный пациент. – 2005. – №9. – С. 20–23.
3. Никонов А.П. Инфекции в акушерстве и гинекологии. Практическое руководство по диагностике и антимикробной химиотерапии / А.П. Никонов, О.Р. Асцатурова // Инфекции и антимикробная терапия. – 2004. – №6 (3). – С. 176–178.
4. Поселюгина О.Б. Неосложненная инфекция мочевых путей у беременных: современные представления о лечении и профилактике [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://www.lvrach.ru/2018/09/15437-072/> (дата обращения: 21.05.2019).
5. Приказ Минздрава СССР №535 от 22.04.1985 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.libussr.ru/doc_ussr/usr-_12667.htm (дата обращения: 21.05.2019).
6. Шехтман М.Н. Руководство по экстрагенитальной патологии у беременных. – М.: Трида, 2005. – 816 с.

Таблица 3

Антибиотикочувствительность микроорганизмов, выделенных из биоматериала

Антибиотики и антимикотические вещества	Виды микроорганизмов в исследуемом биоматериале (%) R – устойчивость, S – чувствительность.															
	<i>St. aureus</i>		<i>St. haemolyticus</i>		<i>Ps. monteilli</i>		<i>Ent. cloacae</i>		<i>Can. albicans</i>		<i>Kl. pneumonia</i>		<i>Ent. faecalis</i>		<i>E. coli</i>	
	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S
Амфотерицин В									50							
Бензилпенициллин	100															
Оксациллин				100												
Эритромицин			100										100			
Клотримазол									100							
Линезолид		100		100										25		
Ципрофлоксацин				100							100			25		50
Гентамицин				100												100
Нифлорксацин		100			100		100									
Цефокситин	100															
Ванкомицин			100										100			
Ампициллин							100					100		100		
Тигециклин								100								100
Цефотаксим												100				
Цефтазидим								100				100				
Имипинем					100											
Итраконазол									50							
Триметоприм/ Сульфаметоксазол																100
Пиперацillin					100											100
Амикацин		100				100		100				100				50
Меропенем					100											
Цефепим					100			100				50				
Нистатин										50						
Флюконазол									100							

Куклина Наталья Григорьевна

канд. биол. наук, старший научный сотрудник

Кузнецова Виктория Александровна

младший научный сотрудник

Шубина Ксения Олеговна

магистрант

Хакимова Гулия Фаратовна

магистрант

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный
педагогический университет им. И.Н. Ульянова»
г. Ульяновск, Ульяновская область

НОЗОКОМИАЛЬНЫЕ ИНФЕКЦИИ КРОВОТОКА ПАЦИЕНТОВ ОТДЕЛЕНИЯ РЕАНИМАЦИИ И ИНТЕНСИВНОЙ ТЕРАПИИ

Аннотация: статья посвящена исследованию нозокомиальной инфекции. Данные инфекции кровотока являются одной из важных проблем пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии, т.к. увеличивают не только сроки пребывания больного в стационаре, но и приводят к повышению уровня смертности. Проведение локального микробиологического мониторинга микроорганизмов, вызывающих бактериемию и изучение их антибиотикочувствительности дает возможность проведения оптимальной антибиотикотерапии.

Ключевые слова: нозокомиальные (внутрибольничные) инфекции, инфекции кровотока, гемокультуры, метод матрично-ассоциированной лазерной десорбции время-пролетной масс-спектрометрии, антибиотикорезистентность.

Нозокомиальные инфекции (внутрибольничные инфекции, ВБИ) – это любое клиническое распознаваемое инфекционное заболевание, которое развивается у пациента в результате его обращения в больницу за лечебной помощью или пребывания в ней [2].

Нозокомиальные инфекции в большинстве случаев (примерно 90%) имеют бактериальное происхождение. Сепсис, бактериемию могут вызывать практически все микроорганизмы, которые относятся к патогенным или условно-патогенным микроорганизмам [2]. Данный вид инфекций является одной из основных проблем в отделении реанимации, т.к. наиболее часто вызывают осложнения у госпитализированных больных, тяжело поддающиеся антибактериальной терапии [4].

Посев крови на стерильность является одним из важнейших исследований так как дает медикам возможность выявить присутствие микроорганизмов в крови, свидетельствующих о развитии различных патологий, внутренних воспалительных процессах.

Кровь здорового человека должна быть стерильна, при обратном результате назначаются гематологические исследования (посев гемокультур на различные питательные среды), так как отсутствие стерильности

свидетельствует о наличии какого-либо заболевания, вызванного заражением микроорганизмами [1]. Инфекции системы кровотока – проблема давно известная и весьма распространенная, особенно в отделениях реанимации [7].

ИК встречаются у 15% больных, имеющих нозокомиальные инфекции, а также у 1% всех пациентов, прошедших госпитализацию. Данный вид инфекций увеличивает продолжительность периода госпитализации, а также частоту летальных исходов [8].

Идентификация возбудителей инфекции кровотока часто осложняется физиологическими особенностями организма. К этим особенностям можно отнести период роста бактериальной пробы, лекарственная устойчивость организма. Не менее важную роль имеет правильная идентификация организма.

Цель данного исследования провести локальный микробиологический мониторинг микроорганизмов при бактериемии у пациентов реанимационных отделений и анализ резистентности основных возбудителей нозокомиальных инфекций.

В качестве материала были взяты образцы крови пациентов отделения реанимации в период с 2016 – 2019 гг.

Исследование гемокультур на стерильность проводилась согласно приказу №535 «Об унификации микробиологических исследований, применяемых в бактериологических лабораториях» с использованием тест-системы Signal (производство компании «БиоВитрум»). После первичного посева материала и получения чистой культуры видовая идентификация проводилась согласно стандартному операционному протоколу прямого нанесения бактериальной культуры на плашку методом матрично-ассоциированной лазерной десорбции время-пролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) системой Microflex LT (программное обеспечение MALDI Biotyper Compass 4.1.70 (Bruker Daltonics, Германия). В качестве надежного критерия видовой идентификации были использованы рекомендуемые значения «Score» $\geq 2,0$. Антибиотикочувствительность проводили с использованием автоматического микробиологического анализатора Vitek 2 Compact согласно Клиническим рекомендациям Eucast 2018 г.

В ходе исследования были изучены 129 образцов крови, из них 36 показали положительный результат (были определены бактериальные культуры). Результаты представлены в таблице 1.

Результаты проведенного исследования показали, что наиболее часто встречающимися микроорганизмами, выделяемые из крови являются *A. baumannii* (5,4%), *St. aureus* (3%) и *St. epidermidis* (3%), *E. faecalis* (1,5%), *Pausteurella pneumotopica* (1,5%), *Serratia liquefaciens* (1,5%), *Sph. paucimobilis* (1,5%), *St. warneri* (1,5%). В 71,5% исследованных образцах гемокультур микроорганизмов не было обнаружено.

Таблица 1

Результаты видовой идентификации микроорганизмов из гемокультур

№	Бактериальные образцы	Количество выделенных штаммов	Количество, (%)
1	<i>Acinetobacter baumannii</i>	7	5,4
2	<i>Staphylococcus aureus</i>	4	3
3	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4	3
4	<i>Enterococcus faecalis</i>	2	1,6
5	<i>Pausteuella pneumotropica</i>	2	1,6
6	<i>Serratia liquefaciens</i>	2	1,6
7	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	2	1,6
8	<i>Staphylococcus warneri</i>	2	1,6
9	<i>Bacillus pumilis</i>	1	0,8
10	<i>Enterococcus columbae</i>	1	0,8
11	<i>Enterococcus faecium</i>	1	0,8
12	<i>Fusobacterium varium</i>	1	0,8
13	<i>Kocuria kristiniaie</i>	1	0,8
14	<i>Kocuria varians</i>	1	0,8
15	<i>Micrococcus luteus</i>	1	0,8
16	<i>Pantoea spp</i>	1	0,8
17	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	0,8
18	<i>Staphylococcus hominis</i>	1	0,8
19	<i>Staphylococcus vitulinus</i>	1	0,8
20	Культуры не обнаружены	93	71,8

У микроорганизмов, наиболее часто вызывающих нозокомиальные инфекции (*St. aureus*, *A. baumannii*, *E. faecalis*, *Ps. aeruginosa*) было проведено изучение антибиотикорезистентности.

Анализ антибиотикочувствительности *A. baumannii*, показал, что все выделенные штаммы (100%) устойчивы к следующим антибиотикам: цефотаксиму, ампициллину, амоксиклаву, цефазолину, цефепиму, азтреонаму, амикацину, ципрофлоксацину, фосфомицину, нитрофурантоину, триметоприм/сульфаметоксазолу и цефтазидиму. Устойчивость к цефоперазон/сульбактаму, гентамицину и меропенему проявили 71,43% штаммов, к имипинему и нетилмицину устойчивы 14,28%.

Штаммы *E. faecalis* устойчивы (100%) к азтреонаму, ципрофлоксацину, моксифлоксацину, эритромицину, клиндамицину, также была выявлена чувствительность (100%) к следующим антибиотикам – имипинему, линезолиду, тейкопланину, ванкомицину и тайгециклину.

Результаты исследования антибиотикорезистентности *St. aureus* показали, все выделенные штаммы (100%) чувствительны к следующим антибиотикам – левофлоксацину, моксифлоксацину, линезолиду, тобрамицину и тайгециклину. К гентамицину, триметоприм/сульфаметоксазолу, эритромицину, клиндамицину, тейкопланину, тетрациклину, рифампицину и фузидиевой кислоте устойчивы только 33,3% полученных изолятов.

Выделенный нами штамм *Ps. aeruginosa* был чувствителен к большинству антибиотиков (цефепиму, азтреонаму, нетилмицину, амикацину, гентамицину, имипинему, меропенему, цефтазидиму), при этом проявил устойчивость к ампициллину, цефотаксиму, цефазолину, фосфомицину.

Полученные нами данные свидетельствует, что большинство изученных нами образцов гемокультур стерильны. Полученные штаммы микроорганизмов, вызывающих ВБИ, занимает лишь 10,8% от общего количества образцов, выделение остальных изолятов может говорить о наличии контаминации при заборе материала. Анализ антибиотикорезистентности показывает, что большинство изолятов чувствительно к основным группам используемых антибиотиков.

Своевременная и точная диагностика инфекции кровотока способствует правильному подбору антибиотиков и соответственно более быстрому выздоровлению пациентов.

Список литературы

1. Бочарова Ю. А. проблемы и перспективы масс-спектрометрических технологий в медицинский микробиологии (обзор литературы) / Ю.А. Бочарова, И.В. Чеботарь [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2016. – № 4(61). – С. 249–256.
2. Венцел Р.П. Внутрибольничные инфекции / под ред. Р.П. Венцеля; пер. с англ. – М.: Медицина, 1990. – 656 с.
3. Крапивина И.В. Микробиологический мониторинг в оптимизации антибактериальной терапии внутрибольничных инфекций в отделениях реанимации и интенсивной терапии и отделениях хирургического профиля / И.В. Крапивина, А.Ю. Миронов // Человек и его здоровье – 2009. – №1. – С. 81–87.
4. Крыжановская О.А. Масс-спектрометрическая идентификация возбудителей инфекции кровотока: опыт в педиатрической практике / О.А. Крыжановская, А.В. Лазарева, О.А. Пономаренко [и др.] // Российский педиатрический журнал. – 2014. – №5. – С. 4–9.
5. Приказ Минздрава СССР №535 от 22.04.1985 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.libussr.ru/doc_ussr/usr_126-67.htm (дата обращения: 21.02.2019).
6. Николаева М. Что показывает анализ крови на стерильность [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://prososud.ru> (дата обращения: 21.02.2019).
7. Hugonnet S., Sax H., Eggimann P., Chevrolet J-C., Pittet D. Nosocomial bloodstream infection and clinical sepsis / S. Hugonnet, H. Sax, P. Eggimann, J-C. Chevrolet, D. Pittet // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2008. – Vol. 24, is. 2. – P. 231–236.
8. Wisplinghoff H., Bischoff T., Tallent S. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24179 cases from a prospective nationwide surveillance study / H. Wisplinghoff, T. Bischoff, S. Tallent // Clin. Infect. Dis. – 2004. – Vol. 39 – P. 3009–3017.

Соловьев Алексей Вячеславович

канд. биол. наук, заместитель директора,
старший научный сотрудник, доцент

Научно-исследовательский центр фундаментальных и прикладных
проблем биозкологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Ульяновский
государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

Пятаева Юлия Андреевна

магистрант

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный
педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

Баранов Александр Валерьевич

бакалавр биол. наук, младший научный сотрудник

Научно-исследовательский центр фундаментальных и прикладных
проблем биозкологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Ульяновский
государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

Хамбикова Анастасия Владимировна

бакалавр биол. наук, младший научный сотрудник

Научно-исследовательский центр фундаментальных и прикладных
проблем биозкологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Ульяновский
государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова»
г. Ульяновск, Ульяновская область

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ПОДТИПОВ ГЕРПЕСА HHV-6

Аннотация: в работе проведен биоинформационный анализ геномов вируса 6-го типа с целью выявления участков, которые могут быть использованы для молекулярно-генетической диагностики подтипов А и В. В качестве таргетного для диагностики участка выбран фрагмент гена U31. Разработанная молекулярно-генетическая система на основе полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени», а также проведена ее апробация.

Ключевые слова: вирус герпеса человека 6 типа (ВГЧ-6, HHV-6), подтипы А и В (HHV-6A, HHV-6B), ПЦР-РВ, ген U31, большой тегументный белок.

Вирус герпеса 6-го типа (*Humanherpesvirus* HHV-6) – это ДНК-содержащий вирус семейства *Herpesviridae* подсемейства *Betaherpesvirinae* рода *Roseolovirus*. Вирус включает два подтипа: HHV-6A и HHV-6B, однако в 2012 году на основе генетических и фенотипических исследований Международный комитет по вирусной таксономии было предложено рассматривать подтипы как различные вирусы.

Оба вируса создают пожизненную латентность после первичной инфекции, а в дальнейшем появляется значительный риск для пациентов с ослабленным иммунитетом. Основной путь заражения – воздушно-капельный, со слюной и мокротой. Также инфицирование возможно при гемотрансфузиях, трансплантации органов и через медицинские инструменты [1]. В большинстве случаев болезнь протекает без ярко выраженных симптомов, проявление экзантемы на кожных покровах часто путают с симптомами кори или краснухи, что приводит к постановке ошибочного диагноза. В дальнейшем это вызывает осложнения со стороны централь-

ной нервной системы: судороги на фоне высокой температуры, энцефалит, менингоэнцефалит, серозный менингит [12]. Доказано, что HHV-6 может также выступать в качестве кофактора ВИЧ.

Вирус проявляет тропизм к широкому спектру клеток хозяина: его можно обнаружить в лимфоцитах периферической крови, моноцитах, макрофагах, лимфатических узлах, клетках почек, в слюнных железах, мозге [3]. И только в момент острой инфекции возбудитель может быть выделен из клеток крови. Данная инфекция отличается всеобщей восприимчивостью. В отличие от других герпесвирусов человека, вирусный геном HHV-6 может быть интегрирован в хромосомы человека [2; 9]. Когда интеграция происходит в зародышевых клетках, интегрированный геном HHV-6 может передаваться 50% потомков. Герпесвирусы 6А и 6В человека, наряду с некоторыми другими герпесвирусами, способны также интегрироваться в теломеры хромосом.

HHV-6В является повсеместным, тогда как распространенность HHV-6А менее четко определена, хотя существуют географические особенности в его распределении. В целом, в популяциях людей вирус HHV-6В диагностируется чаще, чем HHV-6А. Хотя геномы вирусов характеризуются достаточной высокой степенью идентичности, оба вируса имеют различающиеся эпидемиологические, биологические и иммунологические характеристики [6; 10; 11].

К настоящему времени разработаны и широко используются в практике медицинских организаций диагностические тест-системы по ПЦР-диагностике вируса 6-го типа. Вместе с тем существует необходимость развития подходов к дифференциальной диагностике подтипов герпеса 6-го типа, чему и посвящено настоящее исследование. Следует отметить, что ранее проводились исследования по разработке тест-систем по диагностике подтипов [5; 8], однако сохраняется необходимость повышения их специфичности и чувствительности.

Биоинформационные данные для анализа были заимствованы из базы данных GenBank Национального центра биотехнологической информации (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводился в программах MEGA 10 (<https://www.megasoftware.net/>) и Unipro UGENE (<http://ugene.net>).

Геном вируса HHV-6А включает 159322 п.н. (на основе референсной последовательности из GenBank NC_001664), состав GC: 28,2666%; геном HHV-6В – 162114 п.н. (на основе референсной последовательности из GenBank NC_000898), состав GC: 42,8%. Нуклеотидные последовательности геномов обоих подтипов имеют 145631 идентичных сайта, что составляет 92,2%; попарная дистанция – 0,083 [7].

Относительно невысокая степень молекулярно-генетической идентичности обоих вирусов свидетельствует о возможности успешной их молекулярно-генетической дифференциации.

Геномы подтипов содержат 97 генов [4]. В качестве кандидатного гена для диагностики подтипов выбран ген *U31*, кодирующий большой тегументный белок – белок покровов герпесвируса, N-концевой консервативный регион. Кодирующая часть гена имеет длину 6234 п.н. (2077 аминокислоты). Среди генов

остальных изученных клинически значимых типов герпесов наибольшей гомологией к изучаемому обладает ген *U31* у HHV-7. Тем не менее, степень гомологии является очень слабой и попарные дистанции при анализе нуклеотидов между HHV-7 подтипами HHV-6 составляют 0,4147 (для HHV-6A) и 0,4138 (для HHV-6B), при анализе аминокислотных последовательностей – 0,6525 и 0,6492, соответственно. Для анализа молекулярно-генетического полиморфизма гена *U31* у HHV-6 были взяты нуклеотидные последовательности гена *U31* со следующими идентификационными номерами GenBank по подтипу A: KY316056, KY316054, KY316049, KY316048, KC465951, NC_001664, MG894374, MG894371, X83413, MG894370, KJ123690, KT355575, KP257584, KT895199; по подтипу B: NC_000898, AF157706, AB021506, KY316052, KY316051, KY316053, KY316041, KY316045, KY316038, KY316043, KY316042, KY316036, KY316040, KY316037.

Изученные последовательности HHV-6A содержат 98 сайтов вариабельных нуклеотидов (1,6%), попарная дистанция – 0,005429, а также 21 сайт вариабельных аминокислот (1,0%). Нуклеотидные последовательности HHV-6B отличаются 38-ю нуклеотидами (0,6%), попарная дистанция – 0,001158, аминокислотные последовательности – 21-й аминокислотой (1,8%), попарная дистанция – 0,001157. Таким образом, молекулярно-генетический полиморфизм гена *U31* внутри каждого подтипа герпеса 6-го типа относительно невысокий. При этом разные подтипы демонстрируют более сильные различия. Так, разные подтипы имеют 406 различающихся нуклеотидных сайтов (6,5%), попарная дистанция – 0,0527, а также отличные 174 аминокислоты (8,4%), попарная дистанция – 0,0517.

В результате анализа консенсусных нуклеотидных последовательностей гена *U31* обоих подтипов, выбран регион, стабильно отличающийся у разных подтипов 5-ю нуклеотидами и 2-мя аминокислотными остатками, и поэтому пригодный для дифференциации подтипов. Регион соответствует сайтам 3037–3066 кодирующей части гена. Под этот регион были сконструированы ДНК-зонды и праймеры (таблица 1). При конструировании праймеров и зондов производилась проверка их последовательностей на формирование стабильных вторичных структур в виде шпилек и димеров с помощью программного обеспечения OligoAnalyzer (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>).

В состав ДНК-зондов включены модифицированные LNA-нуклеотиды, повышающие температуру плавления и поэтому повышающие и специфичность гибридизации зондов. Расчетная температура плавления ДНК-зондов – 69°C. ДНК-зонды несут различные флуоресцентные метки, что делает возможным их использование для мультиплексной ПЦР-РВ.

ДНК-зонд для выявления HHV-6A:

FAM-A+AGATAAC+AAT+GTCATC+ATTC+ACTT+TAC+C-BHQ1.

ДНК-зонд для выявления HHV-6B:

ROX-CA+GGATAAC+GAT+CTCATCATTCACCTT+C-BHQ2.

Знак «+», находящийся перед нуклеотидом, означает LNA-нуклеотид.

Для целей верификации результатов тест-системы проведен дизайн контрольных оцДНК, которые соответствуют таргетным участкам геномной ДНК подтипов, соответствующие сайтам 2999–3087 кодирующей части гена.

Таблица 1

Фрагмент нуклеотидной последовательности гена с соответствующими аминокислотами
гена *U31* подтипов герпеса 6-го типа

№ сайта	2998	2999	3000	3001	3002	3003	3004	3005	3006	3007	3008	3009	3010	3011	3012	3013	3014	3015	3016	3017	3018	3019	3020	3021	3022	3023	3024	3025	3026	3027
ННВ- 6А	A	T	G	C	A	T	T	T	G	A	A	T	C	T	T	T	T	A	G	A	A	A	C	C	T	T	T	C	T	G
	M			H						N			L			L			E			T			F			L		
ННВ- 6В	G	T	G	C	A	T	T	T	G	A	A	T	C	T	T	T	T	A	G	A	A	A	C	C	T	T	T	C	T	A
	V			H			L			N			L			L			E			T			F			L		
№ сайта	3028	3029	3030	3031	3032	3033	3034	3035	3036	3037	3038	3039	3040	3041	3042	3043	3044	3045	3046	3047	3048	3049	3050	3051	3052	3053	3054	3055	3056	3057
ННВ- 6А	A	A	A	C	A	A	C	T	G	C	A	A	G	A	T	A	A	C	A	A	T	G	T	C	A	T	C	A	T	T
	K			Q			L			Q			D		N			N			V			I			I			
ННВ- 6В	A	A	A	C	A	A	Y	T	G	C	A	G	G	A	T	A	A	C	G	A	T	C	T	C	A	T	C	A	T	T
	K			Q			L			Q			D		N			D			L			I			I			
№ сайта	3058	3059	3060	3061	3062	3063	3064	3065	3066	3067	3068	3069	3070	3071	3072	3073	3074	3075	3076	3077	3078	3079	3080	3081	3082	3083	3084	3085	3086	3087
ННВ- 6А	C	A	C	T	T	T	A	C	C	C	A	T	G	C	A	C	T	A	C	T	G	C	C	A	G	T	G	T	T	A
	H			F			T			H			A			L			L		P			V			L			
ННВ- 6В	C	A	C	T	T	C	A	C	T	C	A	T	G	C	A	C	T	A	C	T	G	C	C	A	G	T	G	T	T	A
	H			F			T			H			A			L			L		P			V			L			

Примечание: в таблице указаны номера нуклеотидов открытой рамки считывания гена *U31*; отличающиеся нуклеотиды и аминокислоты показаны курсивом; серой заливкой показаны праймеры, серой заливкой в рамке – зонды.

С целью апробации тест-системы проводилась постановка реакций с разной концентрацией матрицы (2, 10 и 100 копий в 1 мкл). Объем реакционной смеси – 25 мкл; состав: вода, 5х реакционная смесь qPCRmix-HS (Евроген), концентрация праймеров и зондов – по 0,5 мкМ, 5 мкл контрольной матрицы (положительный контроль для подтипа А или В).

Полимеразная цепная реакция проводилась с использованием детектирующего амплификатора qTower 2.2 (Analytik Jena, Германия). Параметры амплификации: (1) 95°C – 5 мин.; (2) 95°C – 10 с, (3) 55°C – 10 с, (4) 72°C – 15 с; повторение 45 раз этапов 2 – 4. Детекция уровней флуоресценции проводилась на этапе отжига праймеров каждого цикла по каналам FAM и ROX.

Реакционные смеси, содержащие контрольную оцДНК подтипа А с концентрацией 2 копии на 1 мкл, имеют типичную S-образную форму, пороговое значение цикла (Ct) – 21,19 (канал FAM), а для подтипа В – 20,12 (канал ROX) (рисунок 1). При использовании контрольной оцДНК с концентрацией 10 копий в 1 мкл, пороговые значения цикла – 24,05 и 21,04, а при концентрации 100 копий в 1 мкл – 14,56 и 13,90. Все значения получены при значении threshold – 1.

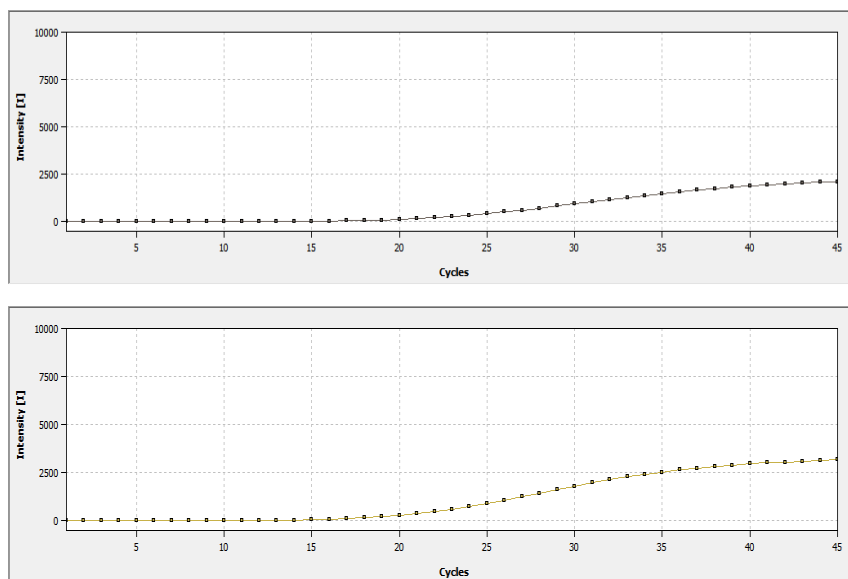


Рис. 1. Детекция по каналам FAM (наверху) и ROX (внизу)
Концентрация контрольной оцДНК 2 копии/мкл.

Таким образом, в ходе апробации разработанная мультиплексная тест-система показала высокую эффективность при выявлении контрольной ДНК подтипов герпеса 6-го типа. При этом аналитическая чувствительность – 10 копий контрольной ДНК на реакцию.

Следует отметить, что требуется дальнейшая апробация тест-система на клиническом материале, а также продолжение исследований с целью возможности постановки количественной ПЦР для определения вирусной нагрузки. Проблема, которую также предстоит решить в процессе модернизации тест-системы – выявление хромосомной интеграции HHV-6, при этом вирус находится в латентном состоянии, а также учет при интерпретации результатов встраивания HHV-6 в клетки зародышевой линии.

Список литературы

1. Никольский М.А. Инфекция, вызванная вирусом герпеса человека 6 типа, у детей: современное состояние проблем // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2008. – №2. – С. 93–97.
2. Никольский М.А. Хромосомно-интегрированный вирус герпеса 6 типа / М.А. Никольский, В.С. Голубцова // Инфекция и иммунитет. – 2015. – Т. 5, №1. – С. 7–14.
3. Chan P.K. Prevalence distribution of human herpesvirus 6 variants A and B in adult human brain / P.K. Chan, H.K. Ng, M. Hui, A.F. Cheng // Journal of Medical Virology. – 2004. – №64. – P. 42–46.
4. Dominguez G. Human herpesvirus 6B genome sequence: coding content and comparison with human herpesvirus 6A / G. Dominguez, T.R. Dambaugh, F.R. Stamey, S. Dewhurst, N. Inoue, P.E. Pellett // Journal of Virology. – 1999. – Vol. 73 (10). – P. 8040–8052.
5. Ihira M. Development of real-time RT-PCR assays for detection of three classes of HHV-6A gene transcripts / M. Ihira, A. Urashima, H. Miura, F. Hattori, Y. Kawamura, K. Sugata, T. Yoshikawa // Journal of Medical Virology. – 2017. – doi: 10.1002/jmv.24862.
6. Komaroff A.L. Summary of the 10th International Conference on Human Herpesviruses-6 and -7 (HHV-6A, -6B, and HHV-7) / A.L. Komaroff, M. Boeckh, E. Eliason, T. Phan, B.B. Kaufer // Journal of Medical Virology. – 2018. – Vol. 90 (4). – P. 625–630. – doi: 10.1002/jmv.25004.
7. Nei M. Molecular Evolution and Phylogenetics / M. Nei, S. Kumar. – Oxford University Press, 2000. – 333 p.
8. Reddy S. Quantitative Detection and Differentiation of Human Herpesvirus 6 Subtypes in Bone Marrow Transplant Patients by Using a Single Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay / S. Reddy, P. Manna // Biology of Blood and Marrow Transplantation. – 2005. – Vol. 11. – P. 530–541.
9. Wood M.L. Chromosomally Integrated Human Herpesvirus 6: Models of Viral Genome Release from the Telomere and Impacts on Human Health / M.L. Wood, N.G. Royle // Viruses. – 2017. – Vol. 9 (7). – E184. – doi: 10.3390/v9070184.
10. Yalcin S. Human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7 infections in renaltransplant recipients and healthy adults in Turkey / S. Yalcin, T. Karpuzoglu, G. Suleymanlar, G. Mutlu, T. Mukai, T. Yamamoto, et al. // Archives of Virology. – 1994. – №136. – P. 183–190.
11. Yalcin S. Prevalence of human herpesvirus 6 variants A and B in patients with chronic fatigue syndrome / S. Yalcin, H. Kuratsune, K. Yamaguchi, T. Kitani, K. Yamanishi // Microbiology and Immunology. – 1994. – №38. – P. 587–590.
12. Yoshikawa T. Evaluation of active human herpesvirus 6 infection by reverse transcription-PCR / T. Yoshikawa, S. Akimoto, N. Nishimura, T. Ozaki, M. Ihira, M. Ohashi, M. Morooka, S. Suga, Y. Asano, M. Takemoto, Y. Nishiyama // Journal of Medical Virology. – 2003. – Vol. 70 (2). – P. 267–272.

КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

Антонова Елена Ивановна

д-р биол. наук, профессор, директор НИЦ ФППББ
Научно-исследовательский центр фундаментальных и прикладных
проблем биоэкологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Ульяновский
государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

Костина Ольга Михайловна

младший научный сотрудник
Научно-исследовательский центр фундаментальных и прикладных
проблем биоэкологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Ульяновский
государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

Волкова Екатерина Сергеевна

младший научный сотрудник
Научно-исследовательский центр фундаментальных и прикладных
проблем биоэкологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Ульяновский
государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

Бармина Светлана Алексеевна

младший научный сотрудник
Научно-исследовательский центр фундаментальных и прикладных
проблем биоэкологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Ульяновский
государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

Хамбикова Анастасия Владимировна

младший научный сотрудник
Научно-исследовательский центр фундаментальных и прикладных
проблем биоэкологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Ульяновский
государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

Федорова Светлана Владимировна

аспирант, младший научный сотрудник
Научно-исследовательский центр фундаментальных и прикладных
проблем биоэкологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Ульяновский
государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

Ленгесова Наталья Анатольевна

канд. биол. наук, доцент, старший научный сотрудник
Научно-исследовательский центр фундаментальных и прикладных
проблем биоэкологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Ульяновский
государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

Сихарулидзе Сергей Владимирович

пластический хирург
ГУЗ «Ульяновская областная клиническая больница»
г. Ульяновск, Ульяновская область

КУЛЬТУРЫ ГЕПАТОЦИТОВ КАК МОДЕЛЬНАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ОЦЕНКИ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ГЕПАТОТОКСИКАНТОВ И ГЕПАТОПРОТЕКТОРОВ

Аннотация: В настоящее время актуальным является культивирование клеток, в частности гепатоцитов, как модельной тест-системы для оценки гепатотоксикантов и гепатопротекторов. Предложенный протокол культивирования гепатоцитов является оптимизированным и адаптированным для оценки токсичности этанола в условиях подострой одно- и многократной интоксикации. Авторами описан ряд биохимических методов по оценке активности ферментов, состояния клеточного гомеостаза с целью использования их в качестве критериев цитотоксичности этанола.

Ключевые слова: гепатоциты, культивирование, гепатотоксиканты, *in vitro*, этаноловая интоксикация.

Изучение влияния гепатопротекторов и гепатотоксикантов на клеточные системы, независимо от последующей цели их использования, на первом этапе в первую очередь предполагает оценку их токсичности и анализ как морфогенетических, так и морфофункциональных показателей. Методы оценки токсичности, альтернативные классическим тестам на экспериментальных животных, а именно, модели с использованием культур клеток находят все более широкое применение в сфере биомедицинских исследований [1; 2]. Такие методы позволяют решать этические проблемы, связанные с массовым использованием и гибелью экспериментальных животных, способствуют сократить сроки, провести менее затратные в финансовом отношении исследования, прежде всего на стадии их доклинических испытаний, а также установить характер влияния изучаемых токсических соединений/веществ непосредственно на клеточном уровне [7; 10]. Учитывая, что в основе комплекса ответных реакций клеток в различных экспериментальных моделях, лежат единые фундаментальные механизмы на различных уровнях организации живых систем, то речь идет об универсальном характере стрессовых реакций на клеточном уровне [11; 12]. Все это делает использование модели *in vitro* перспективным для оценки жизнеспособности и морфофункциональных изменений клеток в ответ на действие повреждающих факторов различной этиологии, в том числе этанола [3; 4; 8].

В нашем исследовании оптимизация протокола культивирования состоит в разработке оригинального комплексного протокола культивирования гепатоцитов – от этапа забора биоматериала до получения готового продукта – клеточной линии гепатоцитов оптимизированной для определения степени цитотоксичности гепатоцитов после воздействия подострой одно- многократной этаноловой интоксикации среднесмертельной дозой (LD₅₀). Составление паспорта клеточной линии гепатоцитов.

Среди известных способов оптимизации протокола культивирования гепатоцитов можно выделить ряд работ как отечественных, так и зарубежных авторов, в которых используются культуры гепатоцитов для достижения поставленных целей проводимых исследований. Патентный анализ показал, что применение клеточных линий гепатоцитов используется для лечения конкретных заболеваний, в других работах использовались дорогостоящие среды культивирования, в ряде работ представлены результаты по культивированию гепатоцитов на микроносителях и т.д [5; 6; 9].

Целью исследования является оптимизация протокола культивирования гепатоцитов и разработка модели тестирования токсичности этанола на клеточных линиях с выявлением комплекса биохимических методов оценки на клеточном уровне состояния мембран, устойчивости клеток к окислительному стрессу, систем детоксикации и показателей клеточного гомеостаза. Предлагаемая нами модель может быть использована для решения самых разнообразных задач в области токсикологии и клеточной биологии, а именно, для изучения ряда представляющих практический интерес потенциальных или уже использующихся в практике фармакологических препаратов на клеточных культурах.

Задачи исследования.

1. Адаптировать протокол культивирования гепатоцитов для оценки цитотоксичности гепатотоксиканта – этанола в режиме подострой одно- и многократной интоксикации.

2. Адаптировать к условиям культур гепатоцитов ряд биохимических методов с целью использования их в качестве критериев жизнеспособности гепатоцитов в системе *in vitro*.

3. Исследовать состояние клеточного гомеостаза гепатоцитов в культуре на воздействие подострой этаноловой интоксикации.

4. Составить паспорт культивируемой линии гепатоцитов.

Собственные данные.

Материал и методы исследования основные цели культивирования в системе *in vitro* клеток различных органов и тканей – выделение большего жизнеспособных клеток, сохранивших морфологическую и функциональную интактность, а также обеспечение максимально большого выхода гепатоцитов относительно исходного количества ткани. В связи с этим предлагаемая оптимизация протокола касается всех этапов выделения, культивирования и анализа клеточных культур гепатоцитов.

– Механическое диспергирование печени: печень перфузировали холодным физиологическим раствором с добавлением коллагеназы I типа (ПанЭко, Россия) без содержания ионов $[Ca^{+}]$. Далее печень помещали в стерильную чашку Петри, содержащую раствор коллагеназы, и стерильными скальпелями измельчали до получения однородной массы.

– Химическое диспергирование печени: ферментативное диспергирование печени: полученные фрагменты оставляли в растворе коллагеназы I типа (ПанЭко, Россия) на 2 часа в темном месте при комнатной температуре. Затем фрагменты помещали в раствор трипсина на 2 часа при температуре 37°C.

– Физико-химический метод диспергирования: далее печень центрифугировали 5 минут при 1000 об/мин. Проводили отмывку полученной суспензии в культуральной среде RPMI-1640 5 минут при 1000 об/мин (ПанЭко, Россия) дважды. Очищенную суспензию проводили в диаколовом градиенте (ПанЭко, Россия) плотностью 1,077 г/см³ и центрифугировали 30 минут при 1000 об/мин. на центрифуге Allegra X-30R (*Beckman Coulter*, Германия). Полученную взвесь клеток собирали пипетками и выливали в чистую пробирку, затем отмывали в культуральной среде RPMI-1640 (ПанЭко, Россия) три раза.

– Определение числа живых гепатоцитов в культуре: жизнеспособность определяли с использованием автоматического счетчика клеток TC10 (Bio-Rad, США). Оптимизированный протокол культивирования гепатоцитов позволяет получить больший выход жизнеспособных гепатоцитов – 95–97%.

– Культивирование до образования монослоя: супернатант отбрасывали, к осадку приливалась полная культуральная среда, состоящая из 20% эмбриональной телячьей сыворотки (ПанЭко, Россия), обогащенной культуральной среды RPMI-1640 (ПанЭко, Россия) и антибиотика гентамицина 10 мкг/мл. Клетки высаживали в чашки Петри, предварительно обработанные 0,2% раствором желатина.

– Морфологический и токсикологический анализ: для токсикологического анализа влияния этанол в культуру гепатоцитов вводили с расчетом *DL*₅₀, через 24 часа культивирования в расчете 75,7 мкг/мл и инкубировали в течение 2 часов при температуре 37°C в CO₂-инкубаторе CB-53 (Binder, Германия).

Культуру гепатоцитов для анализа фаз клеточного цикла и анализа путей программируемой клеточной гибели методом проточной цитофлуориметрии *CyFlowSpace* (Partec, Германия), предварительно снимали со стекла 0,25% раствором трипсина-ЭДТА, действие останавливали отмывочной средой. Далее клетки центрифугировали в течении 5 минут при 700 об/мин. Супернатант отбрасывали, к полученному осадку добавляли 5 мл. раствора параформальдегида разведенного в PBS. Смесь фильтровали через нейлоновый фильтр, окрашивали ядра путем внесения 100 мкл. пропидиум йодида (PI) для анализа клеточного цикла в течении 30 минут в темноте при комнатной температуре. В 1 мл. культур гепатоцитов определяли стадии реализации программы апоптоза, а также клеточного некроза гепатоцитов с использованием флуоресцентных Annexin V, используя коммерческие наборы согласно инструкции производителя – набор Annexin V PI Detection Kit I, BD (Biosciences, США).

ПЦР анализ на исключение контаминации культуры гепатоцитов: использовались праймеры к 25 возбудителям: *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma pneumonia*, *Ureaplasma* sp., *Ureaplasma urealiticum*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Neisseria gonorrhoeae* T.1 и T.2, *Trichomonas vaginalis*, *Cytomegalovirus*, *Gardnerella vaginalis*, HSV-1, 2 (герпесвирус), HCV-6 (герпесвирус), HPV-16,18 (папилломавирус), *Rubella* (краснуха), *Candida albicans*, *Treponema pallidum*, *Toxoplasma*

gondii, *Mycobacterium tuberculosis*, вирусам гепатита А (HAV), В (HBV), С (HCV), D (HDV), G (HDV), вирусу Эпштейн-Барра и др. Определение контаминантов, как тест на микробиологическую стерильность использовали тиогликолевую среду (ТГС), мясопептонный бульон (МПБ); мясопептонный агар (МПА) и жидкую среду Сабуро. ПЦР анализ проводили по конечной точке в режиме «реального времени» на амплификаторе qTOWER 2.2 (Analytik Jena, Германия).

Разработанный нами паспорт клеточной линии гепатоцитов включает:

1. Наименование клеточной культуры: культура гепатоцитов нелинейных беспородных белых мышей *Mus musculus*.
2. Коллекционный шифр: HPMs-1.
3. Номер пассажа и дата закладки клеток на хранение: P1, дата: 12.02.2019г.
4. Условия криоконсервации, режим хранения и жизнеспособность клеток после размораживания: ЭТС и ДМСО для заморозки, при температуре -70°C.
5. Ростовые свойства: посев клеток совершался на культуральные флаконы, в полную среду, содержащую 20% сыворотку, антибиотики и RPMI-1640. Посев клеток совершался в концентрации 1 млн. кл./1 мл, без пересева при температуре 37 °C.
6. Стерильность: отсутствие микробных агентов и микоплазмы.
7. Однородность культуры: присутствие в культуре только гепатоцитов определялось методом проточной цитофлуориметрии фенотипическим маркером глюкозо-6-фосфатаза в присутствии альбумина.
8. Сфера применения: модельная тест-система в научно-исследовательских и фармакологических сферах.

Все этапы исследования проводили на базе научно-исследовательского центра фундаментальных и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии (лаборатория клеточных технологий, лаборатория морфологии (гистология, цитология), лаборатория Биохимии и токсикологии, лаборатория Молекулярной биологии) ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный педагогический университет имени И.Н. Ульянова».

Результаты исследования и их обсуждение

Отличительной особенностью этапов оптимизации протокола в ходе наших исследований является:

- на этапе механического диспергирования использование двойной перфузии холодным физиологическим раствором, без внесения $[Ca^{+}]$, изменили концентрацию используемой коллагеназы;
- использование в составе среды культивирования дополнительных компонентов (селен, инсулин, трансферрин и др.), для достижения цели более длительного сохранения морфофункциональных свойств гепатоцитов в системе *in vitro*.

Перечень функциональных показателей, отражающих токсичность:

1. Определение активности печеночных ферментов, которые позволяют выявлять повреждение и нарушение мембранных систем гепатоцитов (индикаторы цитолиза гепатоцитов), который используется для оценки анаэробного энергетического обмена.

2. Для оценки состояния и соотношения аэробного и анаэробного энергетического обмена анализировали активность фермента лактатдегидрогеназы (ЛДГ), цитохром-с-оксидазы – Ссо (окисление фермента сопровождается появлением мембранного протонного потенциала, который используется клеткой в первую очередь для синтеза АТФ).

Перечень морфологических критериев:

1. Увеличение активности ферментов аланинаминотрансферазы (АлТ) и аспартатаминотрансферазы (АсТ) в плазме крови свидетельствует о повреждении мембран гепатоцитов в процессе ПОЛ, вплоть до их полного разрушения под воздействием различных повреждающих факторов.

2. Анализ клеточного гомеостаза и реализацию путей программированной клеточной гибели проводили методом проточной цитофотометрии.

3. Морфологическая характеристика гепатоцитов в культуре – гепатоциты неправильной полигональной формы с крупным ядром и большим количеством эухроматина. Ядра содержат до 5 ядрышек. Большая часть гепатоцитов – двуядерные, а в цитоплазме клеток присутствуют базофильные включения. Гепатоциты формируют клеточные агрегаты – до 25–30 клеток, напоминающие печеночные балки (рис. 1, 2).

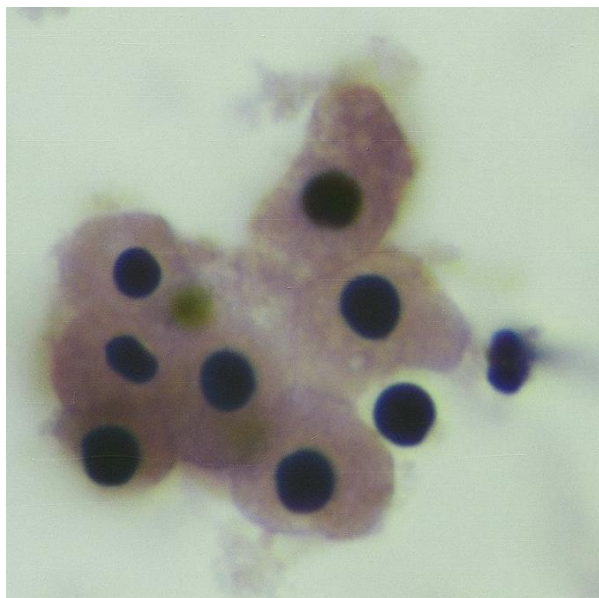


Рис.1. Гепатоциты. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение ок10хоб100

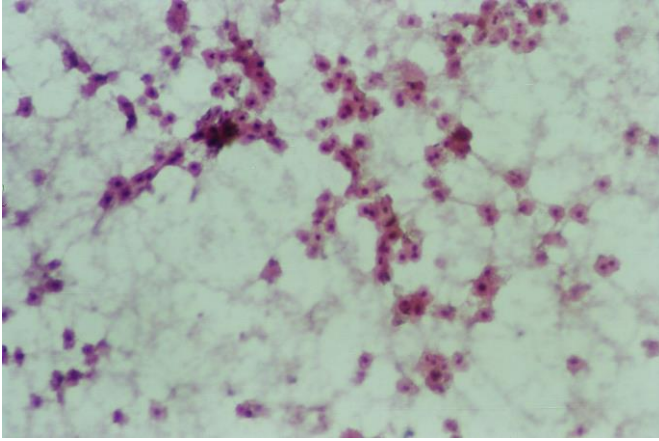


Рис. 2. Формирующийся монослой гепатоцитов.
Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение ок10хоб40

Оптимизированная технология культивирования гепатоцитов может быть использована для получения клеточных линий в качестве тест-системы для испытания гепатопротекторов и гепатотоксинов, для использования в области клеточной трансплантологии для лечения заболеваний печени различной этиологии.

Технологическая карта может быть использована для культивирования гепатоцитов в качестве тест-системы научными лабораториями и институтами, фармацевтическими предприятиями.

Выводы

1. Разработан оптимизированный протокол, позволяющий использовать полученную культуру гепатоцитов в качестве системы для тестирования цитотоксичности этанола как гепатотоксиканта в режиме подострой одно- и многократной интоксикации.

2. Разработанный протокол был адаптирован к условиям культуры гепатоцитов для оценки критериев жизнеспособности гепатоцитов в системе *in vitro*, для этого использован ряд биохимических маркеров таких как – ЛДГ, АлАТ, АсАТ и СсО.

3. Проанализировано состояние клеточного гомеостаза, в частности реализация путей программированной клеточной гибели, соотношение живых и погибших гепатоцитов, а также распределение гепатоцитов по стадиям клеточного цикла.

4. Составлен паспорт клеточной культуры гепатоцитов, который включает полную информацию о полученной культуре.

Список литературы

1. Блажевич О.В. Культивирование клеток: курс лекций. – Минск: БГУ, 2004. – 78 с.
2. Данченко Е.О. Оценка цитотоксичности фармацевтических субстанций с использованием клеточных культур // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2012. – №2. – С. 22–31.
3. Гуцол Л.О. Клиническая патофизиология печени: учебно-методическое пособие / Л.О. Гуцол, С.Ф. Непомнящих. – Иркутск, 2014. – 41 с.

4. Каюпов Б.А. Разработка лиофилизированного препарата из гепатоцитов человека, для лечения печеночной недостаточности / Б.А. Каюпов, С.С. Сапарбаев, С.К. Уалиева, Ж.А. Касымова, А.А. Оралбай, А. Х. Жакупова // С.С. JSC National Scientific Research Medical Center, Astana city, Kazakhstan. – 2013. – Vol. 4, №30. – С. 70–76.
5. Патент США №2346981 20.02.2009. Способ получения жизнеспособных клеток печени человека, в том числе печеночных стволовых клеток/клеток-предшественников // патент США №2346981 2009. Бюл. №5 / Ладлоу Д., Марк Ф [и др.].
6. Патент РФ №RU2271817C1 18.08.2004. Биотрансплантат, способ его получения и способ лечения хронического гепатита и цирроза печени // патент РФ №RU2271817C1 2004. Бюл. №22 / И.Н. Сабурова, А.В. Макаров [и др.].
7. Романова М.А. Изучение цитотоксичности биологически активных соединений на культуре клеток / М.А. Романова, А.Ш. Додонова // Молодой ученый. – 2016. – №18. – С. 110–114.
8. Червонская Г.П. Культура клеток – альтернативная биологическая модель в токсикологических исследованиях // Тезисы докладов 1 съезда токсикологов России. – М., 1998. – 328 с.
9. Чиркин А.А. Молекулярные механизмы повреждения печени // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2000. – №1. – С. 26–33.
10. Allen J.W., Bhatia S.N. Engineering liver therapies for the future // Tissue Engineering. – 2002. – №8(5). – P. 725–737.
11. Hutton J., O'Brien R. Glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene family // The Journal of Biological Chemistry. – 2009. – №284 (43): 29241–5.
12. Tujios S., Fontana R.J. Mechanisms of drug induced liver injury: From bedside to bench // Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology. – 2011. – №8 (4): 202–11.

Масленников Андрей Викторович

канд. биол. наук, доцент

Сорокина Светлана Святославовна

студентка

Филиппова Светлана Сергеевна

аспирант

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный
педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

г. Ульяновск, Ульяновская область

РЕДКИЙ ОХРАНЯЕМЫЙ ВИД СКАБИОЗА ИСЕТСКАЯ (*SCABIOSA ISETENSIS* L.) КАК ОБЪЕКТ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Аннотация: в статье рассматриваются подходы к разработке методики микрклонального размножения редкого и охраняемого вида Ульяновской области скабиозы исетской (*Scabiosa isetensis* L.) *in vitro*. Работа по отработке методики получения каллусной культуры скабиозы начата в 2017 году. В 2018 году из семян *Scabiosa isetensis* L. были получены каллусные культуры.

Ключевые слова: культура клеток, каллус, биотехнология, охраняемые виды, *Scabiosa isetensis* L.

Восстановление численности популяций редких и охраняемых видов растений в природе актуально, но часто при попытках введения их в культуру затруднено по целому ряду причин. Поэтому для уязвимых и хозяй-

ственно перспективных видов, необходим поиск способов их быстрого и массового размножения для возврата в природные экосистемы и для быстрого размножения при необходимости их практического использования человеком. Одним из путей решения проблемы могут быть биотехнологические методы, которые позволяют провести микроразмножение, тиражирование редких и исчезающих видов в культуре *in vitro* (Бутенко, 1999; Носов, 1999).

Понимание необходимости сохранения биологического разнообразия привело к тому, что в последние годы развиваются исследования, направленные на сохранение редких и уязвимых видов, создаются банки-депозитории – хранилища биологического материала, помогающие сохранить биоразнообразие регионов и разработать новые способы рационального и безопасного для природных видов использования биологического материала (Носов, 2010).

Скабиоза исетская (*Scabiosa isetensis* L.) – редкий вид, сокращающий свою численность, в настоящее время занесена в Красную Ульяновской области (2015) и Красные книги сопредельных регионов. В искусственных условиях она очень плохо размножается обычными способами: семена имеют очень низкую всхожесть, проростки часто поражаются грибковыми и вирусными заболеваниями. Наши исследования показали, что для его успешного размножения как перспективный может быть использован метод микроразмножения.

Новизна проведенных исследований заключается в том, что до настоящего времени из-за редкости скабиозы исетской, до сих пор не было попыток провести её клональное микроразмножение, поэтому полученные нами результаты по её клонированию – первый шаг по размножению этого вида *in vitro*.

Выбор микроразмножения как метода выращивания *in vitro* на специальной питательной среде новых растений скабиозы исетской из частей растения-донора был выбран не случайно, так как в ряде случаев имеет ряд преимуществ перед существующими традиционными способами размножения. Во-первых, все получаемые клоны – абсолютные генетические копии исходного «родительского» растения, освобожденные от вирусов. Во-вторых, от одного растения-донора возможно получить огромное количество потомков. В-третьих, растения быстрее развиваются и переходят к репродуктивной фазе, что также имеет значение для быстрого размножения (Егорова, Клунова, 2003; Сельскохозяйственная биотехнология, 2003).

С биологической точки зрения клональное микроразмножение – очень сложный процесс, на который влияют разнообразные факторы: свойства самого растения, состав питательной среды, освещение, температура. Очевидно, что для каждого вида растений должна быть подобрана своя индивидуальная методика (Дитченко, 2007). Поэтому важной задачей нашего исследования стала оптимизация протокола культивирования и

получения регенерантов из клеток изолированных тканей органов скабиозы исетской (*Scabiosa isetensis* L.) в стерильных условиях.

Предыдущий опыт микроклонального размножения и культивирования редких и охраняемых растений нашего региона копеечника крупноцветкового (*Hedysarum grandiflorum* Pall.) (Масленникова, Масленников, 2017) и валерианы русской (*Valeriana rossica* P. Smirn.) (Масленников, Масленникова, 2017) помог подобрать условия культивирования и выращивания эксплантов *Scabiosa isetensis* L. на твердых агаризованных средах.

Обработка протокола микроклонального размножения *in vitro* редкого и охраняемого вида *Scabiosa isetensis* показала, что семена, высаженные в условиях климатической камеры при температуре +26°C и шестнадцатичасовом световом режиме освещения на твердой агаризованной питательной безгормональной среде Мурасиге-Скуга (MS) прорастают через 9 суток при +26°C на свету и всхожесть семян, высаженных в разные сроки изменяется от 9,5 до 10,0%, что показывает возможность выращивания и размножения этого редкого и ценного вида в условиях *in vitro*.

Сеянцы скабиозы исетской, выращенные на безгормональной среде Мурасиге-Скуга развиваются нормально, образуя полноценные побеговую и корневую системы, что позволяет в дальнейшем использовать их для получения стеблевых, листовых и почечных стерильных эксплантов для микроклонального размножения.

В ходе исследования выяснено, что главным условием, благодаря которому у скабиозы исетской происходит дедифференцировка тканей и превращение их в каллус является добавление в питательную среду фитогормонов: ауксинов и цитокининов в оптимальной концентрации: ИУК – 0,5 мг/л и кинетин – 1 мг/л.

В ходе оптимизации протокола культивирования и получения регенерантов из клеток изолированных тканей органов скабиозы исетской (*Scabiosa isetensis* L.) в стерильных условиях выявлено, что лучше всего идет развитие каллусов, взятых с корневой шейки. В среднем срок их полного развития составляет 100 – 110 суток и микроклональное размножение каллусными эксплантами можно проводить, начиная 60 – 65 суток развития каллусов.

Использование каллусных эксплантов показало, что выращивание скабиозы исетской методами клонального микроразмножения *in vitro* перспективно и повышает возможности по восстановлению её популяций в степных и лесостепных экосистемах Приволжской возвышенности.

Список литературы

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. – М.: ФБК-Пресс, 1999. – 160 с.
2. Дитченко Т.И. Культура клеток, тканей и органов растений: курс лекций. – Минск: БГУ, 2007. – 102 с.

3. Егорова Т.А. Основы биотехнологии: учеб. пособие для вузов по спец. «Биология» / Т.А. Егорова, С.М. Клунова. – М.: Академия, 2003. – 207 с.
4. Красная книга Ульяновской области / под науч. ред. Е.А. Артемьевой, А.В. Масленникова, М.В. Корепова. – М.: Буки-Веди, 2015. – 550 с.
5. Масленников А.В., Масленникова Л.А. Современное состояние популяций редкого охраняемого ресурсно-значимого вида – валерианы русской (*Valeriana rossica* P.Smirt.) и возможности её клонального микроразмножения *in vitro* // Природа Симбирского Поволжья: сб. научн. трудов. Вып. 18. – Ульяновск, 2017. – С. 50–54.
6. Масленникова Л.А., Масленников А.В. О состоянии популяций редкого охраняемого вида – копеечника крупноцветкового (*Hedysarum grandiflorum* Pall.) и возможности его клонального микроразмножения *in vitro* // Природа Симбирского Поволжья: сб. научн. трудов. Вып. 18. – Ульяновск, 2017. – С. 55–59.
7. Носов А.М. Культура клеток высших растений – уникальная система, модель, инструмент // Физиология растений. – 1999. – С. 837–844.
8. Носов А.М. Использование клеточных технологий для промышленного получения биологически активных веществ растительного происхождения // Биотехнология. – 2010. – Т. 5. – С. 8–28.
9. Сельскохозяйственная биотехнология / под ред. В.С. Шевелухи. – М., 2003. – 416 с.

Ханды Мария Терентьевна

кандидат биологических наук, научный сотрудник
ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университета
имени М.К. Аммосова»
г. Якутск, Республика Саха (Якутия)

Томилова Светлана Вячеславовна

аспирант кафедры физиологии растений
ФГАОУ ВО «Московского государственного университета
имени М.В. Ломоносова»
г. Москва, Московская область

РАСТЕНИЯ АРКТИКИ КАК ОБЪЕКТ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Аннотация: в настоящей статье рассмотрены работы по внедрению метода культур клеток растений в Якутии. В частности, первый опыт был проведен авторами в 2010 году на базе Института физиологии растений имени К.А.Тимирязева. Из семян лекарственного растения *Thermopsis lanceolata* R.Br. *Subsp. jakutica* (Czeffr.) Schreter были получены каллусные культуры.

Ключевые слова: растения Арктики, Якутия, культура клеток, биотехнология, *Thermopsis*, *Dracosephalum*, *Phlojodicarpus*.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (проект №18–74–00097).

Двадцать первый век справедливо признан ЮНЕСКО веком зеленых технологий. Поддерживаются исследования, направленные на сохранение и возобновление природных ресурсов. Приходит понимание, что генетический фонд живых объектов является национальным достоянием государства. В частности, в России в 2015 году на базе Московского

государственного университета создан Национальный банк-депозитарий живых систем «Ноев ковчег». Проект «Ноев ковчег» посвящен созданию многофункционального сетевого хранилища биологического материала. Ведется работа с материалом всех возможных типов – от отдельных биологических молекул до целых живых организмов. Создание депозитария позволяет сохранить биоразнообразие планеты и создать новые способы полезного использования биологического материала.

Культура клеток высших растений – активно развивающееся и перспективное направление современной биотехнологии. Клетки *in vitro* являются экспериментально созданной популяцией дедифференцированных соматических клеток, имеющих потенциал регенерировать целое растение. Эта система имеет ряд направлений использования. Первое, как модель для исследования многих биохимических и физиологических процессов в растительном организме. Второе, как основа генетических и клеточных технологий. Третье, как объект сельскохозяйственной и биотехнологической промышленности. Для сохранения генофонда – как основа биотехнологических коллекций, в том числе криобанков. В сельском хозяйстве – для микрোকлонального размножения растений, их оздоровления или для получения новых форм растений (клеточная селекция) (Бутенко, 1999). Культуру клеток ценных лекарственных растений можно выращивать в биореакторах промышленного объема и использовать для получения целевых вторичных метаболитов (Бутенко, 1964; 1986; Носов, 2010). Подобный способ получения биомассы способствует сохранению популяций редких и исчезающих экономически ценных растений, при этом сырье стандартно, полностью свободно от всех видов поллютантов (Носов, 1999). Все это делает исследования в области культур клеток и тканей высших растений крайне востребованными и актуальными.

Республика Саха (Якутия) арктический регион, является самым большим субъектом Российской Федерации и обладает высоким уровнем природно-ресурсного экономического потенциала. Особенности климата, светового режима, доминирование криолитозоны определяют большое разнообразие эндемичных видов растений с уникальным составом вторичных метаболитов. Представители флоры Якутии используются в официальной и в народной медицине. Однако, сбор растений в дикой природе представляет существенную опасность для сохранения природных популяций. Для внедрения в медицинскую практику потенциала растений Арктики, использования некоторых видов, систематически близких к официальным, необходимо применение современных методов. В связи с этим возникает потребность в возобновляемых источниках физиологически активных веществ растительного происхождения, как культура клеток высших растений.

В настоящей работе рассмотрены примеры внедрения метода культур клеток растений в Якутии. Первый опыт был проведен авторами в 2010 году на базе Института физиологии растений имени К.А. Тимирязева. Из семян растения термописис якутский *Thermopsis lanceolata* R.Br. subsp. *jakutica* (Czefr.) Schreter были получены каллусные культуры.

Термописис якутский многолетнее травянистое растение, подвид термописиса ланцетного, 2а категории редкости, численность которого сокращается в результате разрушения местообитаний, а также из-за сбора на лекарственное сырье. Эндемик Центральной Якутии (Красная книга РС(Я), 2017).

Все растение *T. lanceolata* очень ядовито из-за содержащихся в нем алкалоидов (термописин, гомотермописин, цитизин и др.). *T. lanceolata* применяют в качестве отхаркивающих средств, стимулятора дыхания и кровообращения (Минаева, 1991). По данным Макарова А.А. содержание алкалоидов в растениях якутской популяции термописиса выше, чем в растениях из других регионов (Макаров, 1977; 2002).

Для исследования и оптимизации способов получения каллусных культур были взяты семена *Thermopsis lanceolata* R.Br. Subsp. *jakutica* (Czeffr.) Schrete. (Амгинская популяция). Часть семян подвергли стратификации при -18°C в течение 2 суток, а часть хранилось при комнатной температуре.

В эксперименте для введения в культуру использовали несколько вариантов модификации среды Мурасиге-Скуга (МС): среда МС без добавления фитогормонов и два варианта среды МС с добавлением ауксинов и цитокининов (первый вариант – 0,5 мг/л α -нафтиуксусной кислоты – НУК и 0,05 мг/л 6-бензиламинопурина – БАП, второй вариант – 1 мг/л 2,4-дихлорфеноуксусной кислоты – 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина – 6-фурфуриламинопурин)

Посаженные семена были помещены для прорастания и каллусогенеза в термостатируемую комнату при +25°C. Первичные каллусы получили на среде с регуляторами роста 2,4 Д 1 мг/л: кинетин 0,5 мг/л в обоих вариантах (до и после стратификации).

Второй опыт был опубликован в 2014 году группой Охлопковой Ж.М. Были получены каллусные культуры клеток змееголовника пальчатого *Dracocephalum palmatum* Steph (Kucharova, Okhlopkova, 2014). Змееголовник пальчатый – многолетний кустарничек, эндемик Восточной Сибири и Дальнего Востока, произрастает в горной местности (Егорова, 2016). Из надземных частей *D. palmatum* было выделено 23 соединения (фенилпропаноиды, кумарины, флавоноиды и тритерпены). Среди них были обнаружены восемь соединений не характерных для рода *Dracocephalum*: сальвианоловая кислота В, кафтаровая кислота, цихоровая кислота, умбеллиферон, эскулетин, апигенин-7-О- β -d-глюкуронопиранозид, изорхоифолин и лютеолин-4'-О- β -d-глюкопиранозид впервые в роду *Dracocephalum* и доказаны их антиоксидантные свойства на культуре клеток *in vitro* (Olennikov et al., 2013).

В эксперименте в качестве эксплантов были использованы живые ткани растения *D. palmatum* оймьяконской популяции. Индукцию каллусогенеза проводили на среде МС с БАП 2 мг/л и НУК 0,01 мг/л.

Были получены хорошо растущие каллусные культуры клеток *D. palmatum* и показано наличие в них биологически-активных веществ фенольной природы. Исследования с данным объектом в настоящее время продолжаются (Кучарова, Охлопкова, 2014; 2018).

Следующий перспективный вид для разработки биотехнологического способа получения клеточной биомассы вздутоплодника сибирского *Phlojodicarpus sibiricus* (Steph.) K.-Pol.). *P. sibiricus* зарегистрирован в Государственном Реестре лекарственных средств РФ в качестве лекарственного растительного сырья. Его корневища и корни обладают сосудорасширяющими, гипотензивными, адренолитическими и спазмолитическими свойствами и служат продуктом для получения препарата «Фловирин». Субстанция фловирин входит в состав общетонизирующего средства растительного происхождения «Сафинор». Он применяется при тяжелых нагрузках, после истощающих заболеваний, как восстановительное средство. Его лекарственные свойства обусловлены содержанием пиранокумаринов (виснадин, дигидросамидин).

Однако, *P. sibiricus* занесен в Красную книгу Якутии, как вид второй категории редкости. Заготовка его в естественных условиях может привести к уничтожению природных популяций (Красная Книга РС(Я), 2017). Из литературы также известно, что корни растения вздутоплодника накапливают тяжелые металлы: цинк, никель, селен и молибден, соответственно использование растений, произрастающих на не контролируемых участках, несет большой риск для здоровья человека.

В настоящее время авторами проводятся эксперименты по получению объектов *in vitro* *P. sibiricus*. При успешной реализации результаты станут основой для развития практического приложения данной отрасли в республике.

Таким образом, разработка технологии получения культуры клеток ценных исчезающих и редких лекарственных растений Якутии с целью получения стандартной, экологически чистой биомассы с содержанием биологически активных вторичных метаболитов является крайне актуальной задачей биологии и биотехнологии для нужд медицинской промышленности.

Список литературы

1. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964. – 350 с.
2. Бутенко Р.Г. Клеточные технологии для получения экономически важных веществ растительного происхождения // Культура клеток растений и биотехнология. – М.: Наука, 1986. – С. 3–20.
3. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. – М.: ФБРК-Пресс, 1999. – 160 с.
4. Егорова П.С. К интродукции *Dracocephalum palmatum* Steph. (змееголовника пальчатого) в Якутском ботаническом саду // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. Серия: Биология. – 2016. – №8 (142). – С. 74–79.
5. Макаров А.А. Лекарственные растения в экстремальных условиях Якутии // Материалы к изучению лекарственной флоры Якутии. – Якутск: Изд-во Якутского гос. ун-та, 1977. – С. 3–7.
6. Макаров А.А. Лекарственные растения Якутии. – Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2002. – 254 с.
7. Минаева В.Г. Лекарственные растения Сибири. – Новосибирск: Наука, 1991. – 430 с.
8. Носов А.М. Культура клеток высших растений – уникальная система, модель, инструмент // Физиология растений. – 1999. – Вып. 46. – С. 837–844.

9. Носов А.М. Использование клеточных технологий для промышленного получения биологически активных веществ растительного происхождения // Биотехнология. – 2010. – Т. 5. – С. 8–28.
10. Данилова Н.С. Красная книга Республики Саха (Якутия). Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды растений и грибов. Т. 1. – М.: Реарт, 2017. – 412 с.
11. Кучарова Е.В. Перспективы *Dracocephalum* в культуре клеток / Е.В. Кучарова, Ж.М. Охлопкова // Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды: сборник материалов Годичного собрания Общества физиологов растений России, Всероссийской научной конференции с международным участием и школы молодых ученых (Иркутск, 10–15 июля 2018 г.): в 2 ч. Ч. 2. – Иркутск: Изд-во Института географии им. В.Б. Сочавы СО РАН, 2018. – С. 1303–1304.
12. Kucharova E.V., Okhlopkova Zh.M. Preparation of cell callus culture of *Dracocephalum palmatum* Steph. // The 2nd International conference with the elements of scientific school for youth «Phytobiotechnology Prospects for improving the quality of Life in the North». – NEFU Publishing House Yakutsk, 2014. – P. 87–89.
13. Olennikov D.N., Chirikova N.K., Okhlopkova Z.M., Zulfugarov I.S. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Tánara Ótó (*Dracocephalum palmatum* Stephan), a Medicinal Plant Used by the North-Yakutian Nomads // Molecules. – 2013. – №18. – P. 14105–14121.
14. Депозитарий живых систем «Ноев ковчег» [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://depository.MCu.ru/> (дата обращения: 10.04.2019).

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ, ЦИТОЛОГИЯ, ГИСТОЛОГИЯ, АНАТОМИЯ И ФИЗИОЛОГИЯ

Антонова Елена Ивановна

д-р биол. наук, профессор, директор
Научно-исследовательский центр фундаментальных и прикладных
проблем биоэкологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Ульяновский
государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

Федорова Светлана Владимировна

аспирант, младший научный сотрудник
Научно-исследовательский центр фундаментальных и прикладных
проблем биоэкологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Ульяновский
государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

Калиновская Ольга Владимировна

старший научный сотрудник
Научно-исследовательский центр фундаментальных и прикладных
проблем биоэкологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Ульяновский
государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

Соловьев Алексей Вячеславович

канд. биол. наук, заместитель директора,
старший научный сотрудник, доцент
Научно-исследовательский центр фундаментальных и прикладных
проблем биоэкологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Ульяновский
государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

Костина Ольга Михайловна

младший научный сотрудник
Научно-исследовательский центр фундаментальных и прикладных
проблем биоэкологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Ульяновский
государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

Вакулова Екатерина Сергеевна

магистрант
ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный
педагогический университет им. И.Н. Ульянова»
г. Ульяновск, Ульяновская область

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЭМБРИОНОВ НА КРИТИЧЕСКИЕ ПЕРИОДЫ ЭМБРИОГЕНЕЗА В УСЛОВИЯХ ИНТОКСИКАЦИИ 4 ФЕНИЛПИПЕРИДИНОМ

***Аннотация:** в работе проанализированы морфологические показате-
ли – масса, размер тела и летальность эмбрионов, развитие которых
проходило в условиях пренатальной интоксикации 4-фенилпиперидином
на критические (сенситивные) периоды эмбриогенеза на организменном*

уровне. Определено, что значения веса и размер тела эмбрионов на критические периоды эмбриогенеза под воздействием 4-фенилпиперидина в группе сотягощенной беременностью выше, чем в контрольной группе. Отмечается так же более насыщенный красный цвет кожи и хорошо определяются в большом количестве полнокровные сосуды различного калибра.

Ключевые слова: дизайнерские наркотики, 4-фенилпиперидин, печень, наркотические анальгетики, эмбриогенез, пренатальная интоксикация, критические периоды эмбриогенеза.

В настоящее время, употребление новых синтетических наркотиков, называемых также «дизайнерские наркотики» в подростково-молодежной среде является серьезной проблемой [6]. Согласно рекомендациям ассоциации клинических токсикологов, «дизайнерские» наркотики – это психоактивные вещества, синтетические заменители какого-либо натурального препарата, полностью воспроизводящие наркотические свойства последнего, либо близкие, но не идентичные по строению вещества, как обладающие, так и не обладающие сходной фармакологической активностью. «Дизайнерские наркотики» были синтезированы с целью «обхода» норм существующего законодательства [19; 30]. Классические наркотики и их прекурсоры включены в список наркотических средств, запрещенных или ограниченных к обороту, что в свою очередь позволяет в уголовном порядке решать вопрос об ответственности за сбыт и распространение наркотиков [16; 17]. В тоже время исполнение запрета оборота «дизайнерских» наркотиков затруднено, несмотря на наличие в законодательстве понятия «производные наркотических средств и психотропных веществ» и проводимых мер по ограничению их оборота [10; 22; 23; 25]. Так же причиной активного распространения нового класса химических веществ, производимых в подпольных лабораториях, является экономически более выгодная альтернатива производству героина [29].

Среди производных 4-фенилпиперидина, применяющихся в настоящее время как самостоятельные наркотики имеются опиоидные анальгетики, в их ряду: меперидин, фентанил, суфентанил, альфентанил и другие. Фенилпиперидины являются химическим классом препаратов с фенильной частью, непосредственно присоединяющейся к пиперидину. Фармакологические эффекты фенилпиперидинов включают морфиноподобную активность у некоторых производных, в то время как в других они оказывают сильное воздействие на центральную нервную систему. Морфин является типичным опиоидным анальгетиком [29]. Меперидин (петидин) был синтезирован немецким химиком Отто Эйслеб, первоначально продавался как один из первых синтетических антихолинергических агентов. Позже обнаружили свойства анальгетика. Фентанил был синтезирован в 1960-е годы под руководством доктора Пола Янссена и является анальгетиком, который находит своё применение в анестезиологии. Длительное употребление чревато развитием зависимости, а биологическое воздействие на организм неотличимо от того, которое вызывается героином, с тем исключением, что фентанил может быть в сотни раз сильнее. В 2018 году

установлено, что главным убийцей американских наркоманов в последние десятилетия является именно фентанил, который широко распространен на территории США. Он действует как мощный агонист μ -опиоидных рецепторов в центральной нервной системе (ЦНС), вызывая возбуждение, угнетение дыхания и анальгезию [33]. В 2013 году были зарегистрированы более шестидесяти случаев передозировки с летальным исходом фентанилом «дизайнерским наркотиком» опиоидного ряда класса 4-фенилпиперидинов в районах Род-Айленда и Пенсильвании [31]. На черном рынке спектр синтетических производных опиоидов прозван «China White», в честь их предполагаемой химической чистоты [28].

Повсеместные отравления новыми видами «дизайнерских наркотиков», представляет трудности для врачей, связанные с клинической и лабораторной диагностикой, лечением больных и их медицинским освидетельствованием, а установление причины смерти представляет сложности при проведении судебно-медицинской экспертизы [4].

Химическая формула 4- фенилпиперидина $C_{11}H_{15}N$, его молекулярная масса 161.248 g/mol. Образование происходит при взаимодействии в трифторметилсульфокислоте между тетрагидропиперидином и бензолом.

На сегодняшний день, в отечественной и зарубежной литературе недостаточно информации о клинике, диагностике и лечении отравлений новыми наркотическими средствами. Практически отсутствуют данные о последствиях длительного употребления изучению воздействия на органогенез организма, и печени в частности, в эмбриогенезе. Таким образом, не включенные в Перечень Постановления Правительства РФ от 30.06.1998 N 681 (ред. от 19.12.2018) и «Список сильнодействующих и ядовитых веществ», контролируемых законодательством РФ, представляет в настоящее время серьезную проблему для правоохранительных органов России и общества в целом и требует тщательного изучения воздействия на организм человека.

Известно, что опиоиды пагубно воздействуют на процессы регенерации тканей и влияют на развитие различных органов в онтогенезе [32]. Крайне важно изучение действия прекурсора «дизайнерских наркотиков» опиоидного ряда – 4-фенилпиперидина на развитие организма в эмбриогенезе, в частности влияния данного вещества на функциональное развитие печени, учитывая его высокую токсичность.

Исследование постнатального развития потомства в значительной степени позволяет избежать недооценки опасности воздействия химических соединений на эмбриогенез. Важно определение чувствительности эмбрионов при воздействии изучаемых факторов: характер эффекта в значительной степени зависит от стадии эмбриогенеза, на которую действует химическое вещество в течение всей беременности [15; 3; 21].

В условиях действия «дизайнерских наркотиков» изучение механизмов регенерации органов, которые, непосредственно участвуют в поддержании гомеостаза организма, представляет актуальную медико-биологическую и биосоциальную проблему, как в фундаментальном, так и в прикладном аспекте [14]. Одним из таких органов является печень,

осуществляющая межсистемную кооперацию в организме, а сложность её структуры, полифункциональность, быстрота вовлечения в деструктивные и репаративные процессы – определяет интерес исследователей к сравнительному изучению закономерностей структурно-функциональной организации, анализу адаптационных перестроек, выявлению механизмов, обеспечивающих развитие организма в целом [9; 27].

В эмбриогенезе у млекопитающих печень является органом, в котором реализуются два гистогенетических процесса – гемопоэз и формирование собственно печеночной ткани [15].

У млекопитающих в эмбриональный и плодный периоды метаболизм ксенобиотиков либо не происходит, либо находится на очень низком уровне. После родов действие репрессоров падает, а интенсивность метаболизма ксенобиотиков нарастает в связи с образованием соответствующих ферментов и кофакторов [11].

Особенно опасным является действие психотропного вещества на организм на критические периоды развития зародыша, когда чувствительность эмбриона повышена [13]. Авторы связывают «критические периоды» с плацентацией (9–10 сутки эмбриогенеза), а также с моментом закладки органов (11 сутки) и ростом плода (начало и вторая половина беременности). Непосредственно день родов (21 сутки эмбриогенеза) для эмбриона, также является критическим, что связано с резким изменением окружающей среды и влечет за собой реализацию стресс-реакции [5].

Цель работы – изучить морфологические показатели: масса, размер тела и летальность, эмбрионов, развитие которых проходило в условиях пренатальной интоксикации 4-фенилпиперидином на критические (сенситивные) периоды эмбриогенеза на организменном уровне.

Исследования проводились на 121 особях (54 из которых составили контрольную группу) клинически здоровых линиях белых беспородных мышей вида *Mus musculus*, весом 15–18 г.

Пренатальную интоксикацию самок в течение всего периода беременности (отяжеленная беременность) моделировали путем приготовления водного раствора, который содержал полулетальную/среднесмертельную дозу (DL_{50}) 4-фенилпиперидина в концентрации 98 мг вещества на 1 кг массы животного. Приготовленный водный раствор давали животным в виде единственного источника питья.

Первую группу составили контрольные животные – потомство, в эмбриональный и постэмбриональный период.

Вторую группу – потомство, составили животные, развитие которых в эмбриогенезе, проходило в условиях хронической пренатальной интоксикации 4-фенилпиперидином полулетальной/среднесмертельной дозой (DL_{50}) (таблица 1).

Таблица 1

Количество животных, экспериментальные группы и сроки забора материала для исследований

Наименование группы	Критические (сенситивные) периоды (сутки) онтогенеза и количество особей			Всего особей
	Эмбриональный период		Период родов	
	9 сутки	11 сутки	21 сутки	
Первая группа – контроль	11	11	32	54
Вторая группа – хроническая пренатальная интоксикация	24	28	15	67
<i>Итого</i>				<i>121</i>

Животные для экспериментов приобретались в Федеральном государственном унитарном предприятии «Питомник лабораторных животных «РАППОЛОВО» (г. Санкт-Петербург), а также в филиале «Столбовая» Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства». После поставки мышей в течение 2-х недель мыши адаптировались к условиям вивария.

При отборе для опыта у мышей-самок проводилось изучение эстрального цикла – проходило окрашивание вагинальных мазков метиленовой синью с последующей оценкой состояния цикла по 4-м стадиям эструса в зависимости от элементов мазков [7].

Спаривание производилось путем подсаживания самцов к самкам в соотношении 1:1. Первый день беременности устанавливался на основании обнаружения у нормально циклирующих самок сперматозоидов в вагинальном мазке. Мазок из влагалища самок забирался слегка увлажненным ватным тампоном, тщательно растирался в капле дистиллированной воды на обезжиренном предметном стекле. Полученный препарат микроскопировали, в случае обнаружения сперматозоидов производили маркировку, определяли массу тела самки, отсаживали ее в отдельную клетку и начинали отсчет срока беременности [1; 8; 18].

С первого же дня, в течение всего срока беременности самкам в опытной группе в виде единственного источника питья ежедневно получали водный раствор, содержащий полуетальную дозу (DL₅₀) 4-фенилпиперидина. Таким образом, моделировалась хроническая пренатальная наркотическая интоксикация плода.

Все серии экспериментов проводили в две повторности в зимний период с учетом физиологического ритма с 9 до 12 часов [24].

Определение массы тела эмбрионов проводили путем взвешивания на весах Mettler Toledo (Швейцария), осуществляли измерение длины тела эмбрионов и регистрировали места резорбций плодов по методу Карасевой Е.В. [8].

Отмечено, что масса эмбрионов после хронического воздействия 4-фенилпиперидина на весь эмбриональный период стабильно больше на все критические периоды эмбриогенеза (таблица 2, рис. 1) в сравнении с контрольной группой.

Так масса эмбрионов на 9 сутки в группе хронической пренатальной интоксикации больше на 19,4% относительно массы эмбрионов контрольной группы эмбрионов.

Масса эмбрионов на 11 сутки эмбриогенеза больше на 25% и на период родов в наркотизированной группе на 21,5% относительно массы эмбрионов контрольной группы.

Также следует отметить, что на организменном уровне размер тела у обеих групп животных последовательно увеличивается от эмбрионального периода к родам (таблица 3, рис. 1), при этом у эмбрионов с хронической пренатальной интоксикацией показатели увеличиваются в большей мере. Размер эмбрионов на 9 сутки в наркотизированной группе больше в сравнении с контрольной группой на 11,4%, на 11 сутки – на 8% и на период родов на 6,9%.

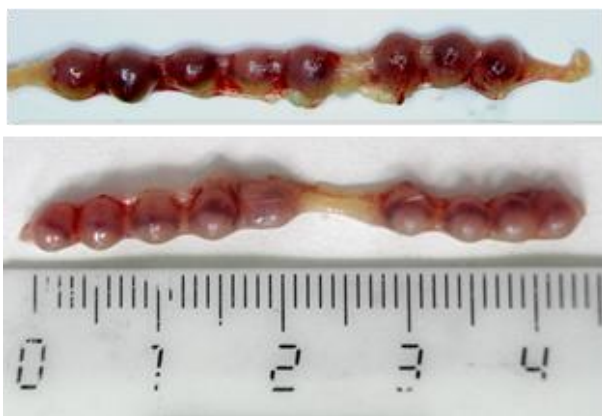


Рис. 1. Группа хронической пренатальной интоксикации 4-фенилпиперидином. 9 сутки эмбрионального развития

Помимо перечисленных наблюдений, были выявлены случаи резорбции плодов. В этих случаях наблюдались плоды с задержкой роста, а также места бывшей имплантации, в этом случае фиксировалось полное рассасывание плодов [8].

Таким образом, были изучены морфологические показатели эмбрионов на критические периоды эмбриогенеза под воздействием 4-фенилпиперидина и отмечено, что масса и размеры эмбрионов в группе с отягощенной беременностью выше, чем масса тела и длина эмбрионов в контрольной группе. Так же отмечается более насыщенный красный цвет

кожи, хорошо определяются в большом количестве полнокровные сосуды различного калибра.

Список литературы

1. Абрашова Т.В. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных / Т.В. Абрашова, Я.А. Гушин, М.А. Ковалева [и др.]. – СПб.: Лема, 2013. – С. 10–13.
2. Абросимова О.А. Биология размножения и развития: курс лекций / О.А. Абросимова, В.Ю. Горбунова. – Уфа: Издательство БГПУ, 2006. – 140 с.
3. Брюхин Г.В. Человек. Спорт. Медицина / Г.В. Брюхин, М.Л. Сизоненко, Ю.Н. Романов [и др.]. – 2012. – С. 83–88.
4. Долгова О.Б. Проблемы судебно-медицинской диагностики смертельных отравлений «дизайнерскими» наркотиками / О.Б. Долгова, М.С. Ефимова, И.А. Грехов // Уральский медицинский журнал. – 2018. – №7. – С. 166–171.
5. Дыбан А.П. Очерки патологической эмбриологии человека. – Л.: Медгиз, 1959. – 327 с.
6. Егоров А.Ю. Дизайнерские наркотики: новая проблема подростковой наркологии // Вопросы психического здоровья детей и подростков. – 2018. – №2. – С. 83–92.
7. Западнюк И.П. Лабораторные животные, их разведение, содержание и использование в эксперименте / И.П. Западнюк, В.И. Западнюк, Е.А. Захария / под ред. И.И. Федорова. – Киев: Госмедиздат УССР, 1962.
8. Карасева Е.В. Методы изучения грызунов в полевых условиях / Е.В. Карасева, А.Ю. Телицына, О.А. Жигальская. – М.: ЛКИ, 2008. – 416 с.
9. Костина Л.Ю. Лимфатический регион печени и пищевода в условиях надпеченочного блока портального кровообращения и лазерного облучения печени [Текст]: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.03.01 / Л.Ю. Костина. – Новосибирск, 2012. – 18 с.
10. Кодекс Российской Федерации об административных правонарушениях от 30.12.2001 №195-ФЗ (ред. от 30.10.2017) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_34661/ (дата обращения: 17.05.2019).
11. Куценко С.А. Основы токсикологии. – СПб., 2002. – 395 с.
12. Межрегиональная благотворительная общественная организация «Ассоциация клинических токсикологов». Федеральные клинические рекомендации «Отравление наркотиками и психоактивными веществами» – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 41 с.
13. Москвитина Н.С. Нарушения эмбрионального развития позвоночных животных в условиях техногенного загрязнения среды / Н.С. Москвитина, В.Н. Куранова, С.В. Савельев // Сибирский экологический журнал. – 2011. – №4. – С. 487–495.
14. Мрыхин В.В. Психиатрические аспекты употребления дизайнерских наркотиков и новых психоактивных веществ / В.В. Мрыхин, А.В. Анцыборов // Интерактивная наука. – 2017. – №2 (12). – С. 64–74.
15. Паюшина О.В. Клеточный состав и регуляторные функции стромы зародышевой печени / О.В. Паюшина, Е.И. Домарацкая, В.И. Старостин // Цитология. – 2012. – Т. 54, №5. – С. 369–380.
16. Постановление Правительства РФ от 01.10.2012 № 1002 (ред. от 19.12.2018) «Об утверждении значительного, крупного и особо крупного размеров наркотических средств и психотропных веществ, а также значительного, крупного и особо крупного размеров для растений, содержащих наркотические средства или психотропные вещества, либо их частей, содержащих наркотические средства или психотропные вещества, для целей статей 228, 228.1, 229 и 229.1 Уголовного кодекса Российской Федерации» [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_136206/92d969e26a4326-c5d02fa79b8f9cf4994ee5633b/ (дата обращения: 17.05.2019).
17. Постановление Правительства РФ от 30.06.1998 № 681 (ред. от 29.07.2017) «Об утверждении перечня наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в Российской Федерации» [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://base.garant.ru/12112176/> (дата обращения: 17.05.2019).

18. Саноцкий И.В. Методы определения токсичности и опасности химических веществ (токсикометрия). – М.: Медицина, 1970. – 344 с.
19. Степушенко О.А. Дизайнерские наркотики и проблема отнесения их к аналогам наркотических средств / О.А. Степушенко, И.М. Фицев, В.К. Блохин [и др.] // Адвокатская практика. – 2011. – №1. – С. 11–13.
20. Сизоненко М.Л. Роль хронического экспериментального поражения печени матери в нарушении генеративной функции потомства / М.Л. Сизоненко, Г.В. Брюхин, А.С. Романов [и др.] // Вестник Южно-Уральского государственного университета. – №8 (267). – С. 98–102.
21. Соляникова Д.Р. Особенности влагалищного эпителия самок крыс в разные фазы полового цикла в зимний и летний периоды года / Д.Р. Соляникова, Г.В. Брюхин // Вопросы морфологии XXI века. – 2018. – №5. – С. 226–230.
22. Списки сильнодействующих и ядовитых веществ (утв. Постановлением Правительства Российской Федерации от 29 декабря 2007 г. №964 «Об утверждении списка сильнодействующих и ядовитых веществ для целей статьи 234 и других статей Уголовного кодекса Российской Федерации, а также крупного размера сильнодействующих веществ для целей статьи 234 Уголовного кодекса Российской Федерации») // Российская газета. – 2008. – 16 января, №4563 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://rg.ru/2008/01/16/vesh-estvadok.html> (дата обращения: 17.05.2019).
23. Сыромятников С.В. Производные наркотических средств и психотропных веществ / С.В. Сыромятников, И.И. Сарычев // Наркоконтроль. – 2011. – №2. – С. 21–25.
24. Ткачёв Д.А. Постинкубационный морфогенез кур / Д.А. Ткачёв, А.А. Ткачёв, Н.Н. Крикливый // Птицеводство. – 2007. – №4. – С. 54–55.
25. Уголовный кодекс Российской Федерации от 13.06.1996 № 63-ФЗ (ред. от 29.07.2017; с изм. и доп., вступ. в силу с 26.08.2017) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_10699/ (дата обращения: 17.05.2019).
26. Федеральный закон от 08.01.1998 № 3-ФЗ (ред. от 03.07.2016) «О наркотических средствах и психотропных веществах» (с изм. и доп., вступ. в силу с 01.01.2017) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://base.garant.ru/-12107402/> (дата обращения: 17.05.2019).
27. Хамитова Л.Е. Сравнительный морфогенез печени птиц синантропов урбобиоценозов и гибридных форм кросс-линий кур в чувствительные периоды онтогенеза [Текст]: автореф. ... дис. канд. биологических наук 03.02.04 / Л.Е. Хамитова. – Омск, 2015. – 14 с.
28. Carlos Ramos-Matos, Wilfredo López-Ojeda, China White: Clinical Insights of an Evolving Designer Underground Drug Universal Journal of Clinical Medicine 3(1): 6–9, 2015.
29. Carroll F.I., Lewin A.H., Mascarella S.W., Seltzman H.H., Reddy P.A., Designer drugs: a medicinal chemistry perspective, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1248 (2012) 18–38.
30. Lindigkeit R., Boehme A., Eiserloh I., Luebbecke M., Wiggermann M., Ernst L., Beuerle T. Spice: A never ending story? *Forensic Science International*. 2009. Vol. 191. Pp. 58–63. doi: 10.1016/j.forsciint.2009.06.008.
31. Roy K. *Advances in QSAR Modeling: Applications in Pharmaceutical, Chemical, Food, Agricultural and Environmental Sciences* // Springer International Publishing. – Jackson: Springer International Publishing, 2017. – 555 p.
32. Stiles J. Effect of topical administration of 1% morphine sulfate solution on signs of pain and corneal wound healing in dogs // *Am. J. Vet. Res.* 2003. Vol. 64, №7. P. 813–818.
33. Wang B.T., Colby J.M., Wu A.H., Lynch K.L. Cross-Reactivity of Acetylfentanyl and Risperidone With a Fentanyl Immunoassay // *Anal Toxicol* (2014) 672–675.

Башук Виктория Владимировна
канд. мед. наук, профессор

Павлова Татьяна Васильевна
д-р мед. наук, профессор

Марковская Вера Александровна
канд. мед. наук, доцент

ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный
исследовательский университет»
г. Белгород, Белгородская область

DOI: 10.31483/r-22112

ГЕРИАТРИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ В ИЗУЧЕНИИ ЭРИТРОЦИТОВ

Аннотация: в данной работе авторы задаются вопросом увеличения продолжительности жизни. Данная задача является очень важной и общегосударственной. Отмечается, что решение этой проблемы невозможно без применения инновационных подходов. Необходим поиск оценочных шкал для качественного анализа проблемы преждевременного старения сердечно-сосудистой системы, приводящей как к инвалидизации, так и к смертности. Данный вопрос обусловлен также тем, что в ряде стран, к которым в последнее время можно отнести и Российскую Федерацию, наблюдается увеличение продолжительности жизни.

Ключевые слова: эритроциты, гериатрия, сердечно-сосудистая система, возраст.

Введение. Несмотря на бесспорный прорыв в направлении увеличения продолжительности жизни, все же остается ряд нерешенных вопросов, имеющих отношение к изучению, профилактике, лечению заболеваний, которые часто идут рядом с увеличением возраста. К ним безусловно, можно отнести заболевания сердечно-сосудистой системы, эндокринопатии, в первую очередь, сахарный диабет, нарушение обмена, с четко выраженной направленностью в сторону ожирения. Особенно неблагоприятным является их сочетанный вариант. Мировая тенденция, несмотря на бесспорный прогресс в изучении данной проблемы, еще далека от решения данных вопросов. Крайне актуальным является поиск новых подходов, дающих возможность дать объективную персонализированную оценку в оценке состояния человека в возрастных аспектах.

Цель исследования – разработать персонализированные инновационные подходы для констатации состояния здоровья у людей пожилого и старческого возраста.

Материалы и методы исследования. Центрами для исследования были выбраны: городская поликлиника №7, муниципальная городская клиническая больница №2 г. Белгорода, а также кафедра патологии медицинского института и Центр развития нанотехнологий ФГАОУ ВПО НИУ «БелГУ». Для персонализированного изучения было отобрано 163 реципиента пожилого возраста.

Исследуемые, лица пожилого возраста, были разделены на пять групп. При этом, 31 реципиент были практические здоровые люди пожилого и старческого возраста (возраст от 60 до 79 лет, средний – 68,7±2,1 года, среди которых женщин было: 16, а мужчин – 15). 2-ю группу представили 32 человека пожилого и старческого возраста, имеющие артериальную гипертензию (АГ) II-III степени в сочетании с гиперхолестеринемией (ГХС) или гиперлипидемией (ГЛ), средний возраст которых составлял 68,8±2,6 года, среди которых было: 13 женщин и 18 мужчин. В 3-ю группу вошло 32 пациента с хронической сердечной недостаточностью (ХСН) I функционального класса (ФК) – 12 женщин и 20 мужчин. 4-ю группу составили 33 пациента в возрасте от 60 до 69 лет, средний при этом был: 66,2±2,4 года, среди которых было 12 женщин и 21 мужчина с ХСН ФК II-III. В 5-й группе было 35 исследуемых имеющих ХСН ФК IV в возрасте от 60 до 79 лет (средний при этом составлял 71,2±2,3 года), среди которых было 9 женщин и 26 мужчин.

Помимо общеклинических методов исследования, были применены инновационные методики сканирующей микроскопии крови. После предварительного изучения форменных элементов крови, для предметного изучения были отобраны эритроциты, как клетки, в наибольшей степени отвечающие за состояние организма в ухудшенном аспекте кровообращения при патологии сердечно-сосудистой системы. Причем, так как продолжительность данных клеток крови не превышает четырех месяцев, мы можем рассматривать факт их изменения, как отображающей картину состояния организма на момент изучения. Следует отметить, что помимо транспорта газов (кислорода и углекислого газа), пептидов, аминокислот и нуклеотидов, эритроциты принимают участие в регулировании кислотно-основного состояния, процессах свертывания крови, детоксикации и иммунных реакциях, что делает их возможным рассматривать как тестовые системы. При описании морфологических характеристик эритроцитарная популяция была распределена на 4 группы. Это: дискоциты, переходные формы клеток (плоские диски, эллипсы, дискоциты с гребнем, дискоциты с выростом, дискоциты с множественными выростами, эритроциты в виде «тутовой ягоды»); предгемолитические (необратимые) формы (кулообразные, сферические, в виде «спущенного мяча») и дегенеративные.

Общепринятые в клинической практике методы не в состоянии отобразить общую картину изменений в них. В связи с этим, нами были выбрана атомносиловая, проводимая на приборе «Ntegra-Aura» и сканирующая электронная микроскопия с применением «FEI Quanta 200 3D» и «FEI Quanta 600 FEG» (НТ-МДТ, Россия). В течении 35±5 мин после забора крови производилась отмывка эритроцитов от плазмы и других клеток и подготовка образцов для просмотра, фотографирования и морфометрической обработки. Для зондовой микроскопии пробы размещали на стекле и изучали во влажной камере, насыщенной парами воды. Данный подход сделал возможным исследование клеток, не терявших свою жизнеспособность, а также определение нативных размеров и формы. Описание, морфометрия и фотографирование было выполнено в

полуконтактном режиме, с применением Si или SiN-кантилеверы серии «NSG 01». Сканирование было проведено в режимах постоянного или прерывистого контактов с обработкой полученных данных с использованием программного обеспечения «NOVA» и «ImageAnalysis». Для электронной микроскопии эритроциты размещались на фольге с последующим изучением и анализом, а также определения состояния в них кислорода.

Результаты исследования и их обсуждение. При изучении эритроцитов правильной формы при помощи электронной сканирующей микроскопии у лиц пожилого возраста нами было показано достоверное уменьшение их числа в зависимости от роста патологии (таблица 1). У практически здоровых людей пожилого возраста в абсолютном большинстве случаев были получены сканы клеток правильной формы ($96,1 \pm 0,4\%$ клеток от общего числа сканированных эритроцитов). Наименьшая числовая разница была между группами 4 и 5. Следует отметить, что при патологии сердечно-сосудистой системы клетки имели несколько вытянутую форму (группы 2–5).

Таблица 1

*Изменения соотношения форм эритроцитов
у лиц пожилого возраста, (%)*

Группы	Контрольная группа	АГ II-III, ГХС	ХСН ФК I	ХСН ФК II-III	ХСН ФК IV
Дискоциты	$85,5 \pm 1,6\%$	$62,4 \pm 1,5\%*$	$56,0 \pm 1,7\%*$	$53,3 \pm 1,3\%*$	$48,9 \pm 1,3\%*$
Переходные формы клеток (обратимые)	$11,6 \pm 0,6\%$	$20,6 \pm 0,9\%*$	$24,7 \pm 0,8\%*$	$25,2 \pm 0,8\%*$	$27,1 \pm 0,8\%*$
Г (Гемолитические (необратимые))	$3,00 \pm 0,04\%$	$10,5 \pm 0,3\%*$	$13,5 \pm 0,3\%*$	$13,6 \pm 0,2\%*$	$14,1 \pm 0,3\%*$
Дегенеративные	$1,0 \pm 0,03\%$	$6,5\% \pm 0,2\%*$	$7,2 \pm 0,2\%*$	$9,9 \pm 0,3\%*$	$10,9 \pm 0,2\%*$

** $p > 0,05$ по сравнению с контрольной группой*

По размеру клетки разделялись на нормоциты, макроциты и микроциты.

Кривизна центрального углубления варьировала незначительно. В случае неизмененных дискоцитов на их поверхности наблюдались округлые выступы шириной $0,28 \pm 0,06$ мкм. Их организация была сходной как в углублении, так и на вершине тора. При изменении нормальной дискоидальной формы на поверхности эритроцитов, формировались и выступы большего размера. В центральных участках отмечены также гребни, расположенные параллельно. На поверхности клеток наблюдались поры, образующий четкий однотипный рисунок размерами порядка $0,61 \pm 0,15$ мкм с рельефными выступами внутри в контрольной группе, который значительно изменялся при патологии.

При изучении мембран эритроцитов в группах 2–5 нами показано, что выросты на ее поверхности имели различное число, размеры ($323,40 \pm 60,20$ nm) и форму по сравнению с контрольной группой ($265,50 \pm 45,15$ nm) (рис.1).

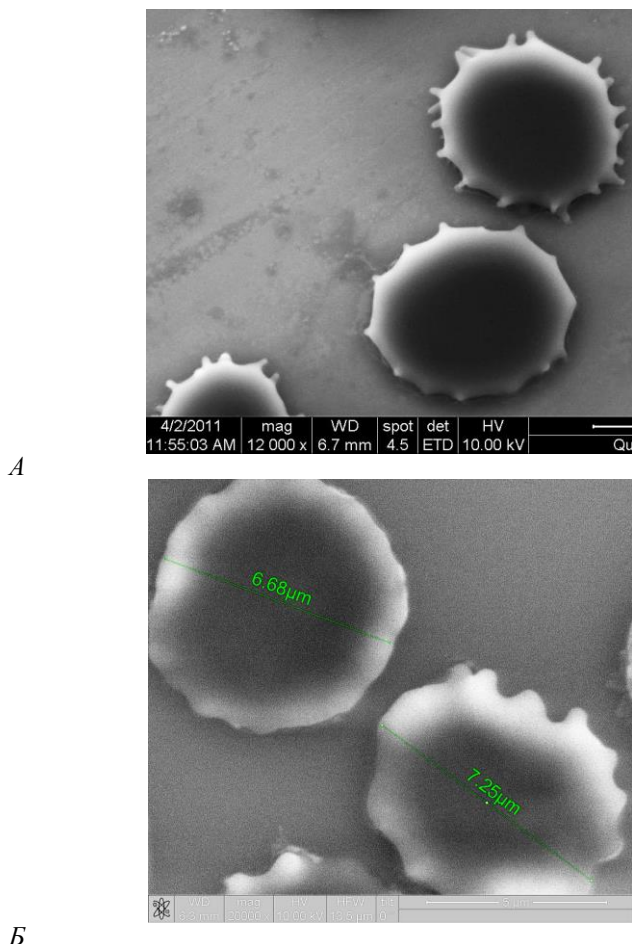


Рис. 1. Эритроциты крови человека, выполненные при помощи растровой электронной микроскопии

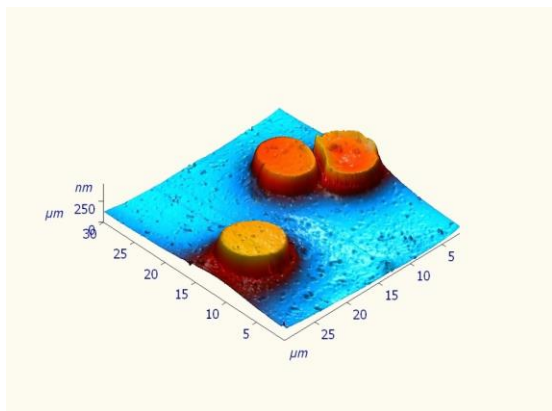
А. У практически здоровой женщины 65 лет

Наблюдаются дискоциты овальной формы

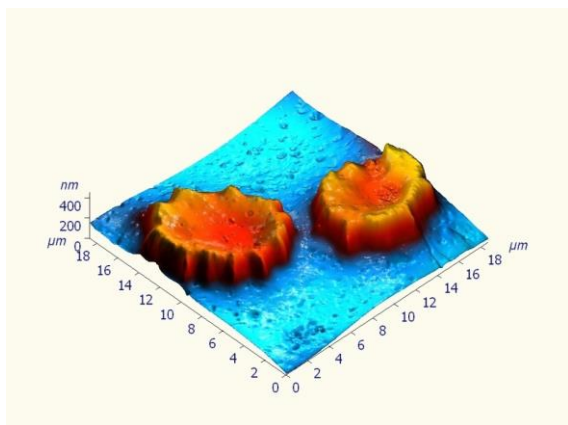
Выросты на плазмолемме хорошо выражены (Ув.12000)

Б. У больной, имеющей артериальную гипертензию III степени в сочетании с гиперхолестеринемией, в возрасте 68 лет. (Ув.20000)

На поверхности эритроцитов сокращалось число пор, а оставшиеся имели меньшие размеры и форму (рис.2, 3).



А



Б

Рис. 2. Эритроциты крови человека, выполненные при помощи атомно-силовой микроскопии (трехмерное изображение)

А. У практически здорового мужчины 61 года

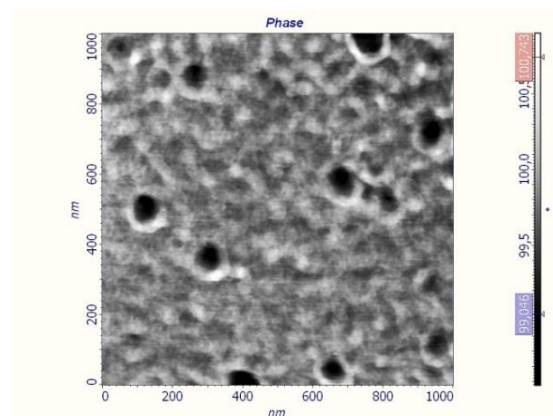
Наблюдаются дискоциты овальной формы

Высота клетки не изменена

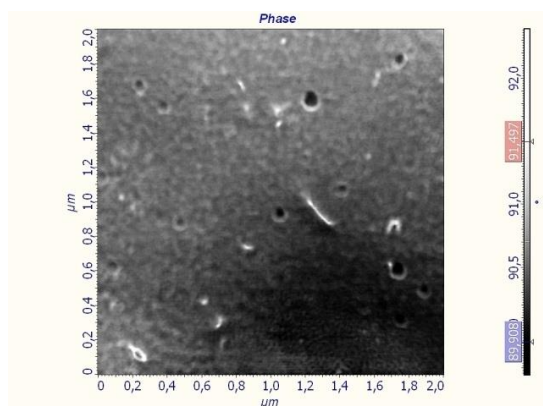
Б. У больного с хронической сердечной недостаточностью
III функционального класса с артериальной гипертензией
и ишемической болезнью сердца.

Изменение формы клеток, глубина впадины,
нарушение строения отростков и пор

На поверхности эритроцитов число пор значительно уменьшилось, а оставшиеся имели меньшие размеры и форму.



А.



Б.

Рис. 3. Фрагмент мембраны эритроцитов крови человека, выполненные при помощи атомносиловой микроскопии (двухмерное изображение)

Рис. 3 – фрагмент рис. 2

А. Строение пор на поверхности мембран эритроцитов не нарушено

Б. Изменение строения форм пор

Содержание кислорода в эритроцитах (пропорциональное число атомов микроэлемента в % от общего числа содержания атомов в эритроците) у всех групп значительно снижалось по сравнению с контрольной (таблица 2).

Таблица 2

*Содержание кислорода в эритроцитах
(пропорциональное число атомов микроэлемента в % от общего числа
содержания атомов в эритроците)*

Группы	Контрольная группа	АГП-III, ГХС	ХСН ФК I	ХСН ФК II- III	ХСН ФК IV
Кислород	21, 25±2,31	17, 50±2,02	16, 35±1,91	15,91±1,35	15, 85±1,05
Всего	100	100	100	100	100

** $p < 0,05$ по сравнению с практически здоровыми людьми*

Таким образом, нами было показано, что при наличии патологии сердечно – сосудистой системы в пожилом и старческом возрасте происходят значительные биохимические и электронно-микроскопические изменения эритроцитов, находящиеся в прямой зависимости от прогрессирования заболевания. При этом, профилактические и лечебные мероприятия должны быть направлены на коррекцию данных повреждений клеток с целью улучшения качества жизни пациента. Поэтому развитие новых подходов в решении данной проблемы носит общегосударственный характер.

Список литературы

1. Прошаев К.И. Анализ соматических изменений при возрастном гипогонадизме / К.И. Прошаев, О.А. Борисов, Т.В. Павлова // Фундаментальные исследования. – 2011. – №5. – С. 68–72.
2. Белозерова Л.М. Определение биологического возраста по анализу крови // Клиническая геронтология. – 2006. – Т. 12, №3. – С. 50–52.
3. Захарова Н. О. Клиническое значение оценки агрегатного состояния крови у больных пожилого и старческого возраста // Клинические и фундаментальные аспекты геронтологии / под ред. Г.П. Котельникова, Н.О. Захаровой. – Самара: Самар. гос. мед. ун-т, 2015. – 399 с.
4. Башук В.В. К вопросу о медико-социальных аспектах геронтологической помощи при социально значимой патологии пожилого возраста / В.В. Башук, А.Н. Ильинский, М.М. Киселевич [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2011. – №3. – С. 36–43.
5. Лобецкая А.В. Проблемы качества жизни пожилых пациентов, пребывающих в стационарных медико-социальных учреждениях (обзор литературы) / А.В. Лобецкая, И.А. Наумов // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2017. – №2.
6. Лысенко А. Особенности состояния сердечно-сосудистой системы и агрегатного состояния крови у гериатрических пациентов // К 49 Клинические и фундаментальные аспекты геронтологии. – Самара: Самар. гос. мед. ун-т, 2015. – 399 с.
7. Муравьев А.В. Микрореологические свойства эритроцитов: возрастной аспект / А.В. Муравьев, А.А. Маймистова, И.А. Тихомирова // Практикующий врач сегодня. – 2011. – №2. – С. 12–17.
8. Переверзев Д.И. Состояние крови у больных с острым инфарктом миокарда на фоне введения цитофлавина / Д.И. Переверзев, Н.В. Симонова, В.А. Доровских // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. – 2017. – Т. 10, №4. – С. 19–23.
9. Aktuální stav v geriatrii [Text] / H. Matějovská-Kubešová, P. Weber, P. Ševčík [et al.] – Praha: Galén, 2009. – 233 s.
10. Carotid ultrasound identifies high risk subclinical atherosclerosis in adults with low framingham risk scores [Text] / M.F. Eleid, S. J. Lester, T.L. Wiedenbeck [et al.] // J. Am. Soc. Echocardiogr. – 2010. – Vol. 23, №8. – P. 802–808.

11. Nilsson P.M. Vascular aging: A tale of EVA and ADAM in cardiovascular risk assessment and prevention [Text] / P.M. Nilsson, P. Boutouyrie, S. Laurent // Hypertension. – 2009. – Vol. 54, №1. – P. 3–10.

12. Social and medical aspects longevity [Text] / N.M. Pozdnyakova, H.K. Martinez Garcés, U.F. Duque Kalderon [et al.]; Belgorod State University // Experientia est optima magistra: collected arts. / ed. A.A. Kolesnikov. – Belgorod, 2011. – P. 97–100.

Башук Виктория Владимировна

канд. мед. наук, профессор

Павлова Татьяна Васильевна

д-р мед. наук, профессор

Марковская Вера Александровна

канд. мед. наук, доцент

Нестеров Аркадий Витальевич

канд. мед. наук, доцент

ФГАОУ ВО «Белгородский государственный
национальный исследовательский университет»
г. Белгород, Белгородская область

DOI: 10.31483/r-22113

СТАРЕНИЕ СОСУДОВ:

КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАЛЛЕЛИ

Аннотация: в статье представлены клинико-морфологические особенности сердечно-сосудистой системы при старении. В результате исследования нами были показаны достоверные данные корреляции между уровнем ET-1, величиной комплекса интима-медиа и экспрессией NO-синтазы у пациентов среднего и пожилого возраста. Соотношение по толщине комплекса интима-медиа у людей, имеющих средний возраст, была достоверно выше, чем у пожилого. Аналогичная динамика наблюдается также и между уровнем ET-1 и экспрессией проапоптозного фактора p53 в миокарде у пациентов среднего и пожилого возраста.

Ключевые слова: старение, сердечно-сосудистая система, патоморфология, долголетие.

Введение. Одной из наиболее важных мировых проблем, имеющих на данный момент приоритетное значение и для Российской Федерации, являются вопросы долголетия. При этом на первый план выступают вопросы, связанные с развитием ряда заболеваний, которые в значительной степени влияют на качество жизни населения. Среди ряда болезней таких как: онкологическая патология, эндокринопатии, заболевания центральной нервной системы, особое место занимает патология сердца и сосудов. Этот аспект в здравоохранении носит социальную ответственность перед обществом за сохранение здоровья индивидуума. К тому же, болезни системы кровообращения занимают лидирующую позицию среди причин инвалидности и летальности как в России, так и в мире в целом. Особое место среди них занимают: атеросклероз, артериальная гипертензия, ишемическая болезнь сердца. Не смотря на значительное число исследований,

проведенных в данном направлении, мы еще далеки от решения проблемы в целом.

Цель исследования. На основе анализа морфогенеза кровеносных сосудов с применением инновационных методов исследования, полученных при аутопсии людей пожилого и старческого возраста, выявить клинимоρφологические параллели, приводящие к летальным исходам.

Материал и методы исследования. Местом исследования явилось ОГБУЗ «Белгородское патологоанатомическое бюро» и кафедра патологии медицинского института ФГАОУ ВО НИУ «БелГУ».

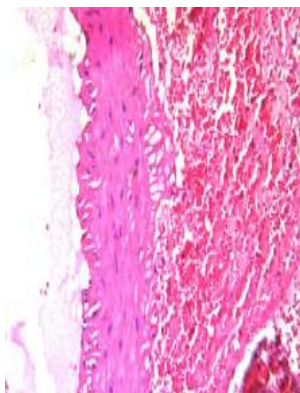
Аутопсийный материал был получен от умерших различных возрастных групп. Первую (25 человек) составили 10 женщин и 15 мужчин среднего возраста (40- 59 лет, у которых средняя продолжительность жизни составляла: 48,2 ± 2,5). Вторую (30): 16 женщин и 14 мужчин пожилого возраста (60 -79; 68,7 ± 2,2 года) при наличии у них хронической ишемической болезни (ХИБС) сердца, с длительностью сердечной недостаточности более трех лет. 10 человек (для изучения патоморфологических параметров, мужчины в возрасте 45,5 ± 2,1, не имевшие ХИБС и умершие в результате последствий травм различного генеза) составили контрольную группу.

Помимо стандартного описания на препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, был выполнен анализ состояния апоптоза. Для этого были использованы первичные специфические моноклональные антитела к p53 («Novocastra», RTU-p53-DO7), bcl-2 («Novocastra», RTU-bcl-2), Ki-67 («Novocastra», RTU-Ki-67-MM1), каспазе 3 («Novocastra», 1:25-CPp32 JHM62). Помимо этого, для исследования качества вторичных антител и визуализирующей системы был применен «Novostain Universal Detection Kit» («Novocastra», NCL-RTU-D). Дополнительную окраску ядер выполняли гематоксилином.

Реакция антигенов была диагностирована согласно наличию темно-светлокориновых гранул в структурах слизистой оболочки желудка при микроскопическом исследовании в обычном световом микроскопе. Была использована полуколичественная шкала оценки интенсивности (0 – отсутствие, 1 – слабая, 2 – умеренная, 3 – выраженная). Поле зрения учитывалось хорошим для данного анализа при присутствии в нем 60% и более положительно окрашенных клеток. Признание апоптоза и цитокинового статуса выполнено при помощи системы компьютерного анализа микроскопических изображений (Nikon). Морфологические изображения, сопоставленной с микроскопом «Nikon Eclipse 400». Число Ki-67, Bcl-2 и каспазы-3 – иммунопозитивных ядер клеток считалось в 10 полях зрения (≥ 1000 клеток). Индекс пролиферации (ядерную метку Ki-67) и апоптоза (перинуклеарную или цитоплазматическую метку Cpp32 – каспазу-3), а также экспрессии p53 (не менее 30%) определяли как долю положительно окрашенных ядер. Описание индекса экспрессии p53 находили в результате умножения интенсивности окрашивания (1–3) на полуколичественно оцененную градацию (0–4). Также выявлялся индекс положительно окрашенных клеток, вычисленных от всего количества эпителиоцитов (≥ 1000

клеток) с делением на 5 градаций: 0 – до 5%, 1 – 5–25%, 2 – 26–50%, 3 – 51–75%, 4 – 75% и более позитивно меченых клеток.

Результаты исследования и их обсуждение. В роли биообъекта для патоморфологического изучения старения сосудов нами была выбрана аорта. При заборе ее фрагментов, выполненном при аутопсийном исследовании у пациентов без наличия в анамнезе сердечно-сосудистой патологии и заболеваний крови, имевших судебно-медицинскую историю (различного рода травмы, приведшие к летальному исходу), мы, как макро-, так и микроскопически, не выявили значительных патоморфологических изменений (рис. 1).



А



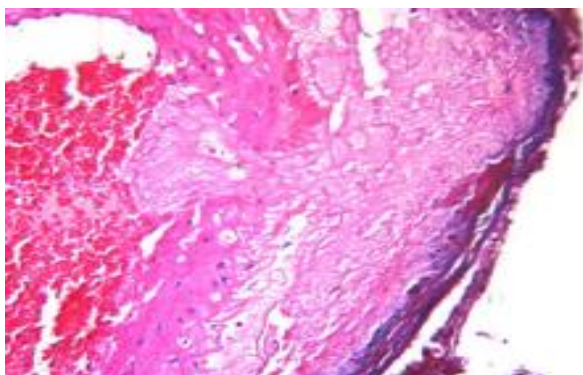
Б

Рис. 1. Фрагмент сосуда у пациента шестидесяти пяти лет

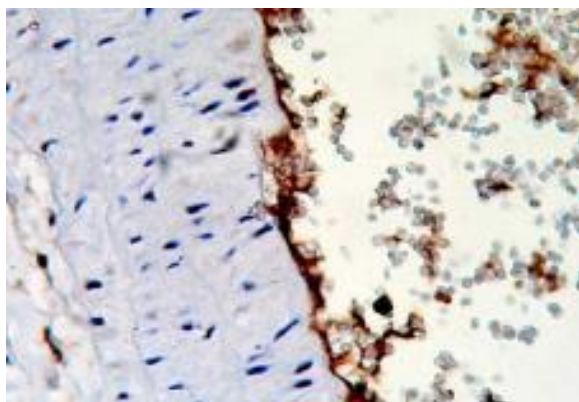
А. Стенка сосуда не изменена. Окраска гематоксилином-эозином (х 400)

Б. При иммуногистохимическом исследовании можно определить слабую экспрессию NO-синтазы (х400)

При проведении иммуногистохимического исследования участков аорты, полученных от пациентов с хронической сердечно-недостаточностью, мы обнаруживали повышенную экспрессию NO-синтазы по сравнению с участками аорты, взятых при патанатомическом исследовании у пациентов без сердечно-сосудистой патологии (рис. 2).



А



Б

Рисунок 2. Участок сосуда пациента шестидесяти семи лет
Клинический диагноз: Ишемическая болезнь сердца: атеросклероз коронарных артерий, стенокардия напряжения, функциональный класс III, хроническая сердечная недостаточность III стадии; на фоне гипертонической болезни III стадии

А. Участок с атероматозными изменениями
Окраска гематоксилином-эозином. (x400)

Б. Повышенная экспрессия NO-синтазы по сравнению с участками аорты, взятых при патанатомическом исследовании у пациентов без сердечно-сосудистой патологии

Нами получена корреляция между уровнями фактора некроза опухоли, степенью изменений эритроцитов альфа, эндотелина-1 в сыворотке крови, толщиной комплекса интима-медиа сонных артерий при прижизненном исследовании с посмертным исследованием экспрессии NO-синтазы в сосудах у пациентов с хронической сердечной недостаточностью, которая представлена в таблице 1.

Таблица 1

Корреляции между уровнями фактора некроза опухоли альфа, эндотелина-1 в сыворотке крови, степенью изменений эритроцитов, толщиной комплекса интима-медиа сонных артерий при прижизненном исследовании с посмертным исследованием экспрессии NO-синтазы в сосудах у пациентов с хронической ишемической болезнью

Группы, представленные по возрастному признаку	Сигнальные молекулы			
	TNF-a	ET-1	Размеры комплекса интима-медиа	Изменения в эритроцитах
Средний возраст	- ($p = 0,1186$)	+ ($p = 0,0301$)	+ ($p = 0,0289$)	+ ($p = 0,0255$)
Пожилой возраст	- ($p = 0,0703$)	+ ($p = 0,0288$)	+ ($p = 0,0125$) *	+ ($p = 0,0304$)

«+» - достоверная корреляция

«-» - отсутствие достоверной корреляции

* - $p < 0,05$ между возрастными

Показано, что корреляция между составом TNF-a и экспрессией NO- синтазы у пациентов среднего была 0,1186, и исследуемых пожилого возраста – 0,0703, что констатировало отсутствие достоверной корреляции. А корреляция между уровнем ET-1 и экспрессией NO-синтазы у пациентов среднего возраста составила 0,0301, в то время как пожилого – 0,0288, что свидетельствовало о достоверности данного параметра. Корреляция между толщиной комплекса интима-медиа и экспрессией NO-синтазы у пациентов среднего возраста составила 0,0289, у пациентов пожилого возраста – 0,0125, что подтверждало достоверность корреляции. При этом, у пациентов среднего возраста она была значительно выше, чем у пожилых реципиентов ($p < 0,05$). Взаимосвязь между изменениями эритроцитов и экспрессией NO-синтазы у пациентов среднего возраста была 0,0255, тогда как у пожилых людей – 0,0304, что так же свидетельствовало о достоверной корреляции. Кроме сосудов, в качестве объекта морфологического изучения старения сосудов мы взяли также миокард.

При исследовании аутопсийного материала фрагментов аорты от реципиентов без сердечно-сосудистой патологии в анамнезе и заболеваний крови, мы не выявили сколь либо существенных патологических процессов, тогда как у пациентов с хронической ишемической болезнью сердца нами было выявлено нарушение строений ядер кардиомиоцитов. Здесь же при иммуногистохимическом исследовании, нами выявлена значительная экспрессия проапоптозного маркера p53. Выполнена корреляция между степенью изменений эритроцитов, уровнями фактора некроза опухоли альфа, эндотелина-1 в сыворотке крови, величиной комплекса интима-

медиа сонных артерий при прижизненном исследовании пациентов с по-
смертным исследованием экспрессии проапоптозного фактора p53 в мио-
карде с хронической ишемической болезнью сердца (таблица 2).

Таблица 2

Корреляция между уровнями фактора некроза опухоли альфа, эндотелина-1 в сыворотке крови, степенью изменений эритроцитов, толщиной комплекса интима-медиа сонных артерий при прижизненном исследовании с посмертным исследованием экспрессии проапоптозного фактора p53 в миокарде у пациентов с хронической ишемической болезнью

Группы, представленные по возрастному признаку	Сигнальные молекулы			
	TNF-a	ET-1	Размеры комплекса интима-медиа	Изменения в эритроцитах
Средний возраст	- (p=0,1003)	+ (p=0,0406)	- (p=0,0625)	+(p=0,0312)
Пожилой возраст	- (p=0,0901)	+ (p=0,0387)	- (p=0,0712)	+(p=0,0182)*

«+» - достоверная корреляция

«-» - отсутствие достоверной корреляции

* - $p < 0,05$ между возрастными

Нами было показано, что соотношение между уровнем TNF-a и экспрессией проапоптозного фактора p53 в миокарде у пациентов среднего возраста составила 0,1003, у людей пожилого возраста – 0,0901, что свидетельствовало в пользу отсутствия достоверной корреляции. Она же между уровнем ET-1 и экспрессией проапоптозного фактора p53 в сердце у пациентов среднего возраста была 0,0406, а у людей – 0,0387, что было фактом достоверности. Корреляция между величиной комплекса интима-медиа и экспрессией проапоптозного фактора p53 в миокарде у людей среднего возраста составила 0,0625, а пациентов пожилого – 0,0712, что демонстрировало отсутствие достоверности. Соотношение между изменениями в эритроцитах и экспрессией проапоптозного фактора p53 у людей среднего возраста составила 0,0312, а у пациентов пожилого – 0,0182, что так же говорило в пользу достоверных величин. К тому же корреляция у людей среднего возраста была достоверно больше, чем у пациентов пожилого ($p < 0,05$).

Таким образом в результате исследования клинико-морфологической особенностей сердечно-сосудистой системы при процессах старения, нами были показаны достоверные данные корреляции между уровнем ET-1, величиной комплекса интима-медиа и экспрессией NO-синтазы у пациентов среднего и пожилого возраста. Соотношение по толщине комплекса интима-медиа у людей, имеющих средний возраст, была достоверно выше, чем у пожилого. Аналогичная динамика наблюдается также и между уровнем ET-1 и экспрессией проапоптозного фактора p53 в миокарде у пациентов среднего и пожилого возраста.

Список литературы

1. Прошаев К.И. Локальные и системные нейроиммуно-эндокринные сдвиги под влиянием поллютантов в контексте преждевременного старения: анализ состояния проблемы / К.И. Прошаев, А.Н. Ильницкий, Т.В. Павлова [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2011. – №6. – С. 150–153.
2. Павлова Т.В. Содержание кислорода в эритроцитах крови пожилых больных с полиморбитной патологией / Т.В. Павлова, Н.М. Позднякова, К.И. Прошаев // Российский семейный врач. – 2011. – Т. 15, №4. – С. 94.
3. Коробанов Ю.Ю. Гендерные особенности жесткости сосудов при артериальной гипертензии у больных пожилого возраста // Университетская наука: взгляд в будущее. – 2018. – 526 с.
4. Прошаев К.И. Введение в семейную гериатрию. – Новополюцк, 2008. – 56 с.
5. Кишкун А.А. Биологический возраст и старение: возможности определения и пути коррекции: руководство для врачей. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 976 с.
6. Хавинсон В.Х. Пептидная регуляция. – СПб.: Наука, 2009. – 50 с.
7. Amarencо Р. High-density lipoprotein-cholesterol and risk of stroke and carotid atherosclerosis: a systematic review. Atherosclerosis. 2008. Vol. 196. No. 2. P. 489–496.
8. Muravyov A.V., Tikhomirova I.A., Maimistova A.A. Crosstalk between adenylyl cyclase signaling pathway and Ca²⁺ regulatory mechanism under red blood cell microrheological changes. Clin. Hemorheol. Microcirc. 2010. Vol. 45. No. 2–4. P. 337–345.
9. Яхонтов Д.А. Мультифокальный атеросклероз у больных ишемической болезнью сердца различных возрастных групп. Клинико-гемодинамические параллели / Д.А. Яхонтов, Ю.О. Остина, М.Ю. Пахарукова [и др.] // Сибирское медицинское обозрение. – 2018. – №2. – 110 с.

Ерофеева Людмила Михайловна

д-р биол. наук, профессор, ведущий научный сотрудник
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека»
г. Москва, Московская область

Дорохович Галина Павловна

канд. мед. наук, доцент
УО «Белорусский государственный медицинский университет»
г. Минск, Республика Беларусь

DOI: 10.31483/r-32638

**МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
ПАХОВЫХ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ ОБЕЗЬЯН
В РАЗЛИЧНЫЕ СРОКИ ПОСЛЕ СОЧЕТАННОГО
ВОЗДЕЙСТВИЯ АНТИОРТОСТАТИЧЕСКОЙ
ГИПОКИНЕЗИИ И ГИПЕРГРАВИТАЦИИ**

Аннотация: в данной статье авторы приводят характеристику лимфатических узлов обезьян, основываясь на собственных наблюдениях за отдельными особями. С целью профилактики структурных и метаболических нарушений в органах и тканях организма при длительной антиортостатической гипокинезии (АНОГ) в космической медицине применяется воздействие гипергравитации (ГГ). Состояние органов иммунной системы является важным показателем иммунного гомеостаза в организме. В настоящем исследовании проведено изучение структуры и клеточного состава функциональных компонентов паховых лимфатических узлов у обезьян *Macaca mulatta* в различные сроки после сочетанного

воздействия длительной (4 недели) антиортостатической (под углом - 50) гипокинезии и гипергравитации силой 1,2g (по 30 минут 2–3 раза в неделю). После сочетанного воздействия АНОГ и ГГ в паховых лимфатических узлах у обезьян установлено уменьшение плотности распределения лимфоидных клеток в корковом веществе и в мякотных тяжах, а также опустошение мозговых синусов. В корковом веществе наиболее уязвимой оказалась паракортикальная (Т-зависимая) зона. Наряду с этим наблюдается увеличение числа и размеров лимфоидных узелков (В-зона). В периодах реабилитации на 20-е и 35-е сутки структурно-функциональное состояние В-зон (лимфоидные узелки, мякотные тяжи) в лимфатических узлах нормализовалось. Показатели клеточного состава практически не отличались от фоновых значений. Площадь паракортикальной зоны, наоборот, продолжала сокращаться. Восстановления клеточного состава в этой зоне не отмечалось, что свидетельствует о нарушении Т-клеточного звена иммунитета.

Ключевые слова: гипергравитация, антиортостатическая гипокинезия, лимфоидная система, иммунная система, лимфатический узел.

Вопросы иммунного гомеостаза организма при воздействии различных экстремальных факторов, которые испытывает человек, особенно, в условиях освоения космоса, остаются актуальными. При длительных экспедициях в космосе к числу наиболее значимых воздействий относится гипокинезия, которая связана с невесомостью и ограничением движений. У космонавтов и на экспериментальных моделях при гипокинезии показаны нарушения в различных тканях организма [2]. Отмечаются структурные изменения на макро- и микроуровнях и атрофические изменения в миокарде, в органах дыхательной, выделительной, костно-мышечной и сосудистой систем [1; 3]. В современных медико-биологических исследованиях в качестве модели, воспроизводящей влияние на организм отдельных эффектов микрогравитации, широко используется ограничение двигательной активности в антиортостатическом положении. Дополнительное воздействие гипергравитационного стимула небольшой силы рассматривается как фактор профилактики. Обусловленные АНОГ изменения в системе крово- и лимфообращения, снижение двигательной активности, функциональных нагрузок на опорно-двигательный аппарат и развивающиеся на этом фоне метаболические нарушения в органах и тканях организма могут быть причиной снижения резервных возможностей лимфоидной (иммунной) системы.

В связи с этим целью настоящего исследования было изучение цитоархитектоники паховых лимфатических узлов у обезьян в норме, после сочетанного воздействия гипергравитации и гипокинезии, а также в периодах восстановления после окончания воздействия.

Эксперименты были выполнены в ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН. Объектом исследования были 6 обезьян-самцов *Macaca mulatta* массой тела 4267 ± 468 г, которые в течение 4-х недель находились в состоянии АНОГ и в то же время 2–3 раза в неделю подвергались

воздействию ГГ силой 1,2 г по 30 минут. В течение всего периода АНОГ обезьяны находились в положении лежа на животе под углом -5° . Забор биопсий лимфатических узлов у обезьян проводили под газовым наркозом за 1 месяц до эксперимента, в день окончания эксперимента и на 20-е и 35-е сутки восстановительного периода. Для предупреждения развития стрессовых реакций на перемену обстановки все животные прошли процедуру поэтапной тренировки к системам фиксации. Эксперименты были утверждены биоэтической комиссией ГНЦ РФ-ИМБП РАН и проводились в соответствии с принципами гуманного обращения с животными.

Стресс-реакция у обезьян в процессе проведения эксперимента отсутствовала, о чем свидетельствовали неизменные уровни кортизола в сыворотке крови по сравнению с фоновыми (до эксперимента) значениями, а также анализ лейкоцитарной формулы [4].

Наблюдения за животными в период эксперимента показали, что в целом обезьяны хорошо переносили экспериментальные воздействия. Однако в ходе эксперимента удалось выявить некоторые черты проявления индивидуальной чувствительности. Так, за время эксперимента две обезьяны прибавили в весе по 400 г, одна обезьяна – 260 г, одна – 100 г, а две обезьяны, наоборот, потеряли в весе: одна обезьяна – 60 г, вторая – 450 г. В периодах восстановления все обезьяны прибавили в весе, но величина прироста также была неодинаковой. Животное, потерявшее в весе 450 г за период эксперимента, медленнее восстанавливало его в реабилитационном периоде. Если все обезьяны в среднем прибавили по 500 г, то у этого животного прирост составил всего 200 г. Сочетанное воздействие АНОГ и ГГ приводило к увеличению размеров паховых лимфатических узлов (в 1,5 – 2 раза) у 67% животных. У других обезьян размеры лимфатического узла либо не изменились, либо несколько уменьшились по сравнению с показателями до воздействия. Гистологическая структура лимфатических узлов после эксперимента в целом сохранялась такой же, как до эксперимента. Капсула узлов толстая, плотная, иногда разволокнена. В области ворот наблюдалось утолщение соединительной ткани, в которой были видны просветы кровеносных сосудов, а также скопления лимфоцитов. Отходящие от капсулы трабекулы проникали в паренхиму узла вплоть до мозгового слоя. В некоторых узлах трабекулы тонкие, в большинстве узлов – широкие. Необходимо подчеркнуть также, что в паренхиме паховых лимфатических узлов обезьян после эксперимента наблюдались крупные тяжи из клеток фибробластического ряда. Если до воздействия такие тяжи наблюдались только у двух животных, то после воздействия – уже у четырех. Обращает на себя внимание также кровеносное русло. Просвет кровеносных сосудов был расширен, сосуды полнокровные. Однако гранулоцитарные лейкоциты в просветах встречаются значительно реже, чем до эксперимента.

В лимфатических узлах обезьян как до воздействия, так и после эксперимента площадь коркового вещества преобладала над площадью мозгового. Однако в лимфатических узлах у обезьян после эксперимента корковое вещество имело меньшую плотность распределения лимфоцитов, чем до воздействия. Количество лимфоидных узелков в лимфатических

узлах обезьян после воздействия увеличилось в 1,5–2 раза. Встречались узелки как с центром размножения, так и без него. Лимфоидные узелки располагались в 2–3 слоя. Нередко можно было наблюдать лимфоидные узелки в мозговом веществе. Центры размножения лимфоидных узелков имеют разнообразную цитоархитектуру: встречаются центры опустошенные, с обнаженной стромой. В них отсутствуют клетки в стадиях митоза. Чаше, чем в контроле, встречаются плазматические клетки, макрофаги и деструктивно измененные клетки. В центрах размножения других узелков можно наблюдать делящиеся клетки (до 4–5 в поле зрения при увеличении 900). Необходимо отметить, что делящиеся и молодые формы лимфоцитов (бласты и большие лимфоциты), в основном, располагаются в пограничной с мантией узелков зоне. В некоторых центрах размножения встречаются скопления малых лимфоцитов. На 35-е сутки реабилитационного периода выявлялись расширенные центры, их цитоархитектура практически не отличалась от показателей до эксперимента. Клетки в стадиях митоза располагались группами по периферии центра размножения.

Паракортикальная зона в лимфатических узлах обезьян до эксперимента была плотно заполнена лимфоцитами, и на гистологических срезах представлена крупными фрагментами. У животных после воздействия паракортикальная зона была плохо выражена и пронизана тяжами фиброзной ткани. Следует отметить, что в периодах восстановления (на 20 и 35 сутки) площадь паракортикальной зоны была резко уменьшена как относительно показателей до воздействия, так и относительно данных, полученных в эксперименте.

Мякотные тяжи в лимфатических узлах обезьян после воздействия, в основном, широкие с неравномерной плотностью расположения клеток. Как правило, ближе к воротам лимфатического узла плотность расположения клеток в мякотных тяжах уменьшалась. Гистоструктура мякотных тяжей в лимфатических узлах от обезьян в реабилитационном периоде практически не отличалась от показателей до эксперимента: мякотные тяжи были узкие, имели низкую плотность расположения клеток.

Обращает на себя внимание расширенная и опустошенная синусная сеть в лимфатических узлах у обезьян после воздействия АНОГ и ГГ, что может свидетельствовать об интенсивном лимфооттоке.

Таким образом, после сочетанного воздействия АНОГ и ГГ в паховых лимфатических узлах обезьян установлено уменьшение плотности распределения лимфоидных клеток в корковом веществе и в мякотных тяжах, а также опустошение мозговых синусов. В корковом веществе наиболее уязвимой оказалась паракортикальная (Т-зависимая) зона. Наряду с этим наблюдается увеличение числа и размеров лимфоидных узелков (В-зона), что, по нашему мнению, является компенсаторной реакцией лимфатических узлов на экспериментальное воздействие. В периодах реабилитации на 20-е и 35-е сутки структурно-функциональное состояние В-зон (лимфоидные узелки, мякотные тяжи) лимфатических узлов нормализовалось. Показатели клеточного состава практически не отличались от фоновых значений. Площадь паракортикальной зоны, наоборот, продол-

жала сокращаться. Восстановления клеточного состава в этой зоне не отмечалось, что свидетельствует о нарушении Т-клеточного звена иммунитета.

Список литературы

1. Володина А.В. Влияние невесомости на ультраструктуру микрососудов скелетных мышц [Текст] // Второй Российский конгресс по патофизиологии с международным участием «Патофизиология органов и систем. Типовые патологические процессы»: тезисы докладов. – М.: РГМУ, 2000. – С. 334.
2. Газенко О.Г. Предвидение в рождении научных идей [Текст] // Второй Российский конгресс по патофизиологии с международным участием «Патофизиология органов и систем. Типовые патологические процессы»: тезисы докладов. – М.: РГМУ, 2000. – С. 334–335.
3. Коваленко Е.А. О проблеме гипокинезии в современной медицине [Текст]: Второй Российский конгресс по патофизиологии с международным участием «Патофизиология органов и систем. Типовые патологические процессы»: тезисы докладов. – М.: РГМУ, 2000. – С. 335.
4. Корольков В.И. Структурные изменения в костно-мышечной системе и лимфатических узлах у обезьян в условиях длительной антиортостатической гипокинезии [Текст] / В.И. Корольков, Ю.В. Гордеев, А.С. Капланский [и др.] // Космическая биология и авиакосмическая медицина: материалы XII Конференции по космической биологии и авиакосмической медицине (10–14 июня 2002 г., Москва) / под общ. ред. академика А.И. Григорьева и профессора Е.А. Ильина. – М: ГНЦ РФ ИМБП РАН, 2002. – С. 181–182.

Михеева Наталья Александровна

канд. биол. наук, доцент

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

г. Ульяновск, Ульяновская область

Терентюк Георгий Сергеевич

д-р биол. наук, профессор

ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава России

г. Саратов, Саратовская область

Михеев Вячеслав Аркадьевич

канд. биол. наук, доцент

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

г. Ульяновск, Ульяновская область

ВЛИЯНИЕ ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ НА КОНЦЕНТРАЦИЮ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В СИНХРОНИЗИРОВАННЫХ ПО СТАДИЯМ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ

Аннотация: в работе рассматривается изменение концентрации активных форм кислорода (АФК) в синхронизированных по периодам клеточного цикла клетках НСТ-116 под влиянием золотых наночастиц. С помощью флуоресцентной микроскопии продемонстрировано, что присутствие золотых наночастиц диаметром 10 нм в культуре раковых клеток

НСТ-116 в течение 60 минут не обуславливает развитие оксидативного стресса, о чем свидетельствует меньшая концентрация АФК в интерфазе. Митотический период клеток с золотыми наночастицами характеризуется ростом концентрации АФК.

Ключевые слова: активные формы кислорода, золотые наночастицы, опухолевые клетки, НСТ-116, клеточный цикл, флуоресценция.

В последнее время широко обсуждаются медицинские технологии, в которых используются материалы с линейными размерами в несколько десятков нанометров. Стремительно развивающиеся исследования свойств наноматериалов и наночастиц ставят задачу оценить их влияния на живые организмы, как на уровне всего организма, так и на отдельные клетки и клеточные структуры. Оценка клеточных эффектов является особенно важной вследствие наноразмерности действующих агентов, которые непосредственно воздействуют на клеточные структуры [3]. Одним из показателей выраженности патологических процессов в клетке является уровень концентрации активных форм кислорода (АФК). В связи с этим, целью настоящей работы явилось изучение изменения концентрации активных форм кислорода в опухолевых клетках под влиянием наночастиц золота (ЗНЧ).

Материал и методы. В экспериментах использовали клеточную линию карциномы толстого кишечника НСТ-116. Синхронизацию клеток по фазам клеточного цикла проводили с помощью двойного тимидинового блока по стандартной прописи [1]. В работе были использованы наночастицы диаметром 10 нм. В культуру клеток вносили 3,125 мкл 10 нм ЗНЧ, концентрацией 50 мкг/мл с добавлением 0,5 мл среды. В связи с тем, что золото обладает собственной флуоресценцией [2], проникновение ЗНЧ в клетки фиксировали с помощью флуоресцентного микроскопа «Nikon» через 30 и 60 минут. Внутриклеточную концентрацию активных форм кислорода после введения ЗНЧ определяли с использованием 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата (DCFH-DA), который добавляли в среду с клетками. Флуоресценция зонда DCFH-DA возникает при взаимодействии его молекул с АФК, и ее интенсивность характеризует активность свободнорадикальных процессов.

При определении значений флуоресценции учитывали фоновые показатели. Все эксперименты и определения параметров были выполнены, как минимум, с пятикратным повторением. Результаты выражались как среднее значение \pm ошибка среднего ($M \pm m$). Статистическую обработку цифрового материала осуществляли с помощью компьютерной программы «Statistica 6.0», используя непараметрический анализ.

Результаты и обсуждение.

Изучение уровня флуоресценции клеток с ЗНЧ свидетельствует об их присутствии в клетках, на что указывают его положительные значения. Флуоресценция интактных клеток при всех прочих равных условиях отсутствовала (рис. 1). Обращает внимание тот факт, что максимальное количество наночастиц в клетках обнаруживается во время деления клеток.

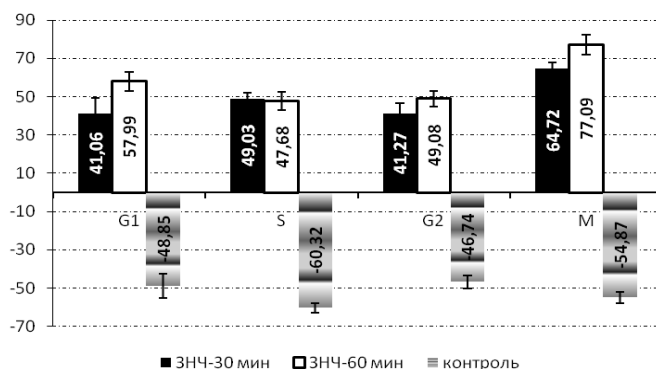


Рис. 1. Уровень флуоресценции (условные единицы) клеток НСТ-116 в норме (контроль) и после культивирования клеток с золотыми наночастицами в течение 30 минут (ЗНЧ-30 мин) и 60 минут (ЗНЧ-60 мин) в разные периоды клеточного цикла

Интерфаза раковых клеток НСТ-116 характеризуется достоверным ростом флуоресценции зонда DCFH-DA, свидетельствующим об усилении продукции АФК. В М-период концентрация АФК значительно уменьшается, о чем свидетельствует 5-кратное снижение флуоресценции зонда DCFH-DA в клетках.

30-минутная инкубация клеток НСТ-116 с ЗНЧ не сопровождается значительными метаболическими изменениями в клетках в G1 периоде, о чем свидетельствует отсутствие достоверных различий в показателях флуоресценции зонда DCFH-DA между клетками контрольной группы и клетками, подвергшихся получасовому воздействию ЗНЧ в указанный период. Обращает внимание тот факт, что 60-минутная культивация раковых клеток НСТ-116 с ЗНЧ приводит к трехкратному падению продукции в этих клетках АФК, индикатором чего служат меньшие значения интенсивности флуоресценции DCFH-DA в интерфазу клеточного цикла в сравнении с клетками контрольной группы и клетками, которые подверглись 30-минутной инкубации с ЗНЧ ($p < 0,05$).

S-период характеризуется достоверным уменьшением ($p < 0,05$) концентрации АФК в клетках, подвергшихся часовому воздействию ЗНЧ, в сравнении с клетками контрольной группы и клеток, подвергшихся 30-минутной инкубации с ЗНЧ. При этом отсутствуют значимые изменения концентрации АФК в клетках контрольной группы и клетках, подвергшихся получасовой инкубации с ЗНЧ, о чем свидетельствует схожие показатели интенсивности флуоресценции клеток указанных групп.

Период G2 характеризуется значительным снижением концентрации АФК в клетках, подвергшихся и получасовому воздействию ЗНЧ (в 1,6 раза), и часовой инкубации (в 4,4 раза), в сравнении со значениями концентрации клеток контрольной группы. Меньшие значения флуоресценции зонда DCFH-DA в клетках с ЗНЧ, по сравнению со значениями клеток контрольной группы, вероятно свидетельствует об уменьшении

продукции АФК в течение этого периода, а также об активации процессов элиминации АФК внутриклеточными антиоксидантными ферментами (супероксиддисмутаза, пероксидредуктаза, глутатионтрансфераза и др.).

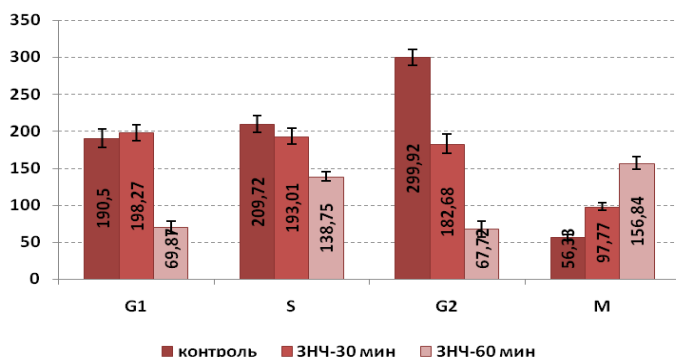


Рис. 2. Уровень флуоресценции (у.е.) зонда DCFH-DA интактных клеток НСТ-116 (контроль) и после культивирования клеток с золотыми наночастицами в течение 30 минут (ЗНЧ-30 мин) и 60 минут (ЗНЧ-60 мин) в разные периоды клеточного цикла

Инкубация клеток НСТ-116 с ЗНЧ в течение 30 и 60 минут обуславливает увеличение продукции АФК клетками в М-период, о чем свидетельствует усиление интенсивности флуоресценции зонда DCFH-DA клеток после воздействия ЗНЧ и клеток контрольной группы. Обращает внимание тот факт, что М-период клеток, подвергшихся часовому воздействию ЗНЧ, характеризуется почти трехкратным усилением флуоресценции по сравнению с клетками контрольной группы и 1,5-кратным с клетками, которые культивировались с ЗНЧ в течение 30 минут. Однако флуоресценция клеток с ЗНЧ в М-период не достигает максимальных значений флуоресценции клеток контрольной группы в другие периоды клеточного цикла.

Заключение. 30-минутное присутствие ЗНЧ в культуре клеток не вызывает изменение концентрации АФК клеток, находящихся в G1 и G2 периодах клеточного цикла. Меньшие значения флуоресценции зонда DCFH-DA в интерфазе клеток после 60-минутной инкубации с ЗНЧ, а также в клетках после 30-минутной инкубации в S период по сравнению с клетками контрольной группы, свидетельствует об уменьшении продукции АФК. М-период клеток НСТ-116, подвергшихся инкубации с ЗНЧ в течение 30 и 60 минут, характеризуется увеличением продукции АФК.

Список литературы

1. Узбеков Р.Э. Анализ клеточного цикла и методика исследования динамики уровня экспрессии белков на его различных фазах с использованием синхронизированных клеток // Биохимия. – 2004. – Т. 69, №5. – С. 597–611.

2. Abdelhalim M.A.K. Physical properties of different gold nanoparticles: ultraviolet-visible and fluorescence measurements / M.A.K. Abdelhalim, M.M. Mady, M.M. Ghannam // J. Nanomed Nanotechnol. – 2012. – Vol. 3. – P. 133–137.

3. Semmler-Behnke M. Biodistribution of 1,4- and 18-nm gold particles in rats / M. Semmler-Behnke, W.G. Kreyling, J. Lipka et al. // Small. – 2008. – V. 4. – P. 2108–2111.

Шибкова Дарья Захаровна

д-р биол. наук, главный научный сотрудник
ФГАОУ ВО «Южно-Уральский
государственный университет (НИУ)»

Шилкова Татьяна Викторовна

канд. биол. наук, доцент
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный
гуманитарно-педагогический университет»

Ефимова Наталья Владимировна

д-р биол. наук, профессор
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный
гуманитарно-педагогический университет»
г. Челябинск, Челябинская область

DOI: 10.31483/r-32666

ОТДАЛЕННЫЕ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ НЕИОНИЗИРУЮЩЕГО ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ У ПОТОМСТВА ОБЛУЧЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Аннотация: в данной статье проведено экспериментальное исследование влияния неионизирующего электромагнитного излучения радиочастотного диапазона с частотой 925 ± 3 МГц, длительностью импульса СВЧ 570 ± 10 мкс на процессы созревания эритроцитов в костном мозге у потомства облученных мышей линии СВА при разных моделях спаривания. Авторами было установлено, что при 5-суточном воздействии электромагнитного излучения радиочастотного диапазона в костном мозге у потомства облученных животных развиваются отдаленные цитогенетические эффекты – увеличение числа нормохромных (НХЭ) и полихроматофильных (ПХЭ) клеток с микроядрами на фоне повышения доли эритроидных клеток.

Ключевые слова: неионизирующее электромагнитное излучение, радиочастотный диапазон, мыши линии СВА, цитогенетические эффекты, микроядра, эритроидный росток костного мозга.

Изучению биологических эффектов неионизирующего электромагнитного излучения радиочастотного диапазона (ЭМИ РЧ) на организм человека и животных посвящены работы отечественных и зарубежных авторов [1; 3; 5]. У экспериментальных животных установлено влияние электромагнитного излучения на функционирование нервной, иммунной, репродуктивной систем и системы крови. Одним из актуальных направлений исследований воздействия ЭМИ РЧ на биообъекты является определение цитогенетических эффектов у облученных животных и их

потомства [2, 8]. Однако вопрос о развитии отдаленных эффектов влияния ЭМИ РЧ у потомства облученных животных остается дискуссионным.

Цель исследования – изучить отдаленные цитогенетические эффекты влияния неионизирующего электромагнитного излучения у потомства облученных животных при разных моделях спаривания.

Организация и методы исследования. Исследование проводили на базе научно-исследовательской лаборатории «Адаптация биологических систем к естественным и экстремальным факторам среды» (ЮУрГГПУ). Источником неионизирующего электромагнитного излучения служила лабораторная исследовательская СВЧ-установка. В исследовании использовали 1-месячное потомство облученных мышей линии СВА ($n=30$). Родительские особи обоего пола в возрасте 1 месяца были подвергнуты воздействию ЭМИ дециметрового диапазона в дальней зоне излучателя, с несущей частотой 925 ± 3 МГц и длительностью импульса СВЧ 570 ± 10 мкс. Средняя плотность потока мощности (ППМ) эквивалентной плоской волны (S) была равна $1,2$ мВт/см² (12 Вт/м²) и соответствовала предельно допустимой энергетической экспозиции (200 мкВт×ч/см²), принятой Санитарными правилами и нормами ЭМП РЧ (Россия). Длительность экспозиции – 10 мин ежедневно в течение 5-ти суток. Излучатель располагали сверху над животными на расстоянии, равном длине волны электромагнитного излучения.

Контрольную группу животных (родительские особи, «ложное облучение») помещали в специальную камеру, как и экспериментальных животных, не подвергая воздействию ЭМИ. Потомство от экспериментальных животных было разделено на три группы в соответствии с моделями спаривания: 1-я – потомство от контрольных самок и самцов; 2-я – потомство от облученных самок и самцов; 3-я – потомство от облученных самок и самцов группы «ложное облучение».

Определение частоты микроядер в полихроматофильных эритроцитах (ПХЭ) и нормохромных эритроцитах (НХЭ) костного мозга мышей СВА проводили по методу Schmid (1975) [4]. При анализе препаратов костного мозга для выявления клеток с микроядрами просматривали 1000 ПХЭ, одновременно фиксируя количество НХЭ, в том числе клеток с микроядрами. Соотношение НХЭ и ПХЭ определяли отдельно для каждого животного в пересчете на 1000 эритроцитов.

Все работы с лабораторными животными проводили в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации», утвержденными приказом Министра здравоохранения РФ №708н от 23.08.2010г [6]. Результаты были подвергнуты статистической обработке с вычислением значений среднего арифметического (M) и ошибки среднего арифметического (m). Для сравнения средних групповых величин использовали t -критерий Стьюдента. Математические расчеты проведены с помощью пакета прикладных программ *Statistica 6.0*.

Результаты исследования. В ходе исследования были изучены отдаленные цитогенетические эффекты воздействия ЭМИ РЧ в эритроидном ростке костного мозга у 1-месячного потомства от облученных мышей линии СВА при различных моделях спаривания. В костном мозге у

потомства облученных животных (2-я и 3-я группы) установлено достоверно значимое повышение количества ПХЭ и НХЭ с микроядрами по сравнению с потомством контрольной группы (рис. 1). Так в костном мозге у потомства от облученных самок и самцов мышей (2-я группа) произошло выраженное повышение количества ПХЭ и НХЭ с микроядрами (в 5,1 и 8,5 раза соответственно) по отношению к группе потомства, полученного от спаривания ложнооблученных родительских особей.

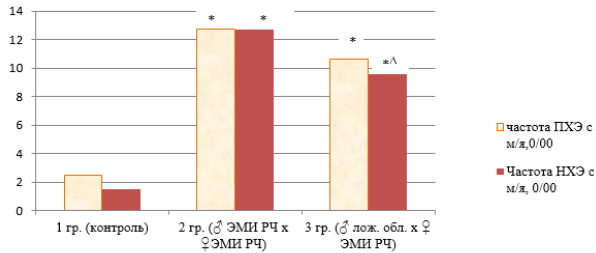


Рис. 1. Содержание ПХЭ и НХЭ с микроядрами в костном мозге экспериментальных животных, %

Примечание: * – достоверность различий с контролем ($p \leq 0,001$),
 Δ – достоверность различий между 2-й и 3-й группами ($p \leq 0,05$)

У потомства от облученных самок и ложно облученных самцов (3-я группа) выявлено достоверное повышение частоты встречаемости ПХЭ и НХЭ с микроядрами (в 4,2 и 6,4 раза соответственно) по сравнению с группой контроля. У потомства 2-й опытной группы отмечалось более выраженное увеличение частоты встречаемости НХЭ с микроядрами (на 3,1%; $p \leq 0,05$) по сравнению с показателями потомства группы облученных самок и ложно облученных самцов. Однако достоверных различий по количеству ПХЭ с микроядрами между животными 2-й и 3-й групп в исследовании установлено не было (рис.1).

В костном мозге у потомства мышей линии СВА, полученного при спаривании облученных родительских особей (2-я группа) было выявлено статистически значимое увеличение доли эритроидных клеток (на 23% по отношению к контролю) (рис. 2). Наряду с этим выявленная тенденция к снижению отношения ПХЭ/НХЭ у потомства 2-й и 3-й групп по сравнению с группой контроля [8] может свидетельствовать об активизации процессов созревания эритроидных клеток в костном мозге у потомства, полученного от животных, подвергнутых воздействию ЭМИ РЧ диапазона. Ранее подобные результаты были получены в экспериментальном исследовании [7] у потомства от самок мышей линии СВА, подвергнутых воздействию ЭМИ РЧ в период беременности.

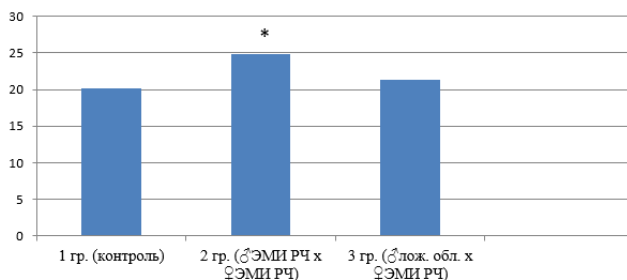


Рис. 2. Содержание эритроидных клеток в костном мозге, %

Примечание: * – достоверность различий с контролем ($p \leq 0,001$)

Результаты проведенного экспериментального исследования свидетельствуют о развитии цитогенетических эффектов у потомства от облученных животных при разных моделях спаривания. Установленные в исследовании практически сопоставимые частоты встречаемости ПХЭ и НХЭ с микроядрами у потомства, полученного от облученных самок и самцов и у потомства от облученных самок и ложнооблученных самцов, позволяют предположить, что решающее значение в наследовании клеточных аномалий принадлежит материнскому организму.

Список литературы

1. Григорьев Ю.Г. Принципиально новое электромагнитное загрязнение окружающей среды и отсутствие адекватной нормативной базы – к оценке риска // Гигиена и санитария. – 2014. – Т. 93, №3. – С. 11–16.
2. Ильинских Н.Н. Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность / Н.Н. Ильинских, В.В. Новицкий, Н.Н. Ванчугова. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 1992. – 271 с.
3. Ruediger H.W. Genotoxic effects of radiofrequency electromagnetic fields [Text] / H.W. Ruediger // Pathophysiology. – 2009. – Vol. 16 (2–3). – P. 89–102.
4. Schmid W. Chemical mutagenesis in animals. The marrow of the Chinese hamster as an in vivo test system [Text] / W. Schmid, K. Boller // Haematologische Befundenach Behandlungmit Trenimon. Humangenetik. – 1975. – Vol. 11. – P. 35–54.
5. Польша Н.С. Функциональное состояние развивающегося организма как критерий гигиенической регламентации электромагнитного поля 2750 МГц // Гигиена и санитария. – 1989. – №10. – С. 36–39.
6. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (Минздравсоцразвития России) от 23 августа 2010 г. №708н «Об утверждении Правил лабораторной практики» [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/902232487> (дата обращения: 30.04.2019).
7. Шибкова Д.З. Ранние и отдаленные эффекты влияния электромагнитного поля радиочастотного диапазона на репродуктивную функцию и морфофункциональное состояние потомства экспериментальных животных / Д.З. Шибкова, Т.В. Шилкова, А.В. Овчинникова // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2015. – Т. 55, №5. – С. 514–519.
8. Шибкова Д.З. Цитогенетические эффекты воздействия электромагнитного излучения радиочастотного диапазона на облученных экспериментальных животных и их потомства / Д.З. Шибкова, Т.В. Шилкова, А.В. Овчинникова [и др.] // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2018. – Т. 58, №6. – С. 646–652.

БИОХИМИЯ И ТОКСИКОЛОГИЯ

Безгодов Андрей Викторович

канд. с.-х. наук, заведующий отделом

Колобков Евгений Васильевич

канд. с.-х. наук

Уральский НИИСХ – филиал ФГБНУ «Уральский федеральный
аграрный научно-исследовательский центр УрО РАН»

г. Екатеринбург, Свердловская область

DOI: 10.31483/r-32345

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРЕДПОСЕВНОЙ ОБРАБОТКИ СЕМЯН ПРЕПАРАТОМ MICROBIONIC ПРОТИВ СЕМЕННОЙ И АЭРОГЕННОЙ ИНФЕКЦИИ

Аннотация: в данной работе была проведена оценка эффективности обработки семян пшеницы препаратом MicroBionic. Отмечен положительный эффект, выраженный в снижении зараженности семян патогенными микроорганизмами рода *Fusarium* и *Helminthosporium* и в увеличении всхожести семян. Рекомендуется применение биопрепарата для обработки партий семян, зараженность которых не превышает или близка к экономическому порогу вредоносности.

Ключевые слова: пшеница, фунгицид, *Fusarium*, *Helminthosporium*, биологический препарат, обработка семян.

Основная задача человека, выращивающего сельскохозяйственную продукцию в полевых условиях – сохранить или создать идеальную почву для производства урожая. Хорошо известно, что на одном и том же типе почвы при одинаковом агрохимическом составе, агрофизических свойствах и погодных условиях далеко не всегда можно получить равноценный урожай и минеральные удобрения здесь не являются лимитирующим факторов. Все дело в микробиологическом составе.

Все больше людей отдают предпочтение экологически чистым продуктам питания, полученным на основе органического земледелия. Органическая продукция не содержит генетически модифицированных организмов, химически синтезированных консервантов, красителей и ароматизаторов. Решением для производства экологически чистых продуктов может служить применение микробиологических препаратов [2].

Японский ученый Теро Хига (Terrio Higa) ввел в сельскохозяйственную практику концепцию эффективных микроорганизмов (ЕМ) и классификацию почвы на основе ее микробиологической деятельности:

1) Стимулирующая болезни почва. Процент *Fusarium* от всех грибов имеющейся в этой почве больше, чем 15–20%. Численность вредителей и патогенной инфекции наносят существенный урон зерновым культурам.

2) Болезнеподавляющая почва – почва, в которой существуют микроорганизмы производящие антибиотики. Процент *Fuzarium* в таких почвах менее 5%. При ее использовании число вредителей и инвазия низки, но отдача урожаем не так хороша.

3) Почва, стимулирующая брожение – это почва содержит микроорганизмы, возбуждающие брожение, типа молочнокислых бактерий и дрожжей. В такой почве содержание *Fuzarium* меньше 5% и увеличивается численность ферментирующих грибов – *Aspergillus*, *Rizopus*. Такая почва становится мягкой, водопроницаемой. Растворимость неорганических питательных увеличивается.

4) Синтетическая почва – дополнительно содержит микроорганизмы типа азотфиксирующих и фотосинтетических бактерий.

5) Возбуждающая брожение синтетическая почва – идеальная почва для производства урожая [5; 6; 7].

Наиболее плодородными почвами, удовлетворяющие всем требованиям земледельца являются естественные, техногенно не нарушенные высоко гумусные черноземные почвы.

Опираясь на мировой научный опыт, исследования в области почвоведения, микробиологии и вермикюльтивирования становится возможным производить в промышленных условиях искусственный чернозем – возбуждающую брожение синтетическую почву, являющуюся основой производства ее экстракта – биопрепарата MicroBionic.

Технология производства препарата MicroBionic разработана на основе синергии технологии Вермикулирования и технологии Эффективных микроорганизмов (ЕМ).

В природе дождевые черви питаются отмершими частицами растений или богатой перегноем почвой, содержащей бактерии, водоросли, грибы, простейших микроорганизмов. Наличие фермента целлюлозы позволяет использовать отходы, содержащие большое количество клетчатки. Большинство видов бактерий, выделенных из кишечника червей, оказались способными продуцировать фермент, разрушающий целлюлозу. Степень разрушения лигнина в кишечнике червей колеблется от 5 до 16%. Размельчая отходы, содержащие целлюлозу и увеличивая площадь их поверхности, черви тем самым содействуют активизации и росту численности микроорганизмов [3].

Если настоять 1 кг биогумуса в 10 л воды и выдержать в полученной вытяжке семена растений, то всхожесть их повышается и растения практически не болеют [3].

Сапропель, или озерный ил, как компонент сырья, используется в производстве препарата MicroBionic. Это вещество преимущественно биогенного происхождения, образуется в воде на дне пресноводных водоемов из остатков растений и простейших живых организмов, которые быстро

размножаясь, накапливаются в огромных количествах, отмирают и откладываются в виде ила. Тут же осаждаются частицы почвенного перегноя, поступающие с полей в водоем. Сапропель богат минеральными веществами. Он содержит каротин, витамины Д, Е, В₂, В₆, В₁₂, С, Р, кальций, фосфор, серу, железо, микроэлементы – йод, кобальт, марганец, бром и другие, а также биологически активные вещества. Установлено бактерицидное действие сапропеля по отношению к болезнетворным микроорганизмам и присутствие в нем микробов, выделяющих антибиотики против некоторых возбудителей болезни растений [4].

Гуматы, содержащиеся в искусственном черноземе, влияют на растение непосредственным образом, а также косвенно. Непосредственное влияние выражается в разностороннем воздействии на процессы роста растений, благодаря чему осуществляется их регуляция. Косвенный эффект связан с улучшением водно-физических свойств почвы, активизацией микрофлоры, влиянием на миграцию питательных веществ, повышения коэффициента использования минеральных удобрений, связыванием токсических агентов (пестицидов, тяжелых металлов и др.) [1].

Эффективность применения биопрепаратов определяется сроком и способами обработки, видом растений и экологической обстановкой. Как правило эти действия на процессы роста и развития наиболее ярко проявляются при обработке растений на ранних фазах развития, причем наиболее чувствительна к препаратам корневая система.

Положительный эффект от применения биопрепаратов содержащих эффективные микроорганизмы и стимуляторы роста возрастает в условиях отличных от благоприятных: высокие или низкие температуры, недостаток влаги, засоление, высокие концентрации азота, ядохимикатов и т. д. Предварительная обработка семян или растений такого типа стимулятором повышает неспецифическую сопротивляемость их к стрессу и способствует активизации восстановительных процессов.

Целью работы является оценка биостимулирующего и фунгицидного воздействия препарата MicroBionic (водная вытяжка из экоморфома) – относящегося по классификации Terrio Higa к возбуждающей брожение синтетической почве – идеальной для производства урожая.

Концентрированный почвенный раствор предназначается для использования при обработке и замачивании семян, выгонке рассады, для корневой и внекорневой подкормки, при посадке и пересадке растений.

Методика и методология. Исследования проведены в Уральском НИИСХ- филиале ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН в рамках государственного задания по теме НИОКТР «Оценка новых сортов сельскохозяйственных культур в различных экологических условиях, совершенствование системы кормопроизводства, разработка технологий возделывания с использованием современного комплекса машин, средств химизации и

биологических препаратов». При проведении в лабораторных условиях работ по оценке эффективности в борьбе с семенной инфекцией на семенах пшеницы использовался фунгицид ТМТД и биопрепарат MicroBionic. Опыт проводился по схеме:

1. Контроль (не обработанные семена);
 2. Биопрепарат MicroBionic – разведение 1:10, (1 л/т);
 3. Биопрепарат MicroBionic – разведение 1:100, (0,1 л/т);
 4. Биопрепарат MicroBionic – разведение 1:1000, (0,01 л/т);
- ТМТД, вск, (3 кг/т).

Проращивание семян пшеницы сорта Ирень осуществляли по стандартной методике ГОСТ 12038–84 (методы определения всхожести) в специальных пластмассовых растильнях 200x120x30 мм. Температурный, влажностный и световой режим соответствовали требованиям ГОСТа.

Результаты и обсуждение. Предварительные микологические анализы двух образцов семян разного качества показали, что уровень из зараженности составил от 34 до 67%. Среди патогенных и сапрофитных форм выделены: *Fuzarium*, *Helmintosporium*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Mucor* и др. Эти количественные показатели превышали экономический порог вредоносности (ЭПВ) в 1,2 – 2,4 раза.

Учитывая, что семена пшеницы сорта Ирень имели пораженность грибной инфекцией от средней до высокой, важно было установить фактор фитотического влияния изучаемого препарата MicroBionic на семенную инфекцию и всхожесть семян.

Исследования по испытанию эффективности препарата как биопротравителя проводились с инфицированностью зерна патогенными организмами (фузариоз + гельминтоспориоз) 8–10%.

В результате проведения микологического анализа семян выявлено, что образец №1 имел в контроле лабораторную всхожесть 56%. После обработки биопротравителем она увеличилась на 17–18%, а зараженность семян снизилась на 12–18%, таблица 1.

Таблица 1

Влияние биопрепарата MicroBionic на всхожесть и зараженность
семян пшеницы

Вариант	Образец №1				Образец №2			
	Всхожесть		Зараженность		Всхожесть		Зараженность	
	%	+ - к контр.	%	+ - к контр.	%	+ - к контр.	%	+ - к контр.
1 Контроль	56	-	67	-	98	-	34,6	-
2 МБ 1:10	73	+ 17	49	- 18	99	+ 1	23,7	- 10,9
3 МБ 1:100	74	+ 18	52	- 15	99	+ 1	25,5	- 9,1
4 МБ 1:1000	74	+ 18	55	- 12	99	+ 1	28,4	- 6,2
5 ТМТД	76	+ 20	34	- 33	99	+ 1	5,0	- 29,6

На семенах пшеницы с высокой лабораторной всхожестью также под воздействием биопротравителя наблюдалось ее повышение на 1%, а снижение зараженности семян снизилось от 6 до 11%.

Данные проведения микологического анализа семян представлены в таблице 2.

Таблица 2
Влияние биопрепарата MicroBionic на видовой состав микроорганизмов, выявленных на семенах пшеницы образца № 2

Вариант	Зараженность	В том числе		
		Патогены		Сапрофиты
		<i>Fuzarium</i>	<i>Helminto-sporium</i>	<i>Alternaria, Penicillium, Cladosporium, Aspergillum</i> и др.
1 Контроль	34,6	2,7	5,3	26,6
2 MicroBionic 1:10	23,7	1,3	3,7	18,7
3 MicroBionic 1:100	25,5	1,8	4,0	19,7
4 MicroBionic 1:1000	28,4	3,7	4,0	20,7
5 ТМТД	5,0	0,0	0,0	5,0

Как следует из данных анализа (табл. 2), наиболее высокий эффект снижения патогенной инфекции семян получен при применении химического протравителя ТМТД, за счет чего инфицированность семян не превысила 5%. При этом семена были заселены только сапрофитной микрофлорой.

Биопрепарат MicroBionic использованный против семенной инфекции в концентрации от 0,1 до 1,0 л/т семян снизил общую зараженность семян на 25,5 и 29,7%, зараженность фузариозом – на 21,7 и 51,8%, зараженность гелиминтоспориозом – на 24,5 и 30,1%. Таким образом отмечается положительное фунгицидное действие препарата на снижение зараженности семян.

В то же время необходимо отметить недостаточно высокую эффективность по сравнению с химическим протравителем. Зараженность семян снизилась на 6,2 – 10,9%.

Суммарный инфекционный фон от патогенных грибов (фузариоз + гелиминтоспориоз) составил от 5 до 7,7%. Этот показатель близок к экономическому порогу вредоносности (8–10%).

Биопрепарат MicroBionic не проявил существенного воздействия на рост проростков пшеницы. Разница по отношению к контролю не превышала 2,4%. Отмечено, что при разбавлении препарата водой в отношении 1:10 и применении дозы препарата 1 л/т семян, наблюдалось снижение доли слабо развитых проростков пшеницы (таблица 3).

Таблица 3

**Влияние биопрепарата MicroBionic на длину проростков пшеницы
(12-й день)**

Вариант	Длина проростков пшеницы на 12 день, см			% проростков менее 10 см
	средняя	в том числе		
		более 10 см	10 см и менее	
1 Контроль	16,9	18,0	8,2	11,3
2 МБ 1:10	17,0	18,0	7,7	8,3
3 МБ 1:100	16,5	17,8	7,5	12,7
4 МБ 1:1000	16,5	17,8	8,1	13,7

Выводы

1. Отмечен положительный эффект увеличения всхожести на 17 -18% и снижения зараженности на 15 -18% партии семян некондиционной по всхожести с высокой зараженностью.
2. Отмечен положительный эффект снижения зараженности на 6,2 - 10,9% на кондиционной по всхожести партии семян.
3. Отмечен положительный эффект на снижение зараженности семян патогенными микроорганизмами рода *Fusarium* и *Helminthosporium*.
4. Применение биопрепарата в разбавлении 1:1000 рассматривать для производственного применения для обработки семян рассматривать не целесообразно.
5. Возможно применение биопрепарата для обработки партий семян, зараженность которых не превышает или близка к ЭПВ.

Список литературы

1. Дербинский Ю.А. «ФЕНИКС» (гумат натрия) – стимулятор роста и развития растений и животных / Ю.А. Дербинский, Д.Г. Боярская. – Екатеринбург, 1992. – 27 с.
2. Гуцева Г.З. Использование технологий на основе эффективных микроорганизмов в сельскохозяйственном производстве / Г.З. Гуцева, С.А. Арендарь // Сахаровские чтения 2018 года: экологические проблемы XXI века: материалы 18-й Международной научной конференции. – С. 36–37 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://elibrary.ru/download/elibrary_35397764_67868783.pdf (дата обращения: 29.03.2019).
3. Зезин Н.Н. Вермикультивирование, производство и применение биогумуса. – Екатеринбург, 1992. – 31 с.
4. Разорвин И.В. Рекомендации по применению сапропеля уральских озер в сельском хозяйстве / И.В. Разорвин, Н.В. Дерябин, Н.А. Чесноков [и др.]. – Свердловск, 1988. – 27 с.
5. Эффективные микроорганизмы. Руководство по применению в сельском хозяйстве и животноводстве. – М., 2001. – 37 с.
6. Higa T. and G.N. Wididana. 1991b. Cangres in the soil microflora inducet bay Effective Microorganisms. H. 153–162. In JF Parr, S.B. Hornick, and C.E. Whitman. (ed.) Proceeding of the Firstinternational Conference on Kyusei Nature Farming. U.S. Departaments of Agriculture, Washington, D.C., USA.
7. Takashi Kuan, Masaki Shuntani. Kuisei nature farming and technologi of Effective Microorganisms. Guidelines for practical USE. Revised Edishion. 1991 [Электронный ресурс]. – URL: www.apnan.org

Заболотских Влада Валентиновнаканд. биол. наук, доцент
ФГБОУ ВО «Самарский государственный
технический университет»
г. Самара, Самарская область

ИССЛЕДОВАНИЯ ТОКСИЧНОСТИ АЭРОПОЛЛЮТАНТОВ ГОРОДСКОЙ СРЕДЫ

Аннотация: на основе применения планшетного метода и методов биотестирования автором статьи проведены исследования токсичности аэрополлютантов городской среды на примере городов Самары и Тольятти и выявлены зоны с повышенной токсической нагрузкой аэрополлютантов на биологические объекты.

Ключевые слова: токсичность аэрополлютантов, методы биотестирования, планшетный метод.

Города являются мощными источниками загрязнения атмосферы, воды, почвы. Прогрессирующая урбанизация ведет к очевидным негативным последствиям. Среди загрязнителей городской среды многие химические вещества являются токсикантами, т.е. оказывают негативное влияние на организм человека и биосистемы, вызывая развитие экопатологий. Так, в городах с развитой нефтехимической промышленностью и вблизи автомагистралей у детей жизненная емкость легких, резервные объемы вдоха и выдоха снижены на 10–30%, а у детей, проживающих вблизи предприятий стройиндустрии с большим пылевым выбросом – на 70% [3].

В окружающей среде присутствуют сотни различных химических соединений, но для любых, даже самых «чистых» регионов или стран, определяется перечень наиболее опасных именно для данного региона загрязняющих веществ (приоритетных загрязнителей) [1]. Для них характерны высокая токсичность, способность к накоплению в трофических цепях, устойчивость в окружающей среде. Среди показателей токсичности – определяющие: канцерогенность, мутагенность, репродуктивное здоровье и эндокринный статус человека, нервно-психическое развитие детей [1; 2; 3].

Приоритетными загрязняющими веществами для городов Самара и Тольятти являются формальдегид, фтористый водород, растворимые сульфаты, непредельные углеводороды, диоксид азота, бенз(а)пирен, аммиак. Аэрополлютанты воздействуют на организм человека и окружающую среду, вызывая различные виды неблагоприятных токсических эффектов. Аэрополлютантам принадлежит значительная роль в развитии патологии дыхательных путей. В крупных промышленных городах со значительным выбросом в атмосферу города формальдегида, соединений серы и азота, оксида углерода распространены болезни органов дыхания, такие как ОРЗ, бронхиты, синуситы, ларинготрахеиты [1; 4; 5].

Необходимо совершенствовать систему мониторинга загрязненности атмосферного воздуха для объективной оценки токсической нагрузки

аэрополлютантов на человека и окружающую природную среду и разработки адекватных мероприятий по снижению антропогенного воздействия токсикантов воздуха.

Одним из неизученных воздействий на окружающую среду химических загрязнений или аэрополлютантов является токсическое воздействие, которое проявляется в токсическом эффекте. Токсический эффект представляет собой реакцию организма или живого объекта на воздействие комплекса неблагоприятных факторов.

Действие комплекса различных факторов на организм взаимосвязано и в значительной степени усложняет вызываемую ими реакцию организма. Как известно, токсический эффект различается в зависимости от особенностей механизма действия различных комбинаций токсичных веществ. Совместное действие последних может вызывать различные эффекты воздействия на организм человека: независимое, интегральное, антагонистическое и синергетическое (эффект, превышающий суммирование), а также изменение характера действия (например, проявление канцерогенных свойств).

Для адекватной оценки эффектов токсического воздействия вредных факторов окружающей среды необходим анализ и учёт реализуемых ситуаций воздействия различных комбинаций токсичных веществ и их взаимовлияния.

Для оценки токсичности аэрополлютантов городской среды нами разработаны конструкции планшетов с растительными сорбентами, которые позволяют адсорбировать и аккумулировать аэрополлютанты непосредственно из городского воздуха в местах взятия проб. Затем, в лабораторных условиях экспериментально определялась токсичность аэрополлютантов, извлечённых их сорбентов, методами биотестирования (метод проростков, тест-объекты – дафния, хлорелла).

Конструкция планшета представлена на рисунке 1. Это компактная модель, на дно которой помещен растительный сорбент. Корпус планшета изготовлен из пластика и имеет ряд отверстий для свободной циркуляции воздуха. По мере прохождения воздуха через планшет, загрязняющие вещества адсорбируются и аккумулируются сорбентом.

Благодаря высокой адсорбционной активности растительных сорбентов, такие планшеты, помещенные в исследуемую точку города, способны поглощать и аккумулировать токсичные вещества из атмосферного воздуха. Токсичность воздуха определялась с помощью методов биотестирования вытяжек, полученных из сорбционного материала, с помощью тест-объектов дафнии и хлореллы согласно методики ПНД Ф Т 14.1:2.4.12–06 Т 16.1:2.3:3.9–06, а также с применением методов проростков (семян кресс-салата и редиса).

Результаты определения острой токсичности вытяжек из планшетных сорбентов представлены в таблице 1.

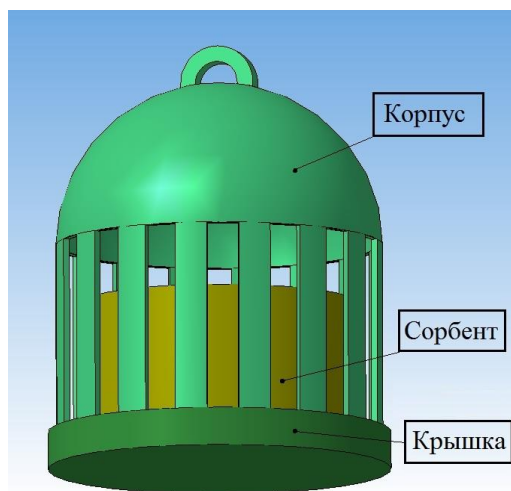


Рис. 1. Схема планшета

Изготовленные планшеты (рис. 1) размещались на 7 суток в исследуемые точки города. В результате дальнейшего биотестирования вытяжек планшетных сорбентов была выявлена токсичность аэрополлютантов атмосферного воздуха в различных точках города и проведена оценка экологического состояния городской среды городов Самара и Тольятти.

Так, в результате определения токсичности аэрополлютантов по выживаемости дафний (*Daphnia magna* Straus) была установлена острая токсичность всех вытяжек, полученных из планшетных сорбентов (таблица 1).

Таким образом, в результате экспериментального определения токсичности аэрополлютантов по выживаемости дафний (*Daphnia magna* Straus) была установлена острая токсичность вытяжек токсикантов воздуха в городах Самара и Тольятти, что свидетельствует о наличии проблемы негативного воздействия токсичных аэрополлютантов на здоровье человека.

Применение методов биотестирования позволило выявить интегральную токсичности аэрополлютантов в городской среде, что позволяет рекомендовать этот метод для достоверной биодиагностики качества воздуха и проведения дальнейших исследований токсического воздействия аэрополлютантов на человека (риски здоровью) и природные сообщества городской среды.

Применение разработанной системы интегральной оценки токсического воздействия аэрополлютантов на человека и окружающую среду с использованием биологических и планшетных методов мониторинга позволяет выявить зоны повышенных рисков и предложить комплекс оптимальных мероприятия по их снижению.

Таблица 1

Оценка токсичности вытяжек из сорбентов

Место отбора пробы	Исследуемая концентрация водной вытяжки, %	Время от начала биотестирования	Количество выживших дафний (в трех параллельных определениях)	Смертность дафний в опыте, %	Оценка качества атмосферного воздуха	
					ЛКР50–48	БКР10–48
Контрольная проба	6,25	48 часов	30	0	-	Проба не токсична
	12,5		30	0		
	25		30	0		
	50		30	0		
	100		27	10		
Южное шоссе	6,25	48 часов	30	0	53,48%-ная концентрация, разбавление в 1,87 раза	18,26%-ная концентрация, разбавление в 5,48 раза
	12,5		30	0		
	25		30	0		
	50		18	40		
	100		0	100		
ул. Тополиная – ул. 70 лет Октября	6,25	48 часов	30	0	59,61%-ная концентрация, разбавление в 1,68 раза	24,51%-ная концентрация, разбавление в 4,08 раза
	12,5		30	0		
	25		30	0		
	50		24	20		
	100		0	100		
ул. 40 лет Победы	6,25	48 часов	30	0	49,40%-ная концентрация, разбавление в 2,02 раза	14,72%-ная концентрация, разбавление в 6,79 раза
	12,5		30	0		
	25		30	40		
	50		15	100		
	100		0	100		

Список литературы

1. Мелехова О.П. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / О.П. Мелехова, Е.И. Егорова, Т.И. Евсеева. – М.: Академия, 2007. – 288 с.
2. Валиуллина В.Н. Разработка сорбционного материала на основе растительных отходов / В.Н. Валиуллина, Т.А. Чадаева, В.В. Заболотских // Научные перспективы XXI века. Достижения и перспективы нового столетия: материалы IX Международной научно-практической конференции (Международный научный институт «Educatio»). Ч. 3. – 2015. – С. 166–170.
3. Заболотских В.В. Приоритетные загрязнители атмосферного воздуха города Тольятти и их влияние на здоровье населения – 25 сентября 2011 года, Тольятти / В.В. Заболотских, И.С. Потапова // Экология и безопасность жизнедеятельности промышленно-транспортных комплексов: сборник трудов III Международного экологического конгресса (V Международной научно-технической конференции) (21–25 сентября 2011 года, Тольятти, Самара). Т. 2. – Тольятти: ТГУ, 2011. – С. 87–93.
4. Васильев А.В. Обеспечение экологической безопасности в условиях городского округа Тольятти: учебное пособие. – Самара: Изд-во Самарского научного центра РАН, 2012. – 201 с.
5. Заболотских В.В. Мониторинг токсического воздействия на окружающую среду с использованием методов биоиндикации и биотестирования: монография / В.В. Заболотских, А.В. Васильев. – Самара: Изд-во Самарского научного центра РАН, 2012. – 333 с.

ЭКОЛОГИЯ И ПРОБЛЕМЫ БИОРАЗНООБРАЗИЯ

Белецкая Екатерина Яковлевна

канд. биол. наук, доцент
ФГБОУ ВО «Омский государственный
педагогический университет»

Чибис Светлана Петровна

канд. с.-х. наук, аспирант
ФГБОУ ВО «Омский государственный
аграрный университет
им. П.А. Столыпина»

Кротова Людмила Анатольевна

д-р с.-х. наук, профессор
ФГБОУ ВО «Омский государственный
аграрный университет
им. П.А. Столыпина»

Шелонцев Владимир Александрович

канд. хим. наук, доцент
ФГБОУ ВО «Омский государственный
педагогический университет»
г. Омск, Омская область

DOI: 10.31483/r-32850

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ НА МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ПОПУЛЯЦИОННЫЕ ПРИЗНАКИ ПШЕНИЦЫ МЯГКОЙ

Аннотация: в статье обсуждаются эффекты воздействия фунгицидов на посевные качества семян, рост и развитие проростков. В результате лабораторных опытов выявлено влияние протравителей семян, концентрации их действующего вещества и продолжительности периода от обработки на формирование проростков мягкой яровой пшеницы сорта Павлоградка. Системные фунгициды Комфорт, АлтСил, Террасил и Алькасар использовали в рекомендованной норме и завышенной в два раза через 1, 6 и 12 месяцев от протравливания. Сравнивали с контрольным вариантом без обработки. Посевные качества обработанных препаратами семян проявляли нестабильность, а морфофизиологические показатели сформировавшихся проростков пшеницы были неоднородными. Применение препаратов в рекомендованной норме через один месяц хранения зерновок приводит к снижению всхожести от 5% до 31%, по сравнению с вариантом без обработки. Количество корешков составляло 3,5–4,7 шт. при варьировании признака в 32–90%. Проростки пшеницы в вариантах с использованием протравителя Алькасар после хранения зерновок 6 и 12 месяцев не имели признаков повреждения грибковыми болезнями, но всхожесть их была ниже контроля в 1,3–1,8 раза. При этом

колеоптиле у основания заметно изгибалось. Изменение его формы не отмечено ни в других вариантах воздействия препаратов, ни в контрольном варианте.

Ключевые слова: яровая пшеница, сорт, фунгицид, семена, проросток пшеницы, посевные качества семян.

Борьба против болезней и вредителей является одной из важнейших задач современного зернового производства. В списке организмов, вредящих сельскохозяйственным культурам, насчитывают не менее 160 видов фитопатогенных бактерий, 250 видов вирусов, 8 тыс. видов насекомых и клещей, 2 тыс. видов сорняков [10]. В борьбе с вредителями, болезнями и сорняками используют различного рода пестициды. Недостатки химических средств известны – многие из них обладают мутагенным или канцерогенным эффектом, они не имеют избирательности действия и вызывают гибель, наряду с вредными, также и полезных организмов, при их систематическом применении происходит быстрая генетическая адаптация вредителей [9]. Установлено, например, что в результате естественного отбора в начале восьмидесятых годов 20 века в биосфере уже насчитывалось 428 видов насекомых, резистентных к химическим препаратам [10]. Поэтому в качестве альтернативы химическим средствам защиты растений применяют экологически безопасные биологические методы борьбы с вредителями, болезнями и сорняками, пытаются облегчить решение этой задачи селекции путём выведения устойчивых сортов и пород. Исключительно важным является интегрирование биологического метода с другими, особенно химическим, в общей системе защитных мероприятий [10].

Известно, что пестициды возглавляют список опасных загрязнителей окружающей среды, так как одни из них токсичны, а другие, будучи сами по себе безвредными, могут превращаться, особенно при участии микроорганизмов и метаболитов высших организмов, в ядовитые продукты с канцерогенными и цитотоксическими свойствами [7; 11]. В связи с этим общественность, включая научное сообщество, обеспокоены повышением экологической нагрузки на окружающую среду и озабочены здоровьем социума, в том числе – генетическим. С другой стороны, мутагенную активность пестицидов можно использовать в целях повышения генетического разнообразия культурных растений, в генофондах которых наблюдается в последнее время эрозия («вымывание») генных комплексов и отдельных локусов адаптивности к биотическим и абиотическим факторам среды. К такому положению в растениеводстве привели интенсивные программы скрещиваний и отбора, проводившиеся в последние десятилетия и направленные в основном на повышение продуктивности растений, приведшие к снижению уровня генетического разнообразия культурных растений по всем их свойствам. В пределах культуры растения становятся генетически все более однообразными, поэтому уязвимыми для воздействия биотических и абиотических

факторов среды оказываются посевы в целом [8]. Недостаточная адаптивность высокопродуктивных сортов обусловлена снижением уровня их устойчивости к неблагоприятным факторам среды. Погоня за урожаем привела к повышению уязвимости растений к стрессам.

Существенную роль в решении проблемы резистентности сортов растений играет метод химического мутагенеза [4]. Например, озимой мягкой пшенице не свойственны признаки устойчивости к мучнистой росе и твердой головне. Немногие сорта пшеницы, обладающие устойчивостью к этим фитопатогенам, приобрели ее благодаря отдаленной гибридизации с другими видами и родами пшеницы. Метод отдаленной гибридизации (даже при использовании биотехнологии и геномной инженерии) весьма длителен, трудоемок и часто не гарантирует сохранения приобретенных адаптивных свойств в последующих поколениях [12].

Химический мутагенез широко используется при создании наследственного разнообразия растений по многим признакам, включая комплексную устойчивость к фитопатогенному окружению. Н.С. Эйгес отмечает, что специфическая особенность индуцированного мутантного признака устойчивости к мучнистой росе, например, состоит в его длительной сохранности в течение 10–40 и более лет, в то время как устойчивость, переданная путем отдаленных скрещиваний, быстро теряется, в среднем через 3–5 лет [12].

В связи с обнаружением многими исследователями мутагенного действия разных пестицидов авторами представляемой статьи с 2014 года проводятся исследования эффектов их воздействия на формообразовательный процесс в изучаемых популяциях, выраженность популяционных и морфологических признаков и посевные качества семян пшеницы мягкой.

Обработка семян мягкой яровой пшеницы сорта Павлоградка протравителями проводилась по схеме, представленной в таблице 1.

Таблица 1

Схема опыта

№ п/п	Вариант опыта	Фунгицид и действующее вещество (д.в.)
1	Сорт яровой пшеницы Павлоградка (контроль, без обработки)	-
2	АлтСил (Павлоградка) – АлП (n)	АлтСил: тебуконазол
3	АлтСил (Павлоградка) – АлП (2n)	АлтСил: тебуконазол
4	Алькасар (Павлоградка) – АкП (n)	Алькасар: дифеноконазол +ципроконазол
5	Алькасар (Павлоградка) – АкП (2n)	Алькасар: дифеноконазол +ципроконазол
6	Комфорт (Павлоградка) – КП (n)	Комфорт: карбендазим
7	Комфорт (Павлоградка) – КП (2n)	Комфорт: карбендазим
8	Террасил (Павлоградка) – ТП (n)	Террасил: тебуконазол
9	Террасил (Павлоградка) – ТП (2n)	Террасил: тебуконазол

В соответствии со схемой эксперимента проводили обработку зерновок сорта пшеницы Павлоградка. Воздействие протравителя наблюдали при использовании концентрации в рекомендованной производству норме (n) и концентрации, превышающей рекомендованную норму в два раза ($2n$). Контрольным вариантом (тест-объектом) послужил сорт Павлоградка без обработки семян протравителями.

Комфорт – высокоэффективный системный фунгицид для обработки семян и посевов зерновых культур. Обладает как лечебным, так и профилактическим действием, длительным периодом защитного действия [5, 11] АлтСил и Террасил – системные фунгициды широкого спектра действия. Обладают защитными, лечебными и искореняющими свойствами. Действующее вещество тебуконазол имеет специфичный эффект против всех видов ржавчины зерновых культур. Алькасар – универсальный двухкомпонентный системный фунгицид для обработки семян зерновых культур против грибковых заболеваний, распространяющихся с семенами. Действующие вещества – дифеноконазол и ципроконазол – идеально дополняют друг друга и позволяют эффективно бороться как с поверхностными, так и с внутренними инфекциями зерновки [1].

Семена пшеницы протравливали препаратами с рекомендуемой нормой их расхода: Комфорт – 1,5 л/т, Алькасар – 1,0 л/т, АлтСил и Террасил – 0,5 л/т и с завышенной нормой расхода в два раза. Зерновки контрольного варианта в опыте обработке протравителями не подвергались. После обработки семена подсушивали и закладывали в пакеты на хранение. Исследования с ними проводили по схеме опыта.

В лабораторном опыте с зерновками определяли энергию прорастания, всхожесть, а также проводили замеры проростка по основным параметрам [3]. Результаты определения всхожести представлены в таблице 2.

По сравнению с контрольным вариантом посевные качества обработанных препаратами семян проявляли нестабильность. Энергия прорастания была максимальной (98–100%), но формирование полноценных проростков за 7 суток наблюдалась не у всех зерновок. Влияние оказывали как норма протравителя, так и период времени, прошедший после обработки семян.

Повышенная концентрация фунгицидов Комфорт и Террасил через 1 мес. у обработанных семян затормаживает всхожесть в 1,4–1,5 раза, а АлтСил и Террасил влияет на показатель незначительно. Применение препаратов в норме по сравнению с вариантом без обработки приводит к снижению всхожести от 5% до 31% за счет наличия семян с неразвившимися корешками, загнивших семян не наблюдалось [11].

Таблица 2

Всхожесть семян пшеницы яровой сорта Павлоградка в зависимости от периода времени после обработки протравителями, среднее за 2017–2018 гг., %

Норма протравителя	Сорт Павлоградка		
	через 1 мес.	через 6 мес.	через 12 мес.
без обработки	81	85	58
Комфорт			
n	75	83	56
2 n	59	83	52
Алькасар			
n	73	73	61
2 n	80	62	32
АлтСил			
n	77	78	88
2 n	80	84	56
Террасил			
n	56	72	46
2 n	53	82	56

**Данные за один год*

Интересно, что в варианте с повышенной концентрацией действующего вещества (2n), увеличение периода после обработки с 1 мес. до 6 мес. протравителями Комфорт, АлтСил и Террасил сказалось благоприятно на лабораторной всхожести, которая возросла на 24% и 29% соответственно. По мнению ученых, тебуконазол, как действующее вещество протравителей АлтСил и Террасил, быстро проникает в растение и равномерно распределяется в нем. Он обладает рострегулирующим действием. Однако может перейти в ретардантное действие при неблагоприятных условиях: недостатке влаги, переувлажнении почвы, слишком глубокой заделке семян, при этом наблюдается низкая энергия прорастания, полевая всхожесть и замедленное появление всходов [2].

Протравители, имеющие в своем составе различные действующие вещества, оказывали неодинаковое влияние на показатели всхожести (рис. 1, 2 – проращивание через один год после обработки семян).

Фунгицид Комфорт вызывал рассеченность первого листа на 2–4 «лопасти» разной глубины по линиям жилкования у 11–13% проростков (расположили справа от остальных растений, рис. 3.).



Рис. 1. Комфорт стимулировал развитие проростков (КП -п, КП- 2п – слева от контроля, он – в центре); Террасил ингибировал их развитие (ТП – п, ТП – 2п – справа от контроля)



Рис. 2. АльтСил в одинарной дозе (АлП – п – крайний слева) показал слабое стимулирование отдельных растений, АлП – 2п и Альткасар в обеих дозах (справа) – ингибирование



Рис. 3. Фунгицид Комфорт: проростки с рассеченностью первого листа (справа)

По сравнению с контрольным вариантом посевные качества обработанных препаратами семян проявляли нестабильность. Энергия прорастания была максимальной (98–100%), но формирование полноценных проростков за 7 суток наблюдалась не у всех зерновок. Влияние оказывали как норма протравителя, так и период времени от обработки.

Заключение

В результате лабораторных исследований можно сделать заключение о разнонаправленном воздействии различных протравителей и норм их расхода на показатели всхожести семян и морфометрические параметры проростков.

Выявлено, что срок хранения семян сорта Павлоградка после обработки протравителями оказывает влияние на формирование проростков пшеницы. Отмечено как ингибирующее, так и стимулирующее действие применяемых препаратов.

При воздействии тебуконазола (АлтСил, Террасил) проростки не проявляли признаков заболеваний, по морфометрическим параметрам они были неоднородными. При использовании двухкомпонентного фунгицида Алькасар (д.в. дифеноконазол + ципроконазол) показатели всхожести были ниже, чем у контроля, проростки внешне были «чистые», но параметры их сильно варьировали. Колеоптиле у основания заметно огибало зерновку, образуя изогнутое полукольцо. Изменение формы колеоптиле не наблюдалось ни в других вариантах воздействия препаратов, ни в контрольном варианте. Лучше всего проростки были сформированы при воздействии препарата Комфорт (д.в. карбендазим). Однако среди них наблюдалось много пораженных болезнями и проростков с рассеченным первым листом проростков, что может быть вызвано ингибированием процесса образования мезофилла листа.

Список литературы

1. Белов Д.А. Химические методы и средства защиты растений в лесном хозяйстве и озеленении: учебное пособие для студентов. – М.: МГУЛ, 2003. – 128 с.
2. Белицкая М.Н. Исследование и сравнительный анализ действующих веществ современных протравителей зерновых культур / М.Н. Белицкая, И.Р. Грибуст, Е.В. Байбакова // Вестник технологического университета. – 2015. – Т. 18, №9. – С. 32–36.
3. ГОСТ 12038–84. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести (с изм. №1, 2). Введ. 1986–07–01. – М.: Стандартинформ, 2011. – 64 с.
4. Дудин Г.П. Получение исходного материала для селекции ярового ячменя с помощью фунгицидов / Г.П. Дудин, М.В. Черемисинов, А.В. Помелов [и др.] // Актуальные проблемы селекции и технологии возделывания полевых культур: материалы II Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. Участием. – Киров: ФГБОУ ВО Вятская ГСХА, 2017. – С. 45.
5. Зинченко В.А. Химическая защита растений: средства, технология и экологическая безопасность. – М.: Колос-С, 2012. – 127 с.
6. Кротова Л.А. Эколого-генетическое влияние химических соединений на адаптацию растений / Л.А. Кротова, С.П. Чибис // Современные проблемы науки и образования. – 2017. – №6 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=27139> (дата обращения: 23.05.2019).
7. Рапопорт И.А. Химический мутагенез: проблемы и перспективы / И.А. Рапопорт, И.Х. Шигаева, И.Б. Ахматуллина. – Алма-Ата: Наука Каз. ССР, 1980. – 320 с.
8. Рейва П. Современная ботаника: в 2 т. Т. 2 / пер с англ.; П. Рейва, Р. Эверт, С. Айкхорн. – М.: Мир, 1990.
9. Савченко В.К. Генетический анализ и синтез в практической селекции. – Минск: Наука и техника, 1986.
10. Черников А.М. Научные предпосылки «Зеленой Революции» // Биология в школе. – 2014. – №7.
11. Чибис С.П. Результаты исследований влияния химических соединений на проростки пшеницы сорта Павлоградка / С.П. Чибис, Я.В. Мухина, Л.А. Кротова // Вестник Омского ГАУ. – 2019. – №1 (33). – С. 61–68.
12. Эйгес Н.С. Повышение эффективности внутривидовой гибридизации методом химического мутагенеза / Н.С. Эйгес, Л.И. Вайсфельд, Г.А. Волченко // Химия и компьютерное моделирование. Бутлеровские сообщения. – 2001. – №5.
13. Chibis S.P. The effect of the chemical protector on the growth and development of spring wheat germ / S.P. Chibis, L.A. Krotova, Ya.V. Mukhina // World Science: proceedings of articles the III International conference, Czech Republic – Russia, Moscow, 2018, September, 28–29. – С. 176–180.

ПЕДАГОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ОБРАЗОВАНИЯ ПО НАПРАВЛЕНИЮ БИОТЕХНОЛОГИЯ

Антонова Елена Ивановна

д-р биол. наук, профессор, директор

Ленгесова Наталья Анатольевна

канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории
морфологии НИЦ ФППББ, доцент

Соловьев Алексей Вячеславович

канд. биол. наук, заместитель директора,
старший научный сотрудник, доцент

Беззубенкова Ольга Евгеньевна

канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории
молекулярной биологии НИЦ ФППББ, доцент

Научно-исследовательский центр фундаментальных и прикладных
проблем биоэкологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Ульяновский
государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова»
г. Ульяновск, Ульяновская область

НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР КАК БАЗА ФОРМИРОВАНИЯ КОМПЕТЕНЦИЙ МАГИСТРОВ НАПРАВЛЕНИЯ ПОДГОТОВКИ 06.04.01 БИОЛОГИЯ ПРОФИЛЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЙ ПРОГРАММЫ «БИОТЕХНОЛОГИЯ С ОСНОВАМИ НАНОТЕХНОЛОГИЙ»

Аннотация: в работе рассмотрены особенности формирования компетенций магистров направления подготовки 06.04.01 Биология профиля образовательной программы «Биотехнология с основами нанотехнологий», показано значение специализированных лабораторий научно-исследовательского центра для подготовки специалистов в данной области.

Ключевые слова: образовательная программа, научно-исследовательский центр, профессиональные стандарты, национальная технологическая инициатива.

Научно-исследовательский центр фундаментальных и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии (НИЦ ФППББ) был открыт на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ульяновский государственный педагогический университет имени И.Н. Ульянова» в 2015 году. Основной вид деятельности НИЦ ФППББ – проведение фундаментальных и прикладных, в том числе экспериментальных, исследований в области морфологии

(гистология, цитология), клеточных технологий, биохимии и токсикологии, биологии развития и размножения, экологии, биоразнообразия, физиологии, молекулярной генетики и микробиологии, подготовка высококвалифицированных научно-педагогических кадров.

Важным аспектом в деятельности НИЦ является реализация фундаментальных научных исследований по приоритетным направлениям; решение научно-технологических проблем по полному циклу работ: от научной идеи до создания опытных образцов материалов и разработок, организация их производства; обеспечение взаимодействия фундаментальной и прикладной науки с образовательным процессом, научные исследования и разработки, а также коммерциализация и продвижение на рынке собственных инновационных продуктов и услуг на основе клеточных, молекулярно-генетических технологий.

С 2016 года научно-исследовательский центр является площадкой для подготовки высококвалифицированных кадров – магистров по направлению подготовки 06.04.01 Биология, направленности (профиля) образовательной программы «Биотехнология с основами нанотехнологий». Реализация и социальная значимость магистерской программы лежит в русле приоритетного направления развития науки и техники в Российской Федерации в соответствии с распоряжением Правительства РФ от 28 февраля 2018 г. №337-р «Об утверждении плана мероприятий (дорожной карты) «Развитие биотехнологий и геномной инженерии» [1].

В основу реализации программы магистратуры легли пять профессиональных стандартов: научный работник (научная (научно-исследовательская) деятельность) [6], педагог профессионального обучения, профессионального образования и дополнительного профессионального образования [4], микробиолог [2], специалист в области лабораторной клинической диагностики [3] и специалист-технолог в области природоохранных (экологических) биотехнологий [5]. В данной части проводится подготовка специалистов направления подготовки «Биология» для трудоустройства в клинические лаборатории медицинских учреждений в должности биолог. По программе магистратуры могут пройти переподготовку работники пищевой, сельскохозяйственной, перерабатывающей промышленности, фармацевтической отрасли, медицины, предприятия которых в полной мере представлены на территории Ульяновской области и областей среднего Поволжья.

Магистранты получают знания в области фундаментальной и прикладной науки об использовании живых организмов, культур клеток и биологических процессов в производстве с целью получения полезных продуктов для народного хозяйства, медицины и ветеринарии, в сфере формирования экологически доброкачественной среды обитания человека и животных.

Научно-исследовательский центр включает лаборатории морфологии, биохимии и токсикологии, клеточных технологий, молекулярной биологии, экологии и проблем биоразнообразия. Лаборатории НИЦ ФППББ активно используются магистрантами для лабораторных и практических занятий, прохождения всех видов практик, написания выпускных квалификационных работ.

Так, в частности лабораторные занятия дисциплины «Биология размножения и эмбриотехнология» проходят в лаборатории морфологии. Лаборатория биохимии и токсикологии используется в дисциплинах «Биокатализ и биокаталитические технологии», «Основы химии коллоидных систем, поверхностных явлений и растворов высокомолекулярных соединений» и «Биохимические методы анализа».

Оборудование лаборатории клеточных технологий позволят магистранту самостоятельно выполнять лабораторные работы в рамках дисциплины «Биотехнология растений». Осваивая программу «Клеточные технологии», магистранты самостоятельно выращивают клеточные линии фибробластов, меланоцитов и кератиноцитов по стандартным протоколам, а также по протоколам с модификациями.

Большое значение для подготовки магистров этого направления имеет лаборатория молекулярной биологии (с микробиологическим блоком). Большая часть лабораторных и практических работ таких дисциплин, как «Биотехнология», «Основы генетической инженерии», «Нанотехнологии в биотехнологии», «Геномика, протеомика», «Организация и функционирование молекулярно-генетических систем: генные сети», «Частная микробиология», «Микробиологические методы исследования» проходят, используя оборудование и материалы этой лаборатории.

Кроме этого, практика по получению первичных профессиональных умений и навыков, научно-производственная практика и практика по получению профессиональных умений и опыта профессиональной деятельности также проходят на базе центра. Задачи первой практики ознакомиться с методами исследований каждой лаборатории, с правилами работы в них и техникой безопасности. На второй практике магистранты закрепляются за одной из лабораторий и приобретают опыт и компетенции в области тех методов исследования, которые применяются в лаборатории. Важной особенностью практики является приобретение навыков и опыта для выполнения выпускной квалификационной работы.

Также не маловажным является тот факт, что магистранты выполняют выпускную квалификационную работу в рамках проектов НИЦ ФППББ, поддержанных различными научными фондами. Все проекты лежат в области мероприятий национальной технологической инициативы Health-Net, основными направлениями которой являются информационные технологии в медицине, медицинская генетика, биомедицина, спорт и здоровье, превентивная медицина, персонализированная медицина и здоровое долголетие. Студенты на практике закрепляются за сотрудниками лабораторий, составляют индивидуальное расписание и согласно индивидуальной траектории, проходят все этапы практики, которые отражены в рабочей программе.

В ходе обучения магистры приобретают знания, умения и опыт работы на новом высокотехнологичном оборудовании, что повышает возможность трудоустройства и конкурентоспособность выпускников на рынке труда.

Использование научно-исследовательского центра в качестве базы для подготовки магистрантов требует от руководства центра правильной организации работы, с разделением времени на работу с магистрантами и на работу в области медицины и биологии, четкого соблюдения правил техники безопасности и санитарно-гигиенических норм.

В настоящее время невозможно подготовить квалифицированного специалиста без наличия хорошо оснащенной материально-технической базы по реализуемому направлению подготовки магистрантов. Большое преимущество в этом отношении имеют образовательные учреждения, в которых созданы если не НИЦ, то отдельные специализированные лаборатории.

Список литературы

1. Об утверждении плана мероприятий («дорожной карты») «Развитие биотехнологий и генной инженерии»: Распоряжение Правительства РФ от 28 февраля 2018 г. №337-р [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/71792682/> (дата обращения: 17.05.2019).
2. Об утверждении профессионального стандарта «Микробиолог»: Приказ Минтруда России от 31.10.2014 № 865н (зарег. в Минюсте России 24.11.2014 №34868 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://rulaws.ru/-acts/Prikaz-Mintruda-Rossii-ot-31.10.-2014-N-865n/> (дата обращения: 17.05.2019).
3. Об утверждении профессионального стандарта «Специалист в области клинической лабораторной диагностики»: Приказ Минтруда России от 14.03.2018 г. №145н (зарег. в Минюсте России 03.04.2018 №50603 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://ppt.ru/docs/prikaz/mintrud/n-145n-197396> (дата обращения: 17.05.2019).
4. Об утверждении профессионального стандарта «Педагог профессионального обучения, профессионального образования и дополнительного профессионального образования»: Приказ Минтруда России от 08.09.2015 № 608н (зарег. в Минюсте России 24.09.2015 №38993 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://base.garant.ru/71202838/> (дата обращения: 17.05.2019).
5. Об утверждении профессионального стандарта «Специалист-технолог в области природоохранных (экологических) биотехнологий»: Приказ Минтруда России от 21.12.2015 №1046н (зарег. в Минюсте России 20.01.2016 № 40654 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_193005/ (дата обращения: 17.05.2019).
6. Об утверждении профессионального стандарта «Научный работник (научная (научно-исследовательская) деятельность)»: проект приказа Министерства труда и социальной защиты РФ (подготовлен Минтрудом России 05.09.2017) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.consultant.ru/cons/cgi/online.cgi?req=doc&base=PNPA&n=4837#04-287642132988525> (дата обращения: 17.05.2019)

Для заметок

Для заметок

Научное издание

**ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
ПО ПРИОРИТЕТНЫМ НАПРАВЛЕНИЯМ БИОЭКОЛОГИИ
И БИОТЕХНОЛОГИИ**

Сборник материалов
II Всероссийской научно-практической конференции
с международным участием
Ульяновск, 30 апреля 2019 г.

Главный редактор *Е.И. Антонова*
Компьютерная верстка и правка *Л.С. Миронова*

Подписано в печать 08.07.2019 г.
Дата выхода издания в свет 22.07.2019 г.

Формат 60×84/16. Бумага офсетная. Печать офсетная.
Гарнитура Times. Усл. печ. л. 5,8125. Заказ К-485. Тираж 500 экз.

Издательский дом «Среда»
428005, Чебоксары, Гражданская, 75, офис 12
+7 (8352) 655-731
info@phsreda.com
<https://phsreda.com>

Отпечатано в Студии печати «Максимум»
428005, Чебоксары, Гражданская, 75
+7 (8352) 655-047
info@maksimum21.ru
www.maksimum21.ru