

ПЕРМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ ПЕРМСКОГО КРАЯ
“ИНСТИТУТ ЭКОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ МИКРООРГАНИЗМОВ УРО РАН” –
ФИЛИАЛ ПФИЦ УРО РАН
“ИНСТИТУТ ТЕХНИЧЕСКОЙ ХИМИИ УРО РАН” – ФИЛИАЛ ПФИЦ УРО РАН
“ИНСТИТУТ МЕХАНИКИ СПЛОШНЫХ СРЕД УРО РАН” – ФИЛИАЛ ПФИЦ УРО РАН
МОО “МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ОБЩЕСТВО”
ПКО ВСЕРОССИЙСКОЕ ОБЩЕСТВО ОХРАНЫ ПРИРОДЫ
ООО “МЕЛИТЭК” ООО “ИМБИОКОМ” ООО “ЛАБОРАТОРИЯ АРГУМЕНТ”
ООО “НАНОТЭК” ООО “ОПТЭК” ООО “АЛАМЕД” ООО “ДИАЭМ”

ВЫСОКИЕ ТЕХНОЛОГИИ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ КАЧЕСТВО ЖИЗНИ

Материалы II Международной научной конференции
(Пермь, 17–19 сентября 2018 г.)



Пермь 2018

УДК 577.3

ББК 28.0

В932

Высокие технологии, определяющие качество
В932 жизни: Материалы II Международной науч. конф.
(Пермь, 17–19 сентября 2018 г.) / Перм. гос. нац.
исслед. ун-т. – Пермь, 2018. – 296 с.
ISBN 978-5-7944-3176-6

Сборник включает материалы участников II Международной научной конференции **«Высокие технологии, определяющие качество жизни»**. Значительная часть работ посвящена проблемам развития и внедрения технологий, направленных на улучшение качества жизни и здоровья людей. Материалы представляют интерес для специалистов, работающих в различных областях биологии, химии и медицины.

УДК 577.3

ББК 28.0

Издается по решению оргкомитета Международной научной конференции «Высокие технологии, определяющие качество жизни»

Главный редактор *В.А. Черешнев*

Редакционная коллегия:

*А.А. Елькин, А.Б. Крашенинников, В.Н. Терпугов,
В.В. Гришко, В.С. Чудинов, А.Ю. Максимов*

ISBN 978-5-7944-3176-6

© ПГНИУ, 2018

ПРЕДСЕДАТЕЛЬ ОРГКОМИТЕТА:

Макарихин И.Ю. д.ф.-м.н., ректор ПГНИУ, Пермь, Россия

ЗАМЕСТИТЕЛИ ПРЕДСЕДАТЕЛЯ ОРГКОМИТЕТА:

Матвеев В.П. академик РАН, директор “ИМСС УрО РАН”, Пермь, Россия

Черешнев В.А. академик РАН, гл. науч. сотр. ИИФ УрО РАН, Екатеринбург, Россия

Каннингхем К.Д. PhD, эксперт Европейской комиссии по программе “Horizon 2020”, Эдинбург, Великобритания

ЧЛЕНЫ ОРГКОМИТЕТА:

Бореко Е.И. д.м.н., гл. науч. сотр. РНПЦЭМ, Минск, Беларусь

Бочарова А.М. начальник отдела по развитию высшего образования и науки Министерства образования и науки Пермского края, Пермь, Россия

Ветров А.Л. к.г.н., проректор по научной работе и инновациям ПГНИУ, Пермь, Россия

Волчо К.П. д.х.н., профессор РАН, Новосибирск, Россия

Гаврин А.Ю. PhD, научный сотрудник Кембриджского университета, Кембридж, Великобритания

Горячева И.Г. академик РАН, зав. лаб. ИПМех РАН, Москва, Россия

Демаков В.А. чл.-корр. РАН, директор “ИЭГМ УрО РАН”, Пермь, Россия

Ившина И.Б. академик РАН, зав. лаб. “ИЭГМ УрО РАН” профессор ПГНИУ, Пермь, Россия

Иноземцев А.А. чл.-корр. РАН, управляющий директор – генеральный конструктор АО “ОДК-Авиадвигатель”, Пермь, Россия

Кристофи Н. PhD, профессор Нэпиер университета, Эдинбург, Великобритания

Кузнецов А.Г. декан мех.-мат. ф-та ПГНИУ, Пермь, Россия

Паньков Н.Н. декан биол. ф-та ПГНИУ, Пермь, Россия

Маккензи Д. профессор Сиднейского университета, Сидней, Австралия

Нечитайло Г.С. д.б.н., с.н.с. ИБХФ РАН, Москва, Россия

Симонетти Д. PhD, доцент Римского университета Сапиенса, Рим, Италия

Стрельников В.Н. д.т.н., директор “ИТХ УрО РАН”, Пермь, Россия

Щёголев С.Ю. д.х.н., зав. лаб. ИБФРМ РАН, профессор СГУ, Саратов, Россия

Старич Эрьявец М. PhD, профессор Люблянского университета, Любляна, Словения

ПРЕДСЕДАТЕЛЬ ПРОГРАММНОГО КОМИТЕТА:

Елькин А.А. к.б.н., н.с. “ИЭГМ УрО РАН”, доцент ПГНИУ,
Пермь, Россия

ЗАМЕСТИТЕЛИ ПРЕДСЕДАТЕЛЯ ПРОГРАММНОГО КОМИТЕТА:

Максимов А.Ю. к.б.н., с.н.с. “ИЭГМ УрО РАН”, доцент ПГНИУ,
Пермь, Россия

Терпугов В.Н. доцент ПГНИУ, Пермь, Россия

Чудинов В.С. директор ООО “Имбиоком”, Пермь, Россия

ЧЛЕНЫ ПРОГРАММНОГО КОМИТЕТА:

Ахова А.В. к.б.н., н.с. “ИЭГМ УрО РАН”, Пермь, Россия

Гришко В.В. к.х.н., зав. лаб. “ИТХ УрО РАН”, Пермь, Россия

Крашенинников А.Б. к.б.н., доцент ПГНИУ, Пермь, Россия

Криворучко А.В. к.б.н., с.н.с. “ИЭГМ УрО РАН”, доцент ПГНИУ,
Пермь, Россия

Куюкина М.С. д.б.н., профессор ПГНИУ, в.н.с. “ИЭГМ УрО
РАН”, Пермь, Россия

Кузнецова М.В. д.м.н., в.н.с. “ИЭГМ УрО РАН”, ПГМУ им. им.ак.
Е.А.Вагнера, Пермь, Россия

Попов Л.А. магистрант ПГНИУ, Пермь, Россия

Русаков С.В. д.ф.-м.н., профессор, зав. каф. ПГНИУ, Пермь,
Россия

Свистков А.Л. д.ф.-м.н., с.н.с., зав. лаб. “ИМСС УрО РАН”,
Пермь, Россия

Синер А.А. к.т.н., зам. начальника отдела внешних
характеристик АО “ОДК-Авиадвигатель”, доцент
ПГНИУ, Пермь, Россия

Смарцалов К.Н. главный специалист службы информационных
технологий, Пермь, Россия

Тюмина Е.А. аспирант ПГНИУ, Пермь, Россия

Ушаков В.Ю. к.б.н., доцент ПГНИУ, Пермь, Россия

Шардаков И.Н. д. ф.-м.н., зав. лаб. “ИМСС УрО РАН”, Пермь,
Россия

Адрес оргкомитета

614990, г. Пермь, ул. Букирева, 15

**ФГБОУ ВО “Пермский государственный национальный исследовательский
университет” оргкомитет II Международной научной конференции
“Высокие технологии, определяющие качество жизни”.**

Председатель программного комитета: Елькин Андрей Анатольевич,

моб. тел.: 8 963 860 6756, факс: +7(342) 280 92 11, e-mail: Andrejelkin1981@gmail.com

ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ

ЭКОЛОГИЯ И ПАТОЛОГИЯ

Черешнев Валерий Александрович^{1,2,3,4},
Черешнева Маргарита Владимировна⁴

¹ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия

²ФГБОУ ВО Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера Минздрава РФ, г. Пермь, Россия

³«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия

⁴ФГБУН Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия

Ключевые слова: демография, мониторинг, природосбережение, народосбережение

Важнейшая роль придается принятию решений в области социальной политики и защите природного наследия. Самый каверзный вопрос заключается в том, как выбрать приоритеты, за что следует браться прежде всего. Главная цель социальной политики – повышение качества жизни каждого гражданина, каждого сообщества и понимание того, что в этом огромную роль играют не только социальные законы, а в первую очередь среда обитания. Разработана система экологического мониторинга – комплексные наблюдения, включающие космический, геофизический, эпидемиологический, социальный, медицинский аспекты, которые позволяют проследить всю цепочку причинно-следственных связей и выявить главные причины, влияющие на здоровье людей. В вопросе охраны здоровья выделяется несколько элементов, но самое главное – профилактическая направленность здравоохранения.

260 лет назад вышла в свет работа Михаила Васильевича Ломоносова «О размножении и сохранении российского народа» [1], в которой он, в частности, писал: «Сила, могущество и величие государства заключаются в сбережении и размножении народа, а не в обширности территории, тщетной без обитателей». То есть без народа никакого государства быть не может. Перелистав страницы этой книг, мы увидим, что Ломоносова интересует не просто количество (а население европейской части России в тот момент составляло около 35

млн. человек), но и «качество» народа: «А сверх того, учением вкорените всем в мысли... что обманщик, грабитель, неправосудный, мздоимец, вор и другими образы ближнего повредитель прощения не сыщется, хотя бы он вместо обыкновенной постной пищи в семь недель ел щепы, кирпич, мочало, глину и уголье и большую бы часть того времени простоял на голове вместо земных поклонов». То есть человек должен быть честным, благородным, думать о своих согражданах и своем государстве.

Известно, что первые 19 лет жизни Ломоносов провел в Холмогорах Архангельской области, потом учился в Москве, Киеве, Петербурге и после этого – 5 лет в Германии. Вернувшись на родину, он стал проповедовать гармонию между интересами власти и народа, пытался донести до императрицы Елизаветы II идею, что государство может стать мощным и прогрессивным только при условии, что народ будет просвещенным. Кроме того, с его точки зрения, в любой научной области нужно добиваться гармонии между фундаментальной теорией и живой практикой. При изучении любого вопроса подход должен быть стандартным. Прежде всего надо изучить историю и динамику исследований по этому вопросу во всем мире, масштабность оценок, соблюдая принципы максимальной всесторонности, многодисциплинарности, интегративности. После этого надо дать прогноз дальнейшего развития и, наконец, все это объединить.

Переходим к социальной политике и экологии. Решения в области социальной политики не будут значить ничего до тех пор, пока приоритетом государства не станет сама социальная политика и защита природного наследия. При этом, как и в любом другом деле, самый каверзный вопрос заключается в том, как выбрать приоритеты, за что следует браться прежде всего, так чтобы дальнейшая деятельность логично выстраивалась шаг за шагом. И, конечно, главная цель социальной политики – повышение качества жизни каждого гражданина, каждого сообщества и понимание того, что в этом огромную роль играют не только социальные законы, а в первую очередь среда обитания, которая может свести на нет все начинания.

В 2000 году мы разработали систему экологического мониторинга [2]. Этим делом занималась большая группа – москвичи, сибиряки, уральцы, петербуржцы. Что такое системный мониторинг? Это комплексные наблюдения, включающие космический, геофизический, эпидемиологический, социальный, медицинский аспекты, которые позволяют проследить всю цепочку причинно-следственных связей и выявить главные причины, влияющие на здоровье людей. Естественно, это важный компонент безопасности и развития страны.

Начинаем с демографического мониторинга. Перепись населения проводится раз в 10 лет, последняя состоялась в 2010 году,

соответственно следующая будет в 2020-м [3]. Согласно переписи, в России проживает почти 143 млн человек, после воссоединения с Крымом добавилось еще около 2 млн, то есть сейчас, по официальным данным, население страны составляет примерно 145 млн человек. Как россияне распределены по нашей обширной территории? В западной части страны плотность населения значительно выше, чем в восточной. Здесь много крупных городов. По данным Росстата, в Петербурге проживают более 5 млн жителей, в Москве – свыше 12 млн. Следующее место после этих двух мегаполисов занимает Московская область – 163 человека на квадратный километр. На юге концентрация населения выше, чем на севере. Например, в Республике Ингушетия – почти 128 человек на квадратный километр, в то время как в Камчатском крае, Магаданской области, Якутии, Ненецком и Чукотском автономных округах плотность населения не превышает одного человека на квадратный километр. Но что произошло с демографическими показателями по сравнению с предшествующими периодами? Только в Петербурге, Москве и Центральном федеральном округе население увеличилось, во всех остальных регионах отмечена убыль. Почему? Люди уезжают из этих мест или там высокая смертность? Возможно, часто встречаются те или иные заболевания? Все это надо расшифровывать и оценивать.

Например, в Свердловской области в конце 1980-х рождаемость составляла 16,4 детей на тысячу человек, смертность – 11,2. А за два года, с 1990-го по 1992-й, рождаемость упала вдвое – до восьми на тысячу, а смертность увеличилась с 11 до 16, по сути цифры поменялись местами, образовав знаменитый «российский крест». Эти показатели почти уравнились только к 2014 году: рождаемость достигла 13,3, смертность снизилась до 13,1. То есть ухудшение произошло лавинообразно, за два года, а на восстановление, по прогнозам, потребуется 30 лет.

Какими причинами обусловлена высокая смертность? [4]. На первом месте – сердечно-сосудистые заболевания (55 %), на втором – травмы (15%) – это данные только по Свердловской области. В регионах с развитой промышленностью, как правило, травмы являются вторым по значимости фактором (11-12 человек на тысячу), в других регионах на втором месте онкологические заболевания (14-16). Дальше (7 %) идут болезни органов пищеварения, органов дыхания, инфекции и т. д.

В каждой стране своя картина, но она очень сильно зависит от экономического развития. Сегодня для оценки социального благополучия в стране не требуется много критериев, как раньше, достаточно одного показателя Всемирной организации здравоохранения – продолжительности жизни. Например, в Канаде, США, странах Европы, в Австралии, Израиле, люди живут в среднем

более 80 лет. В настоящее время самая высокая продолжительность жизни – в Японии и Андорре (85 лет). А как обстоят дела в России? Средняя продолжительность жизни для всего населения – (71,5 года, женщины живут в среднем 77 лет, мужчины – 66).

А до какого возраста теоретически мы можем жить? Наука говорит, что до 100-120 лет. В 1930-х годах академик Александр Александрович Богомолец научно обосновал продолжительность жизни человека. Интересно, что во всех странах без исключения женщины живут дольше мужчин, но чем более развитая страна и выше качество жизни населения, тем меньше разница в продолжительности жизни женщин и мужчин. Сегодня в Скандинавских странах, США и Канаде этот разрыв не превышает двух лет. В России же разрыв гигантский – 11 лет. И, конечно, для этого есть определенные причины. Самая печальная ситуация в Африке – люди живут в среднем до 40 лет. Столько же, сколько жили в России 270-280 лет назад, в Петровскую эпоху. Вот какое значение имеют условия жизни. Интересно, что климат не так важен, как принято думать. Среди стран с долгоживущими гражданами только Австралия и Израиль расположены в теплых климатических поясах, остальные на севере, то есть там люди создают благоприятные условия вопреки природе. Развитие экономики в современном мире оказывается определяющим фактором продолжительности жизни людей.

Две основные цели экологической и социальной политики – народосбережение и природосбережение. Первая включает сбережение как всего народа в стране, так и малых этносов, вторая подразумевает заботу о природе и сохранение заповедников. Заповедники – это образцы, островки природы в ее первозданном виде, они показывают, как жили и развивались бы животные, растения, почвы без воздействия цивилизации. Многообразие и благополучие народов и культур, природные условия – это то, что необходимо сохранять в рамках стратегии народо- и природосбережения. А все законы и другие нормативные документы, которые регламентируют экологические и другие показатели этой стратегии, – по сути ее «шпалы». Надеюсь, вы будете своей деятельностью вносить посильный вклад в реализацию этой политики.

Что мешает народо- и природосбережению? Патогенные факторы [5], которые условно делятся на три вида: **окружающая природная среда** (геомагнитные колебания, атмосферное давление, влажность воздуха, эффективность температур, скорость вращения Земли и т. д.), **антропогенная среда** (загрязнение, акустика, вибрация, радиоактивное излучение, техногенные аварии и т. д.), **социальная среда** (ритмы жизни, ночной шум, неотрегулированные ночные смены, различные события, меняющие общественное мнение, криминальные структуры, войны, революции и пр.).

Что воздействует на нас сильнее – природные или социальные факторы? Вот интересный пример. Летом 1998 года в Москве произошли два важных события [2]. 21 июня налетел очень сильный ураган – такой, что деревья с корнями вырывало из земли, падали светофоры и рекламные щиты, переворачивались машины. Но сначала упало атмосферное давление, и по мере того как оно снижалось, нарастало число вызовов «скорой помощи» по поводу гипертонических кризов. Если в среднем по городу насчитывается около 500 вызовов в день, то в дни самого низкого давления их количество доходило до 900 – увеличение почти в два раза. А через два месяца, 18 августа, случился дефолт и обвальная девальвация, курс рубля упал в несколько раз, и прочие «радости». Интересно, что в тот день по всей стране стояла великолепная солнечная погода. Но количество гипертонических кризов возросло в несколько раз, а инфаркты участились вдесятеро, несмотря на то что средства массовой информации старались сообщать новости максимально корректно и спокойно. Вот что такое социальные причины.

В чем кроются причины многих заболеваний и патологий? Организм человека населен микробами: на коже могут жить сапрофиты, патогенные микроорганизмы (15-16 видов), в верхних дыхательных путях – другие микроорганизмы (30-40 видов), в толстом кишечнике обитает огромное количество микроорганизмов и вирусов (более 2 тыс. бактерий и более 3 тыс. вирусов, причем относительно половины из них сложно сказать, что они вызывают, потому что отсутствует среда для их выращивания). То есть мы изучили космос, знаем о черных дырах, стратосфере, а кишечник человека изучен наполовину, может быть, даже меньше. Бактерии – то, что находится вне клеток, вирусы – внутриклеточные. Между бактериями и вирусами антагонистические отношения. Как только вирусы начинают размножаться, бактерии сразу включают механизм защиты. И поскольку до сегодняшнего дня парадигма лечения бактерий антивирусная, то антибиотики, убивая патогенную микрофлору, убивают и сапрофитную, хорошую флору. Отсюда – дисбактериоз. Антибиотики убивают бактерии, поэтому их становится меньше, а вирусов – больше. Еще И. И. Мечников более ста лет назад призывал найти лекарство, воздействующее на иммунную систему, стимулирующее конкретные клетки против конкретных патогенных микроорганизмов, а не убивать все микроорганизмы, что делают антибиотики. Пока этого сделать не удалось, новых методов терапии не найдено, и поэтому антибиотики будут использоваться еще как минимум 5-10 лет. Недавно был выявлен вирус Эбола, в следующем году тоже будут обнаружены новые вирусные инфекции и вирусные заболевания, потому что антибиотики по-прежнему будут использоваться, следовательно, продолжится мутация вирусов.

Говоря об охране здоровья, мы выделяем несколько элементов, но самое главное – профилактическая направленность здравоохранения [6]. Занимайтесь профилактикой – и не будете болеть. Лучше ежедневно систематически заниматься спортом, соблюдать диету, иметь хороший настрой и т. д. Один из главных лечебных факторов – сон, который нужно выстраивать, ориентируясь на себя. Если человек полноценно отдыхает, стабилизируется долговременная память, нейтрализуются отрицательные эмоции. Людей преклонного возраста часто мучит бессонница, а вслед за ней возникает депрессия. Поэтому хорошо высыпайтесь – и будете здоровы. Оптимальная длительность сна – с 24 до 6 часов утра (6 часов), если вы не «сова», которая работает по ночам. Спать меньше 6 часов – это патология, как правило, человека при таком режиме надолго не хватает. Сон более 9 часов – другая крайность. Как известно, Наполеон во время военных походов спал по 3-4 часа и все успевал.

Факторы, влияющие на здоровье (по данным Всемирной организации здравоохранения):

- образ жизни (50-55 %);
- генетика (15-20 %), как правило, в возрасте до 3-6 лет выявляются генетические нарушения у 90 % детей;
- состояние здравоохранения (10-15 %);
- состояние окружающей среды (20-25 % в городе, а может быть 100 %, если человек живет в парковой зоне, экологически чистом районе, у него есть личный врач и пр.).

Запомните это соотношение и сделайте свою жизнь наполненной на сто процентов.

Библиографический список

1. Ломоносов М.В. О сохранении русского народа / сост. и отв.ред. О.А. Платонов. М.: Институт русской цивилизации, 2011. 848с
2. Агаджанян Н.А., Александров С.И, Аптикаева О.И., Гаврилова Т.В., Гамбурцев А.Г., ...Черешнев В.А., Юдахин Ф.Н. Экология человека в изменяющемся мире / под общей ред. акад. РАН и РАМН В.А.Черешнева. Изд. 2-е, доп. Екатеринбург: УрО РАН, 2008. 570с. (Коллектив авторов).
3. Доклад о человеческом развитии в Российской Федерации 2013. Устойчивое развитие: вызовы Рио / под общей ред. С.Н. Бобылева. М.: ООО «РА ИЛЬФ». 2013. 202с.
4. Зайцева Н.В., Шур П.З., Май И.В., Кириянов Д.А. Методические подходы к оценке интегрального риска здоровью населения на основе эволюционных математических моделей // Здоровье населения и среда обитания. 2011. №10. с.6-9.
5. Зайцева Н.В., Ланин Д.В., Черешнев В.А. Иммунная и нейроэндокринная регуляция в условиях воздействия химических

факторов различного генеза. // Пермь: Издательство Перм.нац.исслед.политехн.ун-та. 2016. 236с.

6. Черешнев В.А., Гамбурцев А.Г. Экология, мониторинг и здоровье людей // Вестник Российской академии наук, 2017. Т. 87, № 2. С. 121-129. Резюме на рус, рис. Библ. 16.

О БИОРАЗНООБРАЗИИ ПРОКАРИОТ И ОСОБЕННОСТЯХ ЕГО ТАКСОНОМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Щеголев Сергей Юрьевич^{1,2}

¹ФГБУН Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, г. Саратов, Россия

²ФГБОУ ВПО Саратовский государственный национальный исследовательский университет им. Н.Г. Чернышевского, г. Саратов, Россия

Ключевые слова: биоразнообразие, прокариоты, филогенетические маркеры, геносистематика

В данном сообщении кратко отражено видение автора картин биоразнообразия прокариот с учетом современных литературных данных и опыта работы сотрудников ИБФРМ РАН в области геносистематики ризосферной микрофлоры.

По литературным источникам. Развитие методов и средств биоинформатики в последние два десятилетия создает уникальные предпосылки для ускоренного прогресса в фундаментальных и прикладных биомедицинских, экологических и разнообразных биотехнологических исследованиях. В том числе, нацеленных на сбор и изучение метаданных о составе и разнообразии микрофлоры планеты, ее конкретных географических зон и регионов. Сведения о совокупностях микроорганизмов как сообществ, населяющих определенные экологические ниши, такие как почва, воздух, водная среда, организмы животных и т.д. (называемых микробиомами), чрезвычайно важны для понимания эволюционных процессов и механизмов сложных взаимодействий с участием микроорганизмов, оптимального выбора объектов для их изучения и практического использования в интересах медицины, экологии, сельского хозяйства, энергетики, промышленности и др.

Современный этап развития биоинформатических ресурсов [1] актуализирует развитие подходов к рациональному использованию генетических сведений с учетом специфики обращения с ними как с объектами, относящимися к категории «больших данных» [2]. Согласно работе [1], суммарный объем общественно доступных баз данных по нуклеиновым кислотам по состоянию на 2014 год оценивался в $6 \cdot 10^{11}$ пар оснований (п.о.), что соответствует примерно 200 полным геномам человека (около $3 \cdot 10^9$ п.о. на один геном). Однако оценка общего числа п.о. на Земле (в глобальном биоразнообразии) составляет $5 \cdot 10^{37}$ [3]. Иными словами, верхний предел биоинформатических ресурсов данного типа (при их экспоненциальном росте [1]) эквивалентен на сегодняшний день сумме полных геномов порядка 10^{28} особей вида *Homo sapiens*.

Что касается численности прокариот (бактерий и архей), количество клеток, к примеру, в Мировом океане оценивается [4, 5] величинами $3.1 \cdot 10^{28}$ (бактерии), $1.3 \cdot 10^{28}$ (археи), при том что аналогичная оценка для вирусных частиц составляет $1 \cdot 10^{30}$. Бактериальное разнообразие, определяемое числом филумов (типов) бактерий в сообществе, характеризуется примерными значениями: 160 в одном миллилитре океанской воды, 6400-38000 в одном грамме почвы и 70 в одном миллилитре сточных вод [5].

Среди довольно большого числа работ последних лет по рассматриваемой теме, по нашему мнению, как наиболее значимые можно выделить публикации [6-9]. В статье [6] демонстрируется преобладающий вклад прокариот в земное биоразнообразие с существенной ролью их некультивируемых представителей. Авторами использованы полногеномные данные, в том числе восстановленные из метагеномных исследований, с наборами по 16 белков рибосомы в качестве филогенетических маркеров. В работе [7], вышедшей годом позже, сведения о биоразнообразии прокариот существенно расширены в сторону некультивируемых представителей бактерий и архей. При этом в качестве филогенетических маркеров использованы дополнительные наборы белков рибосомы и наборы специальным образом подобранных белков. Разработанный подход охарактеризован авторами как «рациональный путь к исследованию микробной темной материи».

Центральное место в этом списке занимает публикация [8], представляющая собой резюме полученных на сегодняшний день результатов изучения микробного разнообразия в рамках проекта Микробиома Земли [10], объединяющего участников консорциума из 161 организации 27 стран. В качестве маркеров были введены в рассмотрение так называемые «точные последовательности» – фрагменты ДНК гена 16S рРНК.

Наконец, в мае текущего года вышла в свет работа [9], представляющая большой методологический интерес. В ней представлен обзор и выполнена систематизация методов филогенетического анализа микробиомных данных, приведены обучающие материалы.

Работоспособность консорциума Микробиома Земли [8, 10] обеспечена применением координированных протоколов и новых аналитических методов. В работе [8] отражены данные, собранные с 2010 г. краудсорсингом, содержащие около 2 миллиардов генетических последовательностей. Таковыми определены фрагменты гена 16S рРНК из его гипервариабельной области. Были рекомендованы праймеры, обеспечивающие получение соответствующих ампликонов ДНК и являющиеся универсальными для бактерий и архей.

Существенную новизну результатов проекта демонстрирует сопоставление полученного набора ярлыковых последовательностей с существующими референтными базами данных по 16S рРНК Greengenes и SILVA: более 50% выявляемого по ним микробного разнообразия в этих базах данных не представлено. Продемонстрировано влияние среды как фундаментального фактора, разделяющего микробные сообщества.

Среди разнообразных результатов проекта [8] обращает на себя внимание значительное увеличение масштабов оценок альфа- и бета-разнообразия по сравнению с любыми индивидуальными исследованиями. Представляет интерес также демонстрация того, что при использовании полноразмерных последовательностей 16S рРНК специфичность среды наилучшим образом фиксируется при их попарной идентичности ниже 97%, т.е. для таксонов достаточно высокого надвидового уровня. Это значение определяет так называемый «золотой стандарт» для разделения видов, широко применяемый в таксономических исследованиях прокариот [11].

Одним из значимых итогов проекта [8, 10] на сегодняшний день является разработанная эталонная база данных с максимально широким контекстом для результатов секвенса ДНК гена 16S рРНК и рабочая среда для инкорпорирования результатов будущих исследований. Эффективному использованию этих ресурсов способствует созданный каталог коллекционных карточек с весьма дружественным для пользователя и информативным интерфейсом.

Большое значение с точки зрения темы данного сообщения имеет недавно вышедшая работа методологического характера [9]. В ней дан обзор систематизированных авторами филогенетически ориентированных методов анализа микробиомных данных. Таких как: а) филогенетические сравнительные методы; б) методы реконструкции наследственного состояния и потомственного наследования признаков и в) методы определения филогенетических переменных и расстояний.

Эти методы широко используются в исследованиях по зоологии, антропологии, экологии и т.п. Однако авторами [9] констатируется их недостаточно активное применение в микробиомных исследованиях и обращен призыв к микробиологам к их освоению и использованию.

Среди общих методических трудностей особо отмечается горизонтальный перенос генов (ГПГ), влияние которого на результаты таксономического анализа прокариот, по мнению авторов [9], исследовано недостаточно. В учебных материалах к этой статье дается пример его оценок, демонстрируются возможности реализации рассматриваемых методов с помощью программ из свободно распространяемого пакета R статистического анализа данных.

Обнаружение ГПГ и выяснение его значения для эволюции и существования прокариот отмечается в работе [12] как одно из главных достижений в сравнительной геномике. Это приводит, в том числе, к необходимости существенных уточнений филогенетических конструкций. В общем случае для прокариот должно рассматриваться сочетание их древовидной (вертикальное наследование) и сетевой (горизонтальное наследование) составляющих, обусловленное эффектами ГПГ [12]. Однако подавляющее большинство тестов, используемых в систематике прокариот, манипулирует маркерами из базовой части пангенома (древовидная филогения), и унифицированной системы учета влияния ГПГ пока не прослеживается.

По результатам собственных исследований. Во второй части данного сообщения рассматривается ряд проблем геносистематики прокариот, с которыми приходится сталкиваться в повседневной лабораторной практике при работе с изолятами. Используются постоянно обновляемые биоинформатические ресурсы для бактерий рода *Azospirillum*, содержащие, в том числе, сведения о результатах полногеномного секвенирования их ДНК. Данные микроорганизмы являются признанной моделью в фундаментальных и прикладных исследованиях растительно-микробной ассоциативности [13] и составляют основу оригинальной части Коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН.

Обсуждение этих проблем можно найти в наших публикациях [14-16]. В работе [14] демонстрируется неоднозначность видовой идентификации изолятов вследствие высокой консервативности генов 16S рРНК и отмечено также то, что в условиях, когда в геносистематике прокариот преобладают маркеры из базовой части пангенома, объективный учет вклада в видообразование ГПГ возможен на основе полифазного подхода [17]. В нем используют сочетание молекулярно-генетических данных с физиолого-биохимическими, хемотаксономическими, культуральными, экологическими и т.п. фенотипическими характеристиками изолятов.

В статье [15] приведен обзор проблем систематики прокариот, отраженных в принципиальных публикациях последних лет в области сравнительной геномики и биоинформатики. На примере бактерий рода *Azospirillum* в ней продемонстрированы результаты таксономического применения набора филогенетических тестов на основе полногеномных данных, рекомендованного в работе [18] в рамках развиваемой авторами геномной таксономии микробов. На примере с бактериями рода *Ochrobactrum* в публикации [16] продемонстрирована условность оценок систематического положения изолятов с полногеномными данными при отсутствии единой генетической системы их видовой идентификации.

Особой информативностью среди имеющихся тестов отличаются те, в которых на достаточно представительном с точки зрения статистики материале разработаны количественные критерии отнесения объектов к тем или иным таксономическим рангам (видам, родам, семействам и т.д.). В этом случае филогенетическую конструкцию существенно дополняет матрица попарных сравнений, позволяющая судить на количественном уровне о степени таксономической близости (родства) тех или иных операционных таксономических единиц в пределах исследуемых групп. К их числу относятся: 16S рPHK, средняя нуклеотидная идентичность (ANI [19]), средняя аминокислотная идентичность (AAI [19]), компьютерная (*in silico*) гибридизация ДНК-ДНК (GGDC [20]) и сигнатуры Карлина [21] (различия между геномами в относительном избытке динуклеотидов).

Далее, в дополнение к результатам работ [14-16], мы рассматриваем применение тестов, основанных на результатах полногеномного секвенирования ДНК *Azospirillum*, собранных в базе данных NCBI [22], в хронологическом развитии содержимого этой части базы данных. В работе [15] приведены примеры сочетания филогенетических построений с матрицами попарных сравнений в перечисленных выше тестах для 17 (по состоянию на 21.08.2017 г.) геномов азоспирилл. Они продемонстрировали, среди прочего, соответствие результатов тестов 16S рPHK ↔ ANI ↔ GGDC-f2 (базовая часть пангенома) и AAI ↔ GGDC-f1 (геном в целом), но недостаточную разрешающую способность на межвидовом уровне теста с использованием сигнатур Карлина.

За прошедший с того времени год произошло несколько обновлений этой базы данных с ее пополнением результатами для объектов, отнесенных их авторами к роду *Azospirillum*. По состоянию на 08.12.2017 г. таковых оказалось семь, и они представлены в таблице 1.

Однако анализ с тестами 16S рPHK, ANI и AAI показал, что только один из них, выделенный сотрудниками ИНМИ РАН из болота

в Тверской области (строка 1, табл. 1), может быть причислен к роду *Azospirillum*. Остальные шесть продемонстрировали межродовые и даже более низкие значения попарной идентичности в указанных выше тестах. Два из них (строки 2, 3, табл. 1), представляющие водный микробиом, были выделены из ряски и оказались близкими таксономически к роду *Niveispirillum*, отделенному в свое время от *Azospirillum* в самостоятельный род. Особенно неожиданным кажется причисление к роду азоспирилл авторами геномов оставшихся четырех объектов (строки 4-7, табл. 1), представляющих метагеном кишечника человека.

Таблица 1

Характеристики объектов из базы данных NCBI результатов полногеномного секвенирования ДНК [22]

No	Organism Name	Strain	Isolation	Release Date
1.	<i>Azospirillum</i> sp.	B2	Russia, Tver region, from raised bog (выпуклое болото)	2017-10-17
2.	<i>Azospirillum</i> sp.	RU37A	Aquatic microbiome for duckweeds (ряска)	2017-07-13
3.	<i>Azospirillum</i> sp.	RU38E	Aquatic microbiome for duckweeds (ряска)	2017-07-13
4.	<i>Azospirillum</i> sp.	CAG:260	From human gut (кишечник) metagenome	2013-05-31
5.	<i>Azospirillum</i> sp.	CAG:239	From human gut (кишечник) metagenome	2013-05-31
6.	<i>Azospirillum</i> sp.	47_25	From human gut (кишечник) metagenome	2016-12-23
7.	<i>Azospirillum</i> sp.	51_20	From human gut (кишечник) metagenome	2016-12-23

В тестах ANI и AAI штамм *Azospirillum* sp. B2 (строка 1, табл. 1) оказался в монофилетической группе со штаммами *Azospirillum* sp. B510, *Azospirillum* sp. B506 и *A. oryzae* A2P, охарактеризованными их авторами как эндофиты и как растительный ассоциант, с межвидовыми значениями ANI (80-95%) и AAI (60-90%). Штаммы из ряски (строки 2,

3, табл. 1) оказались таксономически близкими представителю рода *Niveispirillum*, выделенному из корней и ризосферы риса. Вместе с остальными четырьмя объектами из метабенома кишечника человека (строки 4-7, табл. 1) эти штаммы образуют монофилетическую группу со значениями ANI < 80% и AAI < 60% – за пределами рода *Azospirillum*.

Для представителей животного метабенома (строки 4-7, табл. 1) были получены нулевые значения ANI с остальными штаммами, что свидетельствует об отсутствии в этих геномах генов, ортологических генам остальных исследованных штаммов. Топология филограммы объектов в тесте с AAI полностью соответствовала таковой в тесте с ANI. Однако алгоритм теста AAI не предусматривает фильтрацию в протеоме сегментов, привнесенных в результате ГПГ. Вполне вероятно, что ГПГ может приводить к определенной унификации протеомов, как определяющий фактор при диверсификации белковых семейств [23]. В данном случае это проявилось в ненулевых значениях AAI для объектов из кишечного метабенома человека по отношению к остальным штаммам родов *Azospirillum* и *Niveispirillum* в пределах 41-43, соответствующих уровню, ниже внутриродового (и внутривидового) диапазона AAI > 60%.

По этой же причине, по-видимому, ряд штаммов *A. brasilense*, выходящих за пределы вида по критерию ANI < 95%, оказался объединенным с остальными штаммами внутри этого вида по значениям AAI > 90%. Это иллюстрирует зависимость оценок систематического положения объектов от типа используемых полногеномных данных [15, 16], оперирующих с последовательностями из базовой (ANI) или базовой и подвижной (AAI) частей пангенома.

Следующее пополнение базы данных [22] с результатами полногеномного секвенирования ДНК объектов, приписываемых авторами геномов к роду *Azospirillum*, зафиксированное нами 13.04.2018 г. (всего стало 25 геномов), не внесло существенных изменений в описанные выше наблюдения. Поэтому мы переходим к финальному на сегодняшний день набору полных геномов азоспирилл в количестве 45 от 30.07.2018 г. Часть полученных данных характеризует рис. 1, на котором представлена кластеризация геномов по результатам теста ANI с помощью метода анализа главных координат (PCoA).

Из трех выявленных кластеров (монофилетических групп на филограмме, здесь не показанной) кластеры 1 и 3 соответствуют внутриродовому уровню ANI 80-100%. При этом остальные геномы сосредоточены в кластере 2 с межродовыми значениями ANI < 80%. Три генома из этого кластера были собраны специалистами из Калифорнийского университета в Беркли по метабеномным данным с внутренних поверхностей помещения и из сточных вод отделения

реанимации и интенсивной терапии новорожденных в одной из клиник. На этот раз мы сталкиваемся с тем, что по неизвестной пока причине (поскольку, как и в случае с метагеномом из кишечника, расширенные описания отсутствуют) авторы этих геномов причислили данные объекты не только к роду, но и к конкретному виду *A. brasiliense* (S2_012_000_R2_79, S2_006_000_R2_60 и S2_003_000_R2_10). В итоге из 45 геномов для объектов, причисляемых их авторами к роду *Azospirillum*, 13 не соответствуют данному роду, поскольку имеют значения ANI < 80%.

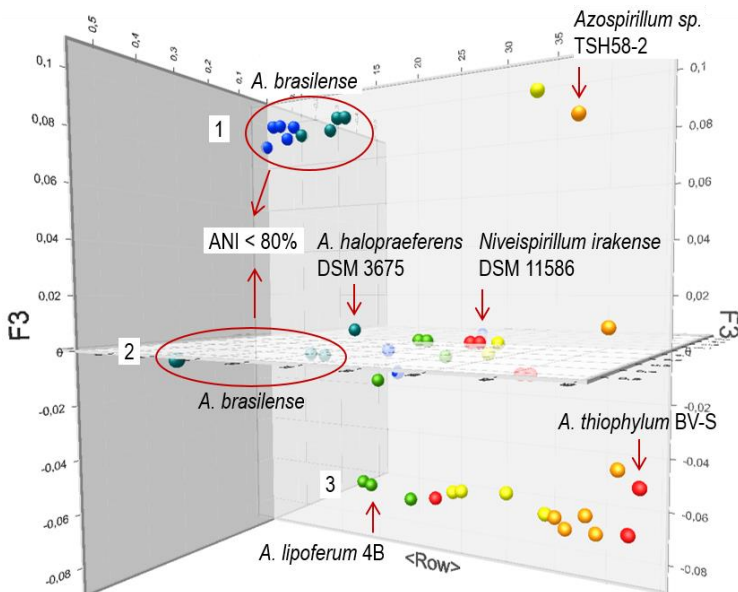


Рис. 1. Кластеризация геномов *Azospirillum* методом PCoA по результатам применения теста ANI к их набору от 30.07.2018 г.

Таким образом, к списку проблем геносистематики прокариот, приведенных на схеме в работе [16], следует, вероятно, прибавить «человеческий фактор». При этом разумным компромиссом остается полифазный подход [17] с сочетанием традиционных молекулярно-генетических тестов и соответствующих наборов фенотипических признаков исследуемых штаммов (по крайней мере, для культивируемых объектов).

Библиографический список

1. Lesk A.M. Introduction to bioinformatics. 4th ed. Oxford: Oxford Univ. Press, 2014. 400 p.
2. Щеголев С.Ю. Разработка и визуализация больших массивов

данных в таксономических и эволюционных исследованиях живой природы // Изв. Сарат. ун-та. Новая сер. Сер. Физика. 2016. Т. 16, вып. 3. С. 145-167.

3. Global biodiversity. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Global_biodiversity (Дата обращения: 25.08.2018).

4. Suttle C.A. Marine viruses – major players in the global ecosystem // Nature Rev. Microbiol. 2007. Vol. 5, No. 10. P. 801-812.

5. Curtis T.P., Sloan W.T., Scannell J.W. Estimating prokaryotic diversity and its limits // PNAS. 2002. Vol. 99, No. 16. P. 10494-10499.

6. Hug L.A. *et al.* A new view of the tree of life // Nat. Microbiol. 2016. Vol. 1. Art. number: 16048. P. 1-6.

7. Parks D.H. *et al.* Recovery of nearly 8,000 metagenome-assembled genomes substantially expands the tree of life // Nat. Microbiol. 2017. Vol. 2. P. 1533-1542.

8. Thompson L.R. *et al.* A communal catalogue reveals Earth's multiscale microbial diversity // Nature. 2017. Vol. 551. P. 457-463.

9. Washburne A.D. *et al.* Methods for phylogenetic analysis of microbiome data // Nat. Microbiol. 2018. Vol. 3. P. 652-661.

10. Earth Microbiome Project. URL: <http://www.earthmicrobiome.org> (Дата обращения: 25.08.2018).

11. Tindall B.J. *et al.* Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010. Vol. 60. P. 249-266.

12. Кунин Е.В. Логика случая. О природе и происхождении биологической эволюции. М.: ЗАО Изд-во Центрполиграф, 2014. 527 с.

13. Pereg L., de-Bashan L.E., Bashan Y. Assessment of affinity and specificity of *Azospirillum* for plants // Plant Soil. 2016. Vol. 399, No. 1. P. 389-414.

14. Бурыгин Г.Л. и др. Бактериальный изолят из ризосферы картофеля (*Solanum tuberosum* L.), идентифицированный как *Ochrobactrum lupini* IPA7.2 // Сельхоз. биол. 2017. Т. 52, № 1. С. 105-115.

15. Щеголев С.Ю. О систематике прокариот: актуальные проблемы и пути выхода из кризиса // Вестн. биотехнол. физ.-хим. биол. 2018. Т. 14, № 1. С. 5-14.

16. Щеголев С.Ю., Бурыгин Г.Л. Опыт применения современных подходов к геносистематике прокариот в таксономических исследованиях ризосферной микрофлоры // Биомика. 2018. Т. 10, № 2. С. 157-161.

17. Oren A., Garrity G.M. Then and now: a systematic review of the systematics of prokaryotes in the last 80 years // Antonie van Leeuwenhoek. 2014. Vol. 106. P. 43-56.

18. Thompson C.C. *et al.* Microbial genomic taxonomy // BMC Genomics. 2013. Vol. 14. P. 1-8.

19. Goris *et al.* DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2007. Vol. 57. P. 81-91.

20. Mukherjee *et al.* 1,003 reference genomes of bacterial and archaeal isolates expand coverage of the tree of life // Nat. Biotechnol. 2017. Vol. 35. P. 676-683.

21. Campbell A., Mrázek J., Karlin S. Genome signature comparisons among prokaryote, plasmid, and mitochondrial DNA // PNAS. 1999. Vol. 96. P. 9184-9189.

22. U.S. National Library of Medicine. NCBI. Genome Information by Organism. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/#!/prokaryotes/azospirillum> (Дата обращения: 30.07.2018).

23. Treangen T.J., Rocha E.P.C. Horizontal transfer, not duplication, drives the expansion of protein families in prokaryotes // PLoS Genetics. 2011. Vol. 7, No. 1 e1001284. P. 1-12.

MICROBIAL BIOFILMS: STRUCTURE AND FUNCTIONAL FEATURES, APPLICATION IN BIOCATALYTIC PROCESSES AND INDUSTRIAL WASTE DISPOSAL PROCESSES

Giovanna Simonetti, Kolesova Olga Vladislavovna

Department of Public Health and Infectious Diseases "Sapienza" University of Rome, P.le Aldo Moro 5, 00185 Rome, Italy

Keywords: biofilm, fungi, pathogen

Biofilm is a widespread in nature form of existence of microorganisms, which is a set of cells of one or different species, located on any surface, immersed in the extracellular polymer substance-matrix. The development of biofilm, and sometimes the biofilm itself is also called a biofouling. A good model of such form are biofilms of *Candida albicans*.

Candida albicans is a part of the normal microbiota of humans, in the oral cavity, gastrointestinal tract and female's genital tract. However, it is also an opportunistic pathogen. *C. albicans* infections range from superficial mucosal and dermal infections to disseminated bloodstream infections with mortality rates above 40% (Calderone and Fonzi, 2001; Uppuluri *et al.*, 2017). The medical impact of *C. albicans* typically depends on its ability to form biofilm, which are closely packed communities of cells that attach to surfaces, such as tissues and implanted medical devices. These adherent cells are frequently embedded in a polymeric extracellular matrix. *C. albicans*

biofilm presents a significant clinical problem, with current treatment options severely limited by the intrinsic tolerance of fungal biofilm for anti-fungal agents (Nett, 2014). Few molecules are reported in literature to inhibit or prevent *C. albicans* biofilm formation; consequently, the development of new anti-biofilm agents is urgently needed.

The use of plant molecules against multiple drug resistant strains of *C. albicans*, as well as biofilm formation and growth may be an effective strategy (Guo et al., 2009; De Vita et al., 2014).

In 2008, thirty plant essential oils were tested for their activity against *C. albicans* biofilms and four of them such as eucalyptus, peppermint, ginger grass and clove showed 80.87 %, 74.16 %, 40.46 % and 28.57 % biofilm reduction, respectively (Agarwal et al., 2008). Polyphenols, extracted from green tea, also proved to be active against *C. albicans* biofilm. Epigallocatechin-3-gallate, the most abundant polyphenol in green tea extract, reduced *C. albicans* biofilm formation (Evensen and Braun, 2009).

To fight biofilm, high doses and frequent administrations of antimicrobial drugs are required, causing adverse side effects or in some cases toxicity. The use of nanoformulations could help overcome such problems and increase drug efficacy (Chronopoulou et al. 2016). Ag nanoparticles (NPs) have proved to be effective, as they showed antimicrobial efficacy against bacteria, viruses and other eukaryotic microorganisms (Agrawal et al., 2018). However, toxicity from Ag NPs has been observed. Moreover, their small size and variable properties most probably make them hazardous to the environment (Rai et al., 2009).

In addition to fundamental and clinical significance, biofilms have prospects for application in biotechnological processes (Demakov et al., 2008). In the attached biofouling state, microorganisms can colonize the surfaces of various carriers in the form of fibers, granules, planes, monolithic or granular materials with an internal porous structure placed in flow reactors. Biofilm reactors can be operated for months (Halan et al., 2011; Maksimova, 2013).

Such technologies have already been developed to produce various alcohols (ethanol, butanol, 1,3-butanedione) and organic acids (acetic, lactic, fumaric, etc.). Similar methods give excellent results in the technologies of biocatalytic synthesis of acrylamide and other monomers for polymer chemistry, as well as for solving environmental problems - biodegradation of man-made organic waste (Maksimova et al., 2015). In particular, it is perspective to use of the ability of microbial communities to the control of bio-fouling for the colonization of solid wood waste and increase recycling (Xiros, Studer 2017).

The research was carried out with the financial support of the project MIG, the Ministry of education and science of the Perm region, agreement No.C-26/796 from 21.12.2017.

AN EXPERT EVALUATORS GUIDE TO WRITING A SUCCESSFUL FUNDING PROPOSAL

Colin J. Cunningham

Expert Evaluator for EU Horizon 2020 Programme, Edinburgh, UK

Keywords: funding, proposal writing, collaboration

Writing a successful funding proposal for a scientific/technical or innovation project is a challenge for both new and experienced researchers from universities/research institutes and also for companies. The scale and complexity of some funding programmes can be overwhelming. For example, the European Union (EU) Horizon 2020 programme is the largest Research and Innovation programme that the EU has ever had. Around €80 billion of funding is available over a 7 year period between 2014 and 2020.

Many funding programmes rely on external experts to perform evaluation of proposals; national scientific funding programmes often rely on the process of peer-review. Dr Cunningham has assisted in the development of funding proposals and creation of project consortia for a UK bioremediation research programme. He has also served as an expert evaluator for the EU Horizon 2020 Programme.

This presentation examines the preparation of funding proposals from the perspective of the expert evaluator. Advice is given on putting together a strong team and presenting a successful funding proposal.

ГЕНОТИПЫ/ПОДГЕНОТИПЫ/ПОДТИПЫ И МУТАЦИИ В ГЕНОМЕ ВИЧ, ВГВ и ВГС

Еремин Владимир Федорович

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий», г. Минск, Республика Беларусь

По современной классификации выделяют 9 подтипов (выделяются также подподтипы) и более 70 рекомбинантных форм ВИЧ, 7 (1-7) генотипов и большое количество подгенотипов вируса гепатита С и 10 (А-Ј) генотипов и большое количество подгенотипов вируса гепатита В. Генотипы/подгенотипы/подтипы вирусов с разной

частотой встречаются в разных странах и на разных континентах. В связи с миграцией населения эти варианты вирусов «перемещаются» по всему миру, приводя к появлению новых рекомбинантных форм, вирусов с новыми биологическими и антигенными свойствами. В настоящее время для лечения пациентов с ВИЧ-инфекцией, гепатитами В и С используется большое количество препаратов разных классов, позволяющих получать, прежде всего у пациентов с гепатитами В и С, стойкий вирусологический ответ и полное излечение. К сожалению, у пациентов с ВИЧ-инфекцией применяемые схемы лечения дают возможность значительно улучшить жизненный статус, но не приводят к полному излечению последних. Для успешного лечения пациентов с ВИЧ-инфекцией, гепатитами В и С необходим постоянный мониторинг в процессе приема препаратов с измерением уровня вирусной нагрузки и, при необходимости, определение мутаций резистентности и, соответственно, своевременной смены терапевтических схем.

Материалом исследований служили 738 образцов сыворотки/плазмы крови, полученные от пациентов с хронической формой вирусного гепатита В из разных регионов страны. Положительны в ПЦР образцы были секвенированы по участкам генов S(preS1/S2) и Р. 1064 образца сыворотки/плазмы крови, полученные из разных регионов стран от пациентов с ВИЧ-инфекцией. Все образцы были исследованы методом ИФА и подтверждены с иммунным блотинге на наличие ВИЧ-инфекции. Во всех образцах была определена вирусная нагрузка. Из 1064 проб в 963 случаях удалось выделить РНК и провести этапы ОТ-ПЦР, ПЦР, секвенирующей ПЦР и получить нуклеотидные последовательности ВИЧ-1 по участку генов gag-pol. 890 положительных на ВГС в ИФА и ОТ-ПЦР образцов плазмы крови были секвенированы по участку генов core/E1. Выделение вирусной РНК/ДНК из образцов сыворотки/плазмы крови выполняли с использованием «Комплекта реагентов для выделения НК», производства ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск, Россия и «Комплекта реагентов для выделения ДНК из клинического материала» «РИБО-сорб», «РНК-преп», производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия. Все манипуляции проводили согласно инструкциям, прилагаемым к наборам. Вирусную нагрузку определяли с использованием тест-систем «АмплиСенс® HBV-Монитор-FL», «ИнтерЛабСервис», г. Москва и «РеалБест ДНК ВГВ (количественный)», производства ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск. Электрофореграммы исследуемых образцов были получены на генетическом анализаторе ABI PRISM® 3100-Avant™ Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Анализ электрофореграмм и сборка последовательностей фрагментов ДНК осуществлялись с помощью программного обеспечения Sequencing Analysis Software™ (Applied Biosystems®) и Geneious® v8 (Biomatters Ltd.). Множественное

выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с помощью алгоритма ClustalW. Поиск генетически близких референсных сиквентов ВГВ осуществлялся с помощью программы BLAST. Филогенетические деревья строились с применением алгоритма ML (maximum likelihood) в программах PHYL (Phylogenetic maximum likelihood) и GARLI (Genetic Algorithm for Rapid Likelihood Inference), с моделью замены нуклеотидов GTR+I+G (I – proportion of invariable sites, G – Gamma shape parameter). Оптимизация топологии дерева – Best of NNIs and SPRs. Для расчета статистической достоверности кластеров использовался тест SH-aLRT. Достоверными считались кластеры филогенетического дерева, корневая ветвь которых имела значение $\geq 0,9$. Определение генотипов/подгенотипов и рекомбинантных форм ВГВ осуществлялось методом филогенетического анализа с использованием референсных сиквентов для генотипирования ВГВ взятых из GeneBank, а также с помощью программ для автоматического генотипирования: jpHMM (jumping profile Hidden Markov Model), REGA ВГВ Subtyping Tool, geno2pheno, HBV/Grade.

Из 1064 образцов, исследованных на маркеры ВИЧ и взятых в работу, 546 (51,3%) были от лиц мужского пола, 414 (38,9%) – от женщин. 104 пробы плазмы были получены от детей в возрасте от 0 до 14 лет рожденных ВИЧ-инфицированными матерями, из них 55 (52,9%) были мальчики и 49 (47%) – девочки. В 906 (94%) случаях определялся подподтип А6, в 25 (2,7 %) – В, 4 (0,5 %) – С, 3 (0,3 %) – G, в 13 (1,3 %) случаях выявлена рекомбинантная форма CRF03_AB, в 8 (0,8 %) – CRF02_AG, в 2 (0,2 %) – CRF06_crx, и по одному (0,1 %) случаю CRF01_AE/В и URF. Проведенный филогенетический анализ позволил установить степень родства между вариантами ВИЧ, выявленными в Республике Беларусь и вирусом, циркулирующим в странах СНГ и дальнего зарубежья. Например, нами было установлено, рекомбинантная форма ВИЧ CRF03_AB образовывала несколько кластеров с образцами из Литвы и России, а 4 образца формировали самостоятельные кластеры, что указывает на «местное» происхождение вируса. Рекомбинантная форма CRF02_AG формировала несколько кластеров с образцами из Узбекистана, России, США и Камеруна, что указывает на неоднократные заносы данного варианта ВИЧ на территорию страны. Рекомбинантная форма CRF06_crx выявленная у брата и сестры-наркопотребителей формировала кластер с образцами из Эстонии и России. Впервые в 2018 году нами выявлена рекомбинантная форма CRF01_AE_В, формирующая кластер с образцами из Китайской Народной Республики. Как было сказано выше, более 94% всех случаев ВИЧ-инфицирования в Республике Беларусь связано с подтипом А6 (бывший А1_{FSU}).

Чаще всего у пациентов, находящихся на ВААРТ определялись мутации M184V/I, определяющая высокий уровень резистентности к ламивудину, эмтрицитабину, но в тоже время, данная мутация не вела существенной смене схем терапии, поскольку ламивудин и эмтрицитабин усиливали чувствительность к азидотимидину, тенофовиру и ставудину при наличии данной мутации. Мутации G190S, K103N и Y180L вели к высокому уровню резистентности ВИЧ к нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы невирапину, эфавиренцу, этравирину и рилпивирину.

Из 890 секвенированных по участку генов *core/E1* образцов положительных на ВГС, Проведенные исследования показали, что в Республике Беларусь доминирует генотип 1 (595 - 66,9%) ВГС представленный 1a (5,7%, n=51) и 1b (60,1%, n=542) подгенотипами, 3a генотип 3a (247 - 27,8%), 2 (29-3,3%), 4 (6 - 0,7%) - 4a (1 - 0,1%) и 4d (5-0,4%), 2 генотип включал 2a (1,9%), 2c (0,8%) и 2k (0,5%) подгенотипы циркулируют на территории страны. Впервые были описаны рекомбинантные формы 2k/1b (1,5%) и 1d/1b (0,1%). 1b (60,1%), подгенотип доминировал во всех группах пациентов за исключением IDUs. Среди IDUs 1b (40,5%) оставался доминирующим, но при этом увеличивался вклад 3a (37,2%) и 1a (17,4%) подгенотипов. С 2016 года в Республике Беларусь стали активно использовать препараты прямого действия для лечения пациентов с хронической формой вирусного гепатита С. Препараты действуют на специфические белки, ферменты вируса: ингибиторы протеазы ВГС – наименования препаратов оканчиваются на «-превир» – включают препараты, разрабатываемые разными фармкомпаниями: боцепревир, телапревир, симепревир, асунапревир, данопревир, фалдапревир, соапревир, АВТ-450 и МК-5172 и т.д., ингибиторы полимеразы ВГС – наименования препаратов оканчиваются на «-бувир» – включают аналоги нуклеозидов/нуклеотидов, такие как софосбувир, мерицитабин и ALS-2200 (VX-135), а также нуклеозидные препараты, такие как делеобувир, сетробувир, АВТ-072, АВТ-333, BMS-791325 и VX-222, ингибиторы NS5A – наименования препаратов оканчиваются на «-асвир» – включают даклатасвир, ледипасвир и АВТ-267. Как показали наши исследования, у пациентов, находящихся на терапии препаратами прямого действия вырабатывается резистентность. Чаще определялись мутации 31M и 31V, 93H, ведущие к резистентности вируса к эльбасвиру, даклатасвиру, ледипасвиру, обитасвиру, вельтапасвиру – ингибиторам белка NS5A, а также 174F и 156G, определяющих устойчивость вируса к боцепривиру и семипревиру, соответственно.

Из 738 образцов сыворотки/плазмы крови, положительных по вирусному гепатиту В, 516 (69,8%) были получены от пациентов из Минска и Минской области, 86 (11,7%) – из Витебской, 71 (9,6%) – из Гомельской, 33 (4,5%) – из Могилевской, 24 (3,3%) – Брестской и 8

(1,1%) – из Гродненской областей. 404 (54,7%) пациентов были мужского пола 250 (33,9%) и у 84 (11,4%) данные отсутствовали. Данные по возрасту пациентов представлены в таблице. Чаще всего ВГВ-инфекция выявлялась в возрастной группе 26 – 45 и старше лет - 82,9% (542) от всех анализируемых случаев. Лица этой возрастной группы чаще других становятся и являются донорами крови и ее компонентов. Из 738 секвенированных образцов ДНК ВГВ 292 (39,6%) относились к подгенотипу D2, 178 (24,1%) - D3, 125 (16,9%) – D1, 136 (18,5%) - A2, 3 (0,4%) – C2, по 1 (0,1%) – B4 и D4, 2 (0,3%) – RF. Таким образом, практически 81 % (596) от всех секвенированных образцов приходилось на D подгенотип ВГВ. Нами описано около 40 случаев резистентности вируса гепатита В к антиретровирусным препаратам. Чаще всего выявлялись мутации M204V, L180M, 80I, V173L и I233V. Известно, например, что мутация 204V ведет к резистентности вируса к ламивудину, телбивудину, а в комбинации с мутацией 180M и одной из дополнительных минорных мутаций к энтекавиру.

Таким образом, проведенные исследования показали, что A6 подподтип ВИЧ, 1b и 3a подгенотипы ВГС и D2 подгенотип ВГВ доминируют на территории страны. Для проведения эффективной терапии пациентов, необходим постоянный мониторинг за проводимым лечением. Безусловно, поиск новых антивирусных препаратов, учитывая высокую распространенность ВИЧ, ВГВ и ВГС в странах СНГ и в мире в целом, необходим, учитывая высокий уровень распространенности и циркуляции резистентных штаммов вирусов.

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОТИВОВИРУСНЫХ СВОЙСТВ ВЕЩЕСТВ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Савинова Ольга Владимировна, Бореко Евгений Иванович.

*Государственное учреждение НИИ эпидемиологии и микробиологии,
г. Минск, Республика Беларусь*

Ключевые слова: тритерпеноиды, аминифенолы, противовирусные свойства

Проблема поиска и синтеза новых лекарственных средств для лечения вирусных заболеваний является крайне важной задачей. В практике здравоохранения в настоящее время используется сравнительно небольшое количество противовирусных препаратов [2]. Активность известных противовирусных препаратов, как правило,

ограничена возбудителями одной инфекции или даже их отдельными подтипами. Опыт лечения заболеваний вирусной этиологии с помощью таких известных препаратов как ремантадин, ацикловир и др. показал возможность быстрого развития у вирусов устойчивости к этим веществам [1, 3]. Устойчивость вирусов к применяющимся противовирусным препаратам является общим недостатком всех самых эффективных лекарственных средств данного назначения, и это является еще одной причиной, побуждающей выявлять новые соединения с уникальным спектром действия и реализовывать новые подходы к ингибированию репродукции вирусов.

Целью настоящей работы являлось изучение противовирусных свойств индивидуальных веществ растительного происхождения и их синтетических производных.

Нами были исследованы природные тритерпеноиды (бетулин, бетулиновая и бетулоновая кислоты и др.) и синтезированные на их основе новые производные тритерпенового ряда, бутаминофен и новые синтетические аминофенолы.

В работе использовали вирусы герпеса простого I типа (ВПГ-1; штамм 1 С и его варианты, устойчивые к действию ацикловира ВПГ-1_{АЦВР} и фосфоноуксусной кислоты ВПГ-1_{ФКР}), гриппа (штаммы FPV/Rostock/34 (H7N1) и его вариант, устойчивый к действию ремантадина FPV_{РР}), энтеровирус ЕСНО 6 из Специализированной коллекции вирусов и бактерий, патогенных для человека РНПЦ эпидемиологии и микробиологии. Противовирусные свойства определяли в экспериментах на культурах клеток методом редукции бляшек на культуре первичных фибробластов эмбрионов кур (ФЭК) с FPV и методом оценки цитопатического эффекта (ЦПЭ) на культуре клеток рабдомиосаркомы человека (RD) с ВПГ-1 и вирусом ЕСНО 6. Критерием противовирусного действия считали снижение титра вируса в присутствии соединений в сравнении с контролем. Вычисляли также концентрацию 50% подавления размножения вируса (среднеэффективная концентрация, ЕС₅₀) и отношение максимальной переносимой концентрации (МПК) к ЕС₅₀.

Большинство соединений тритерпенового ряда, противовирусные свойства которых исследованы в настоящей работе, представлено новыми производными бетулиновой и бетулоновой кислот. В результате выполненных исследований нами впервые были установлены противовирусные свойства значительного количества этих тритерпеноидов. Согласно вычисленному рейтингу активности наиболее выраженными противовирусными свойствами обладают гидразиды и бензальдегиды бетулоновой кислоты, тритерпеновые оксимы, уреиды и карбаматы бетулиновой кислоты. Наиболее выраженные противовирусные свойства исследованные тритерпеноиды

проявили в отношении оболочечных РНК- и ДНК-содержащих оболочечных вирусов гриппа и герпеса.

Ацильные и циклоалкильные производные бутаминафена являются достаточно выраженными ингибиторами репродукции вируса герпеса, в то время как в отношении вируса гриппа они малоактивны. Вместе с тем, одно соединение с ацильным заместителем проявило заметную активность в отношении вируса гриппа.

Достаточно высокий рейтинг активности групп исследованных тритерпеновых и ароматических соединений позволяет считать их новыми классами веществ с противовирусными свойствами.

Бетулин, бетулиновая кислота, 4,6-ди-трет-бутил-2-аминофенол обладают кроме вирусингибирующей еще и вирулицидной активностью в отношении вируса герпеса.

С использованием исследованных веществ возможно преодоление лекарственной устойчивости возбудителей распространенных инфекционных заболеваний к основным применяющимся противовирусным средствам. Доказано синергическое противовирусное действие сочетаний ремантадина и новых тритерпеновых соединений, а также сочетания ацикловира и бутаминафена. Эффективность наиболее активных веществ была изучена при экспериментальной гриппозной инфекции и экспериментальном кожном герпесе белых мышей.

Библиографический список

1. Николаева, С. Н. Штаммы вирусов, обладающие лекарственной устойчивостью / С. Н. Николаева, Н. И. Павлова, Е. И. Бореко // Современные проблемы инфекционной патологии человека (эпидемиология, клиника, вирусология, микробиология и иммунология) : ст. и тез. докл. I итоговой науч.-практ. конф., Минск, 8–9 апр. 1998 г. / Науч.-исслед. ин-т эпидемиологии и микробиологии ; редкол.: Л. П. Титов (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 1998. – С. 581.

2. Синтетические лекарственные средства и интерферон в лечении распространенных социально значимых вирусных инфекций / Г. А. Галегов [и др.] // Новые лекарственные средства: успехи и перспективы / Рос. акад. наук [и др.] ; редкол.: И. Б. Абдрахманов (отв. ред.), Ф. С. Зарудий, М. С. Юнусов. – Уфа, 2005. – С. 3–6.

3. Antiviral resistance in clinical practice / D. W. Kimberlin [et al.] // Antiviral Research. – 1995. – Vol. 26, № 4. – P. 424–438.

STUDYING GENE FAMILIES ASSOCIATED WITH PLANT PATHOGEN INTERACTIONS TO UNCOVER NEW PLAYERS IN *MEDICAGO-RHIZOBIUM* SYMBIOSIS

Aleksandr Gavrin, Sebastian Schornack

Sainsbury Laboratory, University of Cambridge, Cambridge, UK

The plant microbial environment is a driving selection force, which determines the formation of molecular mechanisms of plant immunity and controlled entry of symbiotic microbes. While symbiosis and pathogenesis result in opposite outcomes they may in part rely on similar principles for their establishment and maintenance [1]. Studies indicating common mechanisms involved in symbiosis and disease development have regularly been interpreted to support a long-standing hypothesis that pathogens hijack molecular pathways and mechanisms that were established to accommodate symbiotic microbes [2]. However, the omnipresence of pathogens and the scarcity of specialised examples of symbiosis would argue for plant-pathogen interactions to be the more common and likely more ancient type of relations. Therefore, we hypothesize that plant-pathogen interactions, as the prevalent type of relationship, are a basis or precursor of symbiotic relationships. As a consequence, some symbiotic genes should be descendants of genes implicated in plant-pathogen interactions and arose for example through gene duplication and subsequent neo-functionalisation. Examples are the receptors LjNFR1 and LjCERK6 [3], Nod factor hydrolase and chitinase CHIT5b [5], syntaxins PEN1 and Syp132 [6].

To find further support, we carried out a homology-based survey for gene families typically associated with defence roles but which could harbour members with nodule-associated expression pattern and potentially new functionality in root nodule symbiosis in *Medicago truncatula*. From several identified candidates we studied a β -glucan-binding protein 1 (MtGBP1). Soybean GBP perceives cell-wall β -glucans of pathogenic oomycetes and activates defence responses. The *Medicago* genome encodes 13 GBP-like genes, yet only *MtGBP1* is specifically expressed during nodule initiation. Silencing of *MtGBP1* significantly impairs rhizobial colonization and

decreases the number of nodules per root system. Thus, this strategy may reveal new players contributing to root nodule symbiosis development.

References

1. Rey T. and Schornack S. (2013) *GenBiol*.14:121.
2. Parniske M. (2008) *NatRevMicro*.6:763–775.
3. Kelly S. et al. (2017) *CurrOpinPlantBiol*.39:152–158.
4. Zhang L. et al. (2016) *OpenBiol*.6:160061.
5. Ivanov S. et al. (2010) *CurrOpinPlantBiol*.13:372–377.

COMBINED CLSM/AFM STUDY OF *RHODOCOCCUS* CELL INTERACTIONS WITH ZINC OXIDE NANOPARTICLES

Grigorii Glebov¹, Emma Lalande², Maria Kuyukina^{1,3}, Irina Ivshina^{1,3}

¹*Perm State National Research University, Perm, Russia*

²*Lincoln College, University of Oxford, Oxford, UK*

³*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS, Perm, Russia*

Keywords: *Rhodococcus*, nanoparticles, ASM, CLSM

The *Rhodococcus* actinobacteria have potential applications in bioremediation regarding their hydrocarbon-oxidising properties [1]. Nanoparticles, though typically antibacterial [2], may show some positive features in increasing *Rhodococcus* functionalization, evaluated principally by surface interactions.

Using combined atomic force (Asylum Research, USA) and confocal laser scanning (Olympus, Japan) microscopes, the interactions between zinc oxide nanoparticles and *Rhodococcus* cells were investigated. *R. rhodochrous* IEGM 1363 and *R. pyridinivorans* IEGM 1227 strains from the Regional Specialized Collection of Alkanotrophic Microorganisms (acronym IEGM, WDCM # 768; www.iegmc.ru/strains) were assessed for cell viability, surface roughness and aggregation levels upon the contact with ZnO nanoparticles (0.1–1.0 g/l). Incubation times with ZnO nanoparticles were 6, 12 and 24 hours.

The majority of *R. rhodochrous* cells tended to be dead in 24-hour incubated samples, hence rendering nanometal toxicity. *R. pyridinivorans* IEGM 1227 cells showed partial survival after daily incubation with nanoparticles, which may indicate the resistance of this strain to ZnO. The results show that the RMS (Root Mean Square) values were relatively uniform across all samples, for both strains. However, the roughness of *R. pyridinivorans* IEGM 1227 cells slightly increased at ZnO concentrations of

0.1 and 1 g/l. Negligible changes in profile shape and entire cell size across all concentrations and incubation times for both strains suggested that ZnO nanoparticles have minimal effects on cell surface morphology. It was found that the viability of cells, their size and degree of aggregation depend more on the concentration of nanoparticles than on the incubation time. The results suggested that ZnO nanoparticles at tested concentrations improve rhodococcal cell aggregation and biofilm formation, thus improving cell functionality.

The study was funded by the RF Ministry of Science and Higher Education (State Assignment 6.3330.2017/4.6) . E. Lalande has participated in the study during the Summer Practicum in Environmental Microbiology & Biotechnology at the Perm State National Research University in July 2018.

References

1. Kuyukina, M.S. Application of *Rhodococcus* in bioremediation of contaminated environments / M.S. Kuyukina, I.B. Ivshina // Microbiology Monographs: Springer. 2010. V. 16. P. 231–262.

2. Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity / Y.N. Slavin [*et al.*] // Journal of Nanobiotechnology. 2017. V. 15, N. 1. P. 65.

SCREENING OF *RHODOCOCCLUS* ACTINOBACTERIA FROM THE IEGM COLLECTION FOR THEIR RESISTANCE TO INDENE

Maria Kuyukina^{1,3}, Daria Andreeva¹, Sofia Sandalli², Irina Ivshina^{1,3}

¹Perm State National Research University, Perm, Russia

²University of Aberdeen, Aberdeen, UK

³Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS, Perm, Russia

Keywords: *Rhodococcus*, actinobacteria, indene, resistance

Actinobacteria of the genus *Rhodococcus* are able to metabolize aromatic hydrocarbons and their derivatives. Biotransformation of these compounds generally proceeds via the action of multicomponent dioxygenases or through successive monooxygenations of the aromatic rings to produce diols [1]. Indene is a polycyclic aromatic hydrocarbon with a molecular formula of C₉H₈. It is composed of a benzene ring fused with a cyclopentene ring. Indene can be converted microbiologically to a variety of indandiol, two of which are promising precursors in the synthesis of the HIV

protease inhibitor indinavir sulfate. Since indene is highly toxic [2], bacterial strains resistant to its high concentrations are required for the growth-coupled biotransformation. This study is aimed at the evaluation of indene effects on the viability of *Rhodococcus* collection strains, with the objective of identifying the most resistant ones.

The 25 *Rhodococcus* strains belonging to *R. erythropolis*, *R. jostii*, *R. opacus*, *R. rhodochrous* and *R. ruber* from the Regional Specialized Collection of Alkanotrophic Microorganisms (acronym IEGM, WDCM # 768; www.iegmc.ru/strains) were studied.

Reduction of iodonitrotetrazolium violet, INT (Sigma-Aldrich, USA), into insoluble formazan, visible as a dark-red precipitate, was used as an indicator of bacterial viability upon the contact to indene tested concentrations (0.02-50.0 g/l). Since indene (95%, Energy Chemical, China) does not dissolve in the mineral medium, an ultrasound treatment (5A, 5 min) was used to produce a homogeneous emulsion. To protect the ready-made indene from photo-oxidation, the glass vial was immediately wrapped in aluminum foil. Viability testing was performed in 96-well microplates, which we examined after INT staining, using a microplate reader (Multiskan Ascent, Thermo, Finland) at 630 nm.

It was found that indene at concentrations above 1.0-1.5 g/l has an inhibiting effect on the vast majority of rhodococcal strains within all five species. However, growth stimulating effects were observed even at higher concentrations (up to 10 g/l), particularly for *R. rhodochrous* IEGM 757, *R. ruber* IEGM 75 and *R. opacus* IEGM 717 (and to a lower extent *R. jostii* IEGM 1193), thus indicating the ability of *Rhodococcus* actinobacteria to use indene as a sole carbon source.

The work was financially supported by RSF grant 18-14-00140. S. Sandalli has participated in the study during the Summer Practicum in Environmental Microbiology & Biotechnology at the Perm State National Research University in July 2018.

References

1. Isolation and characterization of indene bioconversion genes from *Rhodococcus* strain I24 / S.L. Treadway [et al.] // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1999. V. 51. P. 786 – 793.
2. Fed-batch bioconversion of indene to *cis*-indandiol A. Amanullah [et al.] // Enzyme Microbial Technology. 2002. V. 31. P. 954–967.

THE POLLUTION LEGACY AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE

Tatyana Peshkur¹, Charles Knapp¹, Fiona Henriquez²,
Kiri Rodgers², Rebecca Tonner¹

¹*Department of Civil & Environmental Engineering, University of Strathclyde, Glasgow, Scotland, UK*

²*Schools of Science and Sport, University of the West of Scotland, Paisley, Scotland, UK*

Keywords: antimicrobial resistance, environmental pollution, resistome

Antimicrobial resistance (AMR) in the environment represents a theme of great interest; it has recently become recognised as an important global issues for public health in terms of impact on society. Untreatable infections have been increasingly developing; existing antimicrobials are becoming less effective; and there is currently a lack of innovation towards new antimicrobials at present. The rapid spread of multi-drug resistance bacteria warrants immediate attention, as we may be approaching a reality where we become unable to combat infections. We must, therefore, understand how AMR develops and disseminates itself across sectors: human health, agriculture and the environment. This holistic approach is needed to avoid returning to a pre-antimicrobial era.

We need to fill knowledge as to gaps why antimicrobial resistance exists and how it may be transmitted. Much research (and media attention) has focussed on AMR in clinical settings and to a slightly lesser extent in animal husbandry. Our works highlights that there is a need for a greater understanding how the environment influences the evolution, acquisition and spread of antimicrobial resistance, and acts as a reservoir of resistance.

Through a series of targeted experiments, which has included: field studies, historical soil archives and an in-depth examination of an industrial estuary, we demonstrate that environmental conditions such as potentially toxic elements (PTEs, e.g., metals) and/or polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) stress bacteria and contribute to the AMR problem. Analytical methods include microbiological susceptibility assays providing toxicological endpoints, sensitive quantitative genetic assays (e.g., qPCR) and high-throughput genetic arrays to provide the surveillance data to inform

scientists and policy makers. All this is corroborated by high-quality, multi-parametric environmental chemistry data.

Results affirm that natural geochemical conditions, regardless of human activity, could elevate AMR among environmental bacteria. More importantly, pollution events, either contemporary or historical, directly create long-lasting impacts in terms of environment 'resistome' (collection of bacteria with resistance traits) via co- and cross-selective pressures. The mere presence of resistance traits imposes an elevated risk, as environmental conditions worsen and stress bacteria, resistance genes become mobilised among bacteria. A recipient bacterium could be a pathogen, impacting food and water security and increased drug-resistant infection risks to human populations.

ENHANCING THE PROPERTIES OF BACTERIAL BIOMINERALS FOR ENGINEERING: OPTIMIZATION OF ARAGONITE PRECIPITATION

Tatyana Peshkur, Vernon Phoenix

*Department of Civil & Environmental Engineering, University of
Strathclyde, Glasgow, Scotland, UK*

Keywords: aragonite, microbial induced carbonate precipitation, engineering

Bacterially generated minerals have outstanding potential as alternatives to traditional cements and grouts in a wide range of engineering applications. However, the current approach to mineral generation - microbial induced carbonate precipitation (MICP) - exclusively generates the mineral calcite. This is a potential flaw because it assumes the mechanical properties of calcite are appropriate for the full gamut of diverse applications. Ideally, we should be able to generate a range of biominerals that have different mechanical properties optimized for specific tasks. In nature, organisms such as mussels and oysters produce carbonate shells of superior mechanical properties through the interaction and incorporation of other ions and molecules. Inspired by this, we are exploring how mineral enhancements can provide advantageous properties in microbially generated minerals. This will provide the first steps towards a new generation of bacterially generated minerals with superior performance in engineering applications. In the work presented here, we used a magnesium inhibition approach to generate the

mineral aragonite. Aragonite has the same chemical composition as calcite, but its different crystal structure affords it superior strength. Indeed, the presence of aragonite is one of the contributing factors to the strength of mussel and oyster shells. We precipitated calcium carbonate minerals using ureolytic bacteria in the presence of different concentrations of magnesium and in systems either unbuffered or pH buffered at pH 6 and 7. Our results demonstrate a range of calcium carbonate minerals can be generated under different magnesium concentrations and levels of pH. As magnesium concentration in the system increased the quantity of aragonite generated increased, with a maximum generation of 90 % aragonite (pH 7). This is significant as aragonite is a stronger mineral than calcite. We were also able to make significant quantities of high-Mg calcite at pH 6 (over 80 %). The presence of high Mg-calcite is significant as it is harder than calcite. Overall this demonstrates the potential of tuning the biomineral mechanical properties for specific engineering tasks.

NEW SET UP FOR PATHOGENICITY EVALUATION OF HUMAN UROPATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI* STRAINS BASED ON BIOMIMMETIC MODEL OF NORMAL PORCINE UROTHELIUM *IN VITRO*

Luka Predojević¹, Darja Žgur-Bertok¹, Darja Keše²,
Mateja Erdani Kreft³, Marjanca Starčič Erjavec¹

¹*Biotechnical Faculty, Department of Biology, Ljubljana, Slovenia*

²*Faculty of Medicine, Institute of Microbiology and Immunology, Ljubljana, Slovenia*

³*Faculty of Medicine, Institute of Cell Biology, Ljubljana, Slovenia*

Keywords: uropathogenic *E. coli*, porcine bladder, urothelial *in vitro* model, virulence factors, biofilm

Escherichia coli (*E. coli*) is part of the normal gut microbiota of warm blooded animals including humans[1]. Most of *E. coli* strains are considered harmless, although certain strains can cause different infections, among them also urinary tract infections (UTIs)[2]. *E. coli* strains causing UTIs are designated as uropathogenic strains of *E. coli* (UPEC)[3]. In 80-90% of community-acquired UTIs the UPEC are the predominant cause for the infection [4]. The research of uropathogenicity among UPEC strains is a fast growing field and many different models for assessing the different aspects

of uropathogenicity are already established with their own advantages and limitations[5] Nevertheless, simple, easy to use models are still lacking. Therefore, our first goal was to develop a model system for the investigation of uropathogenesis of human *E. coli* strains, which would be simple, quick and based on an easily accessible biological material source (porcine bladders). For this purpose, we established a biomimetic model of highly differentiated urothelium *in vitro*, whose morphology, molecular composition, and ultrastructure were thoroughly characterized in our previous studies [6, 7]. Our second goal was to find a correlation between pathogenicity of different human *E. coli* strains, as estimated by their effect on our biomimetic urothelial model *in vitro*, and their genetic background and ability to form biofilm.

For the construction of our *in vitro* biomimetic model, normal healthy urothelial cells derived from the porcine bladder urothelium were used [5, 6]. For the initial assays with the biomimetic urothelial *in vitro* model in order to set up the system, five different *E. coli* strains were employed: UPEC J96 and UPEC 536 strain, the commensal *E. coli* SE15 strain, isolated from a faecal sample of a healthy human donor and two laboratory *E. coli* strains, strain MG1655, which is known to be similar to a natural commensal *E. coli* strain and the typical laboratory *E. coli* strain DH5 α . In subsequent assays employing the biomimetic urothelial *in vitro* model, 10 UPEC strains isolated from patients with UTIs and 10 faecal *E. coli* strains (FEC) isolated from healthy humans were used. Pathogenicity was evaluated as the percentage of viability of urothelial cells in the biomimetic model after 3 hours of infection with different *E. coli* strains. To characterise the *E. coli* strains used in the presented study, we performed biofilm formation assays and PCR for genotyping (phylogenetic group, UPEC virulence-associated genes).

In general, results of the urothelial cells' viability in the here used biomimetic urothelial model corresponded with the type of the *E. coli* strain. When infected with UPEC strains, viability of the cells in our model was much lower than the viability of cells after infection with FEC strains. The total number of virulence factor genes did not correlate with the viability level, but certain genes (*cnf1*, *hlyA*, *clbAQ*, *papGIII*, *sfaDE* and *tcpC*) were more frequently found among strains, which caused a significant lower viability of urothelial cells. The biofilm assays (formed biofilm measured as absorbance at 570 nm) showed no correlation between certain group of strains (either FEC or UPEC) or level of viability (high or low) and the amount of formed biofilm.

In conclusion, genetic, biofilm and cellular analyses of human UPEC and FEC strains showed that among both strain groups, some strains possessed more virulence factor genes, formed a more pronounced biofilm and decreased viability of urothelial cells in the *in vitro* model. However, there was no correlation between biofilm formation, number of virulence factor genes and low viability of urothelial cells.

References

1. Ishii S. and Sadowsky M. J., 2008. *Escherichia coli* in the environment: implications for water quality and human health. *Microbes and Environments*. 23(2):101-8.
2. Blount Z. D., 2015. The unexhausted potential of *E. coli*. *eLife*. 4:e05826.
3. Terlizzi, M. E., Gribaudo G., Maffei M. E., 2017. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) infections: virulence factors, bladder responses, antibiotic, and non-antibiotic antimicrobial strategies. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1566.
4. Ejrnæs, K., 2011. Bacterial characteristics of importance for recurrent urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. *Danish medical bulletin*. Apr;58(4):B4187.
5. Barber A. E., Norton J. P., Wiles T. J., Mulvey M. A., 2016. Strengths and limitations of model systems for the study of urinary tract infections and related pathologies. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : MMBR, 80(2), 351–367.
6. Višnjar T, Kocbek P, Kreft ME. Hyperplasia as a mechanism for rapid resealing urothelial injuries and maintaining high transepithelial resistance. *Histochem Cell Biol*. 2012 Feb;137(2):177-86.
7. Višnjar T, Kreft ME. The complete functional recovery of chitosan-treated biomimetic hyperplastic and normoplastic urothelial models. *Histochem Cell Biol*. 2015 Jan;143(1):95-107.

СКРИНИНГ БАКТЕРИЙ СЕМЕЙСТВА *HALOMONADACEAE* НА СПОСОБНОСТЬ НАКАПЛИВАТЬ ЭКТОИН

Ананьина Людмила Николаевна¹, Пьянкова Анна Александровна¹,
Шестакова Елена Анатольевна¹, Горбунов Алексей Аркадьевич²

¹«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал
ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия

²«Институт технической химии УРО РАН» - филиал ФГБУН ПФИЦ
УрО РАН, г. Пермь, Россия

Ключевые слова: *Halomonadaceae*, эктоин

Эктоин является биотехнологически значимым
осмопротектором, поскольку находит широкое практическое

© Ананьина Л.Н., Пьянкова А.А., Шестакова Е.А.,
Горбунов А.А., 2018

применение в косметической промышленности (в частности, в средствах по уходу за кожей), фармацевтической промышленности и медицине [1]. Из литературных источников известно, что в условиях культивирования в минеральной среде с глюкозой (без дрожжевого экстракта) в присутствии 50 г/л NaCl основным осмопротектором бактерий семейства *Halomonadaceae* является синтезируемый *de novo* эктоин [2].

Целью настоящей работы явилось исследование внутриклеточной концентрации эктоина у бактерий семейства *Halomonadaceae*, выделенных ранее из высокоминерализованных биотопов (солеотвалы) и прилегающих к ним засоленных почв района промышленной разработки Верхнекамского соленосного бассейна.

Проведен скрининг 12 штаммов бактерий родов *Salinicola*, *Halomonas* и *Chromohalobacter* семейства *Halomonadaceae* на способность накапливать эктоин. Бактериальные культуры выращивали в 100 мл минеральной среды Раймонда [3], содержащей 50 г/л NaCl, с глюкозой в конечной концентрации 1 г/л, в колбах объемом 250 мл при 28°C на орбитальном шейкере УВМТ-12-250 при 100 об/мин в течение 24 часов. Экстракцию органических соединений из клеток и последующий анализ проводили согласно методике, описанной Schubert et al. [4]. Идентификацию эктоина проводили по хроматографическому времени удерживания при сравнении с коммерческим препаратом (Fluka, Германия). Количественное содержание эктоина в экстрактах рассчитывали с помощью пакета программ «LCsolution» (Shimadzu, Япония). Анализ этанольных клеточных экстрактов исследованных штаммов методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии выявил, что все исследованные штаммы накапливали эктоин в концентрациях 0.09-0.21 мкмоль/мг сырой биомассы. Наибольшее содержание эктоина отмечено в клетках бактерий рода *Chromohalobacter*, а наименьшее - в клетках бактерий рода *Halomonas*. Для дальнейшего исследования влияния условий культивирования на продукцию эктоина были выбраны штаммы *Chromohalobacter* sp. TC191 (=N1) и TC193 (=N3). Показано, что биосинтез эктоина являлся солеиндуцибельным, т.к. в присутствии 10 г/л NaCl эктоин в клеточных экстрактах не был обнаружен, а увеличение концентрации соли в среде культивирования с 50 до 100 г/л NaCl привело к возрастанию внутриклеточного количества эктоина у штаммов TC191 и TC193 с 1.1 ± 0.2 до 2.07 ± 0.04 мкмоль/мг сухого веса и с 0.9 ± 0.007 до 1.65 ± 0.2 мкмоль/мг сухого веса, соответственно. Исследование ^1H ЯМР-спектров клеточных экстрактов штамма *Chromohalobacter* sp. TC191, выращенного в присутствии 50 г/л NaCl, показало, что помимо эктоина штамм синтезировал бетаин, аланин, трегалозу и неидентифицированное соединение, не являющееся глутаминовой

кислотой или глутамином. Клетки, выращенные в присутствии 100 г/л NaCl, помимо эктоина накапливали аланин, молочную кислоту, гидроксiekтоин и вышеупомянутое неидентифицированное соединение.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Министерства образования и науки Пермского края в рамках проекта № 17-44-590178.

Библиографический список

1. Lentzen G, Schwarz T. Extremolytes: natural compounds from extremophiles for versatile applications. // Appl Microbiol Biotechnol. 2006. V. 72, № 4. P. 623-634.
2. Wolfarth A. et al. The spectrum of compatible solutes in heterotrophic halophilic eubacteria of the family *Halomonadaceae* // Journal of General Microbiology. 1990. V. 136. P. 705-712.
3. Plotnikova E.G. et al. *Thalassospira permensis* sp. nov., a new terrestrial halotolerant bacterium isolated from a naphthalene-utilizing microbial consortium. // Микробиология. 2011. V. 80, №5. P. 691-699.
4. Schubert T et al. Continuous synthesis and excretion of the compatible solute ectoine by a transgenic, nonhalophilic bacterium // Appl Environ Microbiol. 2007. V. 73. P. 3343–3347.

ИЗУЧЕНИЕ БАКТЕРИЙ КЛАССА *ACTINOBACTERIA* НА СПОСОБНОСТЬ СИНТЕЗИРОВАТЬ ЭКТОИН В УСЛОВИЯХ ВЫСОКОЙ СОЛЕНОСТИ СРЕДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Ананьина Людмила Николаевна, Шестакова Елена Анатольевна

*«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал
ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: *Actinobacteria*, эктоин

Из почв района промышленной разработки Верхнекамского соленосного бассейна, методом накопительных культур в минеральной среде Раймонда [1], содержащей 30-60 г/л хлорида натрия и нафталин (1 г/л), были выделены штаммы грамположительных галотолерантных бактерий филума «*Actinobacteria*», принадлежащие родам *Rhodococcus* [2], *Microbacterium* и *Brevibacterium*.

Проведен скрининг исследуемых штаммов на способность синтезировать эктоин в условиях высокой солености среды.

Бактериальные культуры выращивали в 100 мл минеральной среды Раймонда, содержащей 50 г/л NaCl, с глюкозой в конечной концентрации 1 г/л в колбах объемом 250 мл при 28⁰С на орбитальном шейкере УВМТ-12-250 при 100 об/мин в течение 24 часов. Экстракцию органических соединений из клеток и последующий анализ проводили согласно методике, описанной Schubert et al. [3]. Идентификацию соединений проводили при сравнении времени удерживания с коммерческим препаратом эктоина (Fluka, Германия). Количественное содержание веществ в экстрактах рассчитывали с помощью пакета программ «LCsolution» (Shimadzu, Япония). Наиболее высокая концентрация эктоина, составляющая 36.80 нмоль/мг сырой биомассы, обнаружена в клетках штамма *Brevibacterium* sp. B-R. А наименьшее количество эктоина отмечено в клетках бактерии *Microbacterium* sp. Y6 (0.39 нмоль/мг сырой биомассы). Внутриклеточное содержание эктоина у штаммов рода *Rhodococcus* зависело от культуры и находилось в пределах 0.78-8.66 нмоль/мг сырой биомассы.

С целью исследования генетических систем, детерминирующих ферменты синтеза осмопротекторного вещества — эктоина, был осуществлен поиск *ect*-генов в геномах бактерий исследуемых таксономических групп, представленных в базе данных Национального центра биотехнологической информации США (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). На основе множественного выравнивания 55 нуклеотидных последовательностей были выявлены консервативные регионы исследуемых генов, к которым были разработаны олигонуклеотиды, обозначенные как GEA (5'YTTTBTBRTBTGGCA3') и GEB (5'GRAAIGTICCRTTTRTG3'), амплифицирующие фрагмент, включающий участки *ectA* и *ectB*-генов. С применением бесплатного информационного обеспечения OligoAnalyzer 3.1 (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) были определены термодинамические и структурные характеристики олигонуклеотидов. Апробирование праймеров проводили на матрице ДНК бактерий родов *Rhodococcus*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*. Установлено, что применение пары праймеров GEA/GEB привело к амплификации продукта ожидаемой длины около 1100 п.н. только на матрице ДНК штамма *Brevibacterium* sp. B-R. Исследование генетических детерминант ферментов биосинтеза эктоина будет продолжено.

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер госрегистрации темы: 01201353247.

Библиографический список

1. Plotnikova E.G. et al. *Thalassospira permensis* sp. nov., a new terrestrial halotolerant bacterium isolated from a naphthalene-utilizing microbial consortium. // Mikrobiologiya. 2011. V 80, №5. P. 691-699.
2. Anan'ina L.N. et al. Naphthalene-degrading bacteria of the genus *Rhodococcus* from the Verkhnekamsk salt mining region of Russia // Antonie

van Leeuwenhoek. 2011. V.100. P. 309–316.

3. Schubert T et al. Continuous synthesis and excretion of the compatible solute ectoine by a transgenic, nonhalophilic bacterium // Appl Environ Microbiol. 2007. V. 73. P. 3343–3347.

БИОДЕСТРУКЦИЯ ИБУПРОФЕНА КЛЕТКАМИ *RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS* ИЭГМ 501

Бажутин Григорий Андреевич, Тюмина Елена Александровна

*ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный
исследовательский университет, г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: ибупрофен, биодеструкция, *Rhodococcus*

В последнее время проблема фармацевтического загрязнения приобрела планетарный характер по масштабам и по значимости. Оно обнаружено даже в особо охраняемых регионах, таких как Антарктика, территория которой до недавнего времени считалась неподверженной антропогенному воздействию [1].

Одним из наиболее распространенных фармполлютантов является ибупрофен ($C_{13}H_{18}O_2$; CAS: 15687-27-1; (RS)-2-[4-(2-метилпропил)фенил]пропановая кислота) – широко доступный и часто применяемый в медицинской практике нестероидный противовоспалительный препарат из группы производных пропионовой кислоты [2]. Ибупрофен (син. Нурофен®, МИГ®) – один из наиболее популярных препаратов своего терапевтического класса, оказывает выраженное противовоспалительное, анальгезирующее, жаропонижающее действие. Стабильная химическая структура данного карбоциклического соединения обуславливает его высокую устойчивость к биодеградации, экотоксичность и способность к персистированию [2].

Традиционные методы нейтрализации фармпрепаратов и ибупрофена в частности малоэффективны и экологически небезопасны. В настоящее время актуален поиск альтернативных способов детоксикации и выведения фармполлютантов из открытых экосистем, одним из которых выступает микробная деградация. [3–5].

В процессах естественного самоочищения открытых экосистем доминирующую роль играют актинобактерии рода *Rhodococcus*. Выраженная экологическая пластичность, лабильность метаболической системы, полифункциональность, склонность к клеточной агрегации и,

наконец, немицелиальный характер роста указывают на явные технологические преимущества использования родококков в качестве потенциальных биокатализаторов процессов биотрансформации и биодеструкции многих органических соединений, в том числе фармпрепаратов [6].

Цель настоящей работы – подбор оптимальных условий процесса биодеструкции ибупрофена клетками *R. erythropolis* ИЭГМ 501.

В работе использовали штамм *R. erythropolis* ИЭГМ 501 из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним коллекции ИЭГМ, номер 768 во Всемирной федерации коллекции культур, www.iegmc.ru/strains). Выращивание родококков проводили в минеральной среде RS в присутствии 0,01% и 0,005% ибупрофена, вносимого в виде натриевой соли (Sigma-Aldrich, США). В качестве косубстрата использовали 0,5% D-глюкозу. Содержание ибупрофена в культуральных жидкостях родококков регистрировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с помощью хроматографа LC Prominence (Shimadzu, Япония).

По нашим данным, родококки не способны использовать ибупрофен в качестве единственного источника углерода и энергии. Биодеструкция 0,01% ибупрофена в присутствии глюкозы протекала достаточно медленно: остаточное содержание фармпрепарата на 55 сут эксперимента составляла $70,6 \pm 3,1\%$. Наиболее интенсивно процесс биодеструкции ибупрофена протекал в течение первых 20 сут: средняя скорость биоконверсии составляла $0,00225 \text{ г/л*сут}$. После чего скорость биодеструкции ибупрофена значительно снижалась (до $0,00075 \text{ г/л*сут}$).

В условиях 0,005% ибупрофена клетки *R. erythropolis* ИЭГМ 501 катаболизировали фармпрепарат на $83,4 \pm 5,3\%$ за 20 сут эксперимента. При этом средняя скорость убыли соединения составила $0,002085 \text{ г/л*сут}$. Таким образом, наибольшая скорость биодеструкции ибупрофена достигается по большей части на начальном (первые 20 сут) этапе процесса культивирования и не зависит от начальной концентрации соединения.

Полученные данные расширяют представление о каталитической активности актинобактерий рода *Rhodococcus* и свидетельствуют об их возможном вкладе в деконтаминации природных экосистем от фармполлютантов.

Работа поддержана грантами Российского фонда фундаментальных исследований (№ проектов 17-44-590567, 18-34-00109).

Библиографический список

1. Occurrence of pharmaceutical, recreational and psychotropic drug residues in surface water on the northern Antarctic Peninsula region / S.

González-Alonso [et al.] // Environmental Pollution. – 2017. – Vol. 229. – P. 241–254.

2. Pharmaceuticals in the environment-Global occurrences and perspectives / T. aus der Beek [et al.] // Environmental Toxicology and Chemistry. – 2016. – Vol. 35, 4. – P. 823–835.

3. Marchlewicz, A. Bacillus thuringiensis B1(2015b) is a gram-positive bacteria able to degrade naproxen and ibuprofen / A. Marchlewicz, D. Domaradzka, U. Guzik, D. Wojcieszynska // Water, Air and Soil Pollution. – 2016. – Vol. 227. – P. 197.

4. Aerobic degradation of ibuprofen in batch and continuous reactors by an indigenous bacterial community / M.S. Fortunato [et al.] // Environmental Technology. – 2016. – Vol. 37, № 20. – P. 2617–2626.

5. Murdoch, R.W. Formation of Catechols via Removal of Acid Side Chains from Ibuprofen and Related Aromatic Acid / R.W. Murdoch, A.G. Hay // Applied and Environmental Microbiology. – 2005. – Vol. 71, № 10. – P. 6121–6125.

6. Ivshina, I.B. Hydrocarbon-oxidizing bacteria and their potential in eco-biotechnology and bioremediation / I.B. Ivshina, M.S. Kuyukina, A.V. Krivoruchko // In: I. Kurtböke (Ed.), Microbial Resources: From Functional Existence in Nature to Industrial Applications. – Cambridge: Academic Press, 2017. – pp. 121–148.

ВЛИЯНИЕ КВЕРЦЕТИНА НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ЦИПРОФЛОКСАЦИНУ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI*

Безматерных К.В., Самойлова З.Ю., Смирнова Г.В.,
Октябрьский О.Н.

*«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал
ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: микробиота, кверцетин, антиоксидантная активность (АОА), мембранный потенциал, антибиотики

Аэробные организмы подвержены влиянию токсичных активных форм кислорода (АФК). Живые организмы имеют механизмы, позволяющие сохранять концентрацию АФК на низком уровне. Многие болезни и процесс старения сопровождаются нарушением баланса между окислительно-восстановительными реакциями в сторону

усиления продукции АФК. Фармацевтический рынок предлагает большой выбор антиоксидантных биодобавок, содержащих полифенолы (ПФ), включая кверцетин. Известно, что при прохождении по ЖКТ значительная часть ПФ не всасывается в кровь или подвергается превращению в различные производные. Вследствие этого концентрация редокс-активных ПФ в плазме очень мала, что делает маловероятным их непосредственное участие в прямом антиоксидантном действии на клетки человека и животных. В отличие от клеток внутренних органов, микробиота кишечника, представляющая собой важный метаболический орган, может прямо контактировать с ПФ и выступать как вероятный посредник их положительного влияния на здоровье.

Актуальность изучения эффектов ПФ на микробиоту кишечника возрастает в связи с возможностью их модулирующего влияния на чувствительность бактерий к антибиотикам. В последнее десятилетие предложена гипотеза, согласно которой окислительный стресс является единым механизмом гибели клеток при действии различных антибиотиков [1]. Если гипотеза справедлива, АОА ПФ может интерферировать с действием антибиотиков, влияя на эффективность антибиотикотерапии. Некоторые ПФ и ряд экстрактов лекарственных растений способны активировать экспрессию антиоксидантных регулонов и влиять на устойчивость *E. coli* к окислительному стрессу [2]. Однако характер воздействия ПФ на стрессовые регулоны и механизм их АОА остается мало изученным. Одно из бурно развивающихся направлений современной физиологии бактерий связано с изучением механизмов модулирующего действия ПФ на устойчивость бактерий к антибиотикам.

В наших экспериментах редокс-активный ПФ кверцетин проявлял высокую хелатирующую активность по отношению к ионам Fe^{2+} , которая была в 3.3 раза выше, чем у стандартного хелатора дипиридила. Способность кверцетина связывать свободные радикалы $\text{DPPH}^{\bullet}$ была в 2 раза сильнее, чем у тролокса, характеризующегося высокой радикал-связывающей активностью и использующегося в качестве стандарта.

Действие кверцетина на растущие культуры *E. coli* было изучено в концентрациях 1 и 40 мкг/мл. Присутствие 1 мкг/мл кверцетина в среде культивирования не влияло на удельную скорость роста (μ), а доза 40 мкг/мл вызывала снижение μ на 20% через 50 мин экспозиции.

Отрицательно заряженные молекулы флуоресцентного красителя $\text{DiBAC}_4(3)$ не могут проникать в клетки с нормальным мембранным потенциалом вследствие отрицательного заряда с внутренней стороны мембраны, поэтому клетки, окрашенные $\text{DiBAC}_4(3)$, можно рассматривать как деполяризованные. Через 5 мин после добавления кверцетина в среду культивирования наблюдалось

дозозависимое возрастание количества флуоресцирующих клеток, свидетельствующее о падении мембранного потенциала. При дозе кверцетина 40 мкг/мл количество клеток, утративших мембранный потенциал, возросло в 3.4 раза по сравнению с контролем.

С использованием репортерных генных слияний изучалось влияние кверцетина на экспрессию генов *katG*, *katE*, *sodA*, *rpoS* и *sulA*, кодирующих соответственно каталазу HPI и HPII, Mn-супероксиддисмутазу, регулятор общего стрессового ответа RpoS и ингибитор клеточного деления, входящий в SOS-регулон. Предобработка бактерий 40 мкг/мл кверцетина вызывала 29-32% индукцию экспрессии генов *katG* и *sodA*. Доза 1 мкг/мл повышала экспрессию гена *sulA* до 41%. При этом кверцетин не влиял на экспрессию генов *katE* и *rpoS*.

Бактерицидный антибиотик ципрофлоксацин (ЦФ), из группы фторхинолонов, ингибирует синтез ДНК, воздействуя на бактериальные топоизомеразы. В наших экспериментах значение МИК ЦФ для *E. coli* составляло 0.016 мкг/мл. Высокая доза кверцетина оказывала защитное действие, повышая МИК в 16 раз. Экспозиция бактерий с ЦФ приводила к постепенному снижению μ до нуля с последующим переходом в область отрицательных значений, свидетельствуя о лизисе клеток. В присутствии ЦФ, клетки, предобработанные 40 мкг/мл кверцетина, росли со скоростью в 7 раз более высокой, чем необработанные.

Экспозиция бактерий к 0.03 мкг/мл ЦФ в течение 70 мин приводила к снижению числа КОЕ в 83 раза. Предобработка *E. coli* 40 мкг/мл кверцетина полностью предотвращала действие этой дозы антибиотика. Напротив, доза 1 мкг/мл кверцетина усиливала действие 0.03 мкг/мл ЦФ, ускоряя снижение КОЕ в 26 раз уже через 30 мин после внесения антибиотика. При концентрациях ЦФ (0.3 и 3 мкг/мл) КОЕ снижалось на пять порядков, при этом предобработка 40 мкг/мл кверцетина защищала в меньшей степени, увеличивала число КОЕ только в 3.6 раза.

Конкретные механизмы, лежащие в основе наблюдаемых изменений в клетках *E. coli* при действии кверцетина, и причины его модифицирующего влияния на чувствительность к ципрофлоксацину требуют дальнейшего исследования. Одним из таких механизмов может быть способность кверцетина к обратимому связыванию с субъединицами домена F₁ АТФ-синтазы *E. coli* [3], что может приводить к ингибированию активности комплекса. Модулирующее влияние препаратов, содержащих кверцетин, на чувствительность к антибиотикам должно учитываться при антибиотикотерапии.

Исследования выполнены в рамках государственного задания №01201353246, при финансовой поддержке гранта Президента РФ МК-3376.2018.4 и гранта КП УрО №18-7-8-8.

Библиографический список

1. Belenky, P. et al. Cell Rep, 2015; 13(5); 968-980.
2. Samoilova, Z. et al. Microbiol. Res., 2014; 169(4); 307-313.
3. Chinnam, N. et al. Int. J. Biol. Macromol, 2010; 46(5); 478-486.

РАССЕЛЕНИЕ ЧУЖЕРОДНЫХ ВИДОВ ВОДОРΟΣЛЕЙ В ВОДОХРАНИЛИЩАХ СРЕДНЕЙ КАМЫ

Беляева Полина Геннадьевна

«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал
ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия

Ключевые слова: фитопланктон, инвазии, солоноватоводный вид, *Actinocyclus normanii*, *Gonyostomum semen*

Расселение различных видов в несвойственные им ранее местообитания (биологические инвазии) являются серьезной экологической проблемой. Появление в составе альгофлоры аллохтонных, в том числе и солоноватоводных видов, прогрессивно распространяющихся и доминирующих в структуре сообществ часто приводит к нарушениям в разнообразии аборигенной флоры и требует изучения закономерностей их появления и распространения.

В результате исследований фитопланктона Камского и Воткинского водохранилищ в 2017 г. обнаружено 8 представителей инвазивной флоры. Семь из которых относятся к солоноватоводным центрическим диатомовым водорослям и один представитель рафидофитовых.

В Камских водохранилищах присутствуют солоноватоводные виды центрических диатомей: *Thalassiosira lacustris* (Grun.) G.R.Hasle (*Coscinodiscus lacustris* Grun.) *Skeletonema subsalsum* (A.Cl.) Bethge, *Thalassiosira bramaputrae* (Ehrenb.) Håkans. et Locker, *T. pseudonana* Hasle et Heimdal, *T. incerta* Makar., *T. faurii* (Gasse) Hasle, *Cyclotella ambigua* Grunow и *Actinocyclus normanii* (Greg.) Hust. Ни один из солоноватоводных видов в 2017 г. не достигал значительных количеств и образовывал менее 1% общей численности фитопланктона. Исключением является верхний район Воткинского водохранилища, где *Actinocyclus normanii* достигал 10% биомассы фитопланктона. Ранее этот вид в водохранилищах Средней Камы достигал значительного развития и участвовал в ценозообразовании. Доля *A. normanii* в фитопланктоне была велика в 2005–2013 гг., когда его относительная

численность на отдельных станциях могла достигать 20%, а биомасса – 65% от общей в Камском водохранилище и чуть ниже в Воткинском водохранилище – до 16% биомассы в верхнем, 15–32% в центральном и до 43% в приплотинном районе [1; 2]. Однако его вклад в суммарную биомассу и численность сообществ планктона обоих водохранилищ после 2013 г. стал заметно сокращаться.

В 2017 г. при исследовании фитопланктона впервые обнаружен представитель отдела рафидофитовых водорослей *Gonyostomum semen* (Ehr.) Diesing. Вид является инвазивным для бореальных озер. Он положительно реагирует на увеличение в воде концентрации биогенных веществ [3], выдерживает низкую прозрачность и небольшую глубину проникающей солнечной радиации [4]. Данный вид в естественных условиях вызывает «цветение» воды. Его массовое развитие вызывает аллергические реакции у людей. Его встречаемость в пробах фитопланктона Воткинского водохранилища невысока, в центральном районе водохранилища этот вид отмечается единично, однако в Камском водохранилище встречаемость составила 16% в русле и 33% мелководьях, а в центральном районе (ниже впадения основных притоков) он встречается уже в более 90% проб и за счет крупных размеров формирует 10–30% биомассы фитопланктона. И, очевидно этот вид только начал свое развитие в фитопланктоне водохранилищ Средней Камы, поэтому вопрос о его расселении и развитии в разнотипных водоемах Пермского края требует пристального внимания.

Работа выполнена в рамках государственного задания номер госрегистрации темы: 01201353247 «Изучение функционального и видового разнообразия микроорганизмов, полезных для биоценозов и практической деятельности человека».

Библиографический список

1. Беляева П.Г. Пространственно-временные изменения фитопланктона Камского водохранилища // Известия Самарского научного центра РАН. 2015. Т. 17. №5. С. 733–738.
2. Беляева П.Г. Структура фитопланктона Воткинского водохранилища в 2010–2016 гг. // Вестник Пермского университета. Биология. 2017. Вып. 3. С. 257–262.
3. Lepistö L., Saura M. Effects of forest fertilization on phytoplankton in a boreal brown-water lake // Boreal Environment Research. 1998. Vol. 3. P. 33–43.
4. Druvietis I., Spīģe G., Driede A., Kokorīte I., Parele E. A Comparative Assessment of Bog Aquatic Environment of Ramsar Site Teiči Nature Reserve and North Vidzeme Biosphere Reserve, Latvia // Mires and Peat. Riga: University of Latvia Press, 2010. P. 19–40.

ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ ПЕРОКСИДА И ПЕРОКСИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ В ЛИСТЬЯХ КУЛЬТУРНЫХ ЗЛАКОВ ПРИ ИЗМЕНЕНИИ РЕАКЦИИ КОРНЕВОЙ СРЕДЫ

Боталова Ксения Ивановна, Четина Оксана Александровна

ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный
исследовательский университет, г. Пермь, Россия

Ключевые слова: pH корневой среды, окислительный стресс растений

Изменение реакции почвенной среды – распространенное последствие агрогенной и техногенной деятельности человека. Снизить pH почвы может внесение физиологически кислых минеральных удобрений. Само отчуждение урожаев с полей приводит к постепенному обеднению почв элементами, входящими в состав растений, в том числе и основаниями. На поливных сельскохозяйственных угодьях вторичное засоление обычно сопровождается подщелачиванием почв. Побочным промышленным воздействием на природу является выпадение кислых атмосферных осадков и пыли, наиболее выраженное вблизи крупных промышленных предприятий. Почвенная щелочность проявляется в случае поступления в почвы солевых отходов, применения антигололедных солей [1-3].

Известно, что в организмах негативные факторы вызывают окислительный стресс – дисбаланс между оксидантами и антиоксидантами в пользу оксидантов [5-6]. В многочисленных исследованиях зарегистрировано накопление при этом активных форм кислорода и усиление активности ферментов антиоксидантной защиты. Реакция почвенной среды – основной фактор почвенного плодородия, однако, ее влияние на состояние защитных систем растений в условиях кислой и щелочной среды остаются слабоизученными. Цель наших исследований - определить влияние кислой и щелочной реакции корневой среды на динамику содержания пероксида и пероксидазной активности в листьях пшеницы и ржи.

В качестве объекта исследования использовали пшеницу мягкую *Triticum aestivum* L. и рожь посевную *Secale cereale* L.. Предварительно замоченные семена высаживали в вермикулит. На 7 день после посадки на корневую среду растений воздействовали стресс-фактором – кислым или щелочным раствором, контрольный вариант поливали

дистиллированной водой. Кислую среду раствора создавали уксусной кислотой до $\text{pH}=3$. Щелочной раствор – глицин- NaOH буфер с $\text{pH}=10$. Устойчивость реакции среды в вермикулите под воздействием щелочных и кислых растворов контролировали путем измерения на pH -метре в динамике. Активность пероксидазы в растительном материале определили по методу А.Н.Бояркина (1951), содержание пероксида – по ферротитриметрическому методу (Sagisaka, 1976) через 0,5, 1, 2, 3, 4 и 24 часа. Биологическая и аналитическая повторность определений – трехкратная.

Пероксид водорода – одна из активных форм кислорода, которая накапливается в растениях при влиянии экстремальных факторов корневой среды. В первые сроки наблюдений, 30 мин и 1 час, количество пероксида в листьях пшеницы на фоне воздействия кислой реакции было почти в 3 раза выше контроля (рис. 1). В следующие три часа отмечено резкое уменьшение его содержания, а через сутки после начала воздействия фактора существенной разницы между контролем и опытом не обнаружено. На фоне щелочной среды в течение первых 30 минут содержание перекиси в листьях, так же как и при pH 3, было выше контрольного варианта. Через 1 час наблюдалось снижение количества пероксида, через 2, 3, 4 часа уровень пероксида значительно повышался (в 3 – 4 раза больше контроля), а через 24 часа значимых различий с контролем не было обнаружено.

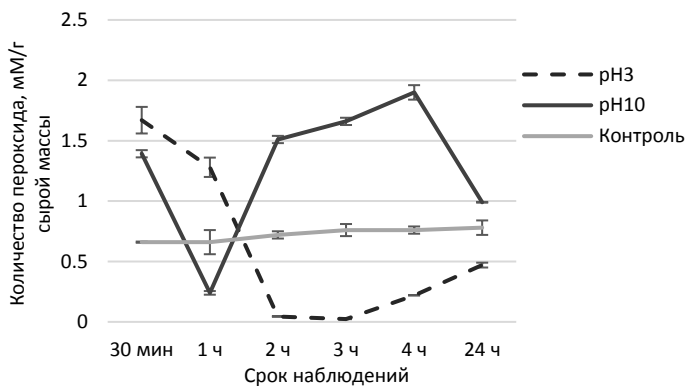


Рис. 1. Изменение содержания пероксида водорода в листьях пшеницы при разных уровнях pH корневой среды

В листьях ржи в начальный период наблюдений содержание пероксида водорода существенно не отличалось от контрольного варианта на исследуемых уровнях pH корневой среды (рис. 2). Значимое увеличение уровня перекиси на фоне кислой реакции среды относительно контроля наблюдается через 3 часа после воздействия стресс-фактором, и через 24 часа – существенное снижение. На фоне

щелочной реакции среды у ржи достоверное отличие от контроля в сторону повышения содержания пероксида водорода наблюдается только через 24 часа после начала наблюдений, в остальные сроки значения не отличались от контроля.

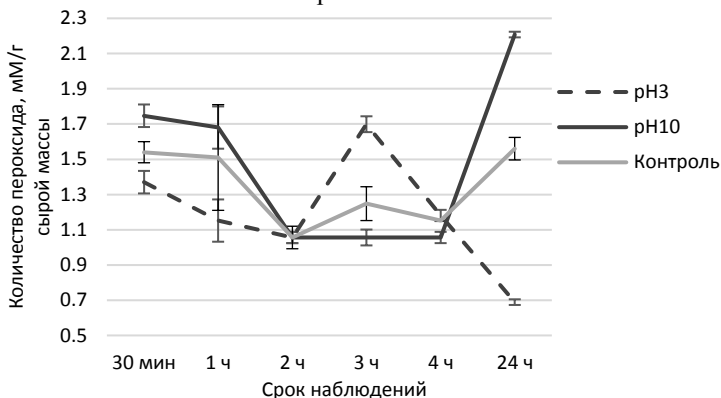


Рис. 2. Изменение содержания пероксида водорода в листьях ржи при разных уровнях pH корневой среды

При стресс-воздействии в ответ на повышение содержания перекиси водорода, как правило, повышается и пероксидазная активность. Пероксидазы обеспечивают нормальный ход окислительных процессов при различного рода неблагоприятных воздействиях на растение [7].

В листьях пшеницы на варианте с pH=3 наблюдалось значимое увеличение активности пероксидазы относительно контрольного варианта за исключением 3 и 24 часов после воздействия стресс-фактором (рис. 3). Максимальная активность отмечена через 4 часа. На фоне щелочной реакции среды активность пероксидазы так же возрастала, за исключением периода 2 часа после воздействия стресс-фактором, где активность ниже контрольного варианта. Через 24 часа пероксидазная активность достоверно не отличалась от контроля.

Первая реакция растительного организма состоит в использовании имеющихся резервов (пула специфических ферментов и низкомолекулярных метаболитов), после чего происходит активация процессов новообразования необходимых ферментов и синтеза специальных высокореактивных веществ [8]. Таким образом, снижение пероксидазной функции в некоторые временные отрезки первых суток может быть обусловлено расходом пула ферментов.

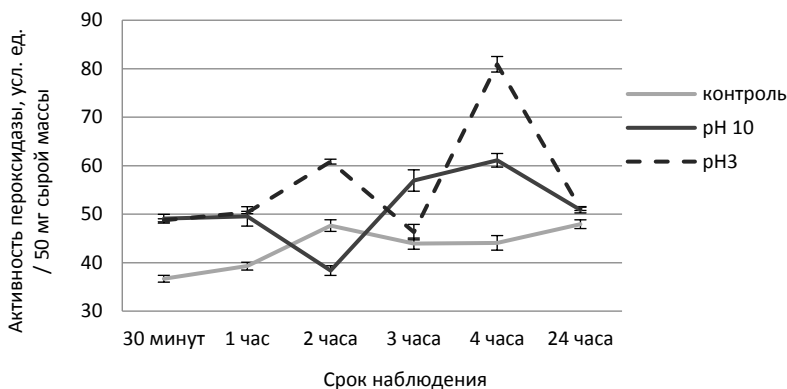


Рис. 3. Изменение пероксидазной активности в листьях пшеницы при разных уровнях корневой среды

В листьях ржи активность пероксидаз при pH=3 корневой среды была достоверно выше контрольного варианта на всех временных точках (в 2 – 3 раза). Наиболее высокие показатели отмечены в период 4-24 часа после воздействия стресс-фактора (рис. 4). На фоне щелочной реакции корневой среды значимое увеличение пероксидазной функции начинается через 2 часа после действия стресса и возрастает к 24 часам.

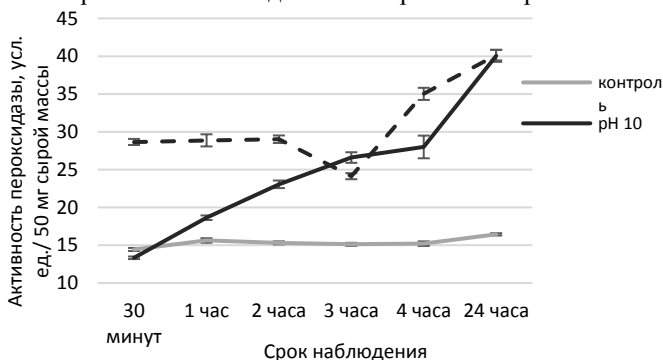


Рис. 4. Изменение пероксидазной активности в листьях ржи при разных уровнях pH корневой среды

Таким образом, резкое изменение реакции корневой среды сопровождалось усилением окислительно-восстановительных реакций в листьях исследуемых культурных растений. У пшеницы к 24 часам после воздействия стресс-фактора показатели содержания перекиси и пероксидазной активности в листьях приближались к контрольному варианту, что, возможно, связано с преодолением стресса. У ржи через сутки количество перекиси в листьях достоверно отличается от контрольного варианта, а пероксидазная активность выше в 2,5 раза как на кислой, так и на щелочной корневой среде, что может

свидетельствовать об активных процессах адаптации, что может свидетельствовать о продолжении адаптационных процессов.

Библиографический список

1. Вальков В. Ф., Елисеева Н. В., Имгрунт И. И., Казеев К. Ш., Колесников С. И. Справочник по оценке почв. Майкоп: ГУРИПП «Адыгея», 2004. 236с.
2. Еремченко О. З., Четина О. А., Кусакина М. Г., Шестаков И. Е. Техногенные поверхностные образования зоны солеотвалов и адаптация к ним растений: монография. Пермь, 2013. 148 с.
3. Эволюция почв и почвенного покрова. Теория, разнообразие природной эволюции и антропогенных трансформаций почв / Отв. ред. В. Н. Кудеяров, И. В. Иванов, М.:ГЕОС,2015. С.824-833.
4. Jones D.P. Redox theory of aging // Redox. Biol. 2015. V. 5. P. 1865-1879.
5. Давлятназарова З.Б. Особенности функционирования механизмов устойчивости растений в условиях абиотического стресса: дисс... д-ра биол. наук. Институт ботаники, физиологии и генетики растений АН республики Таджикистан. 2016.
6. Прадедова Е.В., Нимаева О.Д., Салаяев Р.К. Редокс-процессы в биологических системах // Физиология растений. 2017. Т.64, №6, С. 433-445.
7. Чиркова Т.С. Физиологические основы устойчивости растений. СПб.: Изд-во С.-Пб. ун-та, 2002. 244 с.
8. Гарифзянов А.Р., Жуков Н.Н., Иванищев В.В. Образование и физиологические реакции активных форм кислорода в клетках растений // Современные проблемы науки и образования. 2011. № 2. С. 161–183.

БАКТЕРИИ-ДЕСТРУКТОРЫ БИФЕНИЛА В МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВАХ ТЕХНОГЕННОЗАГРЯЗНЁННЫХ ТЕРРИТОРИЙ ПОЛУОСТРОВА КРЫМ

Воронина Анна Олеговна, Плотникова Елена Генриховна

*«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал
ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: бифенил, бактерии-деструкторы, *bphA1*-гены

На сегодняшний день остро стоит проблема антропогенного загрязнения окружающей среды токсичными органическими

соединениями, к которым относятся бифенил и его хлорпроизводные, моно(поли)ароматические углеводороды. Известно, что природные бактерии являются основным компонентом биологической очистки почв, водоемов от таких загрязнителей. Обнаружение, выделение и использование активных бактерий-деструктов (хлор)бифенилов и других ароматических соединений, перспективных для восстановления загрязненных территорий, является актуальной задачей.

Объект нашего исследования – микробные сообщества загрязненных территорий южных портовых городов (г. Евпатория, г. Феодосия) п-ова Крым. Феодосийский государственный морской порт (предприятие по обеспечению нефтепродуктами, нефтебаза), осуществляет перевалку до 40 тысяч тонн нефтегрузов в сутки, акватория феодосийской нефтебазы находится у излучины берега Феодосийского залива [4]. Евпаторийский торговый порт расположен в центре города, характеризуется круглогодичной навигацией, так как в зимний период Каламитский залив Черного моря практически не замерзает [5]. В результате активной эксплуатации морских портов в окружающую среду попадают мазут, нефть (источники токсичных ароматических соединений), а также бифенилы и полихлорированные бифенилы (ПХБ) – токсичные и канцерогенные вещества, способные к бионакапливанию, использующиеся в качестве компонентов входящих в состав некоторых топливных смесей и смазочных материалов [2].

Бифенил 2,3-диоксигеназа (BphA1) – это ключевой фермент бактериального разложения бифенила/ПХБ (а также ряда ароматических углеводородов), который осуществляет первую реакцию (гидроксилирование ароматического кольца) биохимического пути разложения этих соединений. α -Субъединица BphA1 отвечает за распознавание субстрата и связывание с ним, в связи с чем ген *bphA1* является важным маркером при исследовании биodeградационного потенциала бактериального сообщества [3].

Цель работы – изучение сообществ бактерий-деструкторов ароматических соединений техногеннозагрязнённых территорий п-ва Крым (порты городов Феодосия и Евпатория), выделение активных штаммов-деструкторов бифенила/ПХБ.

Методом накопительного культивирования на бифениле были получены две микробные ассоциации, обозначенные как EV (г. Евпатория) и ФЕО (г. Феодосия). Методом «щелочного лизиса» из полученных накопительных культур (НК, ассоциаций) была выделена тотальная ДНК. Скрининг тотальной ДНК из НК на наличие нуклеотидных последовательностей (генов-*bphA1*), кодирующих α -субъединицы BphA1, показал наличие ПЦР-продукта ожидаемой длины (500 п.н.) с ДНК-матрицы обоих образцов. Секвенирование и дальнейший анализ амплифицированных *bphA1*-генов выявил высокую гомологию (на уровне 99,7%) с аналогичными генами активных

бактерий-деструкторов рода *Pseudomonas* в тотальной ДНК образца ФЕО. В то же время нуклеотидная последовательность ампликона, полученного с тотальной ДНК образца EV, не была идентифицирована (гомология с известными *bphA1*-генами отсутствовала). На основании полученных результатов можно сделать предположение, что в микробном сообществе на территории феодосийской нефтебазы присутствуют бактерии-деструкторы ароматических соединений (бифенила/ПХБ).

Параллельно, из НК были выделены три бактериальных штамма, обозначенные как EV1-1, EV3-3 (порт, г. Евпатория), F1-2 (порт, г. Феодосия) характеризующиеся способностью к активному росту на бифениле в качестве единственного источника углерода и энергии. Методом ПЦР со специфичными праймерами [1] (которые использовались при анализе тотальной ДНК накопительных культур, см. выше) было подтверждено присутствие *bphA1*-гена у штамма F1-2, однако у штаммов EV1-1 и EV3-3 амплификация *bphA1*-генов не наблюдалась.

Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что в микробных сообществах техногеннозагрязнённых территорий п-ва Крым присутствуют бактерии, участвующие в разложении ароматических соединений (в частности, утилизирующих бифенил). Способность штаммов EV1-1 и EV3-3, выделенных из загрязненной почвы на территории порта г. Феодосии, использовать бифенил в качестве субстрата, но отсутствие в геноме данных штаммов известных *bphA1*-генов, может быть обусловлена наличием других (новых) систем метаболизма ароматических соединений. Исследование выделенных бактерий-деструкторов бифенила будет продолжено.

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер госрегистрации темы 01201353249.

Библиографический список

1. Iwai O., Chai B., Sul W. J., Cole J. R., Hashsham S. A., Tiedje J. M. Gene-targeted-metagenomics reveals extensive diversity of aromatic dioxygenase genes in the environment // ISME J. 2010. V. 4, № 2. P. 279–285.
2. Wang X., Thai P. K., Li Y., Li Q., Wainwright D., Hawker D. W., Mueller J. F. Changes in atmospheric concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls between the 1990s and 2010s in an Australian city and the role of bushfires as a source // Environmental Pollution. 2016. V. 213. P. 223-231.
3. Шумкова Е. С., Егорова Д. О., Корсакова Е. С., Дорофеева Л. В., Плотникова Е. Г. Молекулярно-биологическая характеристика бактерий-деструкторов бифенила и идентификация генов α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы // Микробиология. 2014. Т. 83, № 1. С.63–71.

4. http://krymology.info/index.php/Феодосийское_предприятие_по_обеспечению_нефтепродуктами
5. <http://evtp.ru>

БЕЛКИ ХОЛОДОВОГО ШОКА БАКТЕРИЙ РОДА *ACINETOBACTER*

Гончаров Артемий Евгеньевич¹, Соломенный Александр Петрович²

¹*ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, г. Санкт-Петербург, Россия*

²*«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: белки холодового шока, *Acinetobacter* spp., *Acinetobacter lwoffii*, «Малоляховский мамонт»

С развитием технологий консервации значительно расширился ассортимент продуктов питания, поставляемых и сохраняемых при пониженной температуре. Однако, выяснилось, что многие патогенные микроорганизмы являются психротрофами и способны расти при температурах близких к 0°C. К числу таковых относятся энтеропатогенные *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, представители рода *Yersinia* [1]. У них (равно и ряда других бактерий) обнаружены белки в 65-75 аминокислотных остатков, синтез которых значительно активируется при понижении температуры окружающей среды. Отсюда, они получили наименование «белки холодового шока» (БХШ, англ. CSP от Cold Shock Proteins). Представители рода *Acinetobacter* (*A. lwoffii*, *A. baumannii* и другие виды) также высеваются с охлажденных продуктов питания. При определенных физиологических условиях скоординированный процесс синтеза БХШ у ацинетобактера, по-видимому, является альтернативой стратегии выживания, связанной с образованием биопленок [2]. Малоизученными остаются вопросы филогенетических различий БХШ, что полезно с фундаментальной (новое знание о развитии систем адаптивного ответа) и практической точек зрения (разработка новых методов борьбы с контаминантами пищи).

В руках международной группы исследователей оказался уникальный палеонтологический объект - *Mammuthus primigenius* Blumenbach, 1799; известный в научной литературе как «Малоляховский мамонт» [3]. Находка сделана в 2012 году на о. Малый

Ляховский Новосибирского архипелага и датирована периодом 28610 ± 110 лет до н.э. Задняя часть животного находилась в ледяной линзе, благодаря чему мумификация мягких тканей оказалась минимальной. Микробиологический посев материала пищеварительного тракта с использованием тиогликолевой среды обогащения позволил выделить культуру коккобациллы, идентифицированной по результатам стандартных тестов и секвенирования гена, кодирующего 16S rPHK, а также генов *rpoB* и *recA* как *Acinetobacter lwoffii* (штамм 51m). Прочтение полного генома (GenBank LZDF00000000) дало возможность аннотировать гены, кодирующие белки холодового шока семейства Csp (*cspA*, *cspE* и *cspG*) и провести при помощи инструментов BLAST-анализа сравнение с известными последовательностями.

При сравнении аминокислотных последовательностей CspA и CspE (по 71 остатку) у *A. lwoffii* 51m и таковых у *A. lwoffii* ZS207 (выделен из рудничной богатой мышьяком сточной воды), *A. qinghaiensis* TTH0-4 из почвы района многолетней мерзлоты на Тибете, *A. schindleri* и *Acinetobacter* spp. не удастся выявить существенных различий.

Однако, число замен в транслированной последовательности CspG на хромосомах *A. lwoffii* 51m (сверху) и *A. soli* GFJ2 (GenBank NZ_CP016896), выделенного из тропической почвы в Таиланде (сходство по нуклеотидной последовательности 82% при E-value $1e-42$), оказалось

T
QE
S

MSNTVTGTVKWFNETKGFGFIQPDSGPDVFANFKELASSGFK
F V D N I L
TLHEGQRVSFSIVEGQKGPSAVNIVAQ

Причем, две замены полярных аминокислот на неполярные (выделены черной заливкой) принципиально отличают варианты.

Также рассмотрена возможность горизонтального переноса генов, кодирующих БХШ. Действительно, у клинически значимого вида *A. baumannii* малые плазмиды (менее 15 т.п.н.) могут нести таковые гены. Например, у штамма 3207 ген, аннотированный в базе GenBank как *cspG*., находится на плазмиде с геном бета-лактамазы OXA-58, которая маркирует устойчивость в отношении карбапенемов [4]. Отсюда, селективное давление со стороны антибиотиков может способствовать расширению списка новых хозяев вариантов БХШ. Впрочем, один из генов БХШ, аннотирован и на большой плазмиде (более 250 т.п.н.) штамма *A. lwoffii* ED23-35, выделенного из многолетнемерзлых отложений возраста 20-40 тысяч лет на Колымской низменности [5].

Работа выполнена в рамках государственного задания номер госрегистрации темы: 01201353247.

Библиографический список

1. Keto-Timonen R., Hietala N., Palonen E., Hakakorpi A., Lindström M., Korkeala H. Cold Shock Proteins: a minireview with special emphasis on Csp-family of enteropathogenic *Yersinia*. //Front. Microbiol. – 2016. – Vol. 7. – Article ID 1151.
2. Kim J., Ha S., Park W. Expression and deletion analyses of *cspE* encoding cold-shock protein E in *Acinetobacter oleivorans* DR1 // Res. Microbiol. – 2018. – Vol. 169. – P. 244-253.
3. Grigoriev S.E., Fisher D.C., Obada T., Shirley E.A., Rountrey A.N., Savvinov G.N., Garmayeva D.K., Novgorodov G.P., Cheprasov M.Y., Vasilev S.E., Goncharov A.E., Masharskiy A., Egorova V.E., Petrova P.P., Egorova E.E., Akhremenko Yana A., van der Plicht J., Galanin A.A., Fedorov S.E., Ivanov E.V., Tikhonov A.N. A woolly mammoth (*Mammuthus primigenius*) carcass from Maly Lyakhovsky Island (New Siberian Islands, Russian Federation) //Quaternary Int. – 2017. –Vol. 445. – P.89-103.
4. Castro-Jaimes S., Salgado-Camargo A.D., Graña-Miraglia L., Lozano L., Bocanegra-Ibarias P., Volkow-Fernández P., Silva-Sanchez J., Castillo-Ramírez S., Cevallos M.A. Complete genome sequence of a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolate obtained from a Mexican hospital (sequence type 422) // Genome Announc. – 2016. – Vol. 4(3). – e00583-16.
5. Mindlin S., Petrenko A., Kurakov A., Beletsky A., Mardanov A., Petrova M. Resistance of permafrost and modern *Acinetobacter lwoffii* strains to heavy metals and arsenic revealed by genome analysis // BioMed Research International – 2016. – Vol. 2016. – Article ID 3970831.

БИОДЕСТРУКЦИЯ МОНО- И ТРИХЛОРИРОВАННЫХ БИФЕНИЛОВ НОВЫМ БАКТЕРИАЛЬНЫМ СООБЩЕСТВОМ

Егорова Дарья Олеговна

«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал
ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия

Ключевые слова: хлорбифенилы, бактерии, деструкция

Хлорированные бифенилы относятся к группе Стойких органических загрязнителей (СОЗ). Согласно Стокгольмской конвенции о СОЗ, принятой в 2001 г и ратифицированной Россией в 2011 г, соединения группы СОЗ запрещены к производству и применению и подлежат уничтожению. Рядом исследований показано,

что ПХБ встречаются не только в районах производства и применения, но обнаружены в тканях животных, обитающих в диких ландшафтах. В настоящее время на территории России находится не менее 35000 тонн промышленных смесей ПХБ, при этом остается неучтенным количество ПХБ, попавшее в окружающую среду [1].

Несмотря на то, что ПХБ - химически устойчивые соединения, в естественных условиях они подвергаются трансформации под действием ферментов бактерий, грибов, растений и животных [2]. Способность к трансформации отдельных хлорбифенилов описана для ряда аэробных бактерий [3, 4].

Цель настоящего исследования – изучение состава и деградативного потенциала нового природного бактериального сообщества.

Бактериальное сообщество было выделено методом накопительного культивирования из почв, длительно загрязненных хлорорганическими соединениями. Накопительное культивирование осуществлялось в колбах Эрленмееера на 250мл, содержащих 10г почвенного образца и 100мл минеральной среды К1 при 28°C в течение 1 мес. В качестве лимитирующего фактора был внесен коммерческий препарат полихлорбифенилов «Совол» в конечной концентрации 0.01мг/л.

Выделение индивидуальных штаммов проводили методом посева на плотные питательные среды: среда К1 с внесением бифенила (1 г/л) в качестве источника углерода и среда LB.

Определение таксономического положения изолированных штаммов осуществляли на основании морфологических, физиологических и генетических характеристик, как описано [5].

Деструкцию моно- и три-хлорированных бифенилов проводили как описано [6]. Продукты деградации хлорбифенилов (ХБ) определяли спектрофотометрически (спектрофотометр Shimadzu BioSpec-mini) и методом высоко-эффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (хроматограф Shimadzu LC-20A, детектор Shimadzu RF-20A, колонка Discovery C18 (150 x 4.6 мм) (“Supelco”, “Sigma-Aldrich”, США).

В результате проведенных исследований было получено сообщество аэробных бактерий, обозначенное как R63, способное активно расти на бифениле, как единственном источнике углерода и энергии. Было установлено, что сообщество R63 обладает деградативным потенциалом по отношению к моно- и трихлорированным бифенилам, содержащих заместителей в *пара*-положении. Уровень деструкции *пара*-хлорбифенила (4-ХБ) за 24 ч составил 99,9%, при этом в среде культивирования не фиксировался промежуточный продукт, содержащий разрыв в одном из колец молекулы хлорбифенила, но была обнаружена *пара*-хлорбензойная кислота в концентрации 0,686 мкг/мл. Уровень деструкции 2,4,4'-ХБ за

24 ч составил 99,8%. Среди метаболитов были зафиксированы продукт мета-расщепления трихлорбифенила с ОП₃₉₇=4,405 о.е., 4-хлорбензойная кислота в концентрации 0,008 мг/мл и 2,4-хлорбензойная кислота в концентрации 0,017 мг/мл. Таким образом бактериальное сообщество R63 эффективно разлагает моно- и трихлорбифенилы, при этом проявляя активность как к незамещенным, так и к моно- и ди-замещенным кольцам молекулы ПХБ.

Филогенетический анализ сообщества R63 показал, что сообщество представлено 7 бактериальными штаммами. Установлено, что три штамма являются представителями класса *Actinobacteria*, два штамма – класса *Betaproteobacteria* и два штамма – класса *Gammaproteobacteria*. Показано, что наиболее близкими типовыми штаммами являются: для штамма R6-410 штамм *Yersinia pestis* NCTC 5923T (1432 пн; 99,5% сходство), для штамма R6-411 – *Pseudomonas pleucoglossicida* NBRC 103162T (914пн; 99,6%), для штаммов R6-412 и R144 – *Achromobacter insolitus* DSM 23807T (941пн и 944пн; 100% и 99,8% соответственно), для штамма R6-510 – *Streptomyces virginiae* NRRL ISP-5094T (1022 пн; 99,8%), для штамма R6-511 – *Rhodococcus wratislaviensis* NBRC 100605T (898н; 100%), для штамма R143 – *Rhodococcus erythropolis* NBRC 15567T (1047 пн; 99,8%).

Работа выполнена при поддержке Комплексной программой Уро РАН, проект № 18-3-8-19.

Библиографический список

1. Трегер Ю. СОЗ – стойкие и очень опасные // The Chemical Journal. 2013. № 1. С. 30–34.
2. Tehrani R., Van Aken B. Hydroxylated polychlorinated biphenyls in the environment: sources, fate, and toxicities // Environmental Science Pollution Reserch 2014. V. 21. P. 633–6345.
3. Васильева, Г.К., Стрижакова Е.П. Биоремедиация почв и седиментов, загрязненных полихлорированными бифенилами // Микробиология. 2007. Т.76, №6. С. 725–741.
4. Pieper D.H. Aerobic degradation of polychlorinated biphenyls // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2005. V.67. P. 170–191.
5. Егорова Д.О. и др. Деструкция ароматических углеводов штаммом *Rhodococcus wratislaviensis* KT112-7, выделенным из отходов соледобывающего предприятия // Прикладная биохимия и микробиология. 2013. Т. 49, № 3. С. 267–278.
6. Рыбкина Д.О. и др. Новый аэробный грамположительный микроорганизм с уникальными свойствами деструкции орто- и пара-хлорированных бифенилов // Микробиология. 2003. Т. 72, №. 6, С. 759–765.

УГЛЕВОДОДОКИСЛЯЮЩАЯ И СУЛЬФИДОКИСЛЯЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ШТАММА *Rhodococcus* *qingshengii* ИЭГМ 1359

Елькин Андрей Анатольевич^{1,2}, Попов Лев Александрович²,
Ившина Ирина Борисовна^{1,2}

¹«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» –
филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия

²ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный
исследовательский университет, г. Пермь, Россия

Ключевые слова: актинобактерии, *Rhodococcus*,
энантиомерный избыток, сульфоксиды

УВ загрязнения, оказывают значительное влияние на экосистемы, в которые попали тем или иным путем. Как правило, это влияние несет отрицательный характер, особенно для арктических экосистем, очень чувствительных к антропогенной нагрузке, ввиду медленно протекающих биологических процессов и скудного биологического разнообразия [1]. Для ликвидации нефтяных разливов целесообразно использовать комплексы разнообразных методов, важнейшим из которых является применение препаратов микроорганизмов-нефтедеструкторов. В настоящее время отечественные исследователи задаются вопросом выделения психротолерантных и психрофильных культур, способных утилизировать нефтяные загрязнения при низких температурах окружающей среды [2].

Цель работы - определение углеводород- и сульфидокисляющей активности штамма *Rhodococcus qingshengii* ИЭГМ 1359.

Штамм *Rhodococcus qingshengii* ИЭГМ 1359, выделен из образца грунта о. Ли Смита архипелага «Земля Франца-Иосифа» и депонирован в Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов [3,4]. Эксперименты по определению углеводород- и сульфидокисляющей активности проводили в 100 мл колбах Эрленмейера с 30 мл питательной среды. В качестве посевного материала использовали клетки родококков ($(5,0 \pm 0,7) \times 10^6$ кл/мл), выращенные на МПА и отобранные в экспоненциальной фазе роста. Культивирование бактерий осуществляли на орбитальном шейкере (160 об/мин) при температуре 18, 28 и 38°C. Определение углеводородокисляющей активности штаммов актинобактерий

проводили в минеральной среде «К» с добавлением дрожжевого экстракта – 0,1%, раствора микроэлементов по Постгейту – 1,0 мл/л и 3,0 об. % *n*-гексадекана. Культивирование микроорганизмов осуществляли в течение 3 сут. Определение сульфидоксидающей активности проводили в минеральной среде «К» с добавлением дрожжевого экстракта – 0,1%, раствора микроэлементов по Постгейту – 1,0 мл/л, 0,1 или 1,0 об. % *n*-гексадекана, 0,5 г/л фенолметилового сульфида в изопропанол в соотношении 1:10 в качестве косубстрата. Фенолметилсульфид в культуральную жидкость добавляли через 48 ч после начала инкубации. Продолжительность процесса биотрансформации актинобактериями модельного сульфида составляла 3 сут.

Определение углеводородоксидающей активности показало, что при 38°C штамм *Rhodococcus qingshengii* ИЭГМ 1359 малоэффективен и в течение 72 часов способен утилизировать не более 10% *n*-гексадекана. Понижение температуры инкубации до 28°C и 18°C приводит к резкому увеличению окислительной активности данного штамма. Через 72 часа эксперимента уровень биоконверсии модельного углеводорода составил 40%. В дальнейшем целесообразно проверить углеводородоксидающую активность данного штамма при температуре в диапазоне от +4°C до +18°C.

Сульфидоксидающую активность (0,5 г/л) штамма *Rhodococcus qingshengii* ИЭГМ 1359 проводили в условиях соокисления с *n*-гексадеканом (0,1 и 1,0 об.%). Обнаружено, что данный штамм проявлял высокую каталитическую активность вне зависимости от температурных условий. При соокислении фенолметилового сульфида с 0,1 об.% *n*-гексадекана уже через 24 часа в среде культивирования сульфид и продукты его окисления не регистрируются. Снизить сульфидоксидающую активность штамма *Rhodococcus qingshengii* ИЭГМ 1359 удалось путем увеличения концентрации *n*-гексадекана до 1,0 об%. В данных условиях через 72 ч. культивирования родококков уровень биоконверсии фенолметилового сульфида составил более 75% в целевой *R*-фенолметилсульфоксид с энантиомерным избытком > 99%, при этом фенолметилсульфон среди продуктов реакции не регистрировался.

Исследования поддержаны Министерством образования и науки Пермского края Соглашение № С-26/059, грантом РНФ 18-14-00140 и выполнены в рамках госзадания 01201353247.

Библиографический список

1. Кобышев В.Н., Сергунин А.А. Национальные интересы России в Арктике: мифы и реальность // Национальные интересы: приоритеты и безопасность. 2011. № 29. С.3.

2. Федоренко В.Н. Выделение и оценка биотехнологического потенциала микроорганизмов для утилизации нефтяных загрязнений северных морей: Дис. ... канд. биол. наук. М., 2016. 218 с.

3. Catalogue of Strains of Regional Specialized Collection of Alkanotrophic Microorganisms [Электронный ресурс] // URL: <http://www.iegmc.ru/strains/index.html> (дата обращения 20.08.2018).

4. Попов Л.А., Елькин А.А. Выделение углеводородокисляющих актинобактерий с Земли Франца-Иосифа // Материалы конференции «Фундаментальные и прикладные исследования в биологии и экологии», Пермь, 2018, С. 144-147.

АНТИБИОТИКОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КАК ТАКСОНОМИЧЕСКИЙ МАРКЕР ВИДОВОЙ ДИАГНОСТИКИ АКТИНОБАКТЕРИЙ РОДА *RHODOCOCCLUS*

Загуляева Ирина Юрьевна¹, Тудвасева Мария Сергеевна²,
Стед Татьяна³, Куюкина Мария Станиславовна^{1,2},
Ившина Ирина Борисовна^{1,2}

¹ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия

²«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» - филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия

³Оксфордский университет, г. Оксфорд, Великобритания

Ключевые слова: актинобактерии, *Rhodococcus*, идентификация бактерий, антибиотикочувствительность

Ядро ресурсного потенциала Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним коллекции ИЭГМ, номер во Всемирной федерации коллекций культур 768, www.iegmc.ru/iegmc) составляют актинобактерии рода *Rhodococcus*, занимающие доминирующее место в природных популяциях углеводородокисляющих микроорганизмов [1]. К одному из важных направлений деятельности коллекций микроорганизмов относится установление таксономической принадлежности включаемых в коллекционный фонд штаммов. Для эффективного различения родококков на уровне вида применим дополнительный дифференцирующий признак – антибиотикочувствительность.

Тестирование чувствительности к антибиотикам, как экспрессный таксономический метод, используется в тех случаях, когда генетические и иммунохимические анализы не оправданы из-за сложности постановки и высоких финансовых затрат [2].

Цель данного исследования – подбор надежного набора антибиотиков для дифференциации биотехнологически перспективных видов рода *Rhodococcus* и оценка его диагностических возможностей.

В работе использовали коллекционные штаммы видов *Rhodococcus globerulus* (3 штамма), *R. erythropolis* (5 штаммов), *R. opacus* (4 штамма), *R. qingshengii* (5 штаммов), *R. aetherivorans* (2 штамма), *R. rhodochrous* (5 штаммов), *R. ruber* (5 штаммов), *R. pyridinivorans* (2 штамма), поддерживаемых в Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов.

Выявление уровня антибиотикочувствительности актинобактерий осуществляли дискодиффузионным методом [3]. В качестве индикаторного набора использованы диски, пропитанные стандартными растворами антибиотических веществ (неомицина, олеандомицина, стрептомицина, оксациллина, эритромицина, цефалексина, линкомицина, гентамицина, канамицина, доксициклина, ванкомицина и налидоксовой кислоты). Результаты учитывали на 3 сутки путем измерения (в миллиметрах) диаметра зоны ингибирования бактериального роста вокруг диска.

Установлено, что типовые штаммы *R. globerulus* ИЭГМ 591^T, *R. erythropolis* ИЭГМ 7^T, *R. opacus* ИЭГМ 716^T, *R. wratislaviensis* ИЭГМ 1112^T, *R. qingshengii* ИЭГМ 1016^T, обладающие схожими морфологическими признакам, проявляют резистентность к действию оксациллина, налидоксовой кислоты и высокую чувствительность (зона задержки роста более 25 мм) к ванкомицину и неомицину. В отношении олеандомицина высокую чувствительность проявили *R. globerulus*, *R. erythropolis*, *R. wratislaviensis* (диаметр зоны отсутствия роста >25 мм) и умеренную чувствительность – *R. opacus* (зона отсутствия роста 15-25 мм). Культуры *R. erythropolis*, *R. wratislaviensis* отличимы от *R. globerulus* по высокой чувствительности к стрептомицину, а между собой различаются по реакции с линкомицином. На фоне представителей исследованных видов родококков типовой штамм *R. qingshengii* проявляет устойчивость к олеандомицину и эритромицину.

Культуры *R. aetherivorans* ИЭГМ 911^T, *R. ruber* ИЭГМ 70^T, *R. pyridinivorans* ИЭГМ 1055^T, *R. rhodochrous* ИЭГМ 62^T продемонстрировали высокую чувствительность к неомицину, олеандомицину, стрептомицину, гентамицину и устойчивость в отношении налидоксовой кислоты. Типовые культуры *R. aetherivorans* и *R. ruber* с оранжевым недиффундирующим пигментом, различимы по оксациллину и цефалексину. Культуры

R. pyridinivorans ИЭГМ 1055^T, *R. rhodochrous* ИЭГМ 62^T, имеющие оранжево-красную пигментацию, различимы между собой по эритромицину, цефалексину, линкомицину и ванкомицину.

В тоже время, изучение большого набора (31 штамм) коллекционных культур выявило существенную гетерогенность исследуемых признаков антибиотикочувствительности у представителей видов *R. globerulus*, *R. erythropolis*, *R. opacus*, *R. qingshengii*, *R. rhodochrous* и *R. ruber*. Следовательно, степень антибиотикочувствительности родококков может служить лишь дополнительным критерием в полифазном подходе при определении видовой принадлежности свежевыделенных культур.

Исследования выполнены в рамках Госзадания № 6.3330.2017/4.3.

Исследования Т. Стед проводились в лаборатории алканотрофных микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН в рамках летней научной практики по экологической микробиологии для иностранных студентов.

Библиографический список

1. Ившина И. Б. Бактерии рода *Rhodococcus*: биоразнообразие, детекция, иммунодиагностика: Дис. ... д-ра. биол. наук. Пермь, 1997.
2. Осипенко М.А. Вероятностная модель антибиотиков типирования непатогенных актинобактерий // Российский журнал биомеханики. 2004. Том 8. № 2: 77-84.
3. Ившина И. Б. Большой практикум «Микробиология». СПб: Изд-во Проспект Науки, 2014. 112 с.

МИНЕРАЛЬНЫЕ И УГЛЕРОДНЫЕ ВОЛОКНА КАК НОСИТЕЛИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БИОПЛЕНОК ДЛЯ БИОКАТАЛИЗА И БИОЛОГИЧЕСКОЙ ОЧИСТКИ

Зорина Анастасия Сергеевна, Максимова Юлия Геннадьевна

*«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал
ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: биокатализатор, биопленки, базальтовое волокно, Карбопон-В-актив, амидазная активность, нитрилгидратазная активность

В настоящее время большое внимание уделяется биологическим методам синтеза разнообразных соединений и утилизации токсичных

веществ. Способность микробных клеток трансформировать органические вещества в более мягких по сравнению с химическими процессами условиях, а также стереоспецифичность их ферментов, простота и дешевизна использования микробных клеток позволяет выделить биокаталитические технологии в число приоритетных направлений.

В биокатализе и биологической очистке все чаще используются гетерогенные биокатализаторы на основе адгезированных бактериальных клеток, так как они обладают более стабильной активностью и повышенной устойчивостью к высоким концентрациям субстрата и продукта реакции по сравнению со свободными клетками в суспензии и химическими катализаторами [1]. Более того, использование адгезированных клеток в качестве катализаторов позволяет упростить технологическую схему трансформации.

Целью работы явилась оценка биокаталитического потенциала биопленок нитрилгидролизующих бактерий, выращенных на углеродных и базальтовых волокнах.

Объектом исследования являлись перспективные для биокатализа и биологической очистки штаммы *Alcaligenes faecalis* 2 и *Rhodococcus erythropolis* 11–2, обладающие выраженной амидазной активностью, и *Rhodococcus ruber* gt 1, обладающий нитрилгидратазной активностью.

Биопленки выращивали в течение 7 суток на базальтовом волокне (4 мкм, 10–15 мкм и 22 мкм в диаметре) и Карбопоне-В-актив при 30°C на минимальной солевой среде N. В качестве источника углерода для *R. erythropolis* 11–2 и *R. ruber* gt 1 использовали глюкозу, в качестве источника азота – ацетонитрил и NH_4Cl соответственно. Для *Al. faecalis* 2 в качестве источника углерода и азота использовали ацетамид. После 7 суток биопленки отмывали от среды калий-фосфатным буфером и использовали для трансформации акриламида.

Для штамма *R. erythropolis* 11–2 было показано, что биопленки, выращенные на базальтовом волокне 4 мкм и 10–15 мкм, к 24 часам реакции трансформировали 98% и 94% соответственно, тогда как свободные клетки в суспензии трансформировали только половину субстрата к 72 часам реакции (Рисунок). Биопленки *R. erythropolis* 11–2, выращенные на базальтовом волокне 4 мкм и 10–15 мкм, накапливали соответственно на 104% и 87% больше акриловой кислоты, чем свободные клетки в суспензии.

Акрилонитрил полностью трансформировался биопленками *R. ruber* gt 1, выращенными на базальтовом волокне 4 мкм и 10–15 мкм, к 1 часу реакции. Аналогичный результат был получен при трансформации акрилонитрила свободными клетками *R. ruber* gt 1 в суспензии. Это может быть связано со слабой адгезией клеток этого

вида к базальтовому волокну, что приводит к недостаточно массивным биопленкам.

Для штамма *Al. faecalis* 2 ощутимой разницы в скорости трансформации субстрата биопленками, выращенными на разных носителях, не наблюдалось. Однако анализ накопления продукта реакции показал, что и биопленки *Al. faecalis* 2, и свободные клетки в суспензии накапливают акриловую кислоту в реакционной среде до определенного момента, соответствующего исчерпанию субстрата, после чего начинают ее потреблять. Причем свободные клетки в суспензии накапливают на 42% и 80% больше кислоты, чем биопленки, выращенные на базальтовом волокне и Карбопоне-В-актив соответственно, и в меньшей степени используют кислоту для дальнейшего роста. Наименьшее количество кислоты осталось в среде с биопленками, выращенными на Карбопоне-В-актив, что может быть связано также с сорбционной емкостью носителя.

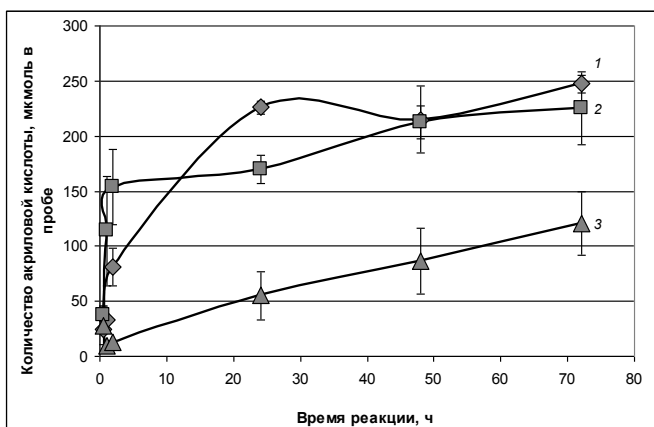


Рисунок. Накопление акриловой кислоты биопленками *R. erythropolis* 11–2, выращенными на базальтовом волокне 4 мкм (1) и 10-15 мкм (2), и свободными клетками в суспензии (3)

Таким образом, было показано, что для биокатализа в большей степени подходит биопленка *R. erythropolis* 11–2, выращенная на минеральном или углеродном носителе, или биопленка *R. ruber* gt 1, так как родококки быстрее трансформируют субстрат в продукт реакции. Для биопленок *R. ruber* gt 1 необходима дальнейшая оптимизация носителя.

Для целей биологической очистки наиболее перспективным биокатализатором является биопленка *Al. faecalis* 2, выращенная на Карбопоне-В-актив. Данный катализатор не только трансформирует

субстрат в продукт реакции, но и потребляет последний, что выгодно в условиях очистки вод от поллютантов.

Работа поддержана Комплексной программой Уральского отделения РАН, проект №18-3-38-2119, блок-проект 18-3-8-19 (№ 0422-2018-1136).

Библиографический список

1. Максимова Ю.Г., Горбунова А.Н., Зорина А.С. и др. Трансформация амидов адгезированными клетками родококков, обладающими амидазной активностью // Прикладная биохим. микробиол. 2015. Т. 51, № 1. С. 53–58.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ИЗУЧЕНИЮ МИКРООРГАНИЗМОВ ГЛУБИННОЙ ПОРОДЫ КАРНАЛЛИТА ВЕРХНЕКАМСКОГО МЕСТОРОЖДЕНИЯ СОЛЕЙ

Кашапова Лилия Эзхаровна¹, Пьянкова Анна Александровна²,
Корсакова Екатерина Сергеевна^{1,2}, Плотникова Елена Генриховна^{1,2}

¹*ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия*

²*«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: бактерии, археи, галофилы, карналлит, ПЦР

Верхнекамское месторождение калийно-магниевых и натриевых солей (ВКМКС) является одним из крупнейших месторождений в мире по запасам калийных солей. Соляные породы ВКМКС представлены каменной солью, сильвинитами и карналлитом. Карналлит, в свою очередь, является одним из главных калийных минералов и в месторождениях бессульфатного типа по степени распространения занимает второе место после сильвина. Такие соляные породы являются источником выделения галофильных микроорганизмов, которые в настоящее время вызывают огромный интерес, как с точки зрения фундаментальных исследований, так и практического использования [1].

Цель работы – исследование микроорганизмов в образце породы карналлита из залежей солей ВКМКС (Пермский край) молекулярно-генетическими методами.

Для изучения был взят образец породы карналлита (глубина 254,2-254,4 м), предоставленный сотрудниками «Горного института УрО РАН» (филиал ПФИЦ УрО РАН).

В исследуемом образце было определено содержание ионов Na^+ , K^+ , Ca^{2+} методом водной вытяжки (приготовленной согласно ГОСТу 26423-85) с последующей детекцией на атомно-абсорбционном спектрофотометре AA-6300 («Shimadzu», Япония), как описано [2]. Концентрация ионов Na^+ составила 1,52 г/л, K^+ - 77,32 г/л, Ca^{2+} - 4,92 г/л. Общая минерализация изучаемого образца карналлита, определенная согласно [3], составила 9,37 % солей.

С применением набора реактивов Fast DNA spin kit for soil («MP Biomedicals», Франция) из образца породы карналлита была выделена тотальная ДНК, которую далее использовали в качестве матрицы для ПЦР. С помощью прибора Qubit® Fluorometer («Invitrogen», США) и набора реактивов Quant-iT™ dsDNA BR Assay Kit («Invitrogen», США) была измерена концентрация выделенной ДНК, которая составила 6,76 мкг/мл.

В результате амплификации генов 16S рПНК бактерий (праймеры 27F/1492R) с выделенной тотальной ДНК был получен ПЦР-продукт (размер около 1450 п. н.). Также была проведена амплификация фрагментов генов 16S рПНК архей (праймеры 344F/915R), в результате которой получен ампликон искомого размера (около 570 п.н.).

Для оценки количества бактерий в образце породы карналлита проводили ПЦР в реальном времени (праймеры Eub338F/Eub518R) [4] с использованием набора реактивов 2X Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix («Thermo Scientific», США) на приборе «CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection Systems» («Bio-Rad Laboratories», США). Для стандартной калибровочной кривой, а также для анализа кривых плавления ДНК (температуры плавления (T_m) дуплекса ДНК), был использован образец очищенной геномной ДНК штамма *Rhodococcus* sp. KT112-7 из коллекции Лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии «ИЭГМ УрО РАН». Установлено, что в исследуемом образце карналлита присутствуют бактериальные гены 16S рПНК в количестве $(1,17 \pm 0,29) \times 10^5$ копий гена на 1 г образца. Методом анализа кривых плавления ДНК была установлена T_m исследуемой ДНК, равная 81,3°C, что на 2,7°C ниже T_m геномной ДНК грамположительного штамма *Rhodococcus* sp. KT112-7 (контрольная ДНК). Данное обстоятельство позволяет предположить, что нуклеотидный состав анализируемой ДНК значительно отличается составом GC-пар от контрольной ДНК и может указывать на доминирование грамотрицательных бактерий в микробном сообществе образца карналлита.

В жидкой модифицированной среде ATCC 213 «*Halobacterium* medium» (200 г/л NaCl) и богатой среде Раймонда (50 г/л NaCl)

получены накопительные культуры (НК). Материал для получения НК был взят из толщи образца исследуемой породы в стерильных условиях. Культивирование проводилось в течение 3 недель на термокачалке при температуре 28°C. Из суспензии НК методом щелочного лизиса выделяли ДНК. На матрице выделенной ДНК также были получены ампликоны фрагментов генов 16S рРНК бактерий (праймеры 27F/1492R) и архей (праймеры 109F/958R), что подтверждает наличие микроорганизмов в исследуемом образце карналлита.

Таким образом, с применением молекулярно-генетических методов впервые показано, что в породе карналлита (глубина 254,2-254,4 м) из залежей солей ВКМКС, присутствуют микроорганизмы – представители доменов *Bacteria* и *Archaea*.

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер госрегистрации темы: 01201353247.

Библиографический список

1. Buried alive: microbes from ancient halite / S.T. Jaakkola et al. // Trends Microbiol. 2016. V. 24(2). P. 148-160.
2. Разнообразие бактерий семейства *Halomonadaceae* района разработок Верхнекамского месторождения солей / Е.С. Корсакова [и др.] // Микробиология. 2013. Т. 82. № 2. С. 247-250.
3. Практикум по агрохимии: учебное пособие / под ред. В.Г. Минеева. М.: МГУ, 2001. 689 с.
4. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays / N. Fierer et al. // Applied and Environmental Microbiology. 2005. V. 71 (7). P. 4117-4120.

ОБЕСПЕЧЕННОСТЬ ПИТАТЕЛЬНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ ВЛИЯЕТ НА ДИНАМИКУ ПЕРСИСТООБРАЗОВАНИЯ В ПЕРИОДИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЕ *ESCHERICHIA COLI*

Кашеварова Наталья Михайловна, Ткаченко Александр Георгиевич

*«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал
ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: персистенция, скорость роста, генная экспрессия

Способность бактерий выживать при летальном действии антибиотиков связана как с генетически закрепленной антибиотикорезистентностью, так и с персисторным фенотипом.

Персистерный фенотип характеризуется ненаследуемой антибиотикотолерантностью, которая обусловлена замедлением скорости метаболических процессов и переходом клеток в дормантное состояние, что приводит к отсутствию активных мишеней для антибиотика [1, 2]. Выживание персистерных клеток зависит от их физиологического состояния, важной характеристикой которого в экспоненциально растущих культурах является скорость роста. Скорость роста бактерий, определяющая такие важные параметры как содержание РНК-полимераз и рибосом, влияет на экспрессию генов, наряду со специфическими регуляторными механизмами [3]. Способность бактерий расти с разными скоростями зависит как от физических параметров (температура, pH и т.д.), так и от качественного и количественного состава питательных веществ в среде культивирования.

Целью работы является сравнительное изучение динамики персистообразования *Escherichia coli* на разных питательных средах, исследование взаимосвязи этого показателя со скоростью роста бактерий и изучение связи между скоростью роста и экспрессией генов, принимающих участие в формировании персистерного фенотипа.

Штамм *E. coli* BW25114 культивировали на минеральной среде М-9, содержащей 0.4 % глюкозы, и в богатой среде (LB-бульон). Пробы отбирали каждые 2 часа в экспоненциальной фазе роста, а далее с 24-часовыми интервалами для определения общего числа культивируемых клеток и персистеров, толерантных к 2.8 мкг/мл аминогликозида нетилимина. Частоту персистообразования определяли как отношение числа персистеров к общей численности культивируемых клеток на момент отбора образцов. Экспрессию исследуемых генов оценивали по активности фермента бета-галактозидазы в клетках полученных нами штаммов *E. coli*, несущих слияния с репортерным геном *lacZ*. Коэффициент ранговой корреляции Спирмена (R) использовали для оценки взаимосвязи между изучаемыми признаками.

В периодической культуре штамма *E. coli* BW25114 изучена динамика образования клеток, толерантных к нетилимину, в LB-бульоне и среде М-9 с глюкозой в течение 72 часов культивирования. Показано, что в фазе раннего экспоненциального роста ($OD_{600} \approx 0.13$) число персистерных клеток было одинаково в разных средах и составляло 10^{-4} клеток/мл, что свидетельствует о том, что частота проявления персистерного фенотипа является относительно постоянной величиной для данного штамма при разведении стационарной культуры свежей средой (независимо от ее состава).

Важная роль метаболизма в персистообразовании подтверждается тем, что доступность питательных веществ оказывает влияние на уровень персистенции [2]. Проведенные нами эксперименты демонстрируют различную динамику образования персистерных

клеток в изучаемых средах. В богатой среде число толерантных клеток в экспоненциальной фазе роста сохранялось на первоначальном низком уровне с последующим ростом в стационарной фазе и достижением максимального значения к 72 часам культивирования. В минимальной среде после 4-часовой лаг-фазы за последующие 4 часа наблюдался резкий рост числа персисторных клеток на 3 порядка до максимума к 8 часам культивирования. В 24-часовой культуре их количество сохранялось на этом же максимальном уровне с последующим снижением в стационарной фазе.

Наблюдаемое различие в динамике персистообразования можно объяснить разными скоростями роста культур в средах, различающихся по качественному и количественному составу питательных веществ. Установлена высокая отрицательная связь ($R=-0,9$, $p<0,05$) между частотой персистенции и удельной скоростью роста для экспоненциально растущей культуры в минимальной среде. Однако в богатой среде связь между этими признаками отсутствует, поскольку образование персисторов индуцируется лишь после полной остановки роста.

С помощью нокаутных мутаций и *lacZ*-слияний было показано, что гены *rmf*, *yqiD* (ответственные за инактивацию рибосом) и *rpoS* (регулятор общего стрессового ответа), положительно модулируемые полиаминами, оказывают влияние на персистообразование в стационарной фазе роста [4]. Выявлена отрицательная зависимость экспрессии генов *rmf*, *yqiD*, *rpoS* от удельной скорости роста в среде LB.

Таким образом, состав питательных веществ в среде культивирования является важной характеристикой, определяющей скорость роста бактерий, что, в свою очередь, влияет на генную экспрессию и динамику персистообразования в периодической культуре *E. coli*, подтверждая важную роль метаболизма в формировании персисторного фенотипа.

Работа выполнена в рамках государственного задания (номер госрегистрации темы: 01201353249) и в рамках Комплексной программы УрО РАН (номер госрегистрации темы: АААА-А18-118030790046-9).

Библиографический список

1. Radzikowski J.L., Schramke H., Heinemann M. Bacterial persistence from a system-level perspective // Current Opinion in Biotechnology. 2017. Vol. 46. P. 98–105.
2. Amato S. et al. The role of metabolism in bacterial persistence // Frontiers in Microbiology. 2014. Vol. 5: 70.
3. Klumpp S., Hwa T. Bacterial growth: global effects on gene expression, growth feedback and proteome partition // Current Opinion in Biotechnology. 2014. Vol. 28. P. 96–102.

4. Tkachenko A., Kashevarova N., Tyuleneva E., Shumkov M. Stationary-phase genes upregulated by polyamines are responsible for the formation of *Escherichia coli* persister cells tolerant to netilmicin // FEMS Microbiology Letters. 2017. Vol. 364, № 9: fnx084.

ИЗУЧЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БИОПЛЕНОК РЕЗИСТЕНТНЫХ К АНТИБИОТИКАМ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ *PROPIONIBACTERIUM ACNES* К НОВЫМ КАТИОННЫМ ПЕПТИДАМ СЕМЕЙСТВА ЛАНТИБИОТИКОВ

Коробов Владимир Павлович^{1,3}, Полюдова Татьяна Вячеславовна^{1,2},
Ерошенко Дарья Владимировна^{1,4},
Лемкина Лариса Марковна¹

¹*«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия*

²*Пермский государственный аграрно-технологический университет им. ак. Д.Н. Прянишникова, г. Пермь, Россия*

³*Пермский национальный исследовательский политехнический университет, г. Пермь, Россия*

⁴*«Институт технической химии УРО РАН» - филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: пропионовые бактерии, биопленки, антибиотикорезистентность, лантибиотики

Цель исследований - анализ чувствительности устойчивых к рифампицину и тетрациклину пропионовых бактерий в планктонных культурах и биопленках к новым катионным пептидам семейства лантибиотиков.

Выделенные из сред культивирования бактерий *Staphylococcus warneri* KL-1 и *Staphylococcus hominis* KLP-1 низкомолекулярные катионные пептиды варнерин и хоминин были использованы для изучения чувствительности к ним бактерий штамма *P. acnes* VKM Ac-50 (VKM, Пущино) и его производных – *P. acnes* VKM Ac-1450 Rif^r и *P. acnes* KM Ac-1450 Tet^r, резистентных, соответственно, к рифампицину и тетрациклину. Анализ устойчивости бактерий к выделенным пептидам проводили согласно МУК 4.2.1890-04, а их адгезивных свойств - по уровням сорбции клеток на гидрофильных поверхностях стекла и гидрофобных поверхностях полистирола. Количество бактерий, оккупирующих поверхности использованных материалов и в

составе формируемых ими биопленок, определяли после окрашивания препаратов 0,1% генциан-виолетом, просматривая не менее 10 полей зрения на микровизоре «µ-Viso-103» (Россия) при увеличении X 1000, а также фотометрической детекцией оптической плотности спиртовых экстрактов пленок, используя планшетный спектрофотометр «Benchmark plus» (США). Степень гидрофобности поверхностей сорбирующихся бактерий оценивали с помощью МATH-теста с н-гексадеканом.

Результаты. Формирование устойчивости пропионовых бактерий к тетрациклину и рифампицину приводит к повышению их сорбционной активности, способствующему возрастанию адгезии бактериальных клеток на гидрофобной поверхности полистирола с быстрым формированием на ней биопленочных структур. Показано, что чувствительность исследованных антибиотикоустойчивых штаммов пропионовых бактерий к обоим пептидам сохранялась на уровнях, характерных для их родительских вариантов. Важно отметить, что бактерии резистентных штаммов обладали более выраженными, по сравнению с бактериями родительских штаммов, способностями к адгезии и образованию биопленок, развитие которых в значительной степени подавлялось внесением в среды культивирования каждого из выделенных нами новых низкомолекулярных катионных пептидов семейства лантибиотиков.

Выводы. Новые пептиды семейства лантибиотиков варнерин и хоминин в значительной степени ингибируют развитие планктонных культур и формирование биопленок чувствительных и резистентных к тетрациклину и рифампицину штаммов пропионовых бактерий, что, по-видимому, может быть эффективно использовано для подавления колонизации этими бактериями характерных экологических ниш.

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер госрегистрации темы 01201353249 и Комплексной программы исследований Уро РАН, проект № 18-7-8-8.

ГАЛОТОЛЕРАНТНЫЕ БАКТЕРИИ-ДЕСТРУКТОРЫ АРОМАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ РОДА *PSEUDOMONAS*

Корсакова Екатерина Сергеевна^{1,2}, Истомина Анастасия Васильевна¹,
Плотникова Елена Генриховна^{1,2}

¹ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный
исследовательский университет, г. Пермь, Россия;

²«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» –
филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия

Ключевые слова: *Pseudomonas*, галотолерантные бактерии,
ароматические соединения, деструкция

В настоящее время все более перспективным методом очистки природных экосистем от загрязнения различными моно(поли)ароматическими соединениями (АС) является использование микроорганизмов-деструкторов. Микробная деструкция АС в ряде случаев может лимитироваться экстремальными факторами среды, в частности, одним из таких факторов является засоление почв и водоемов [1, 2]. Уникальными экологическими условиями (засоление и загрязнение токсичными органическими соединениями) характеризуется промышленная зона разработок Верхнекамского месторождения солей Пермского края [3].

Цель работы – поиск активных бактерий-деструкторов, осуществляющих разложение АС в условиях повышенной минерализации среды, среди группы нативных протеобактерий рода *Pseudomonas*, выделенных с территории солеразработок Верхнекамского месторождения солей.

Из шести образцов техногенно-минеральных образований соледобывающего предприятия ПАО «Уралкалий» (г. Березники, Пермский край), а также трех образцов ризосферы растений, произрастающих в непосредственной близости от солеотвалов (г. Соликамск, Пермский край) было выделено в чистую культуру 23 штамма бактерий рода *Pseudomonas*. На основании филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК было установлено, что все изоляты имеют наибольшее сходство с типовым штаммом ближайшего родственного вида *Pseudomonas xanthomarina* КММ 1447^T (номер в базе данных GenBank AB176954) [4]. Уровень сходства генов 16S рРНК изолятов с типовым штаммом находился в пределах 98.6-99.2%.

Сравнительная характеристика BOX-ПЦР профилей фрагментов геномной ДНК исследуемых бактерий, полученных при ДНК-типировании [5], показала, что 23 изолята отличаются между собой и формируют 10 различных геномогрупп. У представителя каждой сформированной геномогруппы были изучены биодеградационные свойства.

В результате проведенных исследований был обнаружен наиболее активный штамм-деструктор *Pseudomonas* sp. КТ1.311, обладающий широкой субстратной специфичностью и способный использовать в качестве единственного источника углерода и энергии такие соединения, как нафталин, бифенил, *орто*-фталевую, бензойную, *пара*-гидроксibenзойную, протокатеховую, салициловую кислоты, а также толуол и дибутилфталат. Было установлено, что штамм *Pseudomonas* sp. КТ1.311 способен к эффективному росту на агаризованной среде как без добавления NaCl, так и с повышенной концентрацией соли (до 70 г/л). Штамм рос при значении pH от 6.0 до 9.0. Проведенные генетические исследования показали, что в клетках штамма *Pseudomonas* sp. КТ1.311 присутствуют плазмиды небольшого размера (1 - 8 т.п.н.).

Таким образом, скрининг штаммов рода *Pseudomonas* (близкородственных виду *Pseudomonas xanthomarina*), выделенных из района промышленных солееработок (Пермский край), позволил выявить галотолерантный штамм *Pseudomonas* sp. КТ1.311 - активный деструктор фталатов и моно(поли)ароматических углеводов, перспективный для дальнейшего изучения и использования при создании новых биотехнологий ремедиации территорий с высокой минерализацией и контаминацией токсичными ароматическими соединениями.

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер госрегистрации темы: 01201353247.

Библиографический список

1. Влияние техногенного засоления почвы на бактериальные сообщества ризосферы растений мятлика лугового (*Poa pratensis* L.) / А.В. Назаров [и др.] // Вестник Пермского Университета. Серия: Биология. 2017. Вып. 4. С. 435-440.
2. Деструкция ароматических углеводов штаммом *Rhodococcus wratislavensis* КТ112-7, выделенным из отходов соледобывающего предприятия / Д.О. Егорова [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. 2013. Т. 49. № 3. С. 267-278.
3. Бачурин Б.А., Одинцова Т.А., Хохрякова Е.С. Углеводородные маркеры органического вещества солей Верхнекамского месторождения // Проблемы минералогии, петрографии и металлогении. Научные чтения памяти П.Н.

Чирвинского: сб. науч. ст. Перм. гос. нац. исслед. ун-т. Пермь, 2016. Вып. 19. С. 315-323.

4. *Pseudomonas xanthomarina* sp. nov., a novel bacterium isolated from marine ascidian / L.A. Romanenko et al. // Journal of General and Applied Microbiology. 2005. V. 51. № 2. P. 65-71.

5. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction / J. Versalovic et al. // Methods in Molecular and Cellular Biology. 1994. V. 5(1). P.25-40.

ВЫДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИЙ И ГРИБОВ – ФИТОПАТОГЕНОВ КАРТОФЕЛЯ И МОДЕЛИРОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ НА ИХ РОСТ СОЛЕНАСЫЩЕННОЙ АТМОСФЕРЫ

Литасова Алёна Сергеевна^{1,2}, Некрасова Елена Витальевна²,
Максимов Александр Юрьевич^{1,2}

¹*«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» –
филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия*

²*ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный
исследовательский университет, г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: аэроионы, влажность, калийная соль, ПЦР-анализ, фитопатогены картофеля, хранение картофеля

Известно подавление роста бактериальных и грибковых культур - патогенов человека в условиях соленасыщенной атмосферы и насыщения воздуха аэроионами в присутствии природных калийных солей Верхнекамского месторождения. Этот эффект уже используется для лечения различных заболеваний дыхательных путей [1]. Такие свойства соленасыщенной атмосферы представляются перспективными и для применения в процессе хранения овощей, в частности, картофеля, в сельском хозяйстве [2].

Для моделирования такого процесса выделены изоляты фитопатогенных микроорганизмов методом прямого высева на селективные среды из клубней картофеля с признаками характерных заболеваний - фитофтороза, фомоза, мокрой гнили и др. Образцы зараженных клубней картофеля урожая 2016 года были отобраны в хозяйстве ООО «Труженик» Краснокамского района. По данным анализа распределения фитопатогенов картофеля в урожае 2017 года в Пермском крае на инфекционных агентов, количество клубней, пораженных болезнями, составляло 10,2% от исследованного. Общее

количество клубней в объединенной пробе составляло 8000 шт. В том числе: Фитофтороз 0,02 %; Ризоктониоз 0 %; Обыкновенная парша 0,02 %; Серебристая парша 0 %; Мокрая гниль 3,15 %; Сухая гниль (фузариоз) 5,12 %; Сухая гниль (фомоз) 1,86 %; Черная ножка 0 %; Кольцевая гниль 0,05 %; другие 0 %.

Таким образом, наибольшее распространение в структуре инфекционных заболеваний клубней картофеля урожая 2017 года, показали грибные инфекции - фузариоз и фомоз, а также бактериальная мокрая гниль. Незначительную долю составил фитофтороз, распространение которого в сезоны с более высокой степенью увлажнения часто очень велико.

Для определения вида болезни: мокрая гниль, фузариоз, фомоз, ризоктониоз, обыкновенная парша были использованы две основные среды – картофельный агар и среда Чапека. Идентификация изолятов проводилась методами полифазной таксономии в соответствии с определителем Берджи и руководством Bergey Manual. Точная идентификация бактерий - фитопатогенов проводилась методами ДНК-диагностики, с помощью ПЦР-анализа генов и последующего секвенирования 16S рДНК. Для ПЦР-анализа генов 16S PNH и секвенирования генов применяли праймеры 27F AGAGTTTGATCCTGGCTCAG и 1391R GACGGGCGGTGWGTRCA.

Для идентификации фитопатогенных грибов проводилось определение морфологических признаков, в т.ч. особенностей конидиогенеза. Для детекции исследуемых грибов-фитопатогенов в смешанном материале использовали известные ПЦР-системы (Hussain et al., 2014; Khan et al., 2017; A'Hara, 2015; Selim et al., 2015; Egamberdiev et al., 2014; Xu et al., 2016).

В результате были выделены бактериальные культуры: *Ralstonia solanacearum*, *Streptomyces scabies*, *Clavibacter michiganensis*, а также культуры грибов – *Phoma exiqua*, *Fusarium oxysporum* и *Phytophthora infestans*.

Проведено первичное моделирование свойств атмосферы и условий хранения в условиях специальной климатической камеры. Определено влияние соленасыщенной атмосферы на рост изолированных культур фитопатогенов с оценкой степени подавления роста. Для этого в герметичные камеры с линейными размерами 200×240×110 мм (объемом 5,28 л) помещали культуры фитопатогенов, посеянные на картофельный агар. В камере создавали соленасыщенную атмосферу за счет продувки воздухом через колоночный фильтр размерами l=200 мм, d=24 мм, заполненный просеянной фракционированной солью с размером частиц в диапазоне 0,5–1 мм. Исследовали рост культур на чашках Петри с солью в 3-х вариантах:

- скорость потока воздуха через фильтр с солью 1 л/мин;
- скорость потока воздуха через фильтр с солью 0,1 л/мин;

- в герметичной камере без вентиляции (с солью в открытой чашке Петри).

Для учета возможного влияния циркуляции воздуха на рост микроорганизмов на поверхности чашек Петри в контрольных вариантах создавали аналогичные условия воздухообмена:

- скорость потока воздуха через камеру 1 л/мин;
- скорость потока воздуха через камеру 0,1 л/мин ;
- в герметичной камере без вентиляции.

Учитывали количество выросших колоний по сравнению с контрольным вариантом.

В результате проведенных экспериментов показано, наличие соли приводит к подавлению роста (снижению КОЕ) фитопатогенов, притом в случае циркуляции воздуха эффект усиливается и составляет до 24,6% для культуры *Pseudomonas solanacearum* при скорости потока 1 л/мин. Наименьшее влияние среди бактериальных культур показано на культуре стрептомицетов (13,4% при скорости потока 1 л/мин). Также обнаружено, что в циркуляция воздуха является фактором, приводящим к снижению КОЕ исследуемых культур, максимально – до 15,9% в случае *Pseudomonas solanacearum*.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ №17-45-590657.

Библиографический список

1. Красноштейн А.Е., Папулов Л.М., Битинская Л.Н., Исаевич А.Г. Использование в экологических целях природных калийно-натриевых солей Верхнекамского месторождения. // Экологическая технология. - 1998 -№1-2. – С. 5 –9.

2. Накаряков Е.В. Перспективы использования воздушной среды, контактирующей с калийными солями, для хранения сельскохозяйственной продукции. // Стратегия и процессы освоения георесурсов: Сб. науч. трудов. – Пермь: ГИ УрО РАН, 2017. – Вып.15. – С. 310 – 313.

СЕЛЕКЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ, МЕТАБОЛИЗИРУЮЩИХ ОРГАНИЧЕСКИЕ НИТРОСОЕДИНЕНИЯ

Литасова Алёна Сергеевна^{1,2}, Павлова Юлия Андреевна^{1,2},
Шилова Анна Владимировна^{1,2}, Максимов Александр Юрьевич^{1,2}

¹ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия

²«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия

Ключевые слова: биокатализ, биоочистка, биотрансформация, нитросоединения, нитротолуол, нитроцеллюлоза, ГНТ

Известно, что способность к биодegradации нитроцеллюлозы и других органических нитратов встречается у различных таксономических групп бактерий и грибов [1,2]. Для получения активных биодеструкторов нами проведена селекция культур бактерий, способных к быстрой биодegradации нитроорганических соединений. В качестве сред для выделения исследовались образцы промышленных стоков и природных вод карстовых озер и чистых рек, техногенно-измененных грунтов, а также природных супесчаных дерново-луговых и подзолистых почв. В результате отбора получены штаммы микроорганизмов, обладающие высокой биодegradативной активностью по отношению к нитроцеллюлозе и ароматическим нитросоединениям. В частности, высокой активностью обладали штаммы *Pseudomonas fluorescens* N-17, N19 и *Pseudomonas putida* N-26, а также *R. erythropolis* N-4 и N-14, эффективно утилизирующие нитробензолы и нитроцеллюлозу, которые были выделены из стоков производства нитроцеллюлозы, г. Пермь.

Несмотря на то, что большинство органических нитросоединений – загрязнителей окружающей среды имеет техногенное происхождение, достаточно большое количество бактерий, способных использовать эти вещества, высевалось из чистых природных почв и вод, не контактирующих с техногенными органическими нитратами нитросоединениями.

В частности, из карстового озера Молебное, были выделены штаммы *Pseudomonas* sp. N52, N53, быстро утилизовавшие коллоксилин и по активности превосходящий многие известные биодеструкторы [3]. Также установлено, что природные почвы содержат большое количество разнообразных культур прокариот, способных утилизировать ароматические нитраты. Однако скорость их биодegradации в целом была ниже по сравнению с изолятами из промышленных стоков.

Это может быть обусловлено отчасти тем фактом, что в открытых системах возможен перенос микроорганизмов из сред, имеющих техногенные загрязнения, а также возможностью переноса следовых количеств нитроорганических соединений. Однако результаты нашего исследования показывают, что очевидной причиной распространения таких систем метаболизма представляется наличие в природных средах некоторых количеств структурных аналогов техногенных загрязнителей, таких, как различные азотсодержащие метаболиты растений и почвенной микрофлоры, а также продукты распада лигнина, в том числе, его абиогенной деструкции. И, как известно, природные среды, в том числе богатые почвы, вследствие

высочайшего метаболического разнообразия, являются богатейшим источником продуцентов самых разнообразных ферментов. Установлено, что большинство бактериальных культур - активных трансформантов обладало нитроредуктазной активностью. Активность нитроэстеразы (по работе обнаружена лишь у двух изолятов), не проявлявших в условиях модельных экспериментов высокой скорости биодegradации.

Также выделены сообщества микроорганизмов, осуществляющие в анаэробных условиях восстановление нитрата из нитрогрупп ароматических соединений до аммония, органических аминов и амидов.

Проведен метагеномный анализ сред, из которых проводился отбор активных культур: техногенно-измененных сред (производственные стоки пермских химических предприятий, использующих нитросоединения, техногенно-измененные грунты предприятий), а также и естественных сред – карстовых озера, рек, не имеющих существенных химических загрязнителей (Сюзьва, Нытвенский р-н), природных супесчаных дерново-луговых и подзолистых почв. Установлено, что наиболее уникальным является состав метагенома природных карстовых водоемов, а также микроценозов промышленных стоков, содержащих "нитротела". В результате метагеномного анализа установлено, что большая часть выявляемых бактерий в естественных водоемах относится к филе *Proteobacteria* – 61%, представленной в большей мере классом *Betaproteobacteria* (37,5% общей численности), классом *Alphaproteobacteria* (10,3% общей численности), классом *Deltaproteobacteria* (5% общей численности), классом *Gammaproteobacteria* (2% общей численности), классом *Epsilonproteobacteria* (0,1% общей численности). класс *Betaproteobacteria* представлен порядками *Burkholderiales* (8% общей численности), семейством *Comamonadaceae* (5,6% общей численности); порядком *Gallionellales*, семейством *Gallionellaceae* (7,2% общей численности) и порядком *Rhodocyclales*, семейством *Rhodocyclaceae* (5% общей численности).

Значительная часть выявленных прокариот относилась к филам: *Bacteroidetes* (14,7% общей численности), *Cyanobacteria* (0,4% общей численности), *Acidobacteria* (1,1% общей численности), *Chlorobi* (0,6% общей численности). Аналогичные скрининговые и метагеномные исследования для биодеструкторов нитросоединений и микроценозов, их содержащих, отсутствуют в научной литературе.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ №16-44-590359.

Библиографический список

1. Duran M., Kim B.J., Speece R.E. Anaerobic biotransformation of nitrocellulose // Waste Management. – 1994. – V. 14 (6). – P. 481-487.
2. Auer N., Hedger J.N., Evans C.S. Degradation of nitrocellulose by fungi // Biodegradation. – 2005. – V.16 (3). – P.229-236.
3. Саратовских Е.А., Щербакова В.А., Яруллин Р.Н. Деструкция нитрованной целлюлозы грибами *Fusarium solani* // Прикл. биохим. микробиол. – 2018. – Т.54, № 1. – С. 55-62.

МИКРОБНАЯ БИОДЕГРАДАЦИЯ ДРЕВЕСНЫХ ОТХОДОВ

Максимов Александр Юрьевич^{1,2}, Шилова Анна Владимировна^{1,2},
Литасова Алёна Сергеевна^{1,2}, Павлова Юлия Андреевна^{1,2},
Колесова Ольга Владиславовна³

¹ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия.

²«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия

³Sapienza University of Rome, Rome, Italy

Ключевые слова: биодеструкция, кородревесные отходы, целлюлолитические бактерии, целлюлазы

Биодеструкция отходов растительного происхождения является фундаментальным биологическим процессом, занимающим одно из центральных мест в круговороте органических веществ в природе, позволяющим гетеротрофам использовать полимерный органический субстрат, образуемый фотосинтезирующими макроорганизмами. Способностью к деструкции высокомолекулярных компонентов древесины обладают различные прокариоты и грибы. Некоторые микроорганизмы эффективно осуществляют биодеструкцию кородревесных отходов (КДО) в аэробных условиях, но существует и множество анаэробных форм [1].

Несмотря на широкое распространение в природе ферментных систем, позволяющих утилизировать растительное сырьё, серьёзной экологической проблемой является накопление большого количества КДО целлюлозно-бумажной и деревообрабатывающей промышленностью [1,2].

Цель работы – исследование условий среды и микробиологических процессов в материале КДО, а также выделение микроорганизмов-деструкторов компонентов КДО.

Ранее предполагалось, что материал короотвала средней мощности способен полностью гумифицироваться с образованием грунтоподобных образований в течение нескольких десятков лет. В таком случае нижние слои короотвала такого возраста могут быть уже в высокой степени переработаны. В ходе настоящей работы, в мае 2018 г. было проведено бурение короотвала Краснокамского ЦБК Пермского края с отбором проб материала из пластов разной глубины, его химический и микробиологический анализ. Бурение проводилось в 6 точках короотвала до достижения природного грунта. Максимальная зафиксированная мощность короотвала (глубина слоев КДО до достижения грунтовой основы) составляла 19 м. Образцы КДО в количестве 1-2 кг были отобраны в каждой из 6 скважин с глубин 10, 30, 50, 100 см, а далее с шагом в 50 см. В результате исследования показано, что в теле короотвала на глубинах 8-9 м наблюдается нахождение водоносных пластов, а материал с глубин порядка 18 м во время отбора проб был полностью обводнен. Проведенные исследования показали, что природные процессы биодеструкции в реальных условиях, особенно в обводненных пластах, идут значительно медленнее, чем предполагается в литературных источниках. В частности, часть материала толщи короотвала возрастом более 50 лет, поднятого из скважины с глубины 18 м, в условиях обводнения была почти не подвержена разрушению, сохраняла природную структуру, прочностные характеристики и желтоватый цвет древесины.

Таким образом, очевидно, что интенсификация природных процессов биодеструкции КДО является высокоактуальной задачей. С учетом мирового опыта на наш взгляд решением данной задачи является комбинация микробиологических и технологических подходов:

- оптимизация минерального состава и кислотности среды в пластах КДО;
- интенсификация массообменных процессов, включая принудительную аэрацию и увлажнение;
- применение микроорганизмов-биодеструкторов целлюлозы, гемицеллюлозы, лигнина, смолистых веществ и др.;
- применение микроорганизмов-деструкторов интермедиатов, ингибирующих процессы утилизации и гумификации КДО;
- создание искусственных сообществ биодеструкторов

Анализ образцов проб короотвала показал, что материал, извлеченный с глубины до 1,5 м демонстрирует слабокислые значения рН в диапазоне 5,5-6,9, что, очевидно, связано с протеканием аэробных микробиологических процессов, сопровождающихся закислением.

Материал с глубин 1,5-2,5 м показал нейтральные значения pH, а с глубин 3 и более метров имеет кислотность среды в диапазоне от 7,3 до 8,1 (среднее 7,8).

Объектами исследования являлись культуры, выделенные из проб кородревесных отходов Краснокамского короотвала, взятых на разной глубине, на минеральной среде N, pH 7,5 [3] с карбоксиметилцеллюлозой и целлюлозой в качестве селективных субстратов, способные к росту в аэробных условиях. Для подсчета бактерий-биодеструкторов выделение проводили методом прямого высева из поверхностных слоев короотвала, отобранных с глубины 10, 30 и 100 см. В исследуемых образцах обнаружено высокое количество бактерий, обладающих целлюлолитической активностью ($7,8 \times 10^8$ КОЕ/г – $6,3 \times 10^9$ КОЕ/г) и порядка $2,9 \times 10^8$ КОЕ/г – $9,7 \times 10^8$ лигнолитиков.

В результате проведенного отбора изолировано 12 культур бактерий, проявляющих высокую целлюлолитическую активность, а также 8 культур с высокой лигнолитической активностью, представляющих интерес для формирования сообществ. Проводятся исследования по оптимизации среды с помощью микродобавок источника фосфора, азота и микроэлементов, количество которых в КДО недостаточно для их активного развития.

Работа выполнена в рамках проекта МИГ, финансируемого Министерством образования и науки Пермского края соглашение № С-26/796 от 21.12.2017.

Библиографический список

1. Марьиновская Ю.В. Микробиологическая деструкция целлюлозосодержащих отходов / Ю.В. Марьиновская, Н.Н. Севастьянова // Микробиология. 2006. № 3. С. 75 – 81.
2. Лиштван И.И. Отходы целлюлозно-бумажной промышленности и утилизации их в земледелии. Часть I / И.И. Лиштван, А.М. Абрамец, Ю.Г. Янута и др.// Природопользование. - 2012. - №21. С. 229-236.
3. Максимов А.Ю. Влияние нитрилов и амидов на рост и нитрилгидратазную активность штамма *Rhodococcus* sp. gt1 / А.Ю. Максимов и др. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2003. – № 1. – С. 63–68.

БАКТЕРИИ ЩЕЛОЧНЫХ БИОТОПОВ АНТРОПОГЕННОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ, ГИДРОЛИЗУЮЩИЕ НИТРИЛЫ И АМИДЫ

Максимова Юлия Геннадьевна^{1,2}, Мулазянова Элина Эдуардовна²,
Максимов Александр Юрьевич^{1,2}

¹*«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия*

²*ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: экстремофилы, экстремотолерантные бактерии, биокатализ нитрилов, амидазная активность, нитрилгидратазная активность

Щелочные биотопы с высоким содержанием солей являются источником выделения экстремофильных и экстремотолерантных микроорганизмов, которые представляют большой интерес для биотехнологического использования [1]. Штаммы микроорганизмов-продуцентов гидролитических ферментов, выдерживающие экстремальные условия, могут быть востребованы в различных отраслях биотехнологической промышленности. При этом работы, посвященные изучению нитрилгидролизующих бактерий щелочных биотопов крайне немногочисленны [2].

В связи с этим, целью настоящей работы явилось изучение биоразнообразия нитрилгидролизующих бактерий содового шламохранилища антропогенного происхождения, их способности к росту в щелочной среде при высоких концентрациях NaCl.

Из образцов шламохранилища содового завода (ОАО "Сода") г. Березники Пермского края были выделены бактериальные изоляты на агаризованной минеральной среде (pH 7,2 и 0,05% NaCl) с 10 мМ ацетамидом или 0,25% (об./об.) ацетонитрилом в качестве единственных источников углерода и азота. Экстремальные значения pH и концентраций NaCl в сочетании с данными источниками питания не способствовали выделению культур. Микроорганизмы выделяли из осадка шламохранилища (ОШ), техногенного поверхностного образования на месте осушенного содового озера (ССОЗ) с подразделением образцов на поверхностные (ССОП), 5 см (ССОЗ₅) и 10 см (ССОЗ₁₀) глубины. Выделенные культуры пересеивали на жидкую

минеральную среду с ацетамидом или ацетонитрилом и поддерживали на агаризованной минимальной среде с теми же субстратами.

Выделенные изоляты были протестированы на способность к росту на среде с pH 9 и 11, а также с содержанием NaCl от 5 до 200 г/л. Урожай биомассы выражали в мг сухих клеток/мл. Результаты показаны в таблице.

Таким образом, изоляты, выделенные на среде с ацетамидом или ацетонитрилом в качестве единственного источника углерода, но в условиях нейтральной среды и с содержанием NaCl в пределах физиологических концентраций, проявляли устойчивость к экстремально высоким концентрациям соли (15-20% в среде) и высокому pH. Особый интерес представлял изолят ОШ2_{аци}, урожай биомассы которого на нейтральной среде с 0,5% NaCl составил 0,7 мг/мл, тогда как при концентрации соли 20% и pH 7 вырос до 9,5 мг/мл, а при pH 11 и 0,05% NaCl составил 7,25 мг/мл.

Таблица

Урожай клеток при росте изолятов на минеральной среде с различными концентрациями NaCl и pH

Изолят	Биомасса, мг/мл									
	рН 7							рН 9	рН 11	
	Концентрация NaCl в среде, г/л									
	5	10	25	50	100	150	200	0,5	0,5	
	Ацетамид-утилизирующие									
ССО31 _{аа}	0,9	0,75	2,95	4,35	4,05	5,45	5,20	1,45	1,05	
ССО32 _{аа}	0,65	0,75	1,85	1,75	1,60	3,10	6,45	1,10	1,00	
ССО3104 _{аа}	0,60	1,05	2,50	1,75	4,70	11,3	2,55	1,30	0,65	
ССОП2 _{аа}	0,30	0,70	1,10	2,65	5,15	9,50	5,30	0,25	1,25	
	Ацетонитрил-утилизирующие									
ССО32 _{ацин}	1,15	1,10	0	2,10	4,40	6,20	12,10	0,80	0,95	
ССО352 _{ацин}	0,50	1,20	1,65	4,30	11,4	11,2	14,05	1,60	0,50	
ССОП _{ацин}	0,20	1,45	1,20	7,3	8,15	5,20	21,15	1,05	0,60	
ОШ2 _{ацин}	0,70	0,85	1,85	2,35	2,75	5,45	9,50	0,75	7,25	

Такие показатели указывают на экстремофилию данного изолята, что неудивительно, т.к. источником выделения служили содовые осадки шламохранилища, имеющие pH 11 и содержание Ca и Na 743,6 и 2,2 г/кг соответственно. Изолят ССОП_{аци} являлся галофилом, но не

алкалофилом: в среде с 20% NaCl и pH 7 он накапливал биомассу в количестве 21 мг/мл, тогда как с 0,5% NaCl - лишь 0,2 мг/мл, а при pH 11 - 0,6 мг/мл.

Вычислена амидазная и нитрилгидратазная активность изолятов при трансформации акриламида и акрилонитрила соответственно, продукты реакции определены методом ВЭЖХ. Амидазная активность изолятов, выделенных на среде с ацетамидом, составила от 0,3 до 3,3 ммоль/г/ч. Наибольшая нитрилгидратазная активность, равная 5,33 мкмоль/мг/мин, была отмечена у изолята CCO3₅₂acc, который являлся галофилом. Биомасса данного изолята при росте на минеральной среде увеличивалась от 0,5 до 14 мг/мл при возрастании концентрации NaCl от 0,5 до 20%.

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер госрегистрации темы 01201353247.

Библиографический список

1. Biotechnology of Extremophiles. Advances and Challenges / Ed.: P. H. Rampelotto // Springer International Publishing: Switzerland, 2016. 720 p.

2. Sorokin D.Yu., van Pelt S., Tourova T.P., Takaichi S., Muyzer G. Acetonitrile degradation under haloalkaline conditions by *Natronocella acetinitrilica* gen. nov., sp. nov. // Microbiology. 2007. V. 153. P. 1157–1164.

СПОСОБЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКРИЛАМИДА В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ

Максимова Юлия Геннадьевна^{1,2},

Мочалова Елена Михайловна², Демаков Виталий Алексеевич^{1,2}

¹*«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия*

²*ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: акриламид, биосенсор

Акриламид – непредельное органическое соединение, высокотоксичное реакционно-способное вещество, являющееся сырьем для крупнотоннажного синтеза акриловых полимеров. В последнее время акриламид привлекает большое внимание в связи с его обнаружением в продуктах при термообработке [1]. Акриламид

является канцерогенным, репро-, гено- и нейротоксичным соединением для животных и человека. Он может проникать через неповрежденную кожу, слизистые оболочки, дыхательные пути и желудочно-кишечный тракт.

Высокая токсичность и широкое распространение этого вещества требует разработки методов его быстрого определения в окружающей среде и пище. Традиционно акриламид в средах может быть определен методами жидкостной и газовой хроматографии, однако это требует специального аналитического лабораторного оборудования. Альтернативным способом определения акриламида могут являться биосенсорные технологии. Разработан ряд биосенсоров на акриламид, основанных на снижении генерации тока при обратимой конверсии Fe(II)/Fe(III) иммобилизованным гемоглобином при взаимодействии с акриламидом [2]. Разработан электрохимический биосенсор на акриламид, содержащий ДНК [3]. Как альтернатива может быть предложена разработка биосенсора на основе клеток микроорганизмов, что позволит быстро и специфично количественно определять этот токсический агент. Например, это потенциометрический биосенсор на основе интактных клеток бактерий, содержащих амидазу [4]. Нами ранее были изучены амидазосодержащие бактерии, которые в дальнейшем могут быть использованы как биоселектирующий агент такого биосенсора [5, 6]. Также для выявления общей токсичности веществ может быть использована бактериальная люминесценция.

Нами было изучено влияние времени воздействия акриламида в концентрациях от 10 до 1500 мМ на люминесценцию *E. coli* K12 TG1 (pXen7) (Рисунок).

При сравнении с данными научной литературы, касающимися воздействия различных токсикантов на биосенсор на основе люминесцирующих бактерий, можно заключить, что акриламид не является сильно токсичным веществом для бактерий. Так, для *Photobacterium phosphoreum* было показано, что ЕС₅₀ за 15 мин для тяжелых металлов составляет от 0,02 до 5 мг/л, ДДТ 7, фенола 22, анилина 64 мг/л [7]. По нашим данным, 50% снижение люминесценции *E. coli* K12 TG1 (pXen7) за 15 мин наблюдалось при концентрации акриламида 300 мМ, что соответствует 21300 мг/л. Токсичность акриламида (ЕС₅₀) по отношению к дафниям и другим водным беспозвоночным составляет 98 мг/л (48 ч). Следовательно, токсический эффект акриламида проявляется, главным образом, по отношению к эукариотам, а не прокариотам.

Таким образом, использование люминесцентных бактерий в качестве биоиндикатора загрязненных сред не всегда целесообразно, т.к. чувствительность прокариотов и эукариотов к различным токсичным веществам может значительно различаться, что было показано на примере акриламида. Кроме того, многие токсиканты

подавляют свечение, и этот метод не позволит определить акриламид в смеси веществ. Все вышесказанное указывает на необходимость дальнейшей разработки эффективных биосенсоров на акриламид.

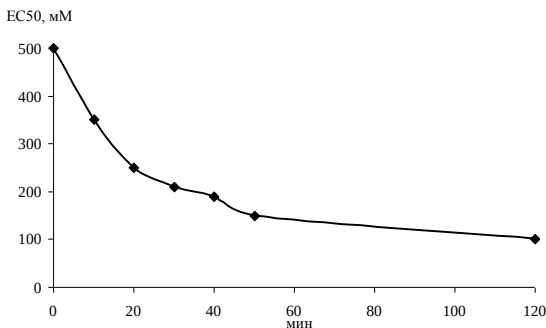


Рисунок. Зависимость 50%-ного тушения свечения *E. coli* K12 TG1 (pXen7) от времени экспозиции с акриламидом

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер госрегистрации темы 01201353249.

Библиографический список

1. Duda-Chodak A. et al. Interactions between acrylamide, microorganisms, and food components – a review // Food Funct. 2016. V. 7. N. 3. P. 1282–1295.
2. Batra B. et al. An acrylamide biosensor based on immobilization of hemoglobin onto multiwalled carbon nanotube/copper nanoparticles/polyaniline hybrid film // Analytical Biochemistry 2013. V. 433. P. 210–217.
3. Li D. et al. Label-free Electrochemical Biosensor for Acrylamide Based on DNA Immobilized on Graphene Oxide-Modified Glassy Carbon Electrode // Int. J. Electrochem. Sci. 2014. V. 9. P. 7217–7227.
4. Silva N. et al. Biosensor for acrylamide based on an ion-selective electrode using whole cells of *Pseudomonas aeruginosa* containing amidase activity // Biocat. Biotrans. 2009. V. 27. N. 2. 143–151.
5. Максимова Ю.Г. и др. Трансформация амидов адгезированными клетками родококков, обладающими амидазной активностью // Прикладная биохим. микробиол. 2015. Т. 51, № 1. С. 53–58.
6. Максимова Ю.Г. и др. Биodeградация акриламида и акриловой кислоты планктонными клетками и биопленками *Alcaligenes faecalis* 2 // Прикладная биохим. микробиол. 2018. Т. 54, № 2. С. 158–164.
7. Куц В.В. и др. Билюминесцентный мониторинг экотоксикантов (Экологическая люминометрия) // Вода: химия и экология. 2011. №10. С. 47–53.

МИКРОБНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ НАЗЕМНЫХ СОЛЯНЫХ СООРУЖЕНИЙ ПЕРМСКОГО КРАЯ

Маммаева Марьям Гасангусейновна¹, Кириченко Лариса Викторовна¹,
Шишкин Михаил Андреевич², Шерстобитова Наталья Петровна²,
Кузнецова Марина Валентиновна^{1,2}

¹ФГБОУ ВО «Пермский медицинский университет имени академика
Е.А. Вагнера» МЗ РФ, г. Пермь, Россия

²«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» –
филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия

Ключевые слова: наземные соляные сооружения, биоразнообразие, бактериологический метод, газовая хроматография–масс-спектрометрия (ГХ–МС)

Микробное разнообразие экосистем природных соляных пещер, солерудников, а также промышленных районов солеразработок активно изучается [1, 2, 3]. Благодаря особенностям микроклимата и бактериостатическому эффекту соли количество и видовой состав микроорганизмов в соляных шахтах существенно отличается от других биотопов. В наземных соляных сооружениях (НСС) проводится микробиологический мониторинг только воздушной среды, тогда как на абиотических поверхностях этих сооружений может формироваться специфический микробиоценоз, включающий патогенные/условно-патогенные бактерии, имеющих антропогенное происхождение.

Цель работы – изучить родо-видовой состав микробных сообществ соляных поверхностей сильвинитовых и галитовых наземных сооружений.

За период 2017-18 гг. исследованы образцы проб из 10 НСС, включающих 7 сильвинитовых и 3 галитовых сооружения. Пробы ($n=71$, не менее шести для каждой камеры) отбирали с соляных поверхностей ($S=0,5 \text{ м}^2$) сухим способом. Высевы проводили на универсальные, селективные агаризованные среды и оценивали уровень бактериальной обсемененности по общему микробному числу, количеству стафилококков. Идентификацию выделенных микроорганизмов осуществляли согласно Приказу МЗ СССР №535 от 22.04.1985 г. Реконструирование таксономического состава проводили методом газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (ГХ–МС) согласно [4].

© Маммаева М.Г., Кириченко Л.В., Шишкин М.А., Шерстобитова Н.П.,
Кузнецова М.В., 2018

Абиотические соляные поверхности всех НСС были контаминированы микроорганизмами. Количество положительных проб варьировало от 20% до 100%, в среднем составил 76,1%, при этом выявлена достоверная разница между сильвинитовыми (86,5%) и галитовыми (47,4%) сооружениями. Численность бактерий также оказалась выше в сильвинитовых ($4,97E+03 \pm 1,32E+04$ КОЕ/мл/м²), чем в галитовых ($1,74E+02 \pm 1,68E+02$ КОЕ/мл/м²) НСС. Уровень обсемененности стафилококками в сильвинитовых сооружениях составил 55,8% ($3,11E+02 \pm 2,32E+02$ КОЕ/мл/м²), тогда как в галитовых – 10,5%, данный микроорганизм был обнаружен только в двух пробах. Большинство изолированных бактерий принадлежали к виду *Staphylococcus epidermidis*, в пяти НСС обнаружен *S. aureus*, в единичных пробах – *S. warneri*, *S. saprophyticus*, *S. simulans*, *S. cohnii urealyticum*.

По данным ГХ–МС, в отличие от метода прямого посева, общее количество микроорганизмов было существенно выше: $1,84E+08 \pm 7,73E+07$ и $1,46E+08 \pm 6,46E+07$ клеток/мл/м² в сильвинитовых и галитовых НСС соответственно, и достоверно не различалось. Анализ видового состава позволил определить представителей 18 родов, относящихся к трем филумам. Актинобактерии (*Actinomyces*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Propionibacterium*, *Rhodococcus* и др.) были доминирующими в обеих группах: 81,2% в сильвинитовых и 91,1% в галитовых сооружениях. Среди фирмикутов в сильвинитовых НСС преобладали представители рода *Clostridium* – 63,8%, тогда как в галитовых их было в два раза меньше – 32,1%. Содержание кокковой микробиоты было на уровне 2-3% от общего количества микроорганизмов в обеих группах. Бактерии рода *Staphylococcus* обнаружены во всех НСС, *Streptococcus* – в семи из десяти. Протеобактерии выявлены почти в 30% проб, но их доля в микробном спектре не превышала 0,6%.

Метод ГХ–МС позволил реконструировать таксономический состав НСС. Идентифицированы представители 18 родов, отнесенные к филумам *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, доли которых не различались в двух группах. Согласно бактериологическому методу уровень общей обсемененности и контаминация стафилококками в сильвинитовых и галитовых сооружениях существенно различались. Это связано, в первую очередь, с коротким сроком эксплуатации и низкой наполняемостью лечебной зоны последних, хотя влияние минерального состава поверхностей также не исключено. Обнаружена высокая обсемененность соляных поверхностей актиномицетами и стафилококками, включая патогенный *S. aureus*, которые являются возбудителями оппортунистических инфекций, в том числе заболеваний верхних дыхательных путей.

Выявленные количественные и качественные показатели микробиоты НСС дополняют представления о структуре микробных сообществ в условиях высокой соляной нагрузки и антропогенного влияния.

Исследование выполнено в рамках государственного задания ГР № 01201353249.

Библиографический список.

1. Microbial diversity of saline environments: searching for cytotoxic activities / Diaz-Cardenas C. [et al.]. AMB Expr. 2017. V. 7. N1. P. 223.
2. The Santa Pola saltern as a model for studying the microbiota of hypersaline environments / Ventosa A. [et al.]. Extremophiles. 2014. V. 18. P. 811–824.
3. Ястребова О.В., Ананьина Л.Н., Пастухова Е.С., Плотникова Е.Г. Разнообразие бактерий, выделенных из района разработок месторождения калийных солей Верхнекамья. Вестник Пермского университета. 2009. Т. 10 №36. С. 124–129.
4. Верховцева Н.В., Осипов Г.А. Метод газовой хроматографии–масс-спектрометрии в изучении микробных сообществ почв агроценоза. Проблемы агрохимии и экологии. 2008. №1. С. 51–54.

АССОЦИАЦИЯ БАКТЕРИЙ ДЕСТРУКТОРОВ ЛИНДАНА (Г-ГЕКСАХЛОРЦИКЛОГЕКСАНА), ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ДЛИТЕЛЬНО ЗАГРЯЗНЕННОЙ ГЕКСАХЛОРЦИКЛОГЕКСАНОМ ПОЧВЫ

Назарова Эльмира Алиевна, Егорова Дарья Олеговна

*«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал
ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: линдан, деструкция, бактерии

Линдан (γ-гексахлорциклогексан) – пестицид из группы хлорорганических соединений, запрещенный к производству и применению на территории 153 стран [1]. Производство линдана началось в 1950-х годах, и достигло своего пика в период 1990-1995 гг (3222 т/год). В России производили неочищенный линдан в составе технической смеси изомеров гексахлорциклогексана. Широкое применение линдана, а также его захоронение привело к загрязнению обширных территорий [2, 3].

Во Франции, Германии, Японии и Индии из почв, загрязненных гексахлорциклогексаном выделены активные штаммы микроорганизмов, способные к деградации линдана. Данные штаммы принадлежат родам: *Sphingobium*, *Sphingomonas*, *Rhodanobacter*, *Pseudomonas* [4].

Цель настоящего исследования: выделение и изучение аэробной бактериальной ассоциации, осуществляющей деградацию линдана.

Культивирование микроорганизмов происходило на минеральной среде Раймонда [5] в аэробных условиях на термостатируемой качалке (Environmental Shaker-Incubator ES 20/60, «BioSan», Латвия) при 120 об/мин и +28°C.

Анализ метаболитов проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на приборе LC-20A Prominence (“Shimadzu”, Япония) с УФ-детектором (при 205 нм) и колонкой C18 (“Supelco”) в системе ацетонитрил – 0.1%-ная H_3PO_4 (70:30).

Определение остаточного содержания линдана в среде культивирования проводили в хлороформенном экстракте культуральной жидкости, на хроматомасс-спектрометре Agilent 6890/5973N (Agilent, США) [6].

Определение свободного хлора в культуральной жидкости проводили согласно [7].

Таксономическое положение изолированных штаммов проводили по результатам амплификации генов 16S рРНК с использованием бактериальных праймеров 27F и 1492R [6, 8].

Из длительно загрязненной гексахлорциклогексаном почвы, отобранной с территории бывшего предприятия по производству пестицидов ОАО «СВЗХ», г. Чапаевск, Самарской области, методом накопительного культивирования на минеральной среде с линданом нами была получена ассоциация микроорганизмов, осуществляющая полную утилизацию линдана (0,03%) за 6 месяцев. Численность микроорганизмов в ассоциации составляла 1×10^5 КОЕ/мл.

Морфологический анализ показал, что в составе ассоциации присутствуют колонии четырех морфотипов:

Тип I: колонии серые плоские с неровным краем, дающие скользящий рост, 5-10 мм.

Тип II: колонии белые круглые блестящие, 3-5 мм.

Тип III: колонии желтые круглые матовые, 3-4 мм.

Тип IV: колонии белые круглые блестящие, 1-2 мм.

Филогенетический анализ на основании последовательности 16S рРНК показал, что среди штаммов морфотипа I присутствуют представители рода *Pseudomonas*, морфотипа II – рода *Ochrobactrum*, морфотипа III – рода *Achromobacter*, морфотипа IV – рода *Agrobacterium*.

Установлено, что штаммы морфотипа II осуществляют начальные этапы биотрансформации линдана, о чем свидетельствует выделение в среду свободных ионов хлора и накопление первичного метаболита. Однако полной утилизации линдана данными штаммами не установлено.

Для штаммов морфотипа III было отмечено слабое образование ионов хлора, а у штаммов с морфотипом I и IV выделение ионов хлора при культивировании на линдане не зафиксировано. Вероятно, данные штаммы осуществляют разложение соединений, образующихся после дехлорирования линдана штаммами с морфотипом II.

Таким образом, выделена ассоциация аэробных бактериальных штаммов-деструкторов, эффективно разлагающих линдан, а также установлены трофические связи между штаммами внутри ассоциации.

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер госрегистрации темы: 01201353246.

Библиографический список

1. Стокгольмская конвенция о стойких органических загрязнителях. (Стокгольм, 22 мая 2001 г.) Доступ из справ.-правовой системы «ГАРАНТ» URL: <http://base.garant.ru/2561308>
2. Амирова З.К., Сперанская О.А. 2016. Новые стойкие органические супертоксиканты и их влияние на здоровье человека. М.: Эко-Согласие, 2016. 170 с.
3. Ежегодник. Состояние загрязнения пестицидами объектов природной среды Российской Федерации в 2015 году. Обнинск: Росгидромет. ФГБУ «ВНИИГМИ-МЦД», 2016. 72с
4. Lal et all. 2008. Pseudomonas sp. to Sphingobium indicum: a journey of microbial degradation and bioremediation of Hexachlorocyclohexane // Indian J. Microbiol. March 2008 V. 48. P. 3–18
5. Розанова Е.П., Назина Т.Н. Углеводородокисляющие бактерии и их активность в нефтяных пластах // Микробиология. 1982. Т. 51. С. 324-348
6. Egorova et all. Bioremediation of hexachlorocyclohexane-contaminated soil by the new Rhodococcus wratislaviensis strain Ch628 // Water Air Soil Pollution. 2017. V. 228. P. 183-199.
7. Tsoi T.V., Zaitsev G.M., Plotnikova E.G., Kosheleva I.A., Boronin A.M. // FEMS Microbiol. Lett. 1991. V. 81. №2. P. 165–169.
8. База данных ДНК Национального центра биотехнологической информации США (NCBI) // GenBank: официальный сайт. URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov> (дата обращения: 15.01.2018)

ПОЛИАМИНЫ СТИМУЛИРУЮТ БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЕ И ПРОДУКЦИЮ АУТОИНДУКТОРА-2 У ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

Негорелова Елизавета Вадимовна¹, Нестерова Лариса Юрьевна^{1,2},
Ткаченко Александр Георгиевич^{1,2}

¹ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный
исследовательский университет, г. Пермь, Россия

²«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» –
филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия

Ключевые слова: Quorum Sensing, аутоиндуктор-2,
люминесценция

Биопленкообразование и связанное с ним возрастание антибиотикорезистентности клинически значимых микроорганизмов является острой проблемой современной микробиологии и медицины. Несмотря на многочисленные исследования, механизмы, способствующие переходу бактерий от планктонного образа жизни к биопленкообразованию, по-прежнему, во многих аспектах остаются неясными. Известно, что эти процессы находятся под контролем систем, обеспечивающих межклеточную коммуникацию бактерий.

Quorum Sensing (QS) – широко распространенный в микробном мире механизм межклеточной внутри- и межвидовой коммуникации, который осуществляется за счет продукции клетками сигнальных молекул – аутоиндукторов (АИ). АИ воспринимаются другими клетками и обеспечивают согласованную экспрессию генов, запуская синтез ряда метаболитов, способствующих выживанию микроорганизмов в окружающей среде. Ген, кодирующий синтазу АИ-2, обнаружен в половине всех секвенированных геномов микроорганизмов. Супернатанты более 100 видов грамотрицательных и грамположительных бактерий обладают активностью АИ-2 [1], который принимает участие в регуляции люминесценции, биосинтеза антибиотиков и токсинов, подвижности, биопленкообразования, а также вирулентности у патогенных форм.

Ранее нами показано, что значительное влияние на процесс перехода свободно плавающих клеток *Escherichia coli* к роению и биопленкообразованию могут оказывать биогенные полиамины - клеточные поликатионы, выполняющие регуляторные и защитные функции при адаптации бактерий к различным неблагоприятным

воздействиям. Однако механизмы влияния полиаминов на эти процессы до конца не выяснены. Показано, что полиамины способны оказывать влияние на экспрессию некоторых генов, которые объединены в так называемый «полиаминовый модулон» и список этих генов постоянно пополняется.

Целью работы является изучение влияния полиаминов на продукцию АИ-2 и биопленкообразование грамотрицательных микроорганизмов.

В качестве объекта исследования использованы штаммы *E. coli* K 12, *Vibrio harveyi* BB120, *V. harveyi* BB152 (продуценты АИ-2) и *V. harveyi* BB170 (сенсор АИ-2). Штаммы-продуценты выращивали на среде Luria Bertani (LB) (с добавлением 2% NaCl для *V. harveyi* и полиаминов в соответствующих вариантах), сенсорный штамм культивировали на среде АВ [2]. Анализ активности АИ-2 проводили биOLUMиНесцентным методом путем добавления 10% бесклеточного супернатанта культуры штамма-продуцента к сенсорной культуре [3,4].

Биопленкообразование оценивали при росте на 96-луночных полистироловых планшетах с последующим окрашиванием генцианвиолетом.

Показано, что биогенные полиамины путресцин, кадаверин, спермидин и спермин при добавке в среду культивирования в концентрациях 0,1-5мМ не оказывали значительного влияния на рост культур *E. coli* и *V. harveyi*.

Присутствие в среде культивирования полиаминов значительно увеличивало биопленкообразование *V. harveyi*. Стимулирующий концентрационно-зависимый эффект наблюдался в присутствии в среде всех исследованных полиаминов, однако наибольший эффект оказывал спермин (стимуляция в 2,5 раза). Ранее подобный эффект полиаминов мы наблюдали в отношении *E. coli*. Таким образом, биогенные полиамины увеличивают биопленкообразование *E. coli* и *V. harveyi*.

Известно, что многие грамотрицательные микроорганизмы, в том числе *E. coli*, способны синтезировать путресцин, кадаверин и спермидин, в то время как спермин, преимущественно, продуцируется эукариотическими организмами, но может поступать в клетки прокариот и накапливаться там. Нами показано, что *V. harveyi* при росте на жидкой среде продуцирует и накапливает путресцин, кадаверин и спермидин в концентрациях до 50 мкмоль/мг сырой биомассы.

При исследовании влияния биогенных полиаминов на продукцию бактериальными клетками АИ-2 показано, что супернатанты, полученные из культуры, выращенной в присутствии ПА, обладали большей активностью, чем в их отсутствии. Стимуляция полиаминами продукции АИ-2 имела место как у *E. coli*, так и *V. harveyi*. Наибольший эффект оказывал спермин (увеличение свечения более чем в 4 раза).

Таким образом, полиамины стимулируют биопленкообразование грамотрицательных бактерий *E. coli* и *V. harveyi*. Влияние ПА на этот процесс может быть обусловлено стимулирующим действием на продукцию микроорганизмами АИ-2, под контролем которого находятся многие клеточные процессы, в том числе переход к формированию биопленки.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Администрации Пермского края в рамках научного проекта р_а 16-44-590279 и комплексной программы УрО РАН АААА-А18-118030790046-9.

Библиографический список

1. Henke J.M., Bassler B.L. Three parallel quorum-sensing regulate gene expression in *Vibrio harveyi* // J. Bacteriol. 2004. Vol. 186. P. 6902–6914.
2. Taga M.E., Bassler B.L. Chemical communication among bacteria // PNAS. USA. 2003. Vol. 100. P. 14549–14554.
3. Surette M.G., Bassler B.L. Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* // PNAS. USA. 1998. Vol. 95. P. 7046–7050.
4. Пшеничнов Р.А., Масленникова И.Л., Никитина Н.М. Экзометаболическая регуляция роста и свечения бактерий *Vibrio harveyi* BB170 при разной плотности популяции // Вестник пермского университета. Серия: Биология. 2010. №2. С. 15-18.

ВЛИЯНИЕ ПОЛИАМИНОВ НА ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЕНК И ПОВЕРХНОСТНЫЕ СВОЙСТВА *ESCHERICHIA COLI*

Нестерова Лариса Юрьевна, Ткаченко Александр Георгиевич

*«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал
ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: биопленка, полиамины, адгезия, дзета-потенциал

В последние годы большое внимание уделяется вопросам, связанным с формированием бактериальных биопленок и возможностью влияния на этот процесс [1].

Способность к биопленкообразованию во многом определяется межклеточными взаимодействиями, а на первых этапах зависит от физико-химических и электростатических взаимодействий между

клеткой и поверхностью [2]. Исходя из этого, можно предположить, что вещества способные изменять поверхностные свойства бактериальных клеток могут оказывать влияние на процесс формирования биопленок.

Известно, что биогенные полиамины, которые в большом количестве вырабатываются бактериальными и эукариотическими клетками, принимают участие в регуляции многих клеточных процессов, что во многом определяется особенностями их молекулярной структуры. При физиологических значениях pH полиамины протонированы по атомам азота, несут положительный заряд и посредством ионные взаимодействия могут связываться с отрицательно заряженными структурами клетки, в том числе компонентами клеточной стенки [3].

Целью работы является исследование влияния полиаминов на первичную адгезию и формирование биопленок, а также на свойства клеточной поверхности *Escherichia coli*.

Способность к биопленкообразованию определяли на 96-луночных полистироловых планшетах с последующей окраской биопленок генцианвиолетом. Адгезию бактерий исследовали на полистироловых чашках Петри с последующим окрашиванием и микроскопированием. Степень гидрофобности–гидрофильности бактерий определяли по адгезии клеток к гексадекану. Дзета-потенциал клеток измеряли с помощью Zetasizer Nano (Malvern Instruments UK)

Установлено, что добавка в среду биогенных полиаминов путресцина (Пт), кадаверина (Кд), спермидина (Сд) и спермина (См), а также их синтетического аналога диаминопропана значительно стимулировала биопленкообразование *Escherichia coli*. Наибольшим эффектом обладали спермидин и спермин (возрастание в 2 и 3 раза, соответственно).

Изучение влияния полиаминов на адгезию – первый этап формирования биопленок – показало, что присутствие поликатионов стимулировало этот процесс. Одновременно наблюдалось и возрастание агрегации клеток. В обоих случаях максимальный эффект оказывали спермидин и спермин. Таким образом, стимуляция биопленкообразования полиаминами частично обусловлена их влиянием на процесс адгезии бактериальных клеток к поверхности субстрата.

Способность бактерий к адгезии во многом определяется свойствами клеточной поверхности. С целью оценить влияние полиаминов на эту структуру мы исследовали изменение степени гидрофобности – гидрофильности и дзета-потенциала поверхности бактериальных клеток при культивировании в присутствии путресцина, кадаверина, спермидина и спермина.

При культивировании *E. coli* с добавлением в среду полиаминов статистически значимых изменений степени гидрофобности-

гидрофильности клеток не наблюдалось ни при одной из исследованных концентраций (от 0,1 до 5 мМ).

Присутствие в среде физиологических концентраций полиаминов изменяло дзета-потенциал клеток (контроль $-34,0(\pm 2,2)$; Пт $-31,03(\pm 3,9)$; Кд $-28,8(\pm 4,2)$; Сд $-23,7(\pm 2,6)$; См $-18,7(\pm 2,7)$).

Эффект был концентрационно зависимым и проявлялся уже через 10 минут после внесения полиаминов, достигая максимума через 30-60 минут.

Таким образом, полиамины стимулируют адгезию клеток к поверхности и биопленкообразование *E. coli*. Это может быть, по крайней мере частично, обусловлено влиянием биогенных поликатионов на поверхностные свойства клеток, которые определяют взаимодействие бактерий с поверхностью и межклеточные взаимодействия.

Исследование выполнено в рамках госзадания, номер госрегистрации темы 01201353249.

Библиографический список

1. Плакунов В.К., Мартянов С.В. Тетенева Н.А. Журина М.В. Управление формированием микробных биопленок: анти- и пробиопленочные агенты // Микробиология. 2017. Т. 86. № 4. С. 402-420.
2. Beloin C., Roux A., Ghigo J.M. Escherichia coli biofilms // Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2008. V. 322. P. 249-289.
3. Tabor C.W., Tabor H. Polyamines in microrganisms // Microbiol. Rev. 1985. V. 40. N 1. P. 81-99.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СПОСОБОВ АКТИВАЦИИ АУТОЛИЗИНОВ БАКТЕРИЙ *STARNYLOCOCCUS COHNII* ВКМ-3165

Отинов Георгий Дмитриевич¹, Филатова Любовь Борисовна²,
Коробов Владимир Павлович^{1,2}

¹*ФГБОУ ВО Пермский национальный исследовательский политехнический университет, г. Пермь, Россия*

²*«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: стафилококки, пептидогликангидролазы, аутолизины, варнерин, хоминин

Быстрое развитие резистентности бактерий к антибиотикам [1] определяет необходимость поиска новых эффективных соединений, обладающих антибактериальной активностью. В связи с этим, внимание исследователей привлечено к способам решения этой проблемы, в частности, к направленной активации комплекса гидролитических ферментов, участвующих в процессе деления клетки. [2]

В настоящей работе представлены результаты изучения биологической активности полученных различными способами лизатов бактерий с оценкой антибактериальных эффектов полученных препаратов.

Целью работы явилось выявление оптимальных условий активации компонентов аутолитических систем бактериальных клеток.

В качестве объекта исследований использовали бактерии *Staphylococcus cohnii* ВКМ-3165. Бактерии культивировали на жидкой среде LB в колбах на термостатируемом шейкере при температуре 37 °C и при перемешивании 150 об/мин.

Получение лизатов бактерий производили следующими методами: замораживанием-оттаиванием [3] с последующим растиранием бактериальной массы стеклянными шариками при различных уровнях кислотности среды при pH 6,4, 7,0, 7,6 и 8,0, а также тепловой обработкой тестируемого штамма в 2,3% растворе детергента додецилсульфата натрия (SDS) [2], а также лизисом бактериальных клеток в присутствии 3М LiCl. Не разрушенные бактериальные клетки удаляли центрифугированием при 13000 об/мин в течение 10 мин., а супернатант подвергали диализу в течение ночи против воды [3]. В специальных экспериментах для лизиса бактериальных клеток использовали катионные пептиды варнерин и хоминин, учитывая антибактериальные свойства этих лантибиотиков.

Наличие аутолитических ферментов в полученных лизатах бактерий определяли методом ренатурируемого электрофореза в 9% ПААГе. [2] Полученные препараты и лизаты тестировали на антибактериальную активность методом двукратных серийных разведений в 96-луночных полистироловых планшетах.

Как показали результаты электрофоретического анализа состава и активности пептидогликангидролаз, полученные лизаты бактерий характеризовались наличием белковых фракций, обладающих выраженной бактериолитической активностью, что свидетельствовало о том, что лизаты бактерий, полученные при действии на них катионных пептидов, обладают более высокой антибактериальной активностью по сравнению с лизатами бактерий, полученными другими способами.

Полученные данные указывают на необходимость проведения дополнительных экспериментов с целью изучения действия ферментативных компонентов лизатов не только на планктонные

бактерии рода *Staphylococcus*, но и на различные стадии формирования биопленок этих бактерий. Дальнейший анализ полученных лизатов методом ренатурируемого электрофореза в 9% ПААГе, с использованием при этом различных субстратов, по-видимому, позволит изучить новые биологические характеристики и выявить спектр действия аутолитических ферментов.

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер госрегистрации темы 01201353249 и комплексной программы исследований УрО РАН, проект № 18-7-8-8.

Библиографический список

1. Davies, J., & Davies, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2010, 74(3), 417–433. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>

2. Lepeuple, A. S., Van Gemert, E., & Chapot-Chartier, M. P. Analysis of the bacteriolytic enzymes of the autolytic *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strain AM2 by renaturing polyacrylamide gel electrophoresis: Identification of a prophage-encoded enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(11), 4142–4148.

3. Qoronfle, M. W., & Wilkinson, B. J. Effects of growth of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* in the presence of β -lactams on peptidoglycan structure and susceptibility to lytic enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1986, 29(2), 250–257.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ТЕХНОГЕННО-ЗАСОЛЕННЫХ АЛЛЮВИАЛЬНЫХ ПОЧВ

Пахоруков Иван Владимирович, Митракова Наталья Васильевна

*ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный
исследовательский университет, г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: аллювиальные почвы, техногенное засоление, технопедокомплекс

Засоленность – один из основных признаков неблагоприятного экологического состояния земель, поэтому увеличение ареалов засоленных почв, как вследствие природных процессов, так и в результате техногенного засоления является актуальной проблемой современности.

В Пермском крае ведется добыча калийных солей, которая неизбежно ведет к образованию промышленных отходов и

складированию их на поверхности, вследствие чего отмечаются очаги вторичного засоления почвенного покрова. Реальные масштабы и последствия продолжающегося техногенного засоления почвенного покрова в регионе не достаточно изучены.

Для оценки состояния почвенного покрова нами был использован метод выделения технопедокомплексов (ТПК) – комбинации почв и техногенных поверхностных образований в однородных элементах рельефа, одинаковых почвообразующих породах при сходном техногенном воздействии, предложенный О.З. Еремченко [1]. В долинах малых рек Прикамья, оказавшихся под воздействием подотвальных соленых вод и вод рассолоподъемных скважин, сформировались ТПК на аллювиальных породах; почвенные разности в них диагностированы на основе морфологического строения профиля и физико-химических свойств [2].

В поверхностных почвенных горизонтах ТПК содержание органического углерода варьировало от очень низкого (0,9%) и до высокого (9,8%) уровня из-за природных особенностей комплекса аллювиальных почв. Реакция почвенной среды находилась в диапазоне от резкокислых и до слабощелочных значений: $pH_{вод}$ от 3,98 до 8,2, $pH_{сол}$ – от 3,51 до 7,59. Около 50 % проб имели кислую реакцию, в том числе, сильнокислую, последнее характерно для глеезема хлоридного натриевого солончакового. Слабощелочную реакцию показал солончак вторичный сульфатно-хлоридный натриевый.

Содержание водорастворимых ионов натрия и хлора варьировало от минимальных значений (0,1-0,2 мг-экв/100 г) в аллювиальной гумусовой глееватой почве и до 250-400 мг-экв/100 г в солончаке вторичном сульфатно-хлоридном натриево-кальциевом.

Среди исследованных почв солончак вторичный сульфатно-хлоридный натриево-кальциевый по аллювиальной перегнойно-глеевой суглинистой почве выделился высоким содержанием гипса – до 19%. Для солончака вторичного сульфатно-хлоридного натриевого по аллювиальной гумусовой глеевой почве характерно значительно меньшее количество гипса (1-2%).

Степень ненасыщенности основаниями у аллювиальной гумусовой глееватой хлоридной натриево-магниев-кальциевой солончаковой почвы составила 29,4 %, при кислой реакции почвенной среды у нее сформировалась солонцеватость – 11,2 % от состава обменных катионов (Таблица).

Степень ненасыщенности основаниями у солончака вторичного сульфатно-хлоридного натриево-кальциевого по аллювиальной перегнойно-глеевой суглинистой почве заметно ниже; одновременно при сохранении почвенной кислотности проявляется солонцеватость по обмену на натрий. У этой почвы также заметно повышена доля обменного калия в почвенно-поглощающем комплексе.

Солончак вторичный сульфатно-хлоридный натриевый по аллювиальной гумусовой глеевой почве насыщен основаниями; при слабощелочной реакции почвенной среды степень солонцеватости у него максимальна –35,4% в слое 11-21 см и 37,8% в слое 27-40 см.

Таблица

Физико-химические и химические свойства верхних горизонтов
техногенно-засоленных почв

Почва	рН	Обменные катионы, мг-экв/100 г				
		$H^{+}+Al^{3+}$	Ca^{2+}	Mg^{2+}	K^{+}	Na^{+}
Аллювиальная солончаковая почва	4,8	5,6	8,0	3,0	0,4	2,1
Солончак сульфатно-хлоридно натриево-кальциевый	5,9	2,5	6,4	2,7	2,4	4,4
Солончак сульфатно-хлоридный натриевый	8,1	0	10,1	2,0	0,3	6, 8

Содержание органического углерода в почвах ТПК на аллювиальных породах варьировало в широких пределах в связи с природными особенностями комплекса аллювиальных почв.

В состав ТПК входят как резкокислые, так и слабощелочные почвы; на фоне почвенной кислотности содержались водорастворимые сульфаты, хлориды и гипс.

Солончак вторичный сульфатно-хлоридный натриево-кальциевый по аллювиальной перегнойно-глеевой суглинистой почве и аллювиальная гумусовая глееватая хлоридная натриево-магниевый-кальциевая солончаковая почва характеризовались ненасыщенностью основаниями и солонцеватостью по обмену натрию.

Библиографический список

1. Еремченко О.З., Митракова Н.В., Шестаков И.Е. Природно-техногенная организация почвенного покрова территории воздействия солеотвалов и шламохранилищ в Соликамско-Березниковском экономическом районе // Вестник Пермского университета. Серия Биология. 2017. Вып. 3. С. 311–320.

2. Классификация и диагностика почв России. Смоленск: Ойкумена, 2004. 341 с.

ДЕЙСТВИЕ КАТИОННЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА БИОПЛЕНКИ *MYCOBACTERIUM SMEGMATIS* MC² 155

Полюдова Татьяна Вячеславовна, Ерошенко Дарья Владимировна,
Коробов Владимир Павлович

«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал
ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия

Ключевые слова: микобактерии, биопленки, N-ацетилцистеин, пептиды, хитозан

Нетуберкулезные виды микобактерий (НТМБ), к которым относятся и *Mycobacterium smegmatis*, долгое время считались типичными сапрофитами человека. Однако в настоящее время все чаще диагностируются заболевания, вызванные бактериями этой группы, причем чаще всего у людей с ослабленной иммунной системой [1]. К инфекциям, связанных с образованием бактериальных биопленок на поверхности медицинских устройств, также могут быть причастны НТМБ. Ранее нами была показана возможность полного подавления роста планктонных культур *M. smegmatis* mc² 155 в присутствии антибактериальных катионных пептидов [2].

Целью настоящего исследования явилось изучение ингибирования развития биопленок НТМБ *M. smegmatis* mc² 155 антибактериальными катионными соединениями. Катионные пептиды варнерин и хоминин были выделены из сред роста стафилококков *Staphylococcus warneri* DSMZ 16081 и *S. hominis* ГИСК 284, соответственно [3, 4]. В работе использовали крабовый хитозан в форме гидрохлорида с мол. массой 200 кДа и степенью дезацетилирования 87% («Биопрогресс», Россия) и кватернизированный хитозан со степенью замещения 98%, полученный на основе хитозана с мол. массой 20 кДа методом алкилирования [5]. N-ацетилцистеин был получен в виде коммерчески доступного препарата «Флуимуцил® для инъекций» («Zambon», Италия). Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) соединений в отношении планктонной культуры *M. smegmatis* mc² 155 определяли стандартным методом двукратных серийных разведений. Для определения ингибирующего действия соединений на формирование биопленок *M. smegmatis* mc² 155, производили серию двукратных разведений соединений в лунках 96-луночного плоскодонного полистиролового планшета. Бактерии культивировали в течение 5 сут. Биопленки промывали 10 мМ натрий-

фосфатным буфером (рН 7,2) и окрашивали раствором МТТ («Sigma», США) (0,1 мг/мл), который вносили по 100 мкл в лунки планшета на промытые биопленки. Инкубировали при 37°C в течение 14 ч, затем в каждую лунку добавляли 100 мкл лизирующего раствора: 20% раствора твин-80 на 50%-ном этаноле и инкубировали в течение 2 ч. Оптическую плотность полученных экстрактов измеряли при длине волны 570 нм на спектрофотометре Benchmark Plus («Biorad», США). Минимальную концентрацию соединений, при которой не наблюдали видимого роста, принимали за минимальную ингибирующую концентрацию для биопленок (МБИК). Концентрацию соединений, при которой наблюдали ингибирование биопленкообразования на 50% (БИК₅₀), определяли по кривой, отражающей зависимость интенсивности образования биопленок *M. smegmatis* mc² 155 от содержания соединений в среде роста (доза-эффект) с помощью программы GraphPad Prism 6.0.

Как видно из таблицы, катионные пептиды наиболее эффективно ингибировали рост планктонной культуры *M. smegmatis* mc² 155 (МИК 4 мкг/мл), тогда как МИК N-ацетилцистеина был почти в 25 раз выше (МИК 98 мкг/мл). Считается, что клетки в биопленках становятся до 1000 раз более устойчивыми к антибактериальным факторам. Действительно, нами установлено, что для N-ацетилцистеина МИК и МБИК отличаются примерно в 100 раз, тогда как для катионных пептидов величина МБИК всего 4-8 раз превосходила МИК. Для исследованных хитозанов величины МБИК и МИК отличались в 1,6 и 10 раз. Интересно отметить, что в большинстве случаев БИК₅₀ была меньше, чем 0,5×МБИК. Данный факт может свидетельствовать о том, что при действии антибактериальных соединений количество живых клеток довольно быстро сокращается, однако, оставшаяся часть биопленок может функционировать вследствие образования персистеров или покоящихся форм.

Таблица

Действие катионных соединений на *M. smegmatis* mc² 155

	МИК, мкг/мл	МБИК, мкг/мл	БИК ₅₀ , мкг/мл
N-ацетилцистеин	98,0	12500,0	600,0
Варнерин	4,0	31,0	6,4
Хоминин	4,0	16,0	7,6
Хитозан	80,0	125	71
Хитозан кватернизированный	1,25	125	12

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о возможности ингибирования биопленок нетуберкулёзных микобактерий катионными соединениями и о перспективности их дальнейшего изучения.

Библиографический список

1. El Helou, G. Rapidly growing mycobacterial bloodstream infections / G. El Helou, G.M.Viola, R.Hachem, X.Y.Han, I.I. Raad // Lancet Infect. Dis. – 2013. – Vol. 13. – P.166-174.
3. Полюдова, Т.В. Антибактериальные эффекты стафилококцинов варнерина и хоминина на *Mycobacterium smegmatis* mc² 155 / Т.В. Полюдова, Н.О. Юркина, Д.В. Ерошенко, В.П. Коробов // Химия. Экология. Урбанистика. –2018. – Т. 1. – С. 614-617.
4. Полюдова Т.В. Оптимизация условий получения и моделирование 3D-структуры нового антибактериального пептида семейства лантибиотиков / Т.В. Полюдова, Л.М. Лемкина, Г.Н. Лихацкая, В.П. Коробов // Прикл. биохим. и микробиол. – 2017. – Т. 53. – № 1. – С. 47-54.
5. Патент РФ № 2428470, 16.02.2010.
6. Шагдарова, Б.Ц. Антибактериальная активность алкилированных и ацилированных производных низкомолекулярного хитозана / Б.Ц. Шагдарова, А.В. Ильина, В.П. Варламов // Прикл. биохим. и микробиол. – 2016. – Т.52. – №2. – С.237-241.

ДЕЙСТВИЕ ЭФИРНЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ МАСЕЛ НА СТАФИЛОКОККИ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ

Попова Иветта Владимировна^{1,2}, Полюдова Татьяна Вячеславовна^{1,2},
Пименова Елена Валентиновна²

¹«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия

²Пермский аграрно-технологический университет им. академика Д. Н. Прянишникова, г. Пермь, Россия

Ключевые слова: стафилококки, эфирные масла, фенольные соединения

Огромная часть продаваемых продуктов питания не требует термической обработки, кроме того, могут быть изготовлены посредством ручного труда. В связи с этим становится возможным распространение бактериальных патогенов из загрязненных продуктов питания среди потребителей [1]. Стремление людей к здоровому образу жизни мотивирует исследователей разрабатывать новые технологии,

которые могут продлить срок годности продуктов питания без использования консервантов. Приемы по сохранению годности продуктов, основанные на применении эфирных растительных масел, становятся все более и более популярным. Различные сочетания эфирных масел (ЭМ) в композиции с продуктами питания создают вкусную и ароматическую гармонию, улучшают кулинарное качество. Однако применение ЭМ позволяет не только улучшить органолептических свойства продукта, но защитить от микробной порчи.

Целью исследования явилось изучение чувствительности стафилококков, выделенных из пищевых продуктов, к эфирным растительным маслам.

В работе использовали 15 штаммов бактерий рода *Staphylococcus*, выделенных ранее из пищевых продуктов методом посева на селективный маннит-солевой агар [2]. Чувствительность бактерий к ЭМ определяли с использованием методом диффузии с диска. На поверхность зараженного ГРМ-агара накладывали бумажные диски (d-10мм), пропитанные 20 мкл ЭМ. В работе исследованы коммерческие препараты ЭМ: «Масло сосны» и «Масло эвкалипта» (ООО «Мирролла», Санкт-Петербург), а также ЭМ «Сосна обыкновенная», «Кедр атласский» и «Бергамот» (ООО «Ботаника», Москва). В исследуемых препаратах ЭМ определяли общее количество фенольных соединений. Для этого применяли перманганатометрический метод определения суммы фенольных (дубильных) веществ в пересчете на танин [3].

Проведенный анализ эффектов эфирных масел в отношении стафилококков, выделенных из продуктов питания, готовых к употреблению, выявил их высокую антибактериальную активность. Так, препарат ЭМ «Сосна обыкновенная» ингибировал рост бактериального газона всех исследованных штаммов стафилококков. К эфирному маслу «Бергамот» также были чувствительны практически все стафилококки, за исключением штаммов №11 и 13. Масло кедра атласского и «Масло эвкалипта» не оказывали ингибирующего действия на бактерии 5 исследованных штаммов стафилококков. Наименьшей антибактериальной активностью обладало «Масло сосны» от компании «Мирролла», к нему оказались устойчивы стафилококки 6 штаммов, в то же время бактерии остальных штаммов проявляли слабую чувствительность к этому препарату, диаметр зон подавления роста в большинстве случаев не превышал 15 мм. Наибольшей резистентностью к эфирным маслам обладали бактерии штаммов № 11 и 13 (к 4 из 5 исследованных масел). Стафилококки штаммов № 10 и 12 проявляли резистентность к 3 препаратам ЭМ.

Основными компонентами ЭМ являются соединения терпенового ряда, альдегиды, кетоны, спирты, сложные эфиры, а также

производные фенолов. Среди компонентов эфирных масел фенолы представлены в наибольшей степени после терпеноидов. Общее содержание фенольных соединений, выявленное в составе исследованных препаратов ЭМ, представлено в таблице. Наибольшее содержание фенольных соединений выявлено в ЭМ «Бергамот», «Кедр атласский» и «Сосна обыкновенная». Следует отметить, что именно эти масла обладали наиболее выраженной антибактериальной активностью в отношении пищевых стафилококков. В то же время, в препарате «Масло эвкалипта» обнаружено наименьшее из всех исследованных образцов, содержание фенольных соединений.

Однако, данное ЭМ эффективно подавляло развитие бактерий большей части исследованных штаммов. Известно, что эвкалипт в большом количестве содержит моноциклический терпен цинеол, который и обуславливает спектр биологической активности эфирного масла этого растения [4].

Таблица

Содержание фенолов в эфирных маслах

Препараты ЭМ	Содержание фенолов, %
«Масло сосны»	0,14 ± 0,02
«Масло эвкалипта»	0,03 ± 0,01
«Сосна обыкновенная»	0,25 ± 0,02
«Кедр атласский»	0,34 ± 0,03
«Бергамот»	1,09 ± 0,05

Проведенное исследование показало, что использование эфирных растительных масел может быть эффективным приемом для подавления развития бактерий рода *Staphylococcus*.

Библиографический список

1. Harada T., Taguchi M., Kawahara R., Kanki M., Kawatsu K. Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of Bacterial Pathogens in Ready-to-Eat Foods Retailed in Osaka Prefecture, Japan // Journal of Food protection. 2018. V. 81(9). P. 1450-1458.
2. Попова И.В. Антибиотикочувствительность стафилококков, выделенных из продуктов питания//Всерос. научно-практич. конф. "Молодежная наука 2018: технологии, инновации" 2018. С. 232-235
3. Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах. ОФС.1.5.3.0008.15. Гос. фармакопея РФ. XIII издание. Т. 2. 2015.
4. Sebei K., Sakouhi F., Herchi W., Khouja M.L., Boukhchina S. Chemical composition and antibacterial activities of seven Eucalyptus species essential oils leaves // Biological Research. 2015. V.48.

ЗАВИСИМОСТЬ ЭФФЕКТИВНОСТИ КОНВЕРСИИ ЭФИРОВ СВОБОДНЫМИ И ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ КЛЕТКАМИ ШТАММА *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS* ПЗ-8 ОТ СТАДИИ РОСТА КУЛЬТУРЫ

Ремезовская Наталья Борисовна, Максимов Александр Юрьевич

«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал
ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия

Ключевые слова: карбоксилэстераза, *Rhodococcus*, конверсия, иммобилизация, каталитический углерод

В настоящее время поиск новых высокоэффективных лекарственных средств, обладающих направленным действием и пониженной токсичностью, а так же биологически активных веществ, используемых для создания экологически чистых методов защиты растений, осуществляется среди природных соединений и их модифицированных или синтетических аналогов. Синтонами многих низкомолекулярных биорегуляторов являются различные оптически активные спирты [1].

Наиболее эффективными способами получения таких соединений в современном органическом синтезе считается кинетическое разделение их рацемических смесей с помощью препаратов гидролаз. В настоящее время применение в органическом синтезе нашли лишь некоторые коммерческие препараты липаз и карбоксилэстераз, которые не всегда удовлетворяют требованиям, предъявляемым к промышленным биокатализаторам. В связи с этим является актуальной разработка новых биокатализаторов для энантиоселективного гидролиза и синтеза оптически активных спиртов.

Целью работы являлось исследование зависимости карбоксилэстеразной активности в свободной и гетерогенной системе от стадии роста культуры.

Объект исследования - штамм *Rhodococcus erythropolis* ПЗ-8, обладающий карбоксилэстеразной активностью. Штамм был выделен из лесной антропогенно не загрязненной почвы Пермского района. В качестве модельной системы для изучения гидролиза эфиров карбоновых кислот использован гидролиз бутилацетата.

С целью выбора оптимального периода сбора активной массы биокатализатора определяли зависимость эстеразной активности изучаемой культуры от стадии роста на среде LB. Для этого отбирали пробы на 2, 3 (логарифмическая фаза роста), 4 (стационарная фаза) и 6

сутки роста (поздний стационар) и проводили биоконверсию 10 мМ бутилацетата.

Наибольшая удельная активность эстеразы наблюдалась у 3- и 4-суточной культуры, микроорганизмы, отобранные на 2 и 6 сутки роста, демонстрировали меньшую скорость гидролиза эфира. При этом количество образовавшегося в процессе конверсии бутанола у культур, выращенных в течение 2, 3 и 4 дней, было примерно одинаковое, в среднем 9.4 ± 0.3 мМ. На 6-суточной культуре выход бутанола к концу периода измерения (180 минут) составил 43.4 % от расчетного.

Известно, что эффективность иммобилизации бактериальных клеток на углеродных носителях зависит от гидрофобности клеточной поверхности. Клетки рода *Rhodococcus* обычно обладают высокой гидрофобностью. Однако этот признак вариабелен, различается у разных штаммов, а также может изменяться внутри одной культуры на разных стадиях роста. Ранее при иммобилизации на каталитический волокнистый углерод (КВУ) штамма *R. erythropolis* 10л наблюдали линейное уменьшение гидрофобности клеточной поверхности в течение роста культуры, что сопровождалось пропорциональным снижением количества адсорбированных клеток [2]. Аналогичное исследование проведено для штамма ПЗ-8. Иммобилизацию проводили на 2, 3, 4 и 6 сутки роста. Обнаружили, что высокая сорбционная активность клеток штамма *R. erythropolis* ПЗ-8 (84-93%) сохраняется на протяжении всего периода роста и не снижается даже на стадии глубокого стационара.

Провели анализ эффективности конверсии 10 мМ бутилацетата иммобилизованными клетками, отобранными на разных стадиях роста бактериальной культуры. К 180 минутам гидролиз бутилацетата клетками, иммобилизованными на 2, 3 и 4 сутки роста, достигал практически 100 %. Выход бутанола был наибольший на 2-суточной культуры - 7.49 мМ. У биокатализатора, полученного из 3- и 4-суточной культуры, выход бутанола варьировал от 73.6 до 61.3%. Значительное падение эффективности наблюдали на 6-суточной культуре. В данном случае остаток бутилацетата составлял 3,9 мМ, а выход бутанола – 24.3 % от теоретически рассчитанного. Сохранение биокаталитической активности в течение продолжительного периода роста свидетельствует о перспективности штамма *Rh. erythropolis* ПЗ-8 для практического применения.

Сравнение биоконверсии свободными и иммобилизованными клетками показало, что эстеразная активность гетерогенного биокатализатора в нашем исследовании несколько ниже, чем таковая свободных клеток. Меньшее количество высвободившегося спирта при равном проценте утилизации эфира может быть, как следствием изменения проницаемости клеточной стенки в процессе адсорбции на

сорбенте, так и частичной утилизации продукта гидролиза вследствие изменения физиологического статуса иммобилизованной клетки.

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер государственной регистрации темы: 01201353249.

Библиографический список

1. Romano D. Esterases in stereoselective biocatalysts/ D.Romano, F.Bonomi, M.C. de Mattos, et al//Biotechnol. Adv. – 2015. – P. 1-19.

2. Осипова И.А., Ремезовская Н.Б., Максимов А.Ю. Биотрансформации, катализируемые эстеразами в гетерогенных системах // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т. 9(18), № 2(1). – С. 744-746.

ХАРАКТЕРИСТИКА ДДТ-ДЕГРАДИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЗАГРЯЗНЕННОЙ ПОЧВЫ ДОБРЯНСКОГО РАЙОНА ПЕРМСКОГО КРАЯ

Ремезовская Наталья Борисовна¹, Максимов Александр Юрьевич¹,
Демидова Марина Иосифовна², Дубовикова Юлия Александровна²

¹*«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия*

²*ФГБОУ ВО «Пермская государственная сельскохозяйственная академия имени академика Д. Н. Прянишникова», г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: ДДТ, деградация, почва, *Microbacterium*, Пермский край

Инсектицид ДДТ (дихлордифенилтрихлорэтан) получил широкое распространение в сельском хозяйстве, промышленности и здравоохранении в 40-50-х годах прошлого века. Применение ДДТ позволяло не только получать стабильные урожаи, но и ограничивать распространение инфекций, передаваемых животными-переносчиками, например, малярии и сыпного тифа. Однако ДДТ токсичен и плохо поддается деградации. Его основные метаболиты ДДД и ДДЭ являются более токсичными и устойчивыми соединениями. В начале 70-х годов XX века его применение было прекращено в Европе и США по ряду экологических соображений, но даже сейчас ДДТ и его изомеры еще можно обнаружить в почвах, донных отложениях, поверхностных и подземных водах.

В настоящем исследовании изучали почву, ранее загрязненную ДДТ в результате использования пестицида в борьбе

против клещевого энцефалита в Добрянском районе Пермского края. С 1965 по 1988 год в микрорайоне Комарово на южной окраине Добрянки находились склад ДДТ и аэродром сельхозавиации. После ликвидации аэродрома и склада на данной территории была проведена рекультивация почвы, однако анализы образцов почв в 1993 году показали превышение ПДК по ДДТ (0,1 мг/кг) в 20-40 раз [1].

Для изучения современного состояния почвы в 2014 г. в г. Добрянка, пос. Лесников, были отобраны образцы почв в 10 репрезентативных точках. Для почвы данного района характерны кислый pH – от 3,89 до 4,6, и низкое содержание гумуса – от 0,15 до 2,99%. В 7 образцах почвы из 10 обнаружили превышение ПДК по ДДТ от 1,5 до 7,6 раз (0,766 мг/кг в 5 образце). Значительное закисление почвы и малое содержание гумуса обусловили невысокое общее количество микроорганизмов в большинстве образцов почв – от 5×10^5 в 7 образце до $2,7 \times 10^8$ в 5 почве, и низкое видовое разнообразие культивируемых бактерий – от 2 до 7 морфотипов.

Микроорганизмы-деструкторы были получены методом накопительных культур путем трехстадийной селекции с повышающейся концентрацией ДДТ. В результате селекции из 6 почв были выделены 15 штаммов, способных утилизировать ДДТ в качестве единственного источника углерода и энергии в концентрациях 50-100 мг/л. Идентификация по совокупности морфологических, биохимических и генетических признаков показала, что два штамма принадлежат к роду *Rhodococcus*, три к *Pseudomonas* и 10 – к *Microbacterium*.

Оценивали деструкцию ДДТ в процессе роста в диапазоне концентраций 50-500 мг/л. Обнаружили, что наиболее эффективно данный субстрат утилизировали микробактерии, выделенные из всех образцов почв: лаг-фаза не превышала 24 часа при росте на концентрациях 50-200 мг/л и 3 суток на 500 мг/л, накопление биомассы происходило пропорционально концентрации ДДТ в диапазоне 50-200 мг/л до 2,4-3,6 г/л к концу логарифмической фазы. Повышение концентрации пестицида до 500 мг/л приводило к снижению скорости роста и уменьшению выхода биомассы от 15 до 50% от максимальной (на 200 мг/л), но ни в одном случае не обнаруживали гибель клеток к концу периода измерения. Для псевдомонад была характерна длительная фаза адаптации – до 7 суток на концентрациях 50-200 мг/л и до 10 суток на 500 мг/л, дальнейшая динамика роста была аналогична таковой у микробактерий, максимальный прирост биомассы – до 1,6 г/л – достигался также на концентрации ДДТ 200 мг/л. В отличие от литературных данных [2], штаммы Д 33 и Д 81, идентифицированные как *Rhodococcus* sp., продемонстрировали низкий уровень деструкции ДДТ. Для обеих культур оптимальная ростовая концентрация соответствовала 100 мг/л, однако даже в этом варианте максимальная

биомасса не превышала 1 г/л в случае штамма Д 33 и 0.4 г/л для штамма Д 81. Более высокие концентрации для этих штаммов были цитостатическими, а 500 мг/л для Д 81 – цитотоксической.

Определяли содержание ДДТ в гексановых экстрактах супернатантов после осаждения клеток центрифугированием. Обнаружили, что на пятые сутки роста, в период начальной логарифмической фазы для большинства культур, ДДТ в супернатантах уже не детектировали на всем диапазоне концентраций, при этом активный рост бактерий в отсутствии другого источника углерода и энергии в среде продолжался еще длительное время. Также в пробах не выявлялись какие-либо метаболиты, за исключением остаточных количеств конечного компонента деградации ДДТ – 4-хлорбензойной кислоты. Эксперимент с «отмытыми клетками» *Microbacterium* sp. Д11, Д21 и В53 показал, что ДДТ накапливается в бактериальных клетках в разной степени, а затем утилизируется при отсутствии других источников углерода и энергии, что подтверждает ранее проведенные исследования [3].

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер государственной регистрации темы: 01201353247.

Библиографический список

1. Калинин М.А. География Добрянского района // М.А. Калинин – Добрянка, 1996. – 50с.
2. Егорова Д.О. Биоремедиация почвы, длительное время загрязненной дихлордифенилтрихлорэтаном, с использованием аэробного штамма *Rhodococcus wratislaviensis* СН628 / Д.О. Егорова, В.В. Фарофонова, Е.А. Шестакова и др. // Почвоведение. – 2017. – № 10. – С. 1262–1269.
3. Katayama A. Microbial degradation of DDT at extremely low concentration / Arata Katayama, Yoshiki Fujimura and Shozo Kuwatsuka // J/Pesticide Sci. – 1993. – V. 18. – P. 353-359.

ИЗМЕНЕНИЕ ТОЛЕРАНТНОСТИ БИОФИЛЬМОВ *ESCHERICHIA COLI* К ДЕЙСТВИЮ АНТИБИОТИКОВ В ПРИСУТСТВИИ ЭКСТРАКТОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Самойлова Зоя Юрьевна, Смирнова Галина Васильевна,
Октябрьский Олег Николаевич

*«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал
ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: *Escherichia coli*, биофильмы, антибиотики, экстракты растений

В природных условиях бактерии существуют в виде биофильмов, сообществ неподвижных клеток, погруженных во внеклеточный матрикс из полисахаридов, белков и ДНК [1]. Интенсивное изучение биофильмов в последние годы связано с их высокой устойчивостью/толерантностью к противомикробным препаратам. Биофильм-ассоциированные штаммы могут быть причиной не поддающихся лечению хронических заболеваний и считаются опасными вирулентными факторами [2]. В связи с этим актуален поиск путей подавления образования биофильмов, один из которых может быть опосредован через модуляцию метаболизма ионов железа в клетках патогенных организмов [1]. Потенциальная токсичность железа обусловлена его участием в реакциях типа Фентона с образованием гидроксильного радикала, способного повреждать все виды биомолекул, включая ДНК [3]. В клетках бактерий *Escherichia coli* метаболизм ионов железа контролируется транскрипционным регулятором Fug, который также отвечает за вирулентность [4]. Одним из эффективных путей нарушения гомеостаза железа является обработка бактерий природными или синтетическими хелаторами. Интерес представляют данные об успешном использовании хелаторов железа в сочетании с антибиотиками [1, 5]. В этом отношении считается перспективным использование хелаторов природного происхождения, прежде всего полифенолов, а также богатых полифенолами экстрактов растений [6].

Целью данной работы явилось изучение модулирующих эффектов экстрактов лекарственных растений на интенсивность биопленкообразования (БПО) *Escherichia coli* в присутствии антибиотиков ципрофлоксацина и цефотаксима.

Наблюдаемые эффекты в штаммах родительского типа сравнивали с эффектами в мутантных штаммах, лишенных Fug-регулона. Fug (ferric uptake regulator) является транскрипционным регулятором метаболизма ионов железа у *E. coli*.

В данной работе к отмытым и выращенным в 96-луночных полистироловых планшетах 22-часовым зрелым биофильмам *E. coli* QC771 (wt) и QC1732 (Δfur) добавляли свежую питательную среду, с/без добавления экстрактов лекарственных растений и антибиотиков и продолжали инкубировать при 37°C и аэрации 330 об/мин.

Испытуемые экстракты *A. uva-ursi*, *V. vitis-idaea*, черного и зеленого чая характеризовались высоким содержанием полифенолов, значительной железо-хелатирующей активностью и способностью продуцировать пероксид. Все они, за исключением зеленого чая, стимулировали БПО. При этом, экстракты *B. pendula* и *L. japonica*

отличались малым содержанием полифенолов, слабой железохелатирующей активностью и пероксид-продуцирующей способностью, и в целом, оказывали незначительное влияние на БПО.

Наличие мутации *Δfur* в отсутствии экстрактов приводило к большей устойчивости биофильмов к дезинтеграции и более ранней стимуляции БПО по сравнению с родительским штаммом.

Изучены эффекты на БПО двух антибиотиков с разным механизмом действия – ципрофлоксацина (CF, подавление синтеза ДНК) и цефотаксима (Cef, подавление синтеза компонентов клеточной стенки). Обработка CF в течение 2 часов не приводила к значительной дезинтеграции биофильмов, но подавляло стимулирующее влияние экстрактов *A. uva-ursi* и *V. vitis-idaea* на БПО.

В этих же условиях Cef значительно снижал БПО, причем в штаммах мутантов *Δfur* этот эффект был выражен слабее. Даже при обработке Cef богатые полифенолами экстракты продолжали оказывать стимулирующее действие на БПО.

В целом, нами выявлена способность экстрактов лекарственных растений с высоким содержанием полифенолов стимулировать БПО даже в присутствии антибиотика цефотаксима. Полученные результаты свидетельствуют о том, что наблюдаемые эффекты могут быть связаны с модуляцией метаболизма ионов железа. Обнаруженные эффекты представляют практический интерес для практической медицины. С одной стороны, в отсутствии антибиотиков экстракты растений можно рассматривать как пребиотики, стимулирующие БПО кишечной микрофлоры. Однако, при проведении курсов антибиотикотерапии в сочетании с лечением народными средствами (травяные чаи) возможно понижение эффективности действия антибиотиков и возникновение хронического инфекционного процесса. Требуется дальнейшее изучение механизмов модуляции толерантности биофильмов к антибиотикам.

Исследование выполнено в рамках государственного задания № госрегистрации темы 01201353246, а также при поддержке грантами Президента МК-3376.2018.4 и РФФИ №16-04-00762.

Библиографический список

1. Karatan E., Watnick P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms//Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2009. – V.73 – P.310–347.
2. Kostakioti M., Hadjifrangiskou M., Hultgren S.J. Bacterial biofilms: Development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era//Cold Spring Harb Perspect Med. – 2013. – V. 3. – P.a010306.
3. Imlay J.A. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide//Annu. Rev. Biochem. – 2008. – V.77. – P.755-76.

4. Porcheron G., Dozois C.M. Interplay between iron homeostasis and virulence: Fur and RyhB as major regulators of bacterial pathogenicity//Vet. Microbiol. – 2015. – V. 179. – P.2–14.

5. Banin E., Vasil M.L., Greenberg E.P. Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation//Proc. Natl Acad Sci USA. – 2005. – V. 102. – P.11076–11081.

6. Barbieri R., Coppo E., Marchese A., Daglia M., Sobarzo-Sánchez E., Nabavi S.F., Nabavi S.M. Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity//Microbiol Res. – 2017. – V.196. – P.44–68.

ВЛИЯНИЕ ФТОРХИНОЛОНОВ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ СИНТЕЗА КАДАВЕРИНА

Секацкая Полина Андреевна^{1,2}, Ахова Анна Викторовна¹,
Ткаченко Александр Георгиевич^{1,2}

¹«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия

²ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия

Ключевые слова: кадаверин, антибиотики, *cadA*, *ldcC*

Кадаверин – биогенный полиамин, встречающийся в клетках *E.coli*. Он синтезируется путем декарбоксилирования лизина при участии лизиндекарбоксилазы (ЛДК) и играет важную роль при адаптации клеток к окислительному стрессу, выполняя в бактериальной клетке функции антиоксиданта и регулятора поринового транспорта [1]. В клетках *E. coli* обнаружено две изоформы ЛДК – CadA и LdcC, кодируемые генами *cadA* и *ldcC*, соответственно. Установлено, что экспрессия гена *ldcC* повышается в условиях воздействия некоторых антибиотиков [2], которые также известны как агенты, способные вызывать в бактериальных клетках повышение продукции активных форм кислорода (АФК) [3].

Целью данной работы является изучение экспрессии генов *ldcC* и *cadA* в условиях окислительного стресса, формирующегося в ответ на воздействие фторхинолоновых антибиотиков.

Для оценки вклада АФК в изменение экспрессии генов *ldcC* и *cadA* в условиях воздействия левофлоксацина исследован уровень генной экспрессии в присутствии антиоксиданта (тиомочевины), способной нивелировать окислительный стресс [3].

В работе были использованы штаммы SHT40 (*ldcC::lacZ*) и SHT45 (*cadA::lacZ*), несущие генные *lacZ*-слияния, в которых промоторная область исследуемого гена слита со структурной частью репортерного гена *lacZ*, кодирующего фермент β -галактозидазу. По изменению активности β -галактозидазы оценивалась экспрессия изучаемого гена.

В ходе работы исследовано изменение экспрессии генов *ldcC* и *cadA* в условиях воздействия антибиотика группы фторхинолонов (левофлоксацин) при итоговых концентрациях равных 0,05 мкг/мл, 0,1 и 0,2 мкг/мл. Воздействие этих концентраций приводило к концентрационно зависимому повышению уровня экспрессии генов *ldcC* и *cadA* со второго часа после добавки антибиотика. На четвертый час эксперимента, при концентрации левофлоксацина, равной 0,1 мкг/мл экспрессия гена *cadA* повышалась в 1,5 раза, а *ldcC* – в 4 раза по отношению к контролю. В то же время концентрация 0,2 мкг/мл к этому времени повышала экспрессию гена *ldcC* до максимума - более, чем в семь раз по отношению к контролю, в то время как уровень *cadA* к тому же времени повышался чуть более чем в два раза.

Добавка тиомочевины приводила к концентрационно зависимому снижению активированной воздействием фторхинолона экспрессии генов *ldcC* и *cadA*. Добавка тиомочевины в концентрации, обеспечивающей полное ингибирование развития эндогенного окислительного стресса (100 мМ), к клеткам, подвергнутым максимальной из исследованных концентраций фторхинолона, приводила к снижению экспрессии гена *cadA* до контрольного уровня. В аналогичных условиях уровень экспрессии гена *ldcC* снижался лишь частично (в 2 раза).

Исходя из полученных данных, можно сделать заключение о том, что левофлоксацин индуцирует экспрессию генов синтеза кадаверина, оказывая большее влияние на ген *ldcC* по сравнению с *cadA*. Увеличение экспрессии гена *cadA* предположительно является ответом на увеличение АФК в бактериальной клетке, в то время как в изменении экспрессии гена *ldcC*, помимо окислительного стресса, участвуют альтернативные механизмы.

Добавка левофлоксацина приводит к концентрационно зависимому повышению уровня экспрессии генов *ldcC* и *cadA*. Повышение экспрессии гена *cadA* при воздействии левофлоксацина преимущественно обусловлено эндогенным окислительным стрессом. Добавление тиомочевины частично снижает экспрессию гена *ldcC*, индуцированную действием левофлоксацина, что свидетельствует о наличии других факторов генной экспрессии *ldcC* наряду с воздействием окислительного стресса.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Администрации Пермского края (проект №16-44-590279 p_a).

Библиографический список.

1. Chattopadhyay M.K., Tabor C.W., Tabor H. Polyamines protect *Escherichia coli* cells from the toxic effect of oxygen // PNAS USA. 2003. Vol. 100. P. 2261-2265.

2. Изменение экспрессии *ldcC Escherichia coli* как фактор адаптации к антибиотикам / Шумков М.С., Гончаренко А.В, Кылосова А.М., Ткаченко А.Г. // Вестник Пермского университета. 2010. Вып. 1(1). С. 36-40.

3. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics / Kohanski M.A., Dwyer D.J., Hayete B., Lawrence C.A., Collins J.J. // Cell. 2007. V. 130, N5. P. 797–810.

ВОВЛЕЧЕННОСТЬ БЕЛКА Rel, МЕТАБОЛИЗИРУЮЩЕГО ГУАНОЗИНТЕТРАФОСФАТ, В МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ АНТИБИОТИКОВ, НАЦЕЛЕННЫХ НА ПЕРСИСТОРНЫЕ КЛЕТКИ MYCOBACTERIUM SMEGMATIS

Сидоров Роман Юрьевич¹, Кашеварова Наталья Михайловна¹,
Ткаченко Александр Георгиевич^{1,2}

¹«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» –
филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия

²ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный
исследовательский университет, г. Пермь, Россия

Ключевые слова: персистенция, гуанозинтетрафосфат, антибиотики

Антибиотики, наиболее часто используемые при лечении инфекций в клинической практике, обычно нацелены на активно растущие клетки. Но при этом в организме больного даже в случае эффективного устранения размножающихся клеток возбудителя остаются персисторные клетки, проявляющие фенотип замедления метаболических процессов и потому нечувствительные к обычным антибиотикам. Их долговременное выживание приводит к хроническим инфекциям. Так, микобактерии туберкулёза, равно как и другие виды бактерий, за счет персистенции способны выживать под действием антибактериальных препаратов за счёт формирования персисторных клеток, представляющих меньшую часть популяции. По окончании терапии эти клетки возобновляют рост и в 90% случаев являются причиной рецидива инфекции.

Одним из возможных решений данной проблемы является разработка и исследование механизма действия новых антибактериальных средств, активных в отношении персистерных клеток. В нашем исследовании предлагается метод, основанный на оценке влияния анализируемого антибиотика на предполагаемую белковую мишень – гуанозин тетрафосфат синтетазу/гидролазу Rel из *Mycobacterium smegmatis*.

Этот фермент ответственен за содержание в клетках гуанозинтетрафосфата (ppGpp), ключевой молекулы, регулирующей стрессорные ответы у бактерий, которая считается важным фактором формирования персистерного состояния [1]. ppGpp-синтазы используются как микобактериями, так и другими бактериями, и не встречаются в клетках млекопитающих, что делает эти белки привлекательной мишенью для разработки и исследования антибиотиков, ингибирующих образование персистерных форм бактерий.

На этапе поиска антибактериальных агентов, обладающих свойствами устранять персистеров, были построены кривые отмирания клеток экспоненциальной или стационарной фазы под действием исследуемых антибиотиков. Исследовались антибиотики различных классов, используемые в клинической практике, а также новый перспективный антибактериальный агент DMNP, предположительно ингибирующий образование персистеров.

Результаты исследований свидетельствуют о том, что общеизвестные клинические антибиотики оказывают токсическое действие на культуру *M. smegmatis* преимущественно в экспоненциальной фазе, теряя активность в стационарной, в то время как DMNP был активен в отношении клеток стационарной культуры, однако проявлял лишь незначительный эффект на экспоненциально растущие клетки. Это явление косвенно указывает на то, что возможная мишень DMNP более активно экспрессируется в стационарной фазе роста культуры.

Для определения возможного механизма влияния DMNP на персистообразование был применен следующий подход. Экспрессия предполагаемой мишени этого антибиотика, белка Rel, была значительно увеличена при помощи индукции микобактериальной сверхэкспрессионной плазмиды pMind [2], содержащей ген *rel*. Таким образом, если этот белок действительно вовлечен в механизм действия DMNP на персистеры, эффект ингибирования персистообразования должен быть снижен за счет связывания антибиотика дополнительными молекулами белка-мишени, что приводит к повышению числа выживших клеток.

Штамм *M. smegmatis* mc²155, несущий экспрессионную плазмиду pMind со вставкой гена *rel*, подвергали воздействию клинических

антибиотиков (тетрациклин, стрептомицин, рифампицин) в сравнении с DMNP, эффект которого на персистенцию мог осуществляться посредством воздействия на предположительную мишень – Rel белок. Результаты показали, что сверхэкспрессия гена *rel* повышала число клеток, выживших после воздействия DMNP, в 1000 раз, чего не наблюдалось при воздействии других исследованных антибиотиков. Это является свидетельством того, что DMNP влияет на персистообразование *M. smegmatis* путем воздействия на Rel белок.

В рамках данного исследования была сконструирована и встроена в хромосому *Mycobacterium smegmatis* интегральная плазида, содержащая слияние промоторной области гена *rel* и репортерного кластера *luxAB*. Результаты измерения билюминисценции, генерируемой пропорционально уровню экспрессии *rel*, дали возможность идентифицировать максимум экспрессии на 24-ом часу культивирования. Этот период соответствует максимальному токсическому действию DMNP на микобактериальную культуру.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что DMNP реализует ингибирующий эффект на персистенцию посредством воздействия на Rel белок. Поэтому максимальное действие данного антибактериального агента проявляется на том этапе развития клетки, когда количество белка-мишени и, соответственно, уровень персистообразования, максимальны.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 18-73-10156).

Библиографический список

1. Hauryliuk V. et al. Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology // Nature Reviews Microbiology. 2015. doi:10.1038/nrmicro3448
2. Blokpoel M. et al. Tetracycline-inducible gene regulation in mycobacteria // Nucleic Acids Res. 2005. doi: 10.1093/nar/gni023

УСТОЙЧИВОСТЬ АКТИНОБАКТЕРИЙ *DIETZA MARIS K* ТЯЖЕЛЫМ МЕТАЛЛАМ

Тищенко Артём Валерьевич¹, Бакиева Эльмира Рашидовна²,
Литвиненко Людмила Викторовна³, Ившина Ирина Борисовна^{1,3}

¹ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия

²ФГБОУ ВО Пермский национальный исследовательский политехнический университет, г. Пермь, Россия

Ключевые слова: *Dietza maris*, актинобактерии, тяжелые металлы, устойчивость

Важным направлением биотехнологии является применение экологически безопасных методов биоремедиации почв и водных объектов, загрязненных тяжелыми металлами (ТМ). Ввиду увеличения объема бытовых и промышленных отходов очистные сооружения испытывают огромные нагрузки при поступлении стоков с высоким содержанием данных поллютантов. В связи с этим повышенный интерес исследователей привлекают алканотрофные актинобактерии, использующие в качестве субстрата природные и синтетические углеводороды, а также обладающие способностью продуцировать активные биосурфактантные комплексы, которые способствуют мобилизации и десорбции ионов тяжелых металлов [1, 2]. Цель настоящей работы – исследование устойчивости алканотрофных актинобактерий *Dietza maris* к тяжелым металлам.

Рабочая коллекция включала 62 штамма актинобактерий из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним коллекции ИЭГМ, WDCM #768, www.iegmc.ru; реестровый номер УНУ 73559), принадлежащих к виду *Dietza maris*. Актинобактерии предварительно выращивали в мясопептонном агаре в течение 48 ч. В работе использовали соли ТМ: $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Cd} \times 2\text{H}_2\text{O}$, K_2CrO_4 , $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ в концентрации от 0.08 до 80.0 мМ. Степень резистентности актинобактерий к ТМ оценивали по минимальной ингибирующей концентрации (МИК), определяемой микролуночным методом [3]. Жизнеспособность бактериальных клеток определяли с помощью красителя 0,2% водного раствора йоднитротетразолия хлорида. Эксперименты проводились в четырёхкратной повторности.

По нашим данным, все культуры сохраняли способность к росту в присутствии ионов ТМ. При этом показатели МИК варьировали в диапазоне от 0.08 до 40.0 мМ. Использованные ТМ по степени токсического воздействия на исследованные культуры *Dietza maris* были распределены в ряд: $\text{MoO}_4^{2-} > \text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{CrO}_4^{2-}$, в котором наиболее токсичным является молибден, менее токсичным – хром. Установлено, что по устойчивости к ТМ штаммы внутри вида *Dietza maris* отличаются от 2 до 125 раз. По-видимому, внутривидовая неоднородность по устойчивости к ионам ТМ связана с экологической приуроченностью бактериальных штаммов. Так, устойчивость к ТМ штаммов, выделенных из нефтезагрязненных

водных и почвенных образцов, превышает в 2–10 раз таковую изолятов из незагрязненных субстратов.

Отобраны штаммы *Dietza maris*, проявляющие высокую (МИК > 10.0 мМ) устойчивость к ионам ТМ (Таблица). Данные штаммы перспективны для применения в процессах биотехнологической очистки сточных вод и грунтов, загрязненных ТМ.

Таблица

Штаммы *Dietza maris* наиболее устойчивые к ТМ

Штамм	Ион металла	МИК, мМ
ИЭГМ 789	Cd ²⁺	20.0
ИЭГМ 44, ИЭГМ 47, ИЭГМ 48, ИЭГМ 50, ИЭГМ 52, ИЭГМ 167, ИЭГМ 169, ИЭГМ 302, ИЭГМ 304, ИЭГМ 306, ИЭГМ 463, ИЭГМ 750	Cr ⁶⁺	40.0
ИЭГМ 300	Cu ²⁺	10.0
ИЭГМ 1172, ИЭГМ 1175	Mo ⁶⁺	20.0
ИЭГМ 299	Ni ²⁺	40.0
ИЭГМ 304	Pb ²⁺	20.0
ИЭГМ 313	Zn ²⁺	20.0

Работа выполнена в рамках Комплексной программы 18-4-8-21 и государственного задания (номер госрегистрации темы: 01201353247), Соглашения № С-26/059 с Министерством образования и науки Пермского края.

Библиографический список

1. Костина Л.В., Кулюкина М.С., Ившина И.Б. Биосорбция, аккумуляция и способы извлечения тяжелых металлов // LAP Lambert Academic Publishing. – 2010. – 254 с.
2. Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Kostina L.V. Adaptive mechanisms of nonspecific resistance to heavy metal ions in alkanotrophic actinobacteria // Russian Journal of Ecology. – 2013. – Vol. 44, № 2. – P. 115–123.
3. Bell J.M.L., Philp J.C., Kuyukina M.S. *et al.* Methods evaluating vanadium tolerance in bacteria isolated from crude oil contaminated land // J. Microbiol. Methods. – 2004. – Vol. 58. – P. 87–100.

ДИНАМИКА РОСТА *STARHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS* В ПРИСУТСТВИИ ХОЛЕСТЕРИНА

Трапезников Яков Павлович

ФГБОУ ВО ПГМУ им. акад. Е.А. Вагнера Минздрава РФ, г. Пермь, Россия

Ключевые слова: *Staphylococcus epidermidis*, холестерин, кинетика роста

Стафилококки являются одним из ведущих факторов гнойно-воспалительных и септических заболеваний. При колонизации макроорганизма бактериями происходит конкурентная борьба за питательные вещества [1]. Нормальный обитатель кожи и слизистых оболочек – условно патогенный эпидермальный стафилококк вызывает к себе пристальное внимание. Немаловажно выявить, насколько часто эпидермальный стафилококк участвует в патологии разных органов и систем человека. Так, отмечен рост гнойного осложнения ожоговых ран за счет эпидермального стафилококка за 2 года с 9 до 18%; рост септических заболеваний – с 45% до 60,3%; рост послеоперационных нагноений в хирургии – до 21,4%; при урологических инфекциях частота осложнений, вызванных эпидермальным стафилококком, достигла 62,8%. Отмечается, что эпидермальный стафилококк вызывает септические процессы в настоящее время чаще, чем золотистый стафилококк [3]. Это позволяет рассматривать микрофлору хозяина как важнейший метаболический и регуляторный орган, участвующий в борьбе за сохранение своей целостности, вопреки агрессивной колонизации *Staphylococcus epidermidis* [2]. При регулировании межмикробных взаимодействий макроорганизм нуждается в централизации питательных веществ, одним из которых является холестерин.

Цель исследования – изучение влияния холестерина на кинетику роста *S. epidermidis*.

В исследовании использован штамм *S. epidermidis* из коллекции ATCC, который культивировали в мясо-пептонном бульоне с добавлением холестерина в концентрациях 0, 3, 5, 7 и 9 ммоль/л. В течение 24ч каждый час проводили измерение оптической плотности бульона при 580 нм.

Концентрацию холестерина определяли в пробах перед культивированием и после него. Для определения уровня холестерина в питательной среде использовали ферментативный метод с помощью набора реагентов ЗАО "Вектор-Бест". Детекцию результатов осуществляли с помощью планшетного спектрофотометра ChroMate (Awareness Technology Inc., USA). Принцип метода заключается в том, что под действием фермента эфиры холестерина распадаются на холестерин и жирные кислоты. Далее холестерин под воздействием холестериноксидазмутазы дает окрашенное соединение и перекись водорода. Интенсивность окраски в реакционной смеси прямо пропорциональна концентрации холестерина в пробе, которую определяют расчетным методом. Статистическую обработку данных проводили с использованием парного варианта *t*-критерия Стьюдента.

В ходе проведенных исследований было установлено, что при культивировании *S. epidermidis* уровень холестерина в пробах существенно

не изменился. Так, до инкубации уровень холестерина был $0,19 \pm 0,16$, а после $0,37 \pm 0,24$ ммоль/л ($p > 0,05$). В контрольных пробах, не содержащих *S. epidermidis*, концентрация холестерина статистически значимо не изменилась, что позволяет исключить саморазрушение холестерина при культивировании.

При изучении антибактериальной активности в отношении *S. epidermidis* холестерин ею не обладал во всех изученных концентрациях.

Показана прямая зависимость накопления биомассы микроорганизма от уровня холестерина (Рисунок).

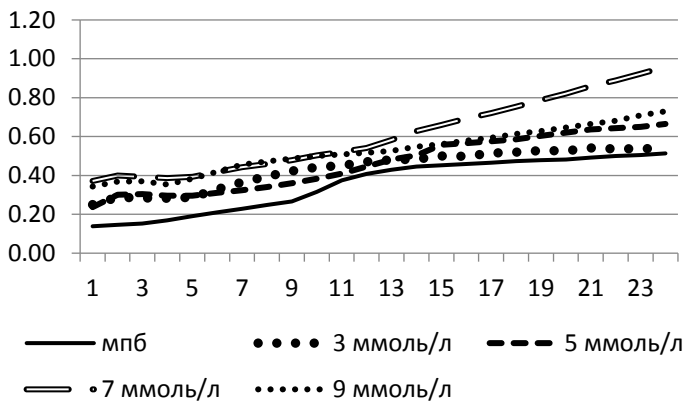


Рисунок. Кинетика роста *S. epidermidis* в присутствии разных концентраций холестерина (По оси ординат единицы оптической плотности, по оси абсцисс — часы)

Стационарная фаза у тест-штамма начинается с 11 часа культивирования. В присутствии холестерина наступление стационарной фазы затягивается. Так, при концентрации холестерина 5 ммоль/л эта фаза начинается с 15 часа, а при концентрации 7 ммоль/л она не началась за весь период наблюдения. Можно предположить, что подобное обусловлено включением холестерина в метаболизм стафилококка, когда происходит интенсификация синтеза клеточных стенок.

Таким образом, в проведенном исследовании показано, что *S. epidermidis* не метаболизирует человеческий холестерин. Однако, ростовые свойства штамма в присутствии холестерина существенно меняются.

Библиографический список

1. Годовалов А.П., Никулина Е.А., Ожигбесов Г.П., Быкова Л.П., Ларин А.Э., Ларина П.М. Изменение микробиоценоза толстого кишечника при воспалительных заболеваниях, вызванных *Staphylococcus aureus* // Сборник научных статей участников Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Фундаментальные и

прикладные аспекты современной инфектологии». – 2016. – С. 70-73.

2. Трапезников Я.П. Некоторые особенности взаимоотношения прокариот и эукариот на биохимическом уровне // Международный студенческий научный вестник. – 2016. – № 6. – С. 33-33.

3. Шпрыкова О. Н., Сатунина Л. Ф., Сперанская Л. Ф. и др. Биологические свойства стафилококков, циркулирующих в стационарах Нижнего Новгорода // ЖМЭИ. – 2001. – №3. – С. 95-99.

ДИНАМИКА ВОССТАНОВЛЕННЫХ НЕОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ СЕРЫ (SO_3^{2-} , H_2S) В АЭРОБНО РАСТУЩИХ КУЛЬТУРАХ *ESCHERICHIA COLI* ПРИ СТРЕССАХ И ДЕЙСТВИИ АНТИБИОТИКОВ

Ушаков Вадим Юрьевич^{1,2}, Смирнова Галина Васильевна²,
Октябрьский Олег Николаевич²

¹ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия

²«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия

Ключевые слова: тиолы, соединения серы, антибиотики, окислительный стресс

Активные формы кислорода (АФК) образуются как при нормальном росте бактерий вследствие случайного одно- или двухэлектронного восстановления кислорода компонентами дыхательной цепи, так и при действии ряда стрессовых факторов (антибиотики, осмотический шок, резкое изменение температуры, голодание и др.). АФК опасны для жизнедеятельности, поскольку способны повреждать все макромолекулы, включая ДНК. Известно, что в клетке супероксидный радикал (O_2^-) и его производные (H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$) подвергаются ферментативной утилизации каталазами и супероксиддисмутазами. Кроме того, в антиоксидантной защите могут участвовать тиолы (глутатион, тиоредоксин) и другие низкомолекулярные соединения, такие как убихиноны и токоферолы. Показано, что двойные мутанты *E. coli* *sodAsodB* по обоим цитоплазматическим супероксиддисмутазам Mn-SOD и Fe-SOD накапливают в среде большие количества сульфита (SO_3^{2-}), являющегося промежуточным продуктом при синтезе цистеина, и не растут в отсутствии экзогенного цистеина. Вытекание сульфита у этих

мутантов обычно рассматривается как результат повышения проницаемости мембран вследствие их окислительного повреждения. Однако снижение концентрации сульфита внутри клеток может быть защитным механизмом, ограничивающим синтез цистеина, который может выступать как восстановитель в реакции Фентона, являющейся источником гидроксильных радикалов. Кроме того, обладающий высокой восстановительной активностью сульфит может выполнять антиоксидантные функции в среде, вступая в реакцию с внеклеточными оксидантами и способствуя их нейтрализации. Известно, что другое восстановленное соединение серы – сероводород (H_2S), продуцируемое бактериями при действии ряда антибиотиков, проявляет антиоксидантный эффект, способствуя повышению выживаемости клеток.

В исследованиях по динамике SO_3^{2-} использовали бактерии *E. coli* BW25113 родительского типа и делеционные мутанты по генам, кодирующим первый фермент синтеза глутатиона JW2663 (*gshA*), периплазматическую Cu_2Zn -супероксиддисмутазу JW1638 (*sodC*), Mn -супероксиддисмутазу JW3879 (*sodA*), менахинон JW3901 (*menA*), каталазу HPI JW3914 (*katG*), а так же двойной мутант NM451 (*sodCgshA*). Продукцию сульфита определяли по методу, описанному Leinweber et al, 1987.

Минимальная концентрация сульфита при нормальном аэробном росте была обнаружена в среде культивирования бактерий родительского типа ($0.49 \pm 0.07 \mu\text{M}$). В других исследуемых штаммах *E. coli* базовый уровень SO_3^{2-} зависел от характера мутации и варьировал от $0.96 \pm 0.03 \mu\text{M}$ у *E. coli gshA* до $1.87 \pm 0.07 \mu\text{M}$ у двойного мутанта *sodCgshA*. Концентрация сульфита в мутантах *sodC* и *menA* составляла $1.05 \pm 0.03 \mu\text{M}$ и $1.13 \pm 0.03 \mu\text{M}$, соответственно. Таким образом, дефицит GSH и периплазматической SOD способствовал ускоренному вытеканию сульфита из клеток, что может быть как следствием повышения проницаемости мембран, так и потенциальной стратегией защиты бактерий от действия АФК.

Динамика уровня экстраклеточного сульфита при добавлении в среду культивирования антибиотика ципрофлоксацина зависела от концентрации антибиотика и наличия мутации. Обработка клеток родительского типа ципрофлоксацином в концентрации $0.3 \mu\text{g/ml}$ и $3 \mu\text{g/ml}$ приводила к снижению уровня SO_3^{2-} на 25% по сравнению с необработанными клетками за 30 и 5 мин экспозиции, соответственно. В культурах *gshA* не выявлено достоверного снижения уровня сульфита при действии ципрофлоксацина.

Была обнаружена обратная зависимость между дозой H_2O_2 , добавленной в среду, и уровнем внеклеточного сульфита: 4.2, 3.6 и $3.1 \mu\text{M}/\text{OD}_{600}$ сульфита на 70 минуте инкубации бактерий wt с $100 \mu\text{M}$, 1 mM и 2 mM перекиси водорода, соответственно.

Для проверки предположения о потенциальных антиоксидантных свойствах сульфита, были проведены эксперименты с предобработкой растущих клеток *E. coli* SO_3^{2-} (100 μM) и последующей обработкой эквимоларной концентрацией H_2O_2 или 0.1 мМ менадиона. Защитное действие экзогенного SO_3^{2-} при действии H_2O_2 было обнаружено только у штамма, дефицитного по каталазе HPI (*katG*). Обработка бактерий SO_3^{2-} (100 μM) перед внесением менадиона достоверно защищала клетки у всех изученных штаммов.

Культивирование бактерий wt и *gshA* в присутствии экзогенного O_2^- приводило к достоверному повышению концентрации SO_3^{2-} на 20% у бактерий *gshA* по сравнению с клетками родительского типа.

Таким образом, совокупность полученных результатов свидетельствует о тесной связи между активностью антиоксидантных систем и уровнем сульфита в среде, а также указывает на способность внеклеточного сульфита реагировать с внеклеточными оксидантами и оказывать защитное действие при супероксидном стрессе.

Нами также было проведено измерение продукции сероводорода (H_2S) в аэробно растущих культурах бактерий *E. coli*, в условиях пероксидного стресса и при обработке клеток валином и рядом антибиотиков (ципрофлоксацин, хлорамфеникол, тетрациклин, стрептомицин, ампициллин, канамицин).

В качестве объекта исследований использовали бактерии *E. coli* BW25113 дикого типа и делеционные мутанты по генам, кодирующим первый фермент синтеза глутатиона JW2663(*gshA*), CuZn-супероксиддисмутазу JW1638 (*sodC*), каталазу HPI JW3914 (*katG*), белок-регулятор SoxS JW4023(*soxS*), транспортер GSH AN2343 (*cydD*), белок-регулятор OxyR JW3933 (*oxyR*), регулятор SOS-ответа RelA JW2755 (*relA*) и двойной мутант NM4861 (*relAgshA*). Штамм NM4861 (*relAgshA*) был сконструирован в Лаборатории генетики и физиологии микроорганизмов ПФИЦ УрО РАН. Измерение продукции сероводорода определяли методикой, описанной у Shatalin et al., 2011.

Продукция сероводорода при нормальном росте *E. coli* на среде M9 с добавлением казиминовых кислот зависела от характера мутации: минимальный уровень был обнаружен у мутантов *cydD*, *soxS*, *katG* и *sodC*., максимальный - у бактерий, лишенных глутатиона и белка-регулятора OxyR. В отсутствие казиминовых кислот продукции H_2S у этих мутантов не наблюдалось.

Нами было показано достоверное увеличение уровня H_2S у бактерий *E. coli* родительского штамма и мутантов по синтезу глутатиона, при остановке роста, вызванной истощением глюкозы в среде культивирования. Повышение продукции сероводорода наблюдалось также при обработке мутантных клеток *gshA*, *relA*, *relAgshA* валином (0.5 мг/мл), но отсутствовало у бактерий дикого типа. Обработка мутантов *gshA*, *relA*, *relAgshA* хлорамфениколом,

тетрациклином и ципрофлоксацином приводила к повышению продукции H_2S , чего не наблюдалось у бактерий wt. Добавление к растущим культурам стрептомицина, канамицина и ампициллина не вызывало выхода H_2S у всех исследуемых штаммов бактерий. Продукция сероводорода отсутствовала при обработке исследуемых штаммов H_2O_2 (1мМ).

Полученные данные указывают на высокую вариабельность продукции сульфида при стрессах в зависимости от состава среды, типа стресса и наличия мутаций.

Исследование выполнено при поддержке грантами Программы УрО РАН (номер госрегистрации АААА-А18-118041890005-1), РФФИ №16-04-00762 и грантом Президента РФ МК-3376.2018.4

УЧАСТИЕ ГЕНОВ СТАЦИОНАРНОЙ ФАЗЫ *rpoS*, *rmf*, *relA* И *spoT* В БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПЕРСИСТЕНЦИИ

Хаова Е.А.^{1,2}, Кашеварова Н.М.¹, Шумков М.С.³, Сидоров Р.Ю.²,
Ткаченко А.Г.^{1,2}

¹ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия

²«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия

³ФГБУН Институт биохимии им. Баха РАН, г. Москва, Россия

Бактериальная персистенция является основной причиной рецидивов инфекционных заболеваний. Явление персистенции связывают с механизмами общего стрессорного ответа, формируемого при переходе микроорганизмов к стационарной фазе [1]. Исходя из этого, целью наших исследований является изучение роли генов *rpoS*, *rmf*, *relA* и *spoT*, участвующих в адаптации к стационарной фазе, в формировании персисторного состояния бактериальных клеток.

Исследования проводили на модельном организме *Escherichia coli* при периодическом культивировании на питательной среде LB. Для этого изучали способность к перистообразованию клеток родительского, дикого штамма в сравнении с клетками нокаутных штаммов по исследуемым генам, сконструированных нами в соответствии с методом Даченко-Воннера [2]. Экспрессию генов родительского штамма определяли методом ПЦР в реальном времени,

совмещенной с обратной транскрипцией, а также при помощи полученных нами транскрипционных *lacZ*-слияний [3, 4].

Согласно ранее опубликованным данным [5], штамм $\Delta rpoS$ показывает наибольшее снижение частоты персистенции по сравнению с родительским штаммом при переходе в стационарную фазу роста (рис. 1А). Эти результаты согласуются с данными об уровне экспрессии *rpoS*, достигающего наибольших значений в этот период (6-8 ч), а также в поздней стационарной фазе (72 ч) (рис. 1Б). Мутанты Δrmf , $\Delta relA$ и $\Delta relA\Delta spoT$ демонстрируют максимальное снижение частоты персистенции в стационарной фазе (с 24 ч) (рис. 1В, 2А, 2Б). При этом наиболее высокий уровень экспрессии *relA* и *spoT* наблюдается в экспоненциальной фазе и при переходе в стационарную фазу (рис. 2).

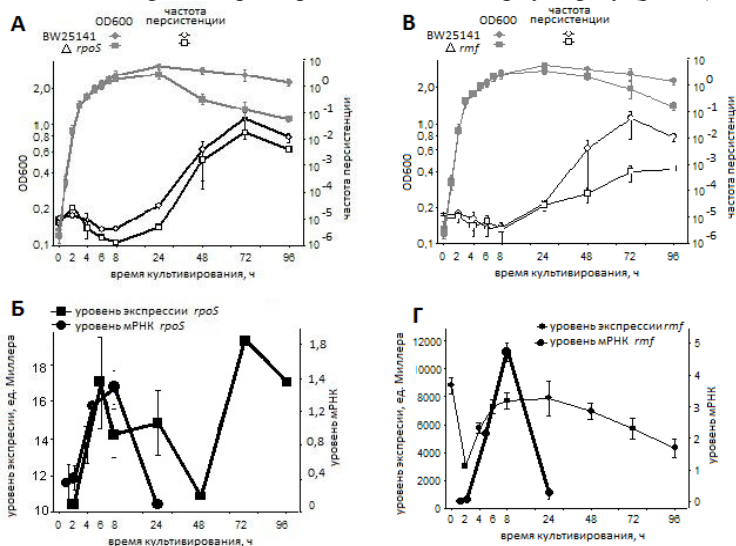


Рис. 1. Влияние нокаутов генов *rpoS* (А) и *rmf* (В) на частоту персистенции *E. coli* и уровни экспрессии данных генов на транскрипционном уровне (Б, Г)

В это же время (8-24 ч) максимум экспрессии демонстрирует также *rmf* (рис. 1Г). Возможно, активация экспрессии этих генов в стационарной фазе происходит преимущественно на трансляционном уровне, как ранее нами показано в случае с *rmf* [5].

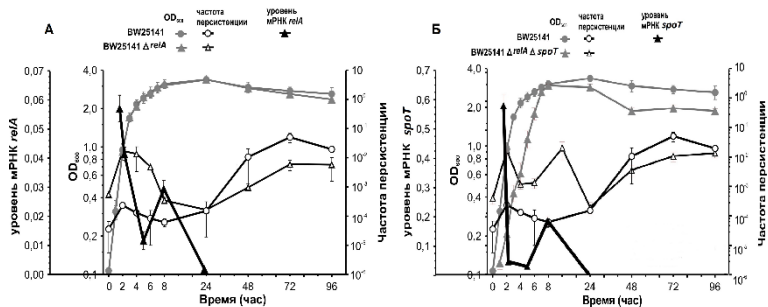


Рис. 2. Роль генов *relA* (А) и *spoT* (Б) в формировании персисторов *E. coli*

В экспоненциальной фазе у мутантов $\Delta relA$ и $\Delta relA\Delta spoT$ наблюдается формирования нитей, состоящих из нескольких не разделившихся клеток [6], что приводит к мнимому завышению значений частоты персистенции по сравнению с контрольным штаммом в этот период (Рис. 2). Однако разделение нитей на отдельные клетки при переходе в стационарную фазу дает возможность объективно выявить снижение частоты персисторных клеток в нокаутных штаммах по сравнению с контрольным.

Таким образом, на основании комплексной оценки данных определения уровня генной экспрессии методами репортерных генных слияний и ПЦР в реальном времени, совмещенной с обратной транскрипцией, в сопоставлении с результатами мутационного анализа установлено участие генов стационарной фазы *rpoS*, *rmf*, *relA* и *spoT* в персистенции *E. coli*

Работа выполнена в рамках государственного задания (номер госрегистрации темы: 01201353249), а также при финансовой поддержке РФФИ и Администрации Пермского края (проект №16-44-590279 p_a).

Библиографический список

1. Rotem E. et al. Regulation of phenotypic variability by a threshold-based mechanism underlies bacterial persistence//Proc. Natl. Acad. Sci. – 2010. – Vol. 107, №28. – p. 12541-12546.
2. Datsenko K.A., Wanner B.L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products// PNAS. – 2000. – Vol. 97, №12. – p. 6640–6645.
3. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике: пер. с англ. под ред. Алиханяна С.И. – М.: Мир. – 1976. – 437 с.
4. Simons R.W. et al. Improved single and multicopy lac-based cloning vectors for protein and operon fusions//Gene. – 1987. – Vol. 53, №1. – p. 85 - 96.

5. Хаова Е.А., Кашеварова Н.М., Ткаченко А.Г. Регуляция бактериальной персистенции полиаминами через стимуляцию экспрессии генов *rpoS*, *uqjD* и *rmf*//Вестник Оренбургского гос. ун-та. – 2017. – с. 100 - 105.

6. Сидоров Р.Ю., Ткаченко А.Г. Роль генов *relA* и *spoT* в персистенции *E. coli*//Материалы IX Всерос. конгр. молодых ученых-биологов. – Пермь, 2016. – с. 47 – 50

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И КИНЕТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА БИОДЕСТРУКЦИИ АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ

Хренков Алексей Николаевич¹, Вихарева Елена Владимировна¹,
Рычкова Марина Ивановна², Селянинов Александр Анатольевич³

¹ФГБОУ ВО Пермская государственная фармацевтическая академия,
г. Пермь, Россия

²«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» –
филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия

³ФГБОУ ВО Пермский национальный исследовательский
политехнический университет, г. Пермь, Россия

Ключевые слова: ацетилсалициловая кислота, биодеструкция, родококки, ВЭЖХ, кинетическое моделирование

Фармацевтические поллютанты (лекарственные средства и их метаболиты) в настоящее время все чаще регистрируются в почве и водных объектах окружающей среды. Угроза данных биологически активных соединений для живых организмов и здоровья человека обусловлена их эмбриотоксическим, нейротоксическим и мутагенным воздействием. Наиболее часто в поверхностных и сточных водах обнаруживаются нестероидные противовоспалительные лекарственные средства, в частности широко применяемая в мировой медицинской практике ацетилсалициловая кислота (АСК) [1,2]. Сведения о поведении данного соединения в природных экосистемах отсутствуют. Ранее нами показана способность экологически значимых актинобактерий рода *Rhodococcus* к биодеструкции АСК в виде фармацевтической субстанции [3]. В качестве промежуточных продуктов разложения выявлены пирокатехин и *цис,цис*-муконовая кислота. Поиск условий количественного определения содержания АСК в культуральных средах родококков предполагает разработку

методики анализа, позволяющей оценить присутствие данного вещества в сложной многокомпонентной системе и степень его биодеструкции в ходе эксперимента.

Поскольку биологическая деструкция лекарственных средств, в том числе и АСК представляет собой сложный многофакторный, продолжительный во времени процесс, то анализ некоторых ключевых аспектов его реализации возможен с помощью кинетического моделирования. Наиболее значимыми параметрами при этом являются изменение концентрации деструктируемого соединения, интенсивность процесса биодеструкции и время его окончания.

Цель настоящего исследования – разработка методики определения содержания АСК в культуральных средах с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии и кинетическое моделирование процесса биодеструкции.

В качестве биодеструктора АСК использовали штамм *R. jostii* ИЭГМ 60, изолированный из нефтезагрязненной почвы и поддерживаемый в Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним коллекции IEGM, WDCM # 768, www.iegmc.ru/strains). Эксперименты по биодеструкции АСК в виде фармацевтической субстанции (Shandong Xinhua Pharmaceuticals Co.Ltd, Китай) в концентрации 0,01%, 0,02%, 0,03%, 0,04% и 0,25% проводили в условиях периодического культивирования (160 об/мин) в минеральной синтетической среде RS в колбах Эрленмейера вместимостью 250 мл при температуре 28 °С. В работе использовали жидкостной хроматограф Shimadzu LC Prominence» (Shimadzu, Япония), снабженный хроматографической колонкой Luna 5u C 18 100A 250×4,6 мм.

Для определения остаточной концентрации АСК в культуральных средах родококков предложены следующие хроматографические условия: подвижная фаза фосфатный буферный раствор (pH 3) – ацетонитрил в соотношении 7:3, режим элюирования – изократический, скорость потока элюента – 1 мл/мин, температура колонки – 40 °С, детектирование при длинах волн 230 и 240 нм, объем вводимой пробы – 10 мкл.

Продолжительность процесса биодеструкции АСК при начальной концентрации исходного субстрата 0,01% соответствует 3 суткам. При увеличении концентрации АСК с 0,01% до 0,25% наблюдается увеличение продолжительности процесса биодеструкции до 30 сут.

Для сравнительного анализа скорости биодеградации АСК использовали параметр k кинетического уравнения первого порядка

$$dx/dt = -kx$$
 с начальным условием $x_0 = 100\%$ при $t = 0$, которое адекватно описывает динамику изменения концентрации x при

биodeградации ряда лекарственных средств. Помимо этого, согласно выражению $t_{1/2} = \ln(2)/k$ определяли период полураспада АСК при биodeградации.

Кинетические кривые для остаточной концентрации АСК хорошо соответствовали экспериментальным данным. Значения параметра k скорости биodeградации при начальных концентрациях АСК 100, 300 и 400 мг/л составили 1,573, 1,555 и 1,667 сут⁻¹ соответственно. Повышение начальной концентрации до 2,5 г/л привело к уменьшению значения параметра скорости процесса до 0,0391 сут⁻¹. Период полураспада $t_{1/2}$ составил 0,440, 0,445 и 0,416 суток при малых начальных концентрациях АСК. При высокой концентрации АСК значение периода полураспада достигло 17,75 сут. С увеличением начальной концентрации АСК в указанных пределах параметр скорости биodeградации АСК уменьшился в 40 раз, период полураспада увеличился в такое же число раз. Сравнение характеристик показало, что результаты экспериментов и выводы по кинетике биodeградации АСК при разных начальных концентрациях не противоречат друг другу.

Полученные экспериментальные данные и теоретические результаты могут быть использованы при разработке способов высокоэффективного удаления АСК из сточных вод.

Исследование выполнено в рамках Комплексной программы фундаментальных исследований УрО РАН (проект 18-4-8-21).

Библиографический список

1. Баренбойм Г.М., Чиганова М.А. Загрязнение природных вод лекарствами. – М.: Наука, 2015. – 283 с.
2. Santos L., Araujo A., Fachini A. et al. Exotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment / Jornal of Hazardous Materials, 2010. – V. 175. – P. 45–95.
3. Хренков А.Н. Исследование продуктов бактериальной деструкции салицилата натрия методом тонкослойной хроматографии / Хренков А.Н. // XXIV Каргинские чтения с международным участием: Сб. научн. трудов Всероссийской научно-технич. конференции молодых ученых «Физика, химия и новые технологии» 23 марта 2017 г. – Тверь: ТГУ, 2017. – С. 122.

ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ГАММАПРОТЕОБАКТЕРИЙ СЕМЕЙСТВА *HALOMONADACEAE* В ТЕХНОГЕННЫХ ВОДАХ НА ТЕРРИТОРИИ ВЕРХНЕКАМСКОГО МЕСТОРОЖДЕНИЯ КАЛИЙНЫХ СОЛЕЙ

Цещинская Екатерина Михайловна

«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал
ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия

Ключевые слова: *Halomonas*, *Chromohalobacter*, клеточные жирные кислоты, галофил

В состав класса *Gammaproteobacteria* входит семейство *Halomonadaceae*, который включает в себя грамотрицательные, аэробные и факультативно анаэробные, умеренно галофильные, хемоорганотрофные бактерии. Представители этого семейства выделены из различных источников, преимущественно высокоминерализованных, в том числе из морей и соленых озер, засоленных почв и солеварен.

У представителей этого семейства в составе внутриклеточных жирных кислот (ЖК) широко представлены октадеценовая $C_{18:1}$, гексадекановая $C_{16:0}$ и гексадеценовая $C_{16:1}$, типичные для разнообразных грамотрицательных бактерий, а также многочисленна редко встречаемая циклопропан-нонадекановая $C_{19:0cyclo}$.

В настоящее время нами описаны три штамма семейства *Halomonadaceae*: *Halomonas boliviensis* RS17, *Chromohalobacter japonicus* RS93 и *Chromohalobacter salexigens* RS92 из маточных рассолов производственных участков флотационного обогащения калийных минералов фирмы “Сильвинит” (г. Соликамск), были изолированы и [1]. Однако изучение состав ЖК в предыдущих исследованиях не проводился.

Halomonas boliviensis RS17 – психротроф с минимальной температурой роста 0–1°C, *Chromohalobacter salexigens* RS92 – мезофил с минимальной температурой роста 10°C и *Chromohalobacter japonicus* RS93 – мезофил с минимальной температурой роста 15°C. Все они являются галотолерантными, умеренно галофильными, нейтрофильными и алкалотолерантными бактериями. Лишь один *Chromohalobacter salexigens* RS92 способен продуцировать различные углеводы и аккумулировать внутриклеточные запасные жироподобные вещества – полигидроксиканоаты (полигидроксипутрат).

Halomonas boliviensis RS17 в составе жирных кислот продуцирует рекордно высокий процент ненасыщенных жирных кислот октадеценовая – C_{18:1} (47.1%) и гексадеценовая – C_{16:1} (17.55). Среди насыщенных ЖК преобладают: гексадекановая – C_{16:0} (17.28), циклопропан-нонадекановая – C_{19:0_{сус}} (15.47).

По сравнению с *H. boliviensis* RS17 у двух штаммов *Chromohalobacter* происходит снижение ненасыщенных кислот октадеценовой в 1.5 раза и гексадеценовой в 5 раз, но повышается в 2 раза содержание насыщенных ЖК. Между собой эти два штамма по составу ЖК так же отличаются. У *C. salexigens* RS92 в составе ЖК доминирует ненасыщенная – C_{18:1} (32.8) и в небольшом количестве содержится C_{16:1} (4.93), а среди насыщенных – C_{19:0_{сус}} (30.3) и C_{16:0} (27.71). А у *C. japonicus* RS93 в составе ЖК, наоборот преобладают насыщенные C_{16:0} (36.2), C_{19:0_{сус}} (30.3) и ненасыщенная – C_{18:1} (25.53).

У всех трех штаммов в небольших количествах и в разных соотношениях присутствуют насыщенные ЖК, такие как октадекановая – C_{18:0} (1.01-2.32), тетрадекановая – C_{14:0} (0.41-0.54) и додекановая – C_{12:0} (0.46-1.21).

Вариабельность состава ЖК позволяет характеризовать семейство, а их соотношение при культивировании в стандартных условиях для каждого штамма имеет свои особенности, достаточно постоянно и его можно использовать как таксономический признак, а также при анализе состава микробных сообществ без изолирования в чистых культурах культурах отдельных представителей.

Работа выполнена в рамках государственного задания номер госрегистрации темы: 01201353247 «Изучение функционального и видового разнообразия микроорганизмов, полезных для биоценозов и практической деятельности человека».

Библиографический список

1. Реутских Е.М. Филогенетическое разнообразие гаммапротеобактерий семейства *Halomonadaceae* в техногенных водах на территории Верхнекамского месторождения калийных солей // Сборник тез. конф. студентов и аспирантов «Фундаментальные и прикладные исследования в биологии и экологии» Пермь, 2012. С. 95-96.

НОВЫЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ ЭФФЕКТА ОГРАНИЧЕНИЯ СКОЛЬЖЕНИЯ У МИКРООРГАНИЗМОВ

Цыганов Иван Вадимович^{1,2}, Нестерова Лариса Юрьевна^{1,2},
Ткаченко Александр Георгиевич^{1,2}

¹*«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» –
филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия*

²*ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный
исследовательский университет, г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: микобактерии, скольжение, антибиотики

На сегодняшний день из-за неизбежно развивающейся адаптации бактерий к антибиотикам особую важность приобретает изучение скоординированных действий микроорганизмов, направленных на выживание колонии, так как подобные реакции способствуют как формированию устойчивости клеток к антибиотикам, так и более эффективному распространению бактериальных сообществ.

Микобактерии движутся по поверхностям сред за счет скольжения. Это особый тип распространения колонии, реализуемый благодаря экспансивной силе, возникающей при делении клеток [1], и уменьшению силы трения о поверхность, что достигается регуляцией гликопептидолипидного состава клеточной стенки [2] молекулами (p)ppGpp и c-di-GMP [3].

Ранее нами было показано, что некоторые нетоксичные для микобактерий вещества оказывают влияние на их способность к скольжению [4], но подобный эффект могут вызывать и токсичные соединения, например антибиотики. В этом случае трудно разделить ограничение скольжения и токсическое действие исследуемых веществ на микроорганизмы, так как уменьшение площади может быть следствием снижения, как числа клеток, так и ограничения их распространения.

Особенно это актуально, поскольку в последнее время активно ведется поиск веществ, которые могли бы оказывать действие на такие аспекты жизнедеятельности патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, как способность к формированию биопленок, вирулентность, работа QS [5,6].

Таким образом, при изучении механизма действия вновь синтезированных веществ, обладающих антибактериальной активностью, актуальным является разграничение действия на

скольжение и антибактериального эффекта этих соединений, мишенями для которых могут быть как гены, так и их продукты, ответственные за регуляцию данных процессов, например алармон (p)ppGpp, сигнальный нуклеотид c-di-GMP и др.

Целью нашего исследования было разработать метод, который позволил бы отделить эффект ограничения скольжения от бактериостатического или бактерицидного действия антибиотиков.

В качестве веществ, способных оказать влияние, как на скольжение, так и на численность клеток в скользящих колониях *M. smegmatis*, мы использовали антибиотики рифампицин, стрептомицин и тетрациклин, которые добавлялись в полужидкую (0,3% агара) питательную среду Middlebrook 7H9.

Для точного измерения площади колонии с неровными краями, мы использовали программу Adobe Photoshop. Чтобы определить, сопровождается ли уменьшение размера скользящей колонии уменьшением числа клеток, мы подсчитывали количество бактерий на 1 мм² скользящей колонии. Для этого мы переносили колонию вместе с агаром в микропробирку и ресуспендировали ее, после чего считали клетки в камере Горяева. Эффект ограничения скольжения без бактерицидного действия фиксировали в том случае, если при уменьшении площади скользящей колонии наблюдалось статистически значимое увеличение количества клеток на мм² по сравнению с контролем.

Из исследованных антибиотиков подобный эффект мы обнаружили только у рифампицина, при добавке минимальной концентрации которого снижение размера скользящей колонии сопровождалось статистически значимым увеличением количества клеток на мм². Добавка в среду стрептомицина и тетрациклина приводила к синхронному уменьшению площади колонии и количества клеток, что свидетельствует об изменении размера колонии за счет их бактерицидного или бактериостатического действия.

Таким образом, наша методика определения влияния различных веществ на способность к скольжению применима как для препаратов, обладающих антибактериальным действием, так и для нетоксичных субстанций. Она позволяет оценить влияние исследуемых веществ на подвижность и отделить его от бактериостатического или бактерицидного действия.

Исследование выполнено в рамках госзадания, номер госрегистрации темы 01201353249.

Библиографический список

1. Daffé M., Draper P. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity // *Advances in microbial physiology*. 1997. № 39. P. 131-203.

2. Ghosh S., Indi S. S., Nagaraja V. Regulation of lipid biosynthesis, sliding motility, and biofilm formation by amembrane-anchored nucleoid-associated protein of *Mycobacterium tuberculosis* // *Journal of bacteriology*. 2013. № 8. P. 1769-1778.

3. Gupta K. R. et al. Regulation of growth, cell shape, cell division and gene expression by second messengers (p)ppGpp and c-di-GMP in *Mycobacterium smegmatis* // *Journal of bacteriology*. 2016. № 198(9). P. 1414-1422.

4. Нестерова Л. Ю., Цыганов И. В., Ткаченко А. Г. Роль биогенных полиаминов в регуляции скольжения у микобактерий // *Вестник пермского университета. Серия: Биология*. 2017. № 3. С. 304-311.

5. Kalia V. C. Quorum sensing inhibitors: an overview // *Biotechnology advances*. 2013. № 2. P. 224-245.

6. Romero D. et al. Biofilm inhibitors that target amyloid proteins // *Chemistry & biology*. 2013. Т. 20. № 1. P. 102-110.

НАПРАВЛЕННАЯ БИОТРАНСФОРМАЦИЯ ЭКОТОКСИЧНОЙ ДЕГИДРОАБИЕТИНОВОЙ КИСЛОТЫ АКТИНОБАКТЕРИЯМИ

Черемных Ксения Михайловна^{1,2}, Лучникова Наталья Алексеевна²,
Гришко Виктория Викторовна³, Ившина Ирина Борисовна^{1,2}

¹*«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия*

²*ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия*

³*«Институт технической химии УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: дегидроабиетиновая кислота, биотрансформация, актинобактерии

Смоляные кислоты – трициклические дитерпеноиды, продуцируемые хвойными растениями семейства *Pinaceae* [1]. В процессе получения целлюлозы в результате механического и химического воздействия на древесину смоляные кислоты накапливаются (до 500 мг/л) в сточных водах целлюлозно-бумажной промышленности. Они аккумулируются в природных экосистемах и оказывают токсическое воздействие на живые организмы, что может приводить к нарушению экологического баланса [2]. Доминирующая

(от 35–60 %) составляющая сточных вод среди смоляных кислот – дегидроабетиновая кислота (ДАК) [3]. В связи с этим перспективным является поиск эффективных способов нейтрализации ДАК.

Известно, что производные ДАК обладают широким спектром биологической активности (противовирусной, противомикробной, фунгицидной, противоопухолевой) [4–6]. В настоящее время в качестве экологически безопасного и эффективного способа снижения содержания ДАК применяются методы селективной биотрансформации, основанные на использовании микроорганизмов. Актинобактерии, катализирующие широкий спектр стерео- и региоселективных реакций – одна из успешно разрабатываемых в биотехнологии групп микроорганизмов [7]. Цель настоящей работы – поиск штаммов актинобактерий, способных к эффективной биотрансформации ДАК.

В работе использовали 147 штаммов актинобактерий, относящихся к видам *Dietzia maris*, *Gordonia rubripertincta*, *G. terrae*, *Rhodococcus ruber*, *R. erythropolis* из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним ИЭГМ, WFCC # 768, www.iegм.ru/iegмcol). Бактерии выращивали в минеральной среде с добавлением 0,02–0,1 об. % *n*-гексадекана. ДАК (500 мг/л) в виде раствора в этаноле вносили через 48 ч роста культуры. Трансформирующую активность бактериальных клеток оценивали через 7 сут после добавления ДАК. Качественный и количественный состав продуктов биотрансформации определяли методами ТСХ и ГХ-МС.

Среди исследованных коллекционных культур отобраны штаммы *G. rubripertincta* ИЭГМ 100, ИЭГМ 120, ИЭГМ 132 и *R. erythropolis* ИЭГМ 267, катализирующие селективную биоконверсию ДАК с образованием ранее не описанного производного абитанового типа, идентифицированного нами как 5 α -гидроксид-ДАК.

В результате подбора условий эффективной биоконверсии ДАК установлено, что максимальный (24 %) выход 5-гидроксид-ДАК обеспечивает предварительное выращивание клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 267 в присутствии 0,06 об. % *n*-гексадекана. Образование более 100 мг/л данного 5 α -гидроксид-производного регистрируется уже через 48 ч ферментации. Использование клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 267, предварительно адаптированных к ДАК, обеспечивало максимальный выход 5-гидроксид-ДАК (49 %), а также ранее не описанного соединения 15,16,17-тринор-абитанового типа (38 %).

С помощью компьютерной программы прогноза возможной биоактивности органических соединений различной химической структуры (PASS, <http://www.pharmaexpert.ru/passonline/index.php>) проведена оценка полученных нами метаболитов. По результатам проведенного анализа 5-Гидроксид-ДАК с высоким (более 0,7)

коэффициентом вероятности может проявлять антиэкземную, дерматологическую и противовоспалительную активность, соединение 15,16,17-тринор-абиетанового типа – антисеборейную и антиэкземную активность. Оба метаболита могут обладать мукомебранным протекторным свойством.

Работа выполнена в рамках Комплексной программы фундаментальных исследований УрО РАН (проект 18-4-8-21) и государственного задания 6.3330.2017/ПЧ Минобрнауки России, а также при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-34-00109).

Библиографический список

1. Chow S.Z. High performance liquid chromatographic determination of resin acids in pulp mill effluent / S.Z. Chow, D. Shepard // Tappi Journal. – 1996. – V. 79, N. 10. – P. 173–179.
2. Liss S.N. Microbiology and biodegradation of resin acids in pulp mill effluents: a minireview / S.N. Liss, P.A. Bicho, J.N. Saddler // Canadian Journal of Microbiology. – 1997. – V. 43, N. 7. – P. 599–611.
3. Volkman J.K. Determination of resin acids by gas chromatography and high-performance liquid chromatography in paper mill effluent, river waters and sediments from the upper derwent estuary, Tasmania / J.K. Volkman, D.G. Holdsworth, D.E. Richardson // Journal of Chromatography A. – 1993. – V. 643. – P. 209–219.
4. González M.A. Synthesis and biological evaluation of dehydroabietic acid derivatives / M.A. González [et al.] // European Journal of Medicinal Chemistry. – 2010. – V. 45, N. 2. – P. 811–816.
5. Savluchinske-Feio S. Antimicrobial activity of resin acid derivatives / S. Savluchinske-Feio, M.J.M. Curto, B. Gigante, J.C. Roseiro // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2006. – V. 72, N. 3. – P. 430–436.
6. Huang X.C. Synthesis and antitumor activities of novel thiourea α -aminophosphonates from dehydroabietic acid / X.C. Huang [et al.] // European Journal of Medicinal Chemistry. – 2013. – V. 69. – P. 508–520.
- Martínková L. Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus* / L. Martínková [et al.] // Environment International. – 2009. – V. 35, N. 1. – P. 162–177.

ИНФОРМАТИВНОСТЬ ISSR-МАРКЕРОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ЛИСТВЕННИЦЫ СИБИРСКОЙ (*LARIX SIBIRICA* LEDEB.) НА УРАЛЕ

Чертов Никита Валерьевич¹, Васильева Юлия Сергеевна¹,
Пришнивская Яна Викторовна^{1,2}, Жуланов Андрей Александрович¹

¹ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный
исследовательский университете, г. Пермь, Россия

²Естественнонаучный институт Пермского государственного
национального исследовательского университета, г. Пермь, Россия

Ключевые слова: генетическое разнообразие, полиморфизм
ДНК, ISSR-маркеры, *Larix*

Одной из важнейших задач популяционной биологии является изучение генетического разнообразия и внутривидовой дифференциации лесообразующих видов хвойных, в том числе и видов рода *Larix*, имеющих важное биосферное и ресурсное значение. Для оценки генетического потенциала вида и разработки стратегии рационального природопользования, необходимы знания об генетической структуре популяций, уровне их генетической изменчивости и характере её распределения в пределах ареала видов [1].

Объектами исследований являлись четыре популяции *L. sibirica* расположенные на Северном и Среднем Урале: Ish – на территории заповедника «Вишерский», юго-западный склон г. Ишерим, Gn - находится северо-западной части Пермского края на территории Гайнского лесничества, Kch – расположена на территории Верхотурского лесничества Свердловский области, Sks – находится на территории Кишертского лесничества Пермского края.

Для молекулярно-генетического анализа *L. sibirica* был избран ISSR-метод (Inter Simple Sequence Repeats) или межмикросателлитный анализ полиморфизма ДНК. Амплификацию проводили в термоциклере Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA) по типичной для ISSR-метода программе. Температура отжига в зависимости от G/C-состава праймеров варьировала от 54° до 64°C. Продукты амплификации разделяли путем электрофореза в 1,7% агарозных гелях, которые окрашивали бромистым этидием и фотографировали в проходящем ультрафиолетовом свете в системе гель-документации Gel Doc XR (Bio-Rad, USA). ISSR-праймеры для анализа (CR-215, ISSR-8, X10, X11, M3) были отобраны ранее в других исследованиях [2].

Эффективность используемого метода и праймеров оценивали с использованием таких параметров как, мера информационного полиморфизма (PIC) показывающая способность маркера устанавливать полиморфизм в популяции, эффективное мультиплексное отношение (EMR) характеризующее эффективность системы «праймер-маркер», маркерный индекс (MI) оценивающий суммарную пригодность маркерной системы и показатель разрешающей способности (R_p), отражающий способность сочетания «праймер – применяемая методика» устанавливать различия между большим числом генотипов [3]. Компьютерный анализ полиморфизма ДНК проведен с помощью специализированного макроса GenAlEx6.5 для MS-Excel. Для описания генетического разнообразия популяций *L. sibirica* были использованы следующие параметры: доля полиморфных локусов (P_{95}) [4], эффективное число аллелей (n_e) [5], ожидаемая гетерозиготность (H_e) [6].

Анализ эффективности избранного метода и праймеров выявил достаточно высокую способность маркера устанавливать полиморфизм ($PIC = 0,307$), высокую эффективность системы «праймер-маркер» ($EMR = 21,351$), достаточную пригодность маркерной системы ($MI = 6,864$) и высокую разрешающую способность метода ($R_p = 20,270$). Наибольшей эффективностью отличается праймер X11 ($PIC = 0,381$; $EMR = 35$; $MI = 13,335$; $R_p = 25,117$), а наименьшей ISSR-8 ($PIC = 0,265$; $EMR = 15,100$; $MI = 4,002$; $R_p = 14,917$).

Наибольшим генетическим разнообразием характеризуется популяция Gn из Гайнского лесничества ($P_{95} = 0,872$; $H_e = 0,232$; $n_e = 1,393$), а наименьшим популяция Ish из заповедника «Вишерский» ($P_{95} = 0,828$; $H_e = 0,192$; $n_e = 1,321$).

Таким образом, выбранный метод и праймеры обладают достаточно высокой эффективностью и информативностью, что позволяет использовать их для дальнейших исследований. Анализ общего генетического разнообразия лиственницы выявил высокую степень изменчивости изученных популяций ($P_{95} = 0,942$; $H_e = 0,215$; $n_e = 1,363$).

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00348\18

Библиографический список

1. Ефремов, С.П. Биоразнообразие лиственниц Азиатской России / отв. ред. С.П. Ефремов, Л.И. Милютин; Рос. академ. наук, Сиб. отд-ние, Ин-т леса им. В.Н. Сукачева. – Новосибирск: Гео, 2010. – 159 с.
2. Анализ полиморфизма ISSR-PCR маркеров и генетической структуры некоторых популяций лиственницы сибирской на Урале / Ю.С. Нечаева [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 6.

3. Чесноков, Ю.В. Оценка меры информационного полиморфизма генетического разнообразия / Ю.В. Чесноков, А.М. Артемьева // Сельскохозяйственная биология. – 2015. – Т. 50. – № 5. – С. 571-578.

4. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // J.G.K. Williams [et al.] / Nucl. Acids Res. – 1990. – V. 18. – P. 6531-6535.

5. Kimura, M. The number of alleles that can be maintained in a finite population // M. Kimura, J.F. Crow / Genetics. – 1964. – V. 49. – P. 725-738.

6. Nei, M. Molecular Evolutionary Genetics / M. Nei. – New York: Columbia University Press, 1987. – 512p.

ЛИПОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИЗОЛЯТОВ ИЗ ЩЕЛОЧНЫХ ЭКОТОПОВ С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ СОЛЕЙ

Шилова Анна Владимировна, Максимов Александр Юрьевич,
Максимова Юлия Геннадьевна

*«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал
ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: алкалофильные бактерии, липолитическая активность, содовое озеро

Содовые озера являются особой формой соленых озер, характеризующихся преобладанием карбонатов/бикарбонатов натрия, что обуславливает стабильно высокий уровень pH (9.0–11.0). В результате создаются уникальные двойные экстремальные условия солености и щелочности, препятствующие развитию в них эукариотного сообщества, при этом прокариотная микробная популяция представлена крайне разнообразно [1–3]. Однако разнообразие микроценозов щелочных экотопов антропогенного происхождения изучено мало, хотя в данном случае интерес представляют процессы вторичной адаптации к защелачиванию и высокой концентрации солей. Микроорганизмы, выделенные из сред с экстремальными условиями, представляют интерес как источник ферментов, которые могут быть использованы в производстве моющих средств и в других отраслях промышленности.

Целью данного исследования является изучение липолитической активности бактерий, изолированных из осадка шламохранилища и

техногенных поверхностных образований старого содового озера завода ОАО «Сода», г. Березники.

Объектами исследования являлись 18 культур, выделенные из проб шламохранилища на минеральной среде Пфеннига (рН 8,0) с селективным субстратом Твин-80. Проведен подсчет микроорганизмов, чистые культуры выделены и идентифицированы методом секвенирования генов 16S рРНК. Реакцию проводили в объеме 4 мл с хромогенным субстратом п-нитрофениллауратом, который расщепляется липазой с образованием п-нитрофенола. Липолитическую активность определяли по росту оптической плотности среды при $\lambda=405$ нм на спектрофотометре Ultraspec3000.

В исследуемых образцах наблюдалось высокое количество бактерий, обладающих липолитической активностью (до $5,7 \times 10^9$ КОЕ/г). Идентифицировано 14 наиболее активных бактериальных культур из 18, которые обладают липолитической активностью (таблица 1).

Таблица 1

Идентификация изолятов-липолитиков

№	Вид	Типовой штамм	% сходства	Количество нуклеотидов
3,14,15	<i>Pseudomonas peli</i>	R-20805(T)	99,17	855
4	<i>Sphingopyxis chelensis</i>	S37(T)	99,47	1321
5	<i>Bosea lathyri</i>	DSM 26656(T)	99,75	809
6	<i>Ensifer morelensis</i>	Lc04(T)	99,76	1264
8	<i>Bacillus vietnamensis</i>	B-23890(T)	99,88	814
9	<i>Bacillus litoralis</i>	SW-211(T)	100,00	870
10	<i>Exiguobacterium undae</i>	DSM 14481(T)	100,00	842
11	<i>Ensifer morelensis</i>	Lc04(T)	100,00	712
12	<i>Citricoccus zhacaeasis</i>	FS24(T)	99,17	844
13	<i>Ensifer morelensis</i>	Lc04(T)	99,63	810
16	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i>	AMX 26B(T)	99,88	843
17	<i>Pseudoxanthomonas putridarboris</i>	WD12(T)	98,56	835

Исследована липолитическая активность супернатанта культуральной среды 18-ти бактериальных культур. Активность отмечена у образцов надосадочной жидкости 6-ти культур (таблица 2), причем наибольшую активность наблюдали у культур, идентифицированных как *P. peli*. Активность внутриклеточной липазы проявили 17 культур бактерий (таблица 2). Высокая липолитическая активность отмечена у культур *P. peli.*, а также *P. mexicana* и *P. putridarboris*.

Таблица 2

Липолитическая активность супернатанта и биомассы исследуемых бактериальных культур

Культура	Удельная активность липазы	
	Супернатант; мкмоль/мин/л	Биомасса; мкмоль/мин/мг
№ 3,14,15 <i>Pseudomonas peli</i>	0,829; 0,780; 0,737	2,968;1,357; 2,245
№ 4 <i>Sphingopyxis chelensis</i>	0	0,191
№ 5 <i>Bosea lathyri</i>	0	0,184
№ 8 <i>Bacillus vietnamensis</i>	0	0,124
№ 9 <i>Bacillus litoralis</i>	0	0,130
№ 10 <i>Exiguobacterium undae</i>	0	0,140
№ 11 <i>Ensifer morelensis</i>	0	0,176
№ 12 <i>Citricoccus zhacaieasis</i>	0	0,180
№ 13 <i>Ensifer morelensis</i>	0,342	0,329
№ 16 <i>Pseudoxanthomonas mexicana</i>	0,253	0,539
№ 17 <i>Pseudoxanthomonas putridarboris</i>	0	0,410

Наибольший интерес для промышленности представляют внеклеточные ферменты микроорганизмов, выделенных из экстремальной среды, т.к. они могут работать в условиях высокой щелочности и солености. В связи с этим наиболее перспективными из изученных явились изоляты *P. peli*, проявившие как внутри-, так и внеклеточную липазную активность.

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер госрегистрации темы 01201353247.

Библиографический список

1. Труды Института микробиологии им. С.Н. Виноградского. Выпуск XIV. Алкалофильные микробные сообщества. М.: Наука, 2007. 396 с.
2. Foti M.J., Sorokin D.Y., Zacharova E.E., Pimenov N.V., Kuenen J.G., Muyzer G. Bacterial diversity and activity along a salinity gradient in

soda lakes of the Kulunda Steppe (Altai, Russia) // Extremophiles. 2008. V. 12. P. 133–145.

3. Grant W.D., Sorokin D.Y. Distribution and diversity of soda lake alkaliphiles // Extremophiles Handbook / Eds. K. Horikoshi et al. Springer, 2011. V. 1. P. 27–54.

ИЗУЧЕНИЕ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ПОЧВЕННОГО ПОКРОВА Г. ПЕРМИ

Шишкин Михаил Андреевич, Шерстобитова Наталья Петровна,
Масленникова Ирина Леонидовна, Кузнецова Марина Валентиновна

*«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал
ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: городские почвы, микробные сообщества, газовая хроматография–масс-спектрометрия

Программы микробиологического мониторинга окружающей среды выполняются во многих крупных промышленных городах России. Такие исследования позволяют охарактеризовать участие микроорганизмов в экологических функциях городских почв, а также разработать технологию проведения индикации различных городских загрязнений [1]. Одним из современных методов, используемых для изучения микробного разнообразия экосистем, является метод газовой хроматографии–масс-спектрометрии (ГХ–МС) [2].

Цель работы – оценить влияние физико-химических факторов и токсичности почвы на структуру почвенного микробного сообщества, реконструированного методом ГХ–МС.

Отбор образцов ($n = 216$) выполнен в семи районах города в соответствии с методическими указаниями (МУ 2.1.7.730-99) из расчета одна площадка на км^2 (число площадок в городе – 214, контрольных площадок – 2) в мае-июне 2016 г. в период устойчивой сухой и жаркой погоды.

Концентрации тяжелых металлов определяли в водной вытяжке методом атомной абсорбции согласно РД 52.18. 286-91. Для оценки уровня загрязнения городских почв рассчитывали коэффициенты накопления (K_c) и суммарный показатель загрязнения (Z_c), равный сумме $K_c > 1,5$ [3]. Токсичность определяли с использованием биOLUMИнесцентного микробиотеста. Реконструирование

таксономического состава микробных сообществ почв проводили методом газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (ГХ–МС) [2] с использованием системы «Agilent 6890/5973».

По данным ГХ–МС в городских почвах общее количество микроорганизмов, исключая грибы, составило $6,03E+07 \pm 1,30E+08$ клеток/г почвы (минимум – $2,27E+06$, максимум – $1,16E+09$). Определено 45 видов бактерий, принадлежащих к 33 родам. Среднее число видов в образце – $33,2 \pm 5,9$. Хотя соотношение различных филогенетических групп микроорганизмов в почвах существенно различалось, доминирующее положение занимали граммотрицательные протеобактерии – $48,9 \pm 25,5\%$ (из них α -Proteobacteria – $43,5 \pm 25,6\%$) и Firmicutes – $31,2 \pm 29,6\%$ (*Clostridium* spp. – $25,0 \pm 29,9\%$). В меньшем количестве выявлены представители филума Actinobacteria – $17,9 \pm 8,8\%$ (*Pseudonocardia* spp. – $10,1 \pm 8,6\%$), а Acidobacteria и анаэробные бактерии из филума Bacteroidetes были минорными участниками почвенных сообществ.

Большая часть почв оказались нетоксичными – I и II класс (115; 53,7% и 69; 32,2%), в классы III «допустимая степень токсичности» и IV «образец токсичен» распределены 8 (3,7%) и 6 (2,8%) образцов соответственно. Общее число клеток в почвах уменьшалось в ряду повышения их токсичности:

I	($4,30E+06 \pm 1,64E+07$)	≥ II	($2,57E+06 \pm 4,36E+06$)	> III	($8,38E+05 \pm 1,07E+06$)	≥ IV	($6,06E+05 \pm 9,65E+05$).	Количество	видов,
детектированных в разных по уровню токсичности почвах, не различалось между группами. Согласно существующим нормативам, при величине суммарного показателя загрязнения почвы тяжелыми металлами Zc менее 16, она относится к категории загрязнения «допустимой», 16-32 – к категории загрязнения «умеренно опасной» и более 32 – «опасной». Показатель Zc в городских почвах существенно варьировал (от 1,0 до 41,5). Превышение порога допустимой категории загрязнения отмечено только в 9 почвах, а превышение порога «умеренно опасной» категории – в одном. Достоверных отличий по численности микроорганизмов между почвами, сгруппированными по степени загрязнения, не выявлено. Хотя корреляционный анализ показал слабую отрицательную зависимость числа видов бактерий от Zc ($r = -0,364$), в образцах, отнесенных к категории загрязнения «умеренно опасные» и «опасные», видовой состав был статистически значимо ниже, чем в группе «допустимого» загрязнения. В большинстве загрязненных почв выявлено значительное представительство бактерий родов <i>Rhizobium</i> , <i>Caulobacter</i> , <i>Mycobacterium</i> , что, как известно, свидетельствует о высоком углеводородном загрязнении. Численность бактерий филума Actinobacteria (<i>Corynebacterium</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Propionibacterium</i> , <i>Rhodococcus</i> и др.) заметно снижалась в образцах, загрязненных тяжелыми металлами ($17,9 \pm 8,8\%$ в урбанозомах против									

45,2±15,1% в контроле). Представители *Desulfovibrio*, напротив, не были обнаружены в контрольных почвах, но часто присутствовали в образцах с повышенным Zc ввиду их относительной устойчивости к тяжёлым металлам.

В урбанизированных экосистемах почвенный микробиоценоз характеризуется в определенной степени стабильностью и устойчивостью к поллютантам. Отклик микробиоты зафиксирован на уровне «допустимая степень токсичности» и «умеренно опасной» категории загрязнения почв. Выявленные нами сопряженные с антропогенным загрязнением качественные и количественные изменения почвенной микробиоты дополняют теоретические представления о влиянии антропогенных факторов на структурную организацию микробного сообщества почвы.

Работа поддержана грантом РФФИ-урал 16-45-590497.

Библиографический список

1. Калинкина В.Е., Сальникова Н.А., Сальников А.Л. К вопросу о биоремедиации урбанизированных почв аридной зоны России: микробиологические показатели и индикаторные биообъекты // Научный журнал Российского НИИ проблем мелиорации. 2015. № 1(17). С. 26-40.
2. Верховцева Н.В., Осипов Г.А. Метод газовой хроматографии–масс-спектрометрии в изучении микробных сообществ почв агроценоза. Проблемы агрохимии и экологии. 2008. №1. С. 51-54.
3. Ревич Б.А., Сает Ю.Е., Смирнова Р.С., Сорокина Е.П. Методические рекомендации по геохимической оценке загрязнения территорий городов химическими элементами. М.: ИМГРЭ, 1982. 111 с.

СЕКЦИЯ II

ТЕХНОЛОГИИ АЭРОКОСМИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛОВЕДЕНИЯ

ПРОБЛЕМЫ СОЗДАНИЯ ЗВУКОПОГЛАЩАЮЩИХ КОНСТРУКЦИЙ ПЕРСПЕКТИВНЫХ АВИАЦИОННЫХ ДВИГАТЕЛЕЙ

Аношкин Александр Николаевич, Писарев Павел Викторович

*ФГБОУ ВО Пермский национальный исследовательский
политехнический университет, г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: звукопоглощающие конструкции, композиционные материалы, численное и экспериментальное моделирование

В настоящее время перед разработчиками и производителями авиационной техники стоит задача по созданию самолетов с улучшенными экологическими характеристиками. Одной из проблем, требующих решения, является вредное воздействие шума, создаваемого самолетами на население, живущее вблизи аэропортов и трасс полетов[1,2].

Международные стандарты, установленные ИКАО – Международной организацией по гражданской авиации и определяющие нижний предел шума самолетов, постоянно пересматриваются в сторону ужесточения, поэтому требование снижения уровня шума — это еще и экономический фактор, закрывающий путь на рынок «шумным» самолетом и, следовательно, «шумным» двигателям.

Для решения задачи снижения шума авиационного двигателя во всем мире непрерывно проводятся теоретические и экспериментальные исследования по определению акустических характеристик звукопоглощающих конструкций (ЗПК), конструкций и устройств, применяемых в газоздушных трактах авиационных двигателей для снижения уровня шума [3,4].

Существующие методы расчетов достаточно хорошо описывают влияние уровня звукового давления на характеристики ЗПК, но влияние более сложных факторов: воздушного потока, азимутальных мод с

большими азимутальными числами, порожденными роторами и ротор-статор взаимодействием изучено недостаточно.

Среди экспериментальных методов преобладают исследования и акустических характеристик ЗПК, с применением интерферометров, с нормальным и касательным падением звуковых волн [5]. При этом современные методики не учитывают наличие масштабного эффекта. А существующие предсказательные модели для определения акустических характеристик ЗПК верифицируются по экспериментальным данным, полученным на основе испытаний маломасштабных образцов.

Таким образом, используемая информация является малопредставительной и полученные в конечном итоге крупногабаритные звукопоглощающие конструкции имеют акустические характеристики отличные от проектных.

Для решения данной проблемы необходимо осуществить переход к прямому экспериментальному определению акустических характеристик ЗПК на натурном двигателе с учетом модальной структуры акустического поля вблизи источника (вентилятора), а также вблизи открытого конца канала ТРДД.

Вместе с тем необходимо расширить поиск оптимального импеданса ЗПК среди класса нелокально реагирующих поверхностей (традиционно рассматриваются локально реагирующие ЗПК) [6].

Кроме того, необходимо разработать ЗПК с контролируемо варьируемым импедансом в заданном диапазоне частот, что должно позволить уточнять параметры ЗПК по мере создания двигателя и самолет.

Актуальной представляется задача по разработке и внедрению методик и программных комплексов, позволяющих проводить непрерывную оптимизацию параметров ЗПК на основе минимизации уровней шума в сумме по трем контрольным точкам с учетом всех источников шума самолета

Библиографический список

1. Маслова Э.Г., Соболев А.Ф. Увеличение эффективности звукопоглощающих конструкций с целью снижения шума самолета на местности // ТВФ, 1992. № 1-3. С. 26-33.
2. А.Г. Мунин, В.Е. Квитка. Авиационная акустика // -М.: «Машиностроение», 1973, 448 с.
3. Соболев А.Ф., Соловьева Н.М., Филиппова Р.Д. Расширение частотной полосы звукопоглощения облицовок силовых установок самолетов. Акуст. журн. 1995. Т. 41. № 1. С. 146-152.
4. Соболев А.Ф., Ушаков В.Г., Филиппова Р.Д. Звукопоглощающие конструкции гомогенного типа для каналов авиационных двигателей Акуст. журн. 2009. Т. 55. №6. С. 749-759.

5. А.Н. Аношкин, А.Г. Захаров, Н.А. Городкова, В.А. Чурсин Расчетно-экспериментальные исследования резонансных частот многослойных звукопоглощающих конструкций // Вестник ПНИПУ. Механика. № 1 (2015) 5–20.

6. P. V. Pisarev, A. N. Anoshkin, and A. A. Pan'kov Acoustic resonance in the cylindrical two-chamber cell with the elastic permeable membrane. Citation: (2016) ISJ Theoretical & Applied Science, 12 (44): 55-61.

ЧИСЛЕННЫЙ РАСЧЕТ СКАЧКА УПЛОТНЕНИЯ ВРАЩАЮЩЕГОСЯ С ЛОПАТОЧНЫМ КОЛЕСОМ ВЕНТИЛЯТОРА АВИАЦИОННОГО ДВИГАТЕЛЯ

Белов Виталий Геннадьевич^{1,2}, Дегтярев Владислав Владиславович^{1,2},
Синер Александр Александрович^{1,2}

¹ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный
исследовательский университет, г. Пермь, Россия

²АО «ОДК-Авиадвигатель», г. Пермь, Россия

Ключевые слова: скачок уплотнения, рабочая лопатка
вентилятора, сеточная адаптация

Для вентиляторных ступеней современных авиационных двигателей гражданской авиации характерны трансзвуковые режимы обтекания рабочих лопаток вентилятора на периферии лопатки. На высоких режимах работы двигателя при взлете самолета на периферии рабочей лопатки вентилятора наблюдаются скачки уплотнения, вращающиеся вместе с лопаточным колесом. При выполнении расчетов генерации звука такими вентиляторными ступенями требуется с высокой точностью моделировать систему вращающихся скачков уплотнения и проходящие через него звуковые волны. Одним из способов повышения точности расчета является локальное сгущение сетки вблизи скачка уплотнения. Для реализации такого сгущения возможно использовать адаптацию сетки в пакете ANSYS Fluent.

В данной работе рассматривается методика расчета системы скачков уплотнения с применением динамической адаптации в пакете ANSYS Fluent. Расчеты выполняются с использованием осредненных по Рейнольдсу уравнений Навье-Стокса. Для замыкания уравнений используется k-ε модель турбулентности. Газ считается термодинамически совершенным и вязким. Основным режимом, на

котором выполняются расчеты, является режим взлета. В расчетах используется сектор из одной рабочей лопатки вентилятора. На входе в расчетную область задается полное давление и полная температура, соответствующее полетным условиям, на выходе из расчетной области задается расход воздуха. На втулочной и периферийной поверхностях, а также на поверхности рабочей лопатки вентилятора задаются условия прилипания, а также условия теплоизоляции. В ходе работы рассматриваются различные параметры, по которым выполняется адаптация сетки: число Маха, градиент давления, производная давления по осевой координате. Адаптация сетки выполняется при достижении указанных параметров определенных пороговых значений, например, при адаптации по градиенту давления таким пороговым значением являлись величины 0.09 и 0.15 (нормализованные значения). При адаптации по значению производной давления по осевой координате пороговое значение составляло 10^6 . Кроме пороговых значений параметров адаптации в расчетах менялось количество уровней адаптации. В ходе расчетов выявлено, что адаптация по производной давления по осевой координате наилучшим образом ложится на фронт скачка уплотнения. Для оценки качества расчета строились распределения давления в окружном направлении на небольшом расстоянии перед входной кромкой рабочей лопатки вентилятора. Основным критерием качества расчета выступала ширина скачка. При использовании адаптации по осевой производной давления ширина скачка оказалась минимальной. Кроме повышения точности расчета в работе оценивается изменение размерности сетки при включении адаптации и тем самым оценивается возможное замедление расчета. По результатам работы формулируются рекомендации по применению сеточной адаптации при выполнении расчетов трансзвукового течения в рабочей лопатке вентилятора современного авиационного двигателя.

ЧИСЛЕННЫЙ РАСЧЕТ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ВРАЩАЮЩЕГОСЯ ЛОПАТОЧНОГО КОЛЕСА ТУРБОМАШИНЫ С ОТДЕЛЬНОЙ АКУСТИЧЕСКОЙ МОДОЙ

Большагин Никита Николаевич^{1,2}, Колегов Руслан Николаевич^{1,2},
Синер Александр Александрович^{1,2}, Шуваев Николай Васильевич^{1,3}

*¹ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный
исследовательский университет, г. Пермь, Россия*

²АО «ОДК-Авиадвигатель», г. Пермь, Россия

³ПАО «ОДК-Сатурн», г. Пермь, Россия

Ключевые слова: акустика, коэффициент отражения, газотурбинный двигатель, ANSYS Fluent

Аэроакустические нагрузки, которые по природе являются нестационарным процессом, могут приводить к существенным поломкам. Диагностика таких нагрузок возможна только на этапе эксплуатации авиационного двигателя, что ведет к увеличению затрат на ремонт и снижению экономической эффективности предприятия. Так как такие нагрузки возникают при сочетании факторов, которые важно знать до проведения эксперимента, то проведение эксперимента становится сложной задачей. Таким образом, перспективным методом исследования данных процессов является численное моделирование.

При моделировании акустических процессов, происходящих внутри узла двигателя, влияние соседних узлов можно учесть при помощи постановки специальных импедансных граничных условий на входе и выходе, тем самым значительно сократив вычислительные затраты [1]. Кроме того, акустические и газодинамические процессы в проточной части двигателя, такие как ротор-статор взаимодействие, имеют существенно разные временные периоды. Разница в значениях шага по времени, необходимых для разрешения соответствующих процессов, может привести к существенному снижению эффективности проводимых расчетов [2,3].

В результате взаимодействия падающей акустической волны с лопаточным венцом часть энергии волны отражается обратно. Основной характеристикой данного процесса является значение коэффициента отражения [4]:

$$\tilde{p} = R p,$$

где p – комплексная амплитуда давления в падающей волне, $\tilde{p}$ – комплексная амплитуда давления в отраженной волне, R – комплексный коэффициент отражения.

Объектом исследования является изолированное рабочее колесо с лопатками NASA Rotor 67. Были выполнены расчеты прохождения плоской акустической волны через расчетную область с заданной амплитудой и различными частотами – 500, 1000, 1500, 2000 Гц. Расчеты проводились в газодинамической программе ANSYS Fluent.

Воздух смоделирован как совершенный вязкий газ с постоянной теплоемкостью, используется k-ε модель турбулентности. Использовались схемы второго порядка точности для уравнений неразрывности, движения и энергии, первого порядка – для уравнений относительно кинетической энергии турбулентных пульсаций и скорости диссипации.

В качестве граничных условий на входе в расчетную область задавалось полное давление, на выходе статическое давление. На входе

также были заданы неотражающие граничные условия. Нестационарный расчет проводился на номинальном режиме работы ротора.

Полученное расчетным путем мгновенное распределение отклонений давления от стационарных значений для режима «100%» приведено на рисунке.

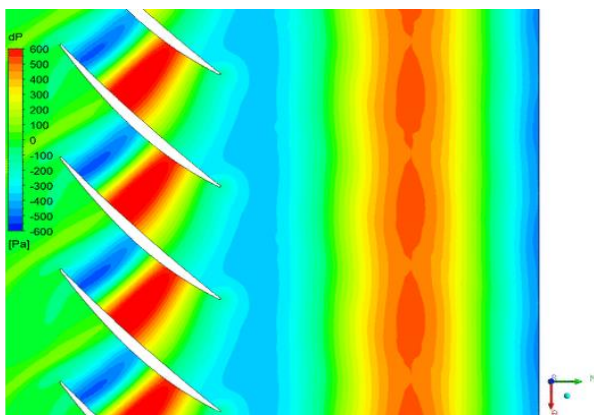


Рисунок. Мгновенное распределение отклонений давления от стационарных значений для режима «100%»

В качестве первого приближения, для определения коэффициента отражения использован двухмикрофонный метод [4], используемый для обработки экспериментов с импедансной трубой. Вычисляется коэффициент отражения с помощью передаточной функции [4], определяемой через осредненные взаимный и автоспектр сигнала давления в двух точках, разнесенных по оси вращения ротора на небольшое расстояние. По результатам расчетов получены зависимости коэффициента отражения R и акустического импеданса Z от частоты набегающей плоской волны.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Пермского края в рамках научного проекта № 17-41-590409 p_a.

Библиографический список

1. Silva C.F., Duran I., Nicoud F., Moreau S. Boundary Conditions for the Computation of Thermoacoustic Modes in Combustion Chambers // AIAA Journal, 2014, vol. 52, no. 6, pp. 1180-1193. DOI: 10.2514/1.J052114
2. Kwatra N., Su J., Gretaars J.T., Fedkiw R. A method for avoiding the acoustic time step restriction in compressible flow // Journal of Computational Physics, 2009, vol. 228, no. 11. P. 4146–4161. DOI: 10.1016/j.jcp.2009.02.027
3. Patel K., Novak C., Defoe J. A Novel Numerical Approach for Generation and Propagation of Rotor-Stator Interaction Noise // Proceedings

of 22th AIAA/CEAS Aeroacoustics Conference, 30 May - 1 June 2016, Lyon, France. AIAA Paper 2016-22821. DOI: 10.2514/6.2016-2821

4. Chung J.Y., Blaser D.A. Transfer function method of measuring in-duct acoustic properties. I. Theory // Journal of acoustical society of America, vol. 68, no. 3, 1980, pp. 907-913. DOI: 10.1121/1.384778

МОДЕЛИРОВАНИЕ НАНОКОМПОЗИТА, ПОЛУЧАЕМОГО ПУТЕМ МОДИФИКАЦИИ ЭПОКСИД- ПОЛИМЕРА НАНОЧАСТИЦАМИ

Боков Кирилл Александрович, Бузмакова Мария Михайловна

*ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный
исследовательский университет, г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: математическое и компьютерное моделирование, теория перколяции, нанокompозиты, эпоксид-полимер, углеродные нанотрубки

Полимерные нанокompозиты привлекают внимание исследователей в силу возможности придавать этим материалам уникальные свойства. Например, можно путем добавления углеродных нанотрубок в полимер повысить его прочность или придать ему электропроводность. Особенностью таких модификаций является то, что свойствами можно управлять, меняя концентрацию нанонаполнителя. Это особенно важно в таких стратегических отраслях промышленности, как, например авиа- и космостроение. Однако в настоящее время такие наноматериалы мало исследованы, и неизвестно как поведет тот или иной полимер с разными наномодификаторами в разных концентрациях. Возникает потребность в теоретическом исследовании структуры и свойств таких материалов, в том числе проведении натуральных и компьютерных экспериментов.

В рамках данной работы предложена и исследована перколяционная модель структуры тонкой пленки эпоксид-полимера, модифицированного углеродными нанотрубками. Полимерная матрица представлена квадратной решеткой, углеродные нанотрубки – k -меры (к-подряд занятых узлов решетки). Горизонтальные и вертикальные ориентации k -меров равновероятны. k -меры равномерно распределены по всей решетке. При моделировании использовались периодические граничные условия. Учтено наличие межфазных областей (областей нанокompозита, структура и свойства которого не принадлежат ни

полимеру, ни наномодификатору и находится на границе взаимодействия полимера с наночастицами) в виде наличия связи между k -мерами. Связь между k -мерами характеризует их принадлежность одному кластеру (в рамках данной модели длина связи – это количество узлов, принадлежащих так называемой межфазной области). То есть, при попадании в область длины связи одного k -мера другим k -мером считается, что k -меры принадлежат одному кластеру. Таким образом, рассмотрена решетчатая перколяционная задача узлов и связей k -меров, которая математически описана следующим образом

$$M = \langle L, Z_n, k, sw, p, K \rangle,$$

где L – линейный размер квадратной решетки, $Z_n = \{x_i, y_i\}$, $i = \overline{1, n}$ – множество пар координат начала k -мера, k – длина k -мера, sw – длина связи, p – заданная концентрация k -меров, K – количество испытаний на каждом уровне концентрации.

Основным результатом решения перколяционной проблемы является определение порога перколяции – концентрации занятых узлов решетки, при которой вероятность возникновения перколяционного кластера равна 0.5. Перколяционный кластер – кластер, пронизывающий всю решетку. Порог перколяции соответствует критической концентрации углеродных нанотрубок в полимере, при которой наноматериал меняет свои свойства.

Моделирование проводилось с использованием методов Монте-Карло. Для реализации модели была написана программа на языке программирования C#. Алгоритмы равномерного распределения k -меров, разбиения их по кластерам и поиска перколяционного кластера, а также методика определения порога перколяции подробно описаны в работах [1, 2]. Пример разбиения на кластеры k -меров приведен на рисунке 1. Получены предварительные результаты моделирования для следующих входных параметров: $L=10000$, $k=100$, $0 \leq sw \leq 20$, $K=1000$, которые представлены на рисунке 2. Длина k -мера взята за 100, так как это значение соответствует аспектному отношению малой нанотрубки (отношения длины к радиусу). При длине связи, равной нулю, порог перколяции совпадает со значением порога перколяции для задачи узлов при $k = 100$, что подтверждает адекватность предложенной модели.

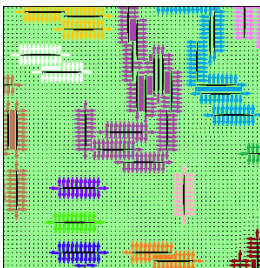


Рис. 1. Разбиение на кластеры k -меров, $k = 100$, $sw = 20$

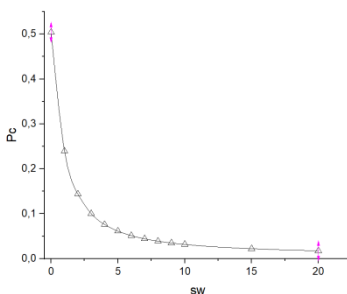


Рис. 2. Зависимость порога перколяции от длины связи при $k = 100$

На рисунке 2 видно, что при увеличении длины связи порог перколяции уменьшается. Таким образом, подтверждается наличие межфазных областей в нанокompозите, влияющих на его свойства и сопоставление полученных результатов с результатами натурных экспериментов можно определить величину межфазного слоя, что является задачей авторов настоящей работы на будущее.

Работа выполнена при финансовой поддержке Правительства Пермского края в рамках научного проекта № С-26/793 и гранта РФФИ (№ 17-41-590649).

Библиографический список

1. Боков К. А., Бузмакова М. М. Компьютерное моделирование перколяции k -меров на квадратной решетке // Вестник Пермского университета. Серия: Математика. Информатика. Механика. 2018. 1 (40). С. 51-55.
2. Бузмакова М. М. Компьютерное моделирование континуальной перколяции сфер и эллипсоидов с проницаемыми оболочками // диссертация на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук 05.13.18 — математическое моделирование, численные методы и комплексы программ, Астрахань, 2013. 168 с.

РЕОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭПОКСИДНОЙ КОМПОЗИЦИИ МОДИФИЦИРОВАННОЙ ФУЛЛЕРЕНАМИ

Бузмакова Мария Михайловна, Гилев Валерий Григорьевич,
Русаков Сергей Владимирович

*ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный
исследовательский университет, г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: эпоксидная смола, фуллерены

Исследуются реологические свойства эпоксид-полимера модифицированного фуллеренами C_{60} .

В опытах использовалась эпоксидная смола L с отвердителем EPH 161 рекомендованная для аэрокосмического применения (соотношение смешивания в весовых частях 4:1). В качестве модификатора использовались фуллерены C_{60} (98+) производства ООО НПК «Современные технологии синтеза».

Реологические измерения выполнены с помощью ротационного вискозиметра Physica MCR 501. Во всех измерениях использовалась система «конус-плита». Диаметр конуса $d = 25$ мм, угол $\alpha = 1^\circ$. Используемая геометрия обеспечивает однородность градиента скорости в измерительном зазоре. Для поддержания и изменения температурного режима использовалось специальное температурное устройство H-PTD 200 на основе эффекта Пельтье. Температура измерений 25°C . Толщина слоя раствора по его внешнему радиусу составляла 0.047 мм, что обеспечивало надежное поддержание рабочей температуры в образце даже в условиях тепловыделения, обусловленного реакцией полимеризации.

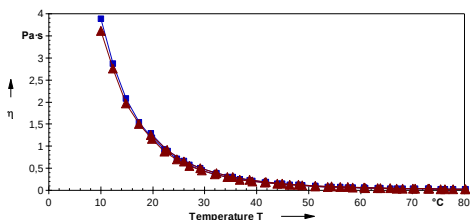


Рис. 1. Температурная зависимость смолы и смолы, допированной фуллеренами (1 масс.%)

(треугольники) показаны на рис. 1. Видно, что максимальная для всех наших последующих опытов концентрация фуллеренов практически не оказывает влияния на вязкость такого раствора.

На рис. 2 показаны временные характеристики изменения вязкости во время полимеризации клеевых композиций. С целью минимизации воздействия сдвигового течения на вязкость композитов измерения выполнены в режиме осцилляций с частотой 1 Гц.

С практической точки зрения представляет интерес исследовать влияние добавок фуллеренов на вязкость составляющих эпоксид-полимер композиций. Температурные зависимости вязкости смолы (квадраты) и смолы с наночастицами

Во всех экспериментах использовалось значение касательных напряжений, равное 10 Па, которое обеспечивает выход кривых течения на вторую ньютоновскую вязкость. Анализ кривых позволяет

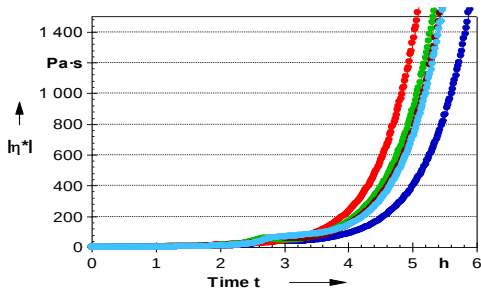


Рис. 2. Зависимости комплексной вязкости композитов от времени полимеризации. Справа-налево: $\varphi = 0, 0.66, 0.33, 0.25, 0.16$ масс.%

заключить, что по мере увеличения концентрации фуллеренов наблюдается тенденция к уменьшению времени полимеризации композиций.

При концентрации фуллеренов свыше 0.16 масс.%, происходит обратный процесс: время достижения одинакового значения вязкости растворов начинает увеличиваться и, в

исследованном диапазоне концентраций, достигает предельного постоянного значения.

Аппроксимировать кривые изменения вязкости одной функциональной зависимостью не удаётся: реакция полимеризации проходит как минимум в две стадии. При исключении из рассмотрения индукционного периода (примерно 3 часа от начала процесса), временные зависимости вязкости хорошо описываются экспоненциальной функцией $\eta = A \exp(B t)$ с критерием достоверности R^2 не менее 0.999.

Зависимости коэффициентов A и B от концентрации фуллеренов показаны на рис. 3, 4. Отметим, что множитель A практически не зависит от концентрации фуллеренов. Напротив, зависимость показателя степени B представляет собой немонотонную функцию с максимумом при $\varphi \approx 0.16$ масс.%.



Рис. 3. Зависимость коэффициента A от концентрации фуллеренов

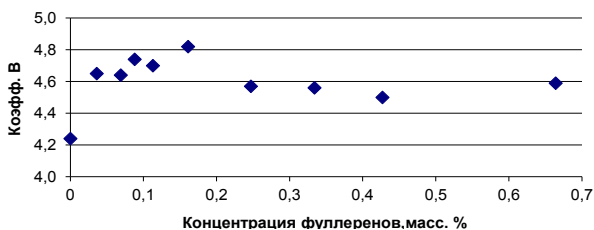


Рис. 4. Зависимость коэффициента В от концентрации фуллеренов

Такая концентрация соответствует максимальному изменению времени полимеризации композита. Полученный результат коррелирует с результатами работы [1], где методами компьютерного моделирования и прямыми натурными измерениями показано, что концентрация $\varphi \approx 0.15$ масс.%, соответствует максимальным значениям показателя преломления и модуля Юнга.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Правительства Пермского края в рамках научного проекта №С-26/793 и гранта РФФИ №17-41-590649.

Библиографический список

1. Бузмакова М.М, Гилев В.Г., Мерзляков А.Ф, Русаков С.В. Физические свойства эпоксидного композита, модифицированного фуллеренами C_{60} //Механика композитных материалов. – 2018. – Т.54, №4. – С.793– 804.

КОЛЕБАНИЯ КРУПНОГАБАРИТНОЙ ЦИЛИНДРИЧЕСКОЙ ОБОЛОЧКИ ПРИ ЕЕ РАЗВЕРТЫВАНИИ ВНУТРЕННИМ ДАВЛЕНИЕМ

Бузмакова Галина Васильевна, Пестренин Валерий Михайлович,
Пестренина Ирина Владимировна, Русаков Сергей Владимирович

*ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный
исследовательский университет, г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: крупногабаритные оболочки, колебания, метод конечных элементов, разворачивание внутренним давлением

Технология создания крупногабаритных оболочечных конструкций в труднодоступных местах, в частности, на околоземной орбите состоит из последовательности шагов: изготовление, упаковка, доставка к месту эксплуатации, развертывание посредством нагружения внутренним давлением. Отдельные этапы описанной технологии рассматривались в публикациях [1,2]. В настоящем докладе изучается динамическое состояние цилиндрической оболочки при ее нагружении внутренним давлением.

Принимается, что в упакованном состоянии оболочка представляет собой две прямоугольные пластины, связанные по образующим шарнирами, работающими без сопротивления изгибающему моменту, направленному по оси оболочки. Геометрические параметры оболочки: длина 100м, радиус 10м, толщина 0,01м. Приведенные материальные характеристики модуль Юнга $50 \cdot 10^6 \text{Па}$, коэффициент Пуассона 0,26, плотность $0,83 \cdot 10^3 \text{кг/м}^3$. Напряженно деформированное состояние оболочки описывается геометрически нелинейными соотношениями. Вычисления проводятся с использованием инженерного пакета ANSYS. Применяется конечный элемент shell_181. Предварительно решается задача о квазистатическом нагружении оболочки внутренним давлением до ее полного развертывания и изучается зависимость ее первой собственной частоты колебаний от давления развертывания.

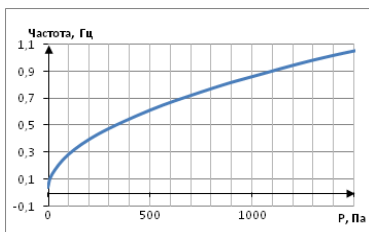


Рис.1. Зависимость первой собственной частоты оболочки от внутреннего давления

Установлено, что полное развертывание оболочки достигается при внутреннем давлении 1500Па, а изменение частоты колебаний представлено на рис.1.

Под динамическим развертыванием понимается развертывание конструкции за конечное время.

Рассматриваются три скорости нагружения внутренним давлением: $v_1=0,033 \text{Па/с}$, $v_2=0,067 \text{Па/с}$, $v_3=0,1 \text{Па/с}$. Результаты вычисления перемещений по вертикали и окружных напряжений в точке срединной поверхности центрального сечения оболочки представлены на рис.2,3. Видно, что и перемещения, и напряжения в оболочке при развертывании имеют колебательный характер.

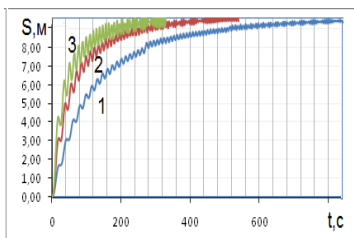


Рис.2. Изменение перемещений точки срединной поверхности по вертикали во времени

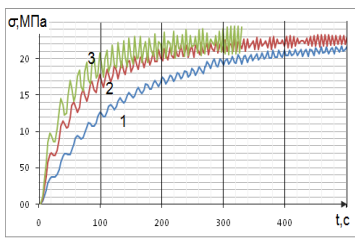


Рис.3. Изменение окружного напряжения в точке срединной поверхности во времени

Амплитуды колебаний возрастают с увеличением скорости нагнетания давления. При разворачивании оболочки с постоянной скоростью частота колебаний параметров состояния оболочки растет с увеличением давления, а амплитуда убывает. На рис.4 приводятся перемещения точки центрального сечения в зависимости от времени вблизи нагрузки внутренним давлением 30Па.

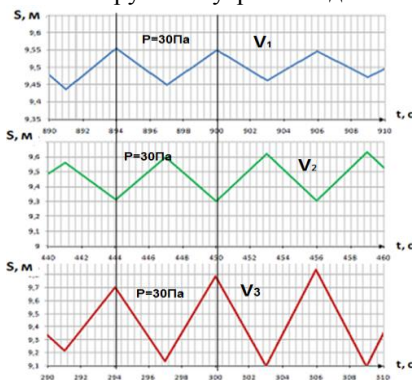


Рис.4. Перемещения точки центрального сечения вблизи внутреннего давления 30Па при разных скоростях нагружения

Из рисунка видно, что период колебаний рассматриваемой точки не зависит скорости подачи давления. Вычисления показывают, что этот период практически соответствует первой частоте свободных колебаний статически нагруженной давлением 30Па оболочки.

Заключение. Разворачивание крупногабаритной оболочки внутренним давлением за конечное время сопровождается периодическим изменением ее параметров состояния.

При постоянной скорости нагнетания давления частота таких колебаний увеличивается с ростом давления, а амплитуда уменьшается. При различных скоростях увеличения давления период колебаний параметров оболочки при текущем внутреннем давлении не зависит от скорости его изменения.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-41-590649 и гранта министерства образования и науки Пермского края С26-793.

Библиографический список

1. Pestrenin V. M., Pestrenina I. V., Rusakov S. V., Kondyurin A. V. Deployment of large-size shell constructions by internal pressure // *Mechanics of Composite Materials*, 2015.–Vol. 51, №5.–p. 629-636.
2. Пестренин В.М., Пестренина И.В., Русаков С.В., Кондюрин А.В., Корепанова А.В. Упаковка и развертывание внутренним давлением крупногабаритных оболочечных конструкций// *Вестник Пермского национального исследовательского политехнического университета. Механика*. – 2016. – № 4. – С. 273–286.

ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРЕПРЕГОВ СЭПОКСИДНЫМ СВЯЗУЮЩИМ ДЛЯ НАДУВНЫХ АНТЕНН НАНОСПУТНИКОВ

Гаришин О.К.¹, Свистков А.Л.¹, Беляев А.Ю.¹, Гилев В.Г.²

¹*ФГБУН Институт механики сплошных сред УрО РАН, г. Пермь, Россия*

²*ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: эпоксидные препреги, горячее отверждение, каркасно-надувные антенны, наноспутники

Одним из наиболее перспективных и быстро развивающихся направлений современной космонавтики является использование так называемых наноспутников. Это сверхмалые (масса от 1 до 10 килограмм) беспилотные космические аппараты, летающие, как правило, на низких околоземных орбитах. Главными их достоинствами являются простота и относительная дешевизна (как самих изделий, так и стоимости их вывода на орбиту). Такие летательные аппараты доступны для широкого круга пользователей и способны решать самые разнообразные технологические и научные задачи. В настоящее время наноспутники запускаются в космос в качестве попутного груза при выводе на орбиту традиционных (conventional) больших космических кораблей. Одной из серьезных проблем для наноспутников является передача информации на Землю, для чего нужны надежные антенны с мощным устойчивым сигналом. На сегодняшний день, для обычных (полноразмерных) космических аппаратов разработано огромное количество антенн разных конструкций. Для наноспутников наиболее предпочтительными являются надувные антенны в виду их

относительно малого веса и компактности в сложенном состоянии [1-2]. Первые разработки таких антенн появились еще в 80-е годы прошлого века. В настоящее время они считаются одним из перспективных направлений развития космической техники [3-5].

Для обеспечения работоспособности такой конструкции необходимо чтобы химическая реакция отверждения эпоксидной реакгентной смеси проходила при достаточно высоких температурах (горячее отверждение). Оптимальным вариантом получения жесткой объемной конструкции на орбите является применение таких реактивных смесей горячего отверждения, когда химическая реакция происходит под действием солнечного и земного излучения. В этом случае не требуются дополнительные источники тепла и можно существенно снизить на массу спутника.

В данной работе представлены результаты двух взаимосвязанных исследований: 1) проведены исследования изменения реологических свойств эпоксидного препрега в процессе отверждения; 2) проведено компьютерное моделирование распределения температуры по каркасу антенны, находящейся под воздействием солнечного и земного излучения в зависимости от ее ориентации к источникам тепла.

Для того чтобы правильно рассчитать давление газа, необходимое для разворачивания надувной антенны и для сохранения ее устойчивости во время совершения маневров, связанных с ориентацией наноспутника необходимо знать, как изменяются механические (реологические) свойства эпоксидных препрегов в процессе их отверждения.

Экспериментальные исследования проводились на ротационном вискозиметре PhysicaMCR 501 в условиях сдвигового деформирования смеси по гармоническому закону с частотой 1 Гц. Характеристикой, описывающей соотношение вязких и упругих особенностей поведения, является угол сдвига фаз θ между сдвиговыми напряжениями и деформациями. Для упругого материала $\theta = 0$, для вязкой жидкости $\theta = 90$, значения $0^\circ < \theta < 90$ соответствуют реологической среде, обладающей одновременно способностью деформироваться и течь.

Оптимальным вариантом для формирования каркасно-надувной антенны на околоземное орбите является горячее отверждение эпоксидного препрега. Чтобы ответить на вопрос о возможности горячего отверждения на околоземной орбите, были проведены компьютерные эксперименты нагрева антенны под действием двух тепловых потоков излучения – от Солнца и от Земли. При расчетах учитывалось, что потоки солнечного и земного излучения можно считать параллельно направленными из-за их большого удаления от

спутника. Поэтому в разных точках антенны величина потока зависит от направления нормали к поверхности конструкции.

При постановке краевой задачи использовались классические уравнения теплопроводности и закон излучения для серого тела Стефана-Больцмана (коэффициент излучения поверхности $\varepsilon \neq 1$). Решение получали в трехмерной постановке методом конечных элементов с использованием программного пакета ANSYS. Использовались оболочечные элементы с заданной толщиной.

Предложена новая конструкция каркасно-надувной антенны из эпоксидного препрега горячего отверждения для околоземных наноспутников. Проведено исследование изменения реологических свойств смолы от времени, температуры и концентрации отвердителя. Показано, что процесс горячего отверждения антенны на околоземной орбите за счет солнечного излучения возможен только в том случае, если на препрег нанести тонкий металлизированный слой.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 16-48-590844 p_a).

Библиографический список

1. Babuscia, B. Corbin, M. Knapp, R. Jensen-Clem, M. VandeLoo, S. Seager, Inflatable antenna for cubesats: Motivation for development and antenna design, ActaAstronautica. 91 (2013) 322-332.
2. Babuscia, M. Corbin, M. Van de Loo, Q.J. Wei, S. Pan, S. Mohan, S. Seager, Inflatable antenna or cubesat: fabrication, deployment and results of experimental tests, IEEE Aerospace Conference. (2014) 1-11.
3. R.E. Freeland, G. Bilyeu, In-step inflatable antenna experiment, ActaAstronautica. 30 (1993) 29-40.
4. R.E. Freeland, G. Bilyeu, G.R. Veal, Development of flight hardware for a large, inflatable-deployable antenna experiment, ActaAstronautica. 38 (1996) 251-260.
5. R.E. Freeland, G. Bilyeu, G.R. Veal, M.D. Steiner, D.E. Carson, Large inflatable deployable antenna flight experiment results, ActaAstronautica. 41 (1997) 267-277.

ВЛИЯНИЕ ТОЧНОСТИ ГЕОМЕТРИИ ОБРАЗЦОВ РЕЗОНАНСНЫХ ЗПК НА ИХ АКУСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Кустов Олег Юрьевич, Храмцов Игорь Валерьевич,
Федотов Евгений Сергеевич

*ФГБОУ ВО Пермский национальный исследовательский
политехнический университет, г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: звукопоглощающие конструкции, интерферометр, импеданс, резонатор Гельмгольца.

Создание эффективных звукопоглощающих конструкций (ЗПК) авиационных двигателей еще долгое время будет актуальной задачей. Конструкция и технология их изготовления постоянно совершенствуются с целью получения высокой акустической эффективности. Для достижения успешных результатов проектирования нужно хорошо представлять структуру затухания звука внутри ячеек ЗПК, которая при высоких уровнях звукового давления связана с турбулентными течениями внутри и вблизи ячейки с конкретной геометрией. Так как проведение натурного эксперимента для этих целей трудноосуществимо, единственным путем решения данной задачи является численное моделирование.

На основе технологии 3D-печати созданы образцы звукопоглощающих конструкций в виде резонаторов Гельмгольца круглой формы с одинаковыми геометрическими характеристиками из ABS-пластика и нейлона, а также из металла. Проведено экспериментальное определение акустических характеристик образцов на интерферометре с нормальным падением волн для высоких уровней акустических давлений. Выполнено численное моделирование акустических процессов в интерферометре для данных образцов. Проведена микроскопия геометрических параметров образцов. Выполнено сравнение полученных акустических характеристик.

Проведенные ранее расчеты однослойного, двух- и трехслойного образца ЗПК в осесимметричной и 3D постановках не дали существенного различия, хотя вихревые структуры в трехмерном варианте задачи учтены в полном объеме. Переход от осесимметричной к полной трехмерной постановке должен был дать заметное улучшение сходимости с экспериментом [1]. В статье [2] отличия расчетных данных от экспериментальных многослойных образцах также есть, хотя геометрия моделировалась в расчете идеально точно.

Численное моделирование базировалось на прямом решении уравнений Навье-Стокса (DNS) с учетом сжимаемости в программном пакете ANSYS FLUENT. Использовалась геометрия канала натурного интерферометра и образцов ЗПК. Внутренняя геометрия интерферометра представляет собой цилиндрическую трубу с резонатором Гельмгольца на одном конце и акустический драйвер на другом [3]. Течения внутри интерферометра можно считать акустически стабильными и осесимметричными, в связи с этим для снижения времени расчета использовалась осесимметричная модель. Детально методика моделирования представлена в работах [1,2,4].

Актуальным в работе стал вопрос точности геометрии натуральных образцов. Готовые образцы из ABS и нейлона имеют грубую

шероховатость и скругления кромок, в зависимости от толщины нити. Толщина нити, как оказалось, повлияла и на толщины стенок образцов, в этом и есть главный недостаток аддитивных технологий [5].

Данная работа является следующим шагом в исследовании способов уменьшения сходимости результатов численного моделирования с экспериментом. Важно детальное исследование влияния отклонения геометрических параметров от проектных значений на точность получения акустических характеристик образцов ЗПК при численном моделировании.

Опорная серия образцов изготовлена из металла, как контрольные образцы, на станке с ЧПУ, три другие серии напечатаны на 3D-принтере из двух видов ABS пластика и нейлона. Первая серия ABS пластика печаталась соплом $d=0,4$ мм, вторая серия и серия из нейлона - соплом с $d=0,3$ мм. Геометрия образцов контролировалась штангенциркулем 16EWR с цифровым отсчетным устройством марки "Mahr" и цифровым индикатором MarCator 1086R. Расхождения в геометрии максимально достигают 0,44 мм.

В результате сравнения образцов из различных жестких материалов можно сделать вывод, что влияние материала не влияет на акустические характеристики. Важно, сохранить заданные геометрические параметры. Также, показано качественное применение численного моделирования элементарных образцов ЗПК. Данная методика численного моделирования может быть применена и к сложному расчету резонаторов в виде классических сот, но здесь стоит учесть, что потребуется увеличения расчетного времени и вычислительных ресурсов в несколько раз.

Библиографический список

1. Khramtsov I.V., Kustov O.Yu., Fedotov E.S., Siner A.A. On numerical simulation of sound damping mechanisms in the cell of a sound-absorbing structure. *Acoustical Physics*. 2018. Vol. 64, No. 4. P. 511-517.
2. Храмцов И.В., Кустов О.Ю., Федотов Е.С., Пальчиковский В.В., Синер А.А. Численное моделирование акустических процессов в интерферометре с образцами многослойных звукопоглощающих конструкций / Вестник Пермского национального исследовательского политехнического университета. *Аэрокосмическая техника*. 2017. № 51. С. 5-15.
3. Кустов О.Ю., Пальчиковский В.В. Интерферометр для высоких уровней акустического давления // *Аэрокосмическая техника, высокие технологии и инновации*. – 2015. – Т. 1. – С. 157-160.
4. Fedotov E.S., Khramtsov I.V., Kustov O.Y. Numerical simulation of the processes in the normal incidence tube for high acoustic pressure levels // *AIP Conference Proceedings*. – 2016. – Vol. 1770. DOI: <http://dx.doi.org/10.1063/1.4964062>.

5. Аношкин А.Н., Пальчиковский В.В., Писарев П.В., Кустов О.Ю., Лапин И.Н. Особенности изготовления эталонных образцов звукопоглощающих конструкций с применением аддитивных технологий / в книге: Тезисы докладов пятой открытой всероссийской (XVII научно-технической) конференции по аэроакустике Центральный аэрогидродинамический институт им. профессора Н.Е. Жуковского. 2017. С. 74.

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ПРОЦЕССА ПОЛИМЕРИЗАЦИИ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО ОТВЕРЖДАЕМОГО ЭПОКСИД-ПОЛИМЕРА

Русаков С.В.¹, Кондюрин А.В.¹, Свисков А.Л.^{1,2}, Гилев В.Г.¹,
Чудинов В.С.^{1,2}

¹ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный
исследовательский университет, г. Пермь, Россия

²ФГБУН Институт механики сплошных сред УрО РАН, г. Пермь,
Россия

Ключевые слова: эпоксидная смола, отвердитель,
математическая модель

Работа является продолжением серии исследований [1,2], в ней предлагается новый подход для построения математической модели описания процесса отверждения эпоксид-полимера находящегося в жидкой фазе, ориентированной на состав с эпоксидной смолой L с отвердителем EPN 161 (соотношение смешивания в массовых частях 4:1).

На рисунке приведены структурные и химические характеристики рассматриваемого эпоксид-полимера.

В предлагаемой математической модели делаются следующие допущения:

- скорость изменения количества реакционных групп, способных участвовать в химической реакции, пропорциональна вероятности встречи этих реакционных групп.

- вероятность встречи реакционных групп, способных участвовать в химической реакции, пропорциональна их количеству.

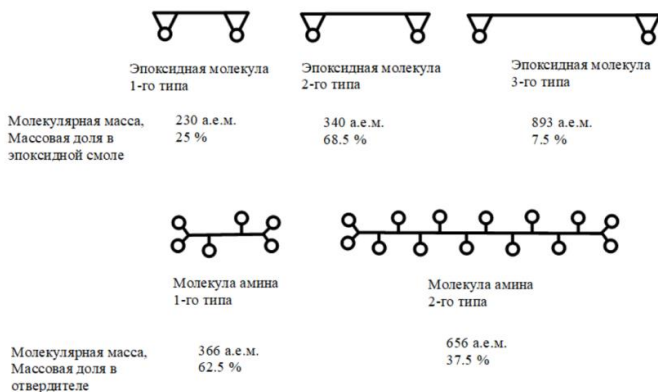


Рисунок. Характеристики эпоксид-полимера

Исходя из сделанных выше упрощающих предположений, формулы химических реакций имеют вид:

$$\frac{dp_i^{ep}(t)}{dt} = -k^{ep} p_i^{ep}(t) \sum_{j=1}^2 p_j^{am}(t), \quad i = 1, 2, 3 \quad (1)$$

$$\frac{dp_j^{am}(t)}{dt} = -k^{am} p_j^{am}(t) \sum_{i=1}^3 p_i^{ep}(t), \quad j = 1, 2 \quad (2)$$

где k^{ep} , k^{am} - кинетические параметры, отражающие скорость реакции полимеризации смолы и отвердителя соответственно;

$p_i^{ep}(t)$ - количество способных к химической реакции групп (олигомеров) у эпоксидов i -го типа в текущий момент времени t ;

$p_j^{am}(t)$ количество способных к химической реакции групп (олигомеров) у аминов j -го типа в текущий момент времени t ,

Причем

$$p_i^{ep}(t) = 2N_i^{ep} \varphi_i^{ep}(t), \quad p_j^{am}(t) = q_j N_j^{am} \varphi_j^{am}(t) \quad (3)$$

Где N_i^{ep} — количество молекул эпоксидов i -го типа в начальный момент времени; N_j^{am} — количество молекул амина j -го типа в

начальный момент времени; $\varphi_i^{ep}(t)$ — доля олигомеров у эпоксидов i -го типа в текущий момент времени;

$\varphi_j^{am}(t)$ — доля олигомеров у аминов j -го типа в текущий момент

времени; $q_1 = 2, q_2 = 14$. В начальный момент времени $\varphi_i^{ep}(0) = \varphi_j^{am}(0) = 1$.

Путем несложных математических преобразования можно показать, что данная модель достаточно просто приводится к задаче Коши вида

$$\begin{aligned} \frac{d\varphi^{ep}(t)}{dt} &= -K^{ep}\varphi^{ep}(t)\varphi^{am}(t), \quad \varphi^{ep}(0) = 1, \\ \frac{d\varphi^{am}(t)}{dt} &= -K^{am}\varphi^{ep}(t)\varphi^{am}(t), \quad \varphi^{am}(0) = 1, \end{aligned} \quad (4)$$

имеющей аналитическое решение, которое в случае стехиометрического равновесия выглядит следующим образом:

$$\varphi^{ep}(t) = \varphi^{am}(t) = \varphi(t) = (1 + Kt)^{-1}, \quad K^{ep} = K^{am} = K. \quad (5)$$

Проведенные эксперименты по определению концентрации олигомеров в ходе реакции полимеризации и изменению вязкости эпоксид-полимера показали, что предлагаемая модель описывает эти процессы с приемлемой точностью.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Правительства Пермского края в рамках научного проекта №С-26/793 и гранта РФФИ №17-41-590649.

Библиографический список

1. Kondyurin A, Komar L.A, Svistkov A.L. Combinatory model of curing process in epoxy composite// Composites: Part B (2011).
2. Кондюрин А.В., Комар Л.А., Свистков А.Л. Моделирование кинетики реакции отверждения композиционного материала на основе эпоксидного связующего // Механика композиционных материалов и конструкций. Рига – 2010. – т.16, №4. – С.597–611.

ЭЛЕКТРОПРОВОДНОСТЬ ЭПОКСИДНОЙ МАТРИЦЫ С УГЛЕРОДНЫМИ НАНОТРУБКАМИ

Семёнов Виталий Анатольевич, Русаков Сергей Владимирович

ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия.

Ключевые слова: электропроводность, эпоксидная матрица, углеродные нанотрубки

Вопрос об электропроводности эпоксидных матриц с углеродными нанотрубками имеет актуальное значение при разработке

различных прикладных технологий использования полимерных нанокомпозитов [1-3]. При этом возможны два варианта его изготовления: отверждение при постоянном протекании тока через нанокомпозит и без тока. Обзор научной литературы показывает, что данный вопрос еще недостаточно изучен. Цель настоящей работы – экспериментальное исследование электропроводности нанокомпозитов после отверждения для указанных двух случаев.

Измерения проводились по следующей методике. Для каждой концентрации нанотрубок эпоксидной матрицы изготавливались две кюветы из обрезка поливинилхлоридного кабель-канала, к торцам которого прижимались электроды из фольгированного стеклотекстолита. Конкретные размеры кювет для каждого образца измерялись после затвердевания эпоксидной матрицы. Характерный размер кювет 35x14x3 мм. После добавления отвердителя эпоксидная матрица заливалась в две кюветы. Затем измерялась начальная вольт-амперная характеристика (ВАХ) образца в одной кювете, через которую далее в процессе отверждения пропусклся электрический ток. Из результатов измерений следует, что до напряжений 28 В для массовых концентраций нанотрубок до 0,2% начальные ВАХ образцов имеют линейный характер. Далее проводилось исследование изменения тока при постоянном напряжении (28 В) с течением времени от момента добавления отвердителя. Результаты приведены на рис.1. Из графиков следует, что для выбранных размеров кювет характерное время установления тока составляет 100–120 мин.

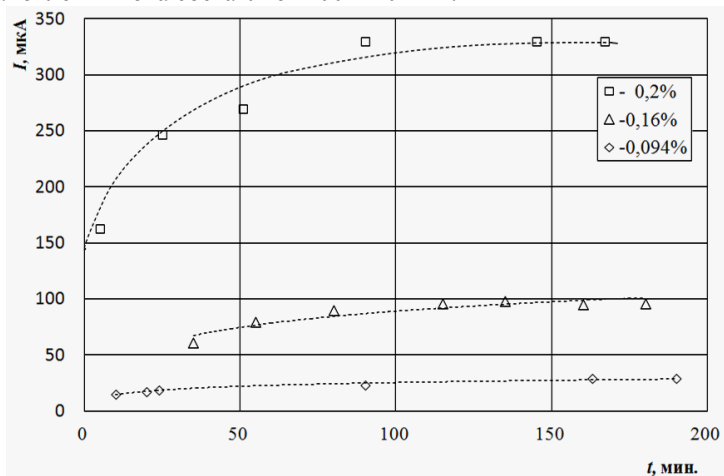


Рис.1. Изменение тока при постоянном напряжении после добавления отвердителя ($t=0$) для концентраций нанотрубок: 0,094%, 0,16%, 0,2%

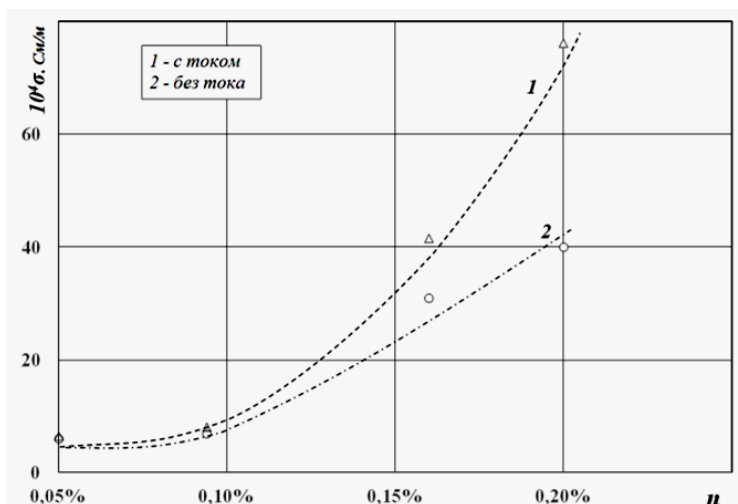


Рис.2. Удельная проводимость эпоксидной матрицы при различных концентрациях углеродных нанотрубок

По установившемуся значению тока определялась удельная проводимость образцов, через которые протекал ток в процессе отвердевания. Соответственно, после отвердевания определялась проводимость образцов без тока. На рис.2 представлены результаты измерений удельной проводимости эпоксидной матрицы при разных концентрациях углеродных нанотрубок с током и без тока. Из полученных результатов следует, что при протекании тока в процессе отвердевания итоговая проводимость вдоль линий тока оказывается больше, чем без тока. При этом с увеличением концентрации нанотрубок наблюдается рост относительной разности проводимостей.

Работа выполнена при финансовой поддержке Правительства Пермского края в рамках научного проекта №С-26/793 и гранта РФФИ №17-41-590649.

Библиографический список

1. Бочаров Г.С., Елецкий А.В., Книжник А.А. Нелинейное сопротивление полимерных нанокомпозитов с присадкой углеродных нанотрубок в условиях перколяции // ЖТФ. – 2016. – Т.86, в.10. – С.64 – 68.
2. Блохин А.Н. Влияние углеродных нанотрубок на электропроводность эпоксидной матрицы // Вопросы современной науки и практики. Университет им. В.И.Вернадского. – 2012. - №3(41). – С.384-386.
3. Абдрахимов Р.Р., Сапожников С.Б., Синицин В.В. Сенсоры давления и температуры на основе суспензии эпоксидной смолы и

углеродных нанотрубок // Вестник ЮУрГУ. Серия «Компьютерные технологии, управление, радиоэлектроника». – 2013. – Т.13. - №4. – С.16-23.

РАЗРАБОТКА РАСЧЕТНОЙ МЕТОДИКИ ОЦЕНКИ РЕЗОНАНСНЫХ ПРОЦЕССОВ В ОБЛАСТЯХ СЛОЖНОЙ ФОРМЫ НА ОСНОВЕ НЕСТАЦИОНАРНОГО ГАЗОДИНАМИЧЕСКОГО РАСЧЕТА

Синер Александр Александрович^{1,2}, Большагин Никита Николаевич^{1,2},
Колегов Руслан Николаевич^{1,2}, Шуваев Николай Васильевич^{1,3}

¹*ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный
исследовательский университет, г. Пермь, Россия*

²*АО «ОДК-Авиадвигатель», г. Пермь, Россия*

³*ПАО «ОДК-Сатурн», г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: акустический резонанс, собственные частоты, ANSYS Fluent

В работе рассматривается задача численного моделирования акустических резонансных характеристик замкнутых полостей. Прогнозирование резонансных явлений в проточной части газотурбинного двигателя является важной задачей, поскольку это позволяет избежать повышенных пульсаций давления в проточной части и повышенных напряжений в деталях двигателя еще на этапе эскизного проектирования, когда детали еще не изготовлены. В настоящее время не существует достаточно подробных математических моделей для прогнозирования акустического резонанса в проточной части газотурбинного двигателя. Задача об оценке резонансных свойств каналов и полостей газотурбинного двигателя (ГТД) очень слабо освещена в существующей литературе, в связи с тем, что дефекты, вызываемые резонансными процессами в элементах ГТД, как правило, выявляются только на этапе эксплуатации, иногда только через несколько лет. После выявления таких дефектов они исправляются путем экспериментальной доводки, что приводит к удорожанию жизненного цикла двигателя. В связи с этим, разработка методик численного анализа резонансных акустических характеристик полостей ГТД является актуальной задачей в области авиационного двигателестроения.

Среди современных работ, посвященных изучению резонансных процессов в проточной части осевых компрессоров можно выделить работы Хелмиха [1,2], в которых подробно экспериментально исследуются пульсации давления в проточной части компрессора. Среди теоретических можно отметить работу [3], в которой акустический резонанс рассматривается как причина поломки центробежной ступени компрессора.

В данной работе предлагается математическая модель, основанная на уравнениях движения вязкого теплопроводного совершенного газа. Для тестирования модели выбрана задача о резонансе в замкнутой полости в форме прямоугольного параллелепипеда с абсолютно жесткими стенками. В полости расположен точечный источник акустических колебаний, имеющий спектр частот в диапазоне 100-5000 Гц с линейным затуханием интенсивности колебаний на его концах по частоте. Спектр звукового давления в заданном диапазоне частот является равномерным, уровень звукового давления на каждой частоте составляет 100 дБ.

Все расчеты выполнены в пакете ANSYS Fluent. Используется модель идеального политропного газа, источник задан в виде источникового слагаемого в уравнении неразрывности, локализованного в произвольной точке пространства.

В работе определены собственные частоты колебаний рассматриваемой полости на основе спектрального анализа сигналов давления в точках, расположенных в углах полости. Проведено исследование влияния положения источника на значения собственных частот колебаний, сравнение результатов, полученных расчетным и аналитическим способами.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ-Урал № 17-41-590409 p_а.

Библиографический список

1. Helmich, B. Acoustic resonance in a high-speed axial compressor, Hannover, Leibniz University – 2008 - 110 p.
2. Hellmich B., Seume J. R., Causes of acoustic resonance in a high-speed axial compressor // Journal of Turbomachinery, Vol. 130, №3, 2008, 031003 (9 pages), doi:10.1115/1.2775487
3. Konig, S. Aeroacoustic phenomenon in high-pressure centrifugal compressor – a possible root cause for impeller failures / Proceedings of the 38 turbomachinery symposium, 2009.

РАСЧЕТ ГЕНЕРАЦИИ ЗВУКА ВЕНТИЛЯТОРНОЙ СТУПЕНЬЮ АВИАЦИОННОГО ДВИГАТЕЛЯ МЕТОДАМИ ВЫСОКОГО ПОРЯДКА ТОЧНОСТИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ GPU

Синер Александр Александрович, Коромыслов Евгений Васильевич,
Кнутова Наталия Сергеевна

*ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный
исследовательский университет, г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: аэроакустика, аэродинамический шум, GPU

Главным источником шума гражданского авиационного двигателя является вентиляторная ступень. На всех режимах работы двигателя она вносит основной вклад. Поскольку наблюдается тенденция к увеличению степени двухконтурности двигателя, доля шума вентилятора будет только расти. Основными механизмами генерации шума вентиляторной ступенью являются собственно вращение лопаточного колеса и взаимодействие вязких следов за рабочими лопатками вентилятора со спрямляющим аппаратом. Для проектирования малозумной вентиляторной ступени требуется с высокой точностью определять её шумовые характеристики. Для этой цели требуется использовать подробные сетки и специальные численные схемы высокого порядка точности с высокими диссипативными и дисперсионными свойствами. Поскольку требуется накапливать длинные временные реализации на подробных сетках необходимо использовать графические ускорители (GPU) для максимального сокращения времени расчета.

В работе рассматривается разработка решателя с использованием явных и неявных схем по времени. Представлены результаты расчетов с использованием явных схем по времени; рассматривается вопрос выбора библиотек для расчетов с использованием неявных схем по времени. В качестве библиотек рассматриваются Intel MKL и MAGMA.

Представлены результаты расчета звукового поля, генерируемого вентиляторной ступенью авиационного двигателя, в программном комплексе, использующем указанные схемы и GPU. На входе задается полное давление, на выходе – статическое давление. Лопатки вентилятора считаются с условием прилипания. В качестве определяющих уравнений используются уравнения Навье-Стокса для совершенного газа. Данные уравнения решаются методом конечных разностей на криволинейных структурированных многоблочных

расчетных сетках. Для аппроксимации производных по пространству используется схема DRP 4-го порядка точности с 13-точечным шаблоном с фильтрацией. Для интегрирования по времени в работе используется 6-шаговая явная оптимизированная схема Рунге-Кутты 4-го порядка (LDDRK). В случае сверхзвуковых зон используется специальная Shock-Capturing фильтрация. Для уменьшения отражения от выходной границы расчётной области был использован поглощающий слой (Absorbing Sponge Zone, ASZ), в котором пульсации давления по отношению к заданному на выходе постепенно гасятся. Для реализации программного кода используется технология CUDA. Анализируется влияние дискретизации в следе за рабочей лопаткой вентилятора на результаты расчета шума с использованием разрабатываемого программного обеспечения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы» Министерства образования и науки Российской Федерации, проект – «Разработка и реализация высокоэффективных вычислительных алгоритмов для расчета генерации звука вентиляторной ступенью авиационного двигателя с целью снижения воздействия шума самолетов на окружающую среду и человека», Уникальный идентификатор соглашения - RFMEFI57417X0145, соглашение о предоставлении субсидии №14.574.21.0145 от 26.09.2017 г.

ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ МЕХАНИЧЕСКОГО ПОВЕДЕНИЯ НОВЫХ ЯЧЕЙСТЫХ РЕЗОНАТОРОВ ДЛЯ КОНСТРУКЦИЙ ЗВУКОПОГЛОЩАЮЩЕГО КОНТУРА

Шипунов Глеб Сергеевич, Воронков Андрей Александрович,
Тихонова Александра Алексеевна, Пеленев Константин
Александрович, Шестакова Ксения Николаевна

*ФГБОУ ВО Пермский национальный исследовательский
политехнический университет, Пермь, Россия*

Ключевые слова: полимерные композиционные материалы, звукопоглощающие конструкции, математические модели с эффективными характеристиками, прочность, жесткость, напряженно-деформированное состояние

© Шипунов Г.С., Воронков А.А., Тихонова А.А., Пеленев К.А., Шестакова К.Н., 2018

Мировой тенденцией при проектировании перспективных авиационных двигателей нового поколения является все более широкое применение полимерных композиционных материалов (ПКМ). В настоящее время ПКМ применяются в основном в деталях мотогондолы и корпусных узлах внутреннего кожуха двигателя с элементами звукопоглощающего контура. Развитие технологий композиционных материалов приводит к снижению себестоимости изготовления деталей и узлов, а появление новых высокомодульных и высокопрочных композиционных материалов расширяет спектр их применения в деталях и узлах авиационных двигателей.

В связи с ужесточением экологических норм по шуму самолетов на местности, введенных с декабря 2016 г. в 4 главе ИКАО [1], для перспективных авиационных двигателей требуется значительное повышение эффективности звукопоглощающих конструкций (ЗПК) из композиционных материалов. Одним из наиболее эффективных способов снижения шума авиационных двигательных установок является применение деталей с элементами звукопоглощающего контура (ЗПК). Объектом исследования в данной работе является новый тип звукопоглощающего наполнителя, разработанный и запатентованный авторским коллективом, доказавший свою высокую акустическую эффективность, однако апробация акустических характеристик проводилась с применением методов быстрого прототипирования. В связи с этим основной задачей данного исследования является разработка технологии изготовления, определение физико-механических характеристик новых, разработка математических моделей для прогнозирования эффективных характеристик [2] ячеистых резонаторов конической формы.

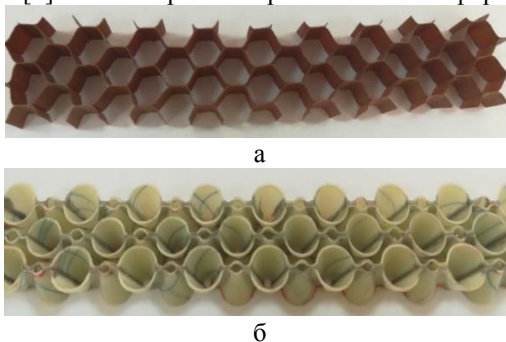


Рис. 1. Виды ЗПК: а) Сотовые, б) Конические

В ходе проведения исследований разработана лабораторная технология изготовления нового вида звукопоглощающего заполнителя конической формы, изготовлены образцы для проведения

исследовательских испытаний и определения, первичных физико-механических характеристик. (Рис.1).

В результате исследования (рис 2) ячеистых резонаторов конической формы из полимерных композиционных материалов для заполнителей звукопоглощающих конструкций авиационной двигательной установки были выявлены такие особенности как повышенная прочность, жёсткость, эксплуатационный ресурс, по сравнению с ячеистыми заполнителями сотовой формы.

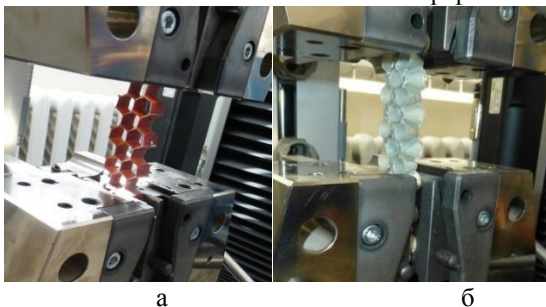


Рис. 2. Виды ЗПК: а) Сотовые, б) Конические

Полученные результаты использовались для создания математической модели крупногабаритного корпуса авиационной двигательной установки с элементами звукопоглощающего контура [2,3], для оценки его прочности и жесткости с новым видом звукопоглощающего заполнителя.

Исследование выполнено в Пермском национальном исследовательском политехническом университете при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (18-38-00746мол_а)

Библиографический список

1. Соболев А.Ф. Повышение эффективности снижения шума в канале с потоком при наличии звукопоглощающих облицовок // Акуст. журн. 1999. Т. 45. №3. С. 404-414.
2. Аношкин А.Н., Шустова Е.Н., Страумит И.С. Прогнозирование эффективных свойств ячеистых заполнителей из композиционных материалов // Аэрокосмическая техника, высокие технологии и инновации – 2009: сб. науч. тр. XII Всерос. науч.-техн. конф.; г. Пермь, 9–10 апреля 2009 г. – Пермь: Изд-во Перм. нац. исслед. политехн. ун-та, 2009. – С. 257.
3. Мирошниченко И. П. Об особенностях напряженно-деформированного состояния слоистых цилиндрических конструкций из трансверсально-изотропных материалов // Научно-методический электронный журнал «Концепт». – 2016. – Т. 15. – С. 2431–2435.

ЧИСЛЕННЫЙ РАСЧЕТ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ВРАЩАЮЩЕГОСЯ ЛОПАТОЧНОГО КОЛЕСА ТУРБОМАШИНЫ С ОТДЕЛЬНОЙ АКУСТИЧЕСКОЙ МОДОЙ

Шуваев Н.В., Синер А.А., Большагин Н.Н., Колегов Р.Н.

*ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный
исследовательский университет, г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: акустика, коэффициент отражения, газотурбинный двигатель, ANSYS Fluent

Аэроакустические нагрузки, которые по природе являются нестационарным процессом, могут приводить к существенным поломкам. Диагностика таких нагрузок возможна только на этапе эксплуатации авиационного двигателя, что ведет к увеличению затрат на ремонт и снижению экономической эффективности предприятия. Так как такие нагрузки возникают при сочетании факторов, которые важно знать до проведения эксперимента, то проведение эксперимента становится сложной задачей. Таким образом, перспективным методом исследования данных процессов является численное моделирование.

При моделировании акустических процессов, происходящих внутри узла двигателя, влияние соседних узлов можно учесть при помощи постановки специальных импедансных граничных условий на входе и выходе, тем самым значительно сократив вычислительные затраты [1]. Кроме того, акустические и газодинамические процессы в проточной части двигателя, такие как ротор-статор взаимодействие, имеют существенно разные временные периоды. Разница в значениях шага по времени, необходимых для разрешения соответствующих процессов, может привести к существенному снижению эффективности проводимых расчетов [2,3].

В результате взаимодействия падающей акустической волны с лопаточным венцом часть энергии волны отражается обратно. Основной характеристикой данного процесса является значение коэффициента отражения [4]:

$$\tilde{p} = R p,$$

где p – комплексная амплитуда давления в падающей волне, $\tilde{p}$ – комплексная амплитуда давления в отраженной волне, R – комплексный коэффициент отражения.

Объектом исследования является изолированное рабочее колесо с лопатками NASA Rotor 67. Были выполнены расчеты прохождения

плоской акустической волны через расчетную область с заданной амплитудой и различными частотами – 500, 1000, 1500, 2000 Гц. Расчеты проводились в газодинамической программе ANSYS Fluent.

Воздух смоделирован как совершенный вязкий газ с постоянной теплоемкостью, используется k-ε модель турбулентности. Использовались схемы второго порядка точности для уравнений неразрывности, движения и энергии, первого порядка – для уравнений относительно кинетической энергии турбулентных пульсаций и скорости диссипации.

В качестве граничных условий на входе в расчетную область задавалось полное давление, на выходе статическое давление. На входе также были заданы неотражающие граничные условия. Нестационарный расчет проводился на номинальном режиме работы ротора.

Полученное расчетным путем мгновенное распределение отклонений давления от стационарных значений для режима «100%» приведено на рисунке.

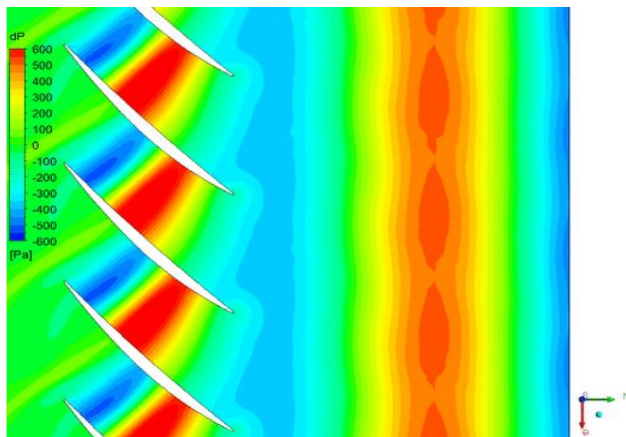


Рисунок. Мгновенное распределение отклонений давления от стационарных значений для режима «100%»

В качестве первого приближения, для определения коэффициента отражения использован двухмикрофонный метод [4], используемый для обработки экспериментов с импедансной трубой. Вычисляется коэффициента отражения с помощью передаточной функции [4], определяемой через осредненные взаимный и односторонний спектры значений давления в двух точках, разнесенных по оси вращения ротора на небольшое расстояние. По результатам расчетов получены зависимости коэффициента отражения R и акустического импеданса Z от частоты набегающей плоской волны.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Пермского края в рамках научного проекта № 17-41-590409.

Библиографический список

1. Silva C.F., Duran I., Nicoud F., Moreau S. Boundary Conditions for the Computation of Thermoacoustic Modes in Combustion Chambers // AIAA Journal, 2014, vol. 52, no. 6, pp. 1180-1193. DOI: 10.2514/1.J052114
2. Kwatra N., Su J., Gretaars J.T., Fedkiw R. A method for avoiding the acoustic time step restriction in compressible flow // Journal of Computational Physics, 2009, vol. 228, no. 11. P. 4146–4161. DOI: 10.1016/j.jcp.2009.02.027
3. Patel K., Novak C., Defoe J. A Novel Numerical Approach for Generation and Propagation of Rotor-Stator Interaction Noise // Proceedings of 22th AIAA/CEAS Aeroacoustics Conference, 30 May - 1 June 2016, Lyon, France. AIAA Paper 2016-22821. DOI: 10.2514/6.2016-2821
4. Chung J.Y., Blaser D.A. Transfer function method of measuring in-duct acoustic properties. I. Theory // Journal of acoustical society of America, vol. 68, no. 3, 1980, pp. 907-913. DOI: 10.1121/1.384778

СЕКЦИЯ III

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ И МЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

EFFECTIVENESS OF CONJUGATION TRANSFER OF THE F-PLASMID DERIVATIVE pOX38 TO UROPATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI* STRAINS

Gizatullina Yulia S.¹, Kuznetsova Marina V.¹, Maslennikova Irina L.¹,
Žgur-Bertok Darja², Starčič Erjavec Marjanca²

¹"Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms of the Ural Branch of RAS", Perm, Russia

²Biotechnical Faculty, Department of Biology, Ljubljana, Slovenia

Key words: UPEC, biofilm, conjugation, bacteriocins, phages

It is well known that conjugative plasmids are present in bacteria from various natural habitats and that horizontal gene transfer including conjugation contributes to the genetic diversity of natural microbial communities. Some plasmids are more efficiently transmitted in a liquid medium, others in an attached microorganism community [1]. We assume that differences in the frequency of conjugative transfer of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) may be due to the biological properties of the recipient: the production of bacteriocins, the presence of a lysogenic phage as well as biofilm-forming ability.

The aim of the study was to *in vitro* evaluate the efficiency of the F-plasmid derivative pOX38 conjugative transfer to different UPEC strains during planktonic and biofilm growth.

In the here presented study, in total 33 UPEC (Amp^r) clinical strains isolated from urine of patients with urinary tract infections were included as recipient strains. All used UPEC strains were genotyped with ERIC-PCR in order to confirm their non-clonality. A recombinant strain of *E. coli* N4i pOX38 Gm^rCm^r was used as a donor [2]. Conjugative transfer was carried out for 6 hours during planktonic and biofilm growth. The conjugation frequency was estimated as the ratio of the transconjugants CFU to that of the recipient [3]. Screening of strains for the production of bacteriocins was carried out using the "overlay test" technique [4]. Lysogenic cultures were identified by UV induction of the bacteriophage. *E. coli* DH5α was used as an indicator strain for demonstration of bacteriocin production and presence

of lysogenic phages. Biomass biofilm was evaluated according to Merritt J.H. et al. (2005) [5].

Our study revealed that the conjugative transfer of the pOX38 plasmid to UPEC strains during planktonic growth occurred at a frequency from E-05 to E-00, while in biofilms from E-05 to E-01, in average $4.40\text{E-}01 \pm 1.56\text{E+}00$ and $1.10\text{E-}01 \pm 1.99\text{E-}01$, respectively. There was no statistically significant difference in conjugative transfer efficiency between planktonic and biofilm growth. The transfer efficiency was independent of the recipient's biofilm-forming ability as well as the biomass of the mixed biofilm formed during conjugation.

The ability to produce bacteriocins was revealed for 15 out of 33 (45.5%) of the studied UPEC strains. The frequency of conjugative transfer in groups of strains producing and not producing bacteriocins did not differ either in planktonic ($6.40\text{E-}01 \pm 1.94\text{E+}00$ vs $2.73\text{E-}01 \pm 1.06\text{E+}00$) or in biofilm growth ($1.30\text{E-}01 \pm 2.08\text{E-}01$ vs $9.41\text{E-}02 \pm 1.84\text{E-}01$) (Figure).

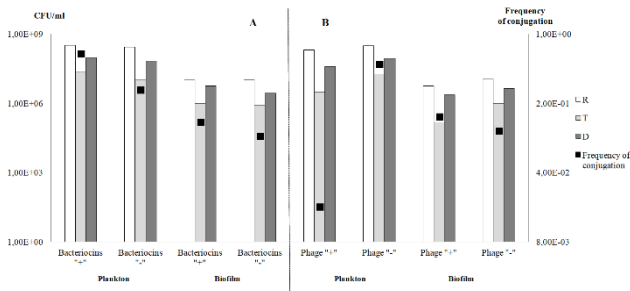


Figure. The CFUs of cells and the frequency of conjugation in conjugation assays in plankton and biofilm with UPEC recipient strains A) producing bacteriocins (Bacteriocins "+") and not producing bacteriocins (Bacteriocins "-"); B) lysogenic (Phage "+") and non-lysogenic strains (Phage "-")

Lysogenesis was detected in only 4 UPEC strains (12.1%). The frequency of conjugal transfer was not significantly different in the groups of lysogenic and non-lysogenic UPEC recipient strains in biofilm conjugation assays: $1.48\text{E-}01 \pm 2.42\text{E-}01$ vs $1.05\text{E-}01 \pm 1.88\text{E-}01$, respectively. However, during planktonic growth the conjugation frequency among lysogenic UPEC strains was lower than among non-lysogenic UPEC strains: $1.82\text{E-}02 \pm 1.6\text{E-}02$ vs $4.98\text{E-}01 \pm 1.63\text{E+}00$, respectively (Figure). In addition, the number of transconjugants (CFU/ml) during planktonic, as well as upon biofilm growth, among lysogenic UPEC strains and non-lysogenic UPEC strains, differed: $3.07\text{E+}06 \pm 2.46\text{E+}06$ vs $1.83\text{E+}07 \pm 4.48\text{E+}07$ CFU, (in plankton) and $1.51\text{E+}05 \pm 1.58\text{E+}05$ vs $1.02\text{E+}06 \pm 2.09\text{E+}06$ (in biofilm), respectively (Figure).

Transfer of the F plasmid derivative pOX38 to UPEC strains occurred at comparable frequencies among planktonic and biofilm populations.

Bacteriocinogenicity of recipient cells did not significantly affect the effectiveness of conjugative transfer. Lysogenicity, on the other hand, was associated with a lower conjugation frequency during planktonic, but not biofilm growth. However, among lysogenic UPEC recipient cells there were less transconjugant cells than among non-lysogenic UPEC recipient cells, both during planktonic as well as biofilm growth.

The research was supported by the grant BI-RU/16-18-047.

References

1. Invasion of *E. coli* biofilms by antibiotic resistance plasmids / Kroll A. [et al.]. Plasmid. 2013. V. 70(1). P. 110-119.
2. Strain ŽP – the first bacterial conjugation-based “kill”–“anti-kill” antimicrobial system / Starčič Erjavec M. [et al.]. Plasmid. 2015. V. 82. P. 28-34.
3. Study of the adhesion of *Bifidobacterim bifidum* MIMBb75 to human intestinal cell lines / Guglielmetti S. [et al.]. Curr Microbiol. 2009. V. 59(2). P. 167-172.
4. *Escherichia coli* bacteriocins: 248 antimicrobial efficacy and prevalence among isolates from patients with bacteraemia / Budič M. [et al]. PLoS One. 2011. V. 6. P. 1-7.
5. Merritt J. H., Kadouri D.E., O'Toole G.A. Growing and Analyzing Static Biofilm // Curr Protoc Microbiol. 2005. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4568995/>

ВЛИЯНИЕ РАСТВОРИТЕЛЕЙ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ СТРЕССОВЫХ ОТВЕТОВ *ESCHERICHIA COLI*

Ахова Анна Викторовна, Ткаченко Александр Георгиевич

*«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал
ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия*

Ключевые слова экспрессия генов, окислительный стресс, ДМСО

Тест-системы на основе генно-модифицированных микроорганизмов используют для высокопродуктивного скрининга при поиске веществ, обладающих определенными свойствами, в том числе при разработке лекарственных препаратов. В частности, микроорганизмы, несущие генные слияния, нашли применение в изучении антиоксидантных и хелатирующих свойств веществ, а также генотоксичности соединений [1, 2]. При изучении свойств гидрофобных

соединений возникает вопрос выбора растворителя, который бы оказывал минимальное воздействие на результаты исследования.

Целью данной работы является исследование влияния растворителей на экспрессию генов, участвующих в адаптации *Escherichia coli* к различным неблагоприятным внешним воздействиям. Полученные результаты будут полезны при выборе конкретного растворителя при исследовании свойств гидрофобных веществ с использованием репортерных конструкций на основе *lacZ*, а также интересны с точки зрения изучения физиологического ответа *E. coli* на действие растворителей.

Уровень экспрессии исследуемых генов оценивали по активности бета-галактозидазы в клетках *E. coli*, несущих слияние промотора соответствующего гена со структурной частью гена *lacZ*. Растворители, метанол и диметилсульфоксид (ДМСО), вносили в экспоненциально растущую бактериальную культуру в концентрации 5% по объему – максимальная концентрация не вызывающая гибель клеток. Жизнеспособность бактериальных клеток оценивали по количеству колониеобразующих единиц при посевах на твердую питательную среду.

Исследовано влияние растворителей на экспрессию генов общего стрессового ответа и адаптации к стационарной фазе роста (*rpoS*, *rmf*), множественной антибиотикоустойчивости (*mar*), регуляции проницаемости клеточной стенки (*micF*, *ompF*), адаптивного ответа *E. coli* на пероксидный окислительный стресс (*katG*, *oxyR*) и окислительный стресс, вызванный действием редокс-циклирующих агентов (*soxS*, *sodA*, *fpr*, *nfo*). Кроме того, изучено изменение экспрессии генов, кодирующих лизиндекарбоксилазы – ферменты синтеза кадаверина (*cadA*, *ldcC*)

Установлено, что добавка 5% ДМСО вызывает снижение уровня экспрессии генов *mar*, *ompF*, *rpoS*, *ldcC*, увеличение уровня экспрессии генов *sodA*, *fpr*, *rmf*, *cadA* и не оказывает влияния на экспрессию *soxS*, *micF*, *nfo*, *oxyR* и *katG*. Из числа вышеназванных генов при добавке 5% метанола наблюдалось увеличение экспрессии *soxS*, *sodA*, *fpr*, *katG*, *rmf* и снижение экспрессии *ldcC*, *mar*, *ompF*.

Активация генов антиоксидантной защиты, свидетельствующая о развитии окислительного стресса в клетках *E. coli*, наблюдалась на первых этапах воздействия обоих растворителей.

Добавка ДМСО вызывала почти двукратное относительно контроля снижение уровня экспрессии генов *rpoS* и *mar*, кодирующих транскрипционные регуляторы, под контролем которых находятся общие адаптивные ответы на стресс и действие антибиотиков [3]. Можно предположить, что угнетение экспрессии столь важных регуляторов значительно снижает адаптивные возможности бактериальных клеток и их способность выживать в неблагоприятных

условиях. В связи с этим не исключено усиление антибактериальной активности соединений, растворенных в ДМСО.

Таким образом, метанол и ДМСО вызывают изменение экспрессии некоторых генов *E. coli*, что стоит учитывать при выборе их в качестве растворителя при изучении биологической активности соединений.

Работа выполнена в рамках государственного задания (номер госрегистрации темы: 01201353249) и в рамках Комплексной программы УрО РАН (номер госрегистрации темы: АААА-А18-118030790046-9).

Библиографический список

1. Biran A. et al. Bacterial genotoxicity bioreporters // *Microbial Biotechnology*. 2010. Vol. 3, № 4. P. 412-427.
2. Park S., Chung H., Lee J. Rapid *in vivo* screening system for anti-oxidant activity using bacterial redox sensor strains // *Journal of Applied Microbiology*. 2010. Vol. 108, № 4. P. 1217-25.
3. Storz G., Hengge-Aronis R. (Eds). *Bacterial stress responses*. Washington, DC: ASM Press, 2000. 485 p.

НОВЫЙ ГАЛОТОЛЕРАНТНЫЙ ШТАММ-ДЕСТРУКТОР ФТАЛАТОВ *IDIOMARINA* SP. PSN17-1

Багаутдинова Н. А.¹, Ястребова О. В.², Плотникова Е.Г.^{1,2}

¹*ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия*

²*«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: бактерии-деструкторы, *Idiomarina*, орто-фталевая кислота, дибутилфталат, галофильность

В результате промышленной деятельности человека происходит загрязнение окружающей среды различными химическими веществами. Одними из наиболее токсичных и трудноразлагаемых соединений являются органические вещества класса фталатов - соли и эфиры орто-фталевой кислоты (орто-ФК). В больших количествах данные соединения обнаружены в районах работы предприятий соледобывающей промышленности (г.г. Березники, Соликамск, Пермский край), а именно в глинисто-солевых шламах, избыточных рассолах, отходах калийного производства. Обогащение и переработка

калийных руд сопровождается использованием ряда реагентов, продуктами трансформации которых являются фталаты. [1].

Фталаты и их метаболиты признаны опасными для человека и животных, в связи с чем актуальной является проблема биodeградации данных соединений в окружающей среде [2]. Среди бактерий-деструкторов фталатов обнаружены представители различных родов: *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Sphingomonas*, *Arthrobacter*, *Rhodococcus* [2–4]. Однако к настоящему времени не представлено данных о способности бактерий рода *Idiomarina* к деструкции фталатов, а также недостаточно изучена бактериальная деструкция данных соединений в условиях повышенного засоления среды.

Цель работы – характеристика штамма-деструктора *орто*-фталевой кислоты (*орто*-ФК) и дибутилфталата (ДФ) *Idiomarina* sp. PSH17-1, выделенного из донных отложений промышленных стоков промканала (г. Березники, Пермский край).

Из рабочей коллекции микроорганизмов Лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии «ИЭГМ УрО РАН» отобран для исследования грамотрицательный штамм-деструктор *орто*-ФК PSH17-1, идентифицированный ранее как представитель рода *Idiomarina*. Наибольший уровень гомологии (99,43%) данный штамм проявляет с типовым штаммом вида *Idiomarina fontislapidosi* F23^T.

Установлено, что штамм *Idiomarina* sp. PSH17-1 способен к росту как в среде без добавления соли, так и в присутствии до 10% NaCl и относится к галотолерантным микроорганизмам [5].

Показано, что штамм PSH17-1 обладает широкой субстратной специфичностью и способен к деструкции ряда моно- и полиароматических углеводов: *орто*-ФК, ДФ – токсичного производного *орто*-ФК, протокатеховой кислоты (ПКК) – основного метаболита разложения *орто*-ФК и ДФ, а также *пара*-оксибензоата и гентизата.

Полученные нами данные позволяют предположить, что разложение ДФ штаммом PSH17-1 осуществляется с образованием *орто*-ФК и разложением последней через стадии образования 4,5-дигидроксифталевой и ПКК, как показано ранее в литературе для ряда грамотрицательных штаммов [2, 4].

Изучено влияние различных концентраций NaCl на рост штамма *Idiomarina* sp. PSH17-1 в минеральной среде с *орто*-ФК в качестве субстрата. Наиболее высокие показатели роста штамма зафиксированы в среде без добавления соли и в присутствии 3% NaCl. Повышение концентрации NaCl в среде до 5% и 7% приводило к увеличению лаг-фазы роста и к снижению ростовых показателей штамма (незначительный прирост биомассы, снижение скорости роста).

Исследование на наличие экстрахромосомной ДНК методом щелочного лизиса выявило у штамма PSH17-1 плазмиду молекулярной

массой ~100 т.п.н. Известно, что гены деструкции фталатов у грамотрицательных бактерий часто имеют плазмидную локализацию [4], однако ранее не было представлено данных о наличии плазмид деструкции в клетках бактерий рода *Idiomarina*.

Таким образом, впервые у представителей рода *Idiomarina* обнаружена способность разлагать фталаты (*орто*-ФК и ДБФ) в условиях повышенного засоления среды (до 70 г/л NaCl). Данный штамм является перспективными для разработки новых методов биоремедиации засоленных почв, загрязненных фталатами.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Министерства науки и образования Пермского края в рамках научного проекта № 16-44-590968 п. а.

Библиографический список

1. Бачурин Б.А., Одинцова Т.А. Стойкие органические загрязнители в отходах горного производства // Современные экологические проблемы Севера. Апатиты: Изд-во Кольского НЦ РАН, 2006. Ч. 2. С. 7-9.
2. Liang D.W., Zhang T., Fang H. Phthalates biodegradation in the environment // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 80, P. 183–198.
3. Chang H.K., Zylstra G.J. Novel organization of the genes for phthalate degradation from *Burkholderia cepacia* DBO1 // J. Bacteriol. 1998. V. 180, P. 6529–6537.
4. Jin D.-C., Liang R.-X., Dai Q.-Y., Zhang R.-Y., Wu X.-L., Chao W.-L. Biodegradation of di-n-butyl phthalate by *Rhodococcus* sp. JDC-11 and molecular detection of 3,4-phthalate dioxygenase gene // J. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 20. №10, P. 1440–1445.
5. Кашнер Д. Жизнь микробов в экстремальных условиях. М.: Мир, 1981. 365 с.

ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА СРЕДЫ ЗАМОРОЗКИ И ХРАНЕНИЯ КЛЕТОК ГИБРИДОМЫ ВАРЗ

Бочкова М.С., Заморина С.А., Тимганова В.П., Храмов П.В.,
Раев М.Б.

*«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал
ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: гибридома ВАРЗ, трофобластический β 1-гликопротеин (ТБГ), культивирование, жизнеспособность, среда заморозки и хранения

© Бочкова М.С., Заморина С.А., Тимганова В.П., Храмов П.В.,
Раев М.Б., 2018

Клеточная линия гибридомы ВАРЗ («Genovac», Германия) продуцирует моноклональные антитела против трофобластического β 1-гликопротеина (ТБГ). В лаборатории экологической иммунологии («ИЭГМ УРО РАН», г. Пермь) разработана и запатентована технология выделения и очистки нативного ТБГ из сыворотки крови беременных женщин [1]. В рамках запатентованной технологии ТБГ человека получали комбинацией методов: аффинной хроматографией с использованием биоспецифического сорбента и последующим освобождением от иммуноглобулиновой контаминации на колонке HiTrapTM Proten G HP ("Amersham Biosciences", Швеция) [1]. В качестве биоспецифического сорбента использовали сефарозу CL 4В, модифицированную моноклональными антителами к ТБГ, продуцируемыми гибридомой ВАРЗ («Genovac», Германия).

Так как гибридные клетки хранятся в условиях глубокой заморозки, необходимо понимать, в какой среде оптимально замораживать и хранить клетки, так как литературные данные и рекомендации фирм-производителей сред различаются. Ранее мы уже рассмотрели вопрос о том, в какой среде они лучше восстанавливают свою пролиферативную и функциональную активность [2].

Цель работы - изучение параметров роста и жизнеспособности клеток гибридомы ВАРЗ после хранения в разных средах заморозки.

Клетки гибридомы ВАРЗ хранили в криохранилище при температуре жидкого азота (количество клеток в каждой пробирке - $6\text{--}9 \times 10^6$) в разных средах заморозки: 1. [DMSO (Диметилсульфоксид, «Sigma», США) + 10% FCS (Сыворотка эмбриональная телячья, «Biological Industries», Израиль)], 2. [DCCM («Biological Industries», Израиль) + 12% DMSO + 15% FCS], 3. [DMEM+10% DMSO + 15% FCS] и были разморожены согласно протоколу производителя («Genovac», Германия). После размораживания клетки были перенесены в 48-луночный планшет («Eppendorf», Германия) для культивирования в среде роста [DMEM+12% FCS] в течение 48 часов. По истечении указанного времени клетки были перенесены во фласки (75 см²) («Cellstar»®, Германия) в среду культивирования [DMEM + 12% FCS], модифицированную добавлением 3,3 мМ L-глутамина, 67 Ед пенициллина, 0,07 мг/мл стрептомицина, 0,17 мкг/мл амфотерицина В, 1мМ пирувата натрия (все компоненты произведены «Biological Industries», Израиль, концентрации согласно рекомендациям Antibody Unit, Dept. of Biological Services, Институт Вейцмана, Израиль). Культивирование осуществляли в CO₂-инкубаторе «IG-150 Jouan» (Франция) при концентрации CO₂ 10%. Подсчет клеток осуществляли в гемоцитометре Ньюбауэра, одновременно оценивали жизнеспособность клеток в тесте с трипановым синим (0,2%) («Sigma», США). Концентрацию клеток в динамике роста и их жизнеспособность

контролировали в каждой экспериментальной серии в течении двух недель каждые 2 суток.

Ранее мы уже изучали рост и жизнеспособность клеток гибридомы ВАРЗ после размораживания в условия культивирования в разных средах *in vitro*. Было показано, что культивирование в среде [DMEM + 12% FCS] приводит к максимальному росту клеток (в 1,8 раз за 2 суток) с сохранением жизнеспособности на уровне более 70%, в средах на основе [DCCM] прирост составил 1,1-1,2 раз, жизнеспособность в районе 55-59%; в среде [RPMI-1640 + 12% FCS] – прирост составлял 1,6 раз за 2 суток. Таким образом, использование среды [DMEM + 12% FCS] выглядит наиболее рациональным для культивирования клеток с целью их восстановления после разморозки. В данной работе мы дополнили имеющиеся сведения о том, в какой среде оптимальней замораживать и хранить гибридные клетки. Согласно полученным результатам, заморозка и хранение в среде 3 [DMEM + 10% DMSO + 15% FCS] давала более высокие уровни жизнеспособности клеток и последующего прироста клеточной массы в сравнении со средами 1 [DMSO + 10% FCS] и 2 [DCCM + 12% DMSO + 15% FCS]. Так, после разморозки клеток жизнеспособность в среде 3 составила более 70%, в то время как в среде 1 – около 50%, в среде 2 – более 50%. Дальнейшее инкубирование и динамическое наблюдение за клетками также показало, что заморозка и хранение в среде 3 давало более активный рост клеток – в 1,6 раз за 2 суток, в то время как в среде 1 – в 1,2 за 2 суток, в среде 2 – 1,3 за 2 суток.

Таким образом, среда [DMEM + 10% DMSO + 15% FCS] оптимальна для заморозки и хранения гибридомы ВАРЗ. Важно отметить, что и культивирование в среде на основе DMEM также дает оптимальный в сравнении с другими средами рост клеток. Очевидно, что набор клеточной массы после хранения и разморозки необходим для того, чтобы реализовать конечную цель культивирования – синтез целевого продукта (моноклональных антител против ТБГ). Именно поэтому важно сохранить как количество клеток, так и их способность к пролиферации и продукции антител. В дальнейшем мы планируем оценить эффективность продукции антител клетками гибридомы в зависимости от сред заморозки, хранения и культивирования, что позволит оптимизировать процесс получения целевого продукта, как с позиции технологии, так и с позиции экономической целесообразности.

Работа выполнена в рамках государственного задания, N госрегистрации темы: 01201353248.

Библиографический список

1. Раев М.Б. Способ выделения и очистки трофобластического β-1-гликопротеина. Патент РФ №2367449, опубликован 20.09.2009, Бюл. № 26.

2. Раев М.Б., Заморина С.А., Тимганова В.П., Бочкова М.С., Храмцов П.В. Изучение роста и жизнеспособности клеток гибридомы ВАРЗ в различных средах культивирования *in vitro* // Российский иммунологический журнал. 2017. Т. 11. № 3 (20). С. 476-478.

РОЛЬ Sema4D В ОТВЕТЕ Т-ЛИМФОЦИТОВ НА ПОЛИКЛОНАЛЬНУЮ СТИМУЛЯЦИЮ

Валиева Ю.В., Некрасова И.В.

*«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал
ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: Sema4D, Т-лимфоциты, пролиферация, апоптоз

Ранние этапы активации Т-лимфоцитов в ответ на антиген начинаются с пролиферации, за которой следует дифференцировка клеток. Однако при неадекватном ответе клетки на антиген возможен и альтернативный вариант активации – антиген-индуцированная гибель, или апоптоз. Потенциальным регулятором ранних этапов активации является семафорин IV класса Sema4D.

Семейство семафоринов объединяет молекулы, участвующие в процессах аксонального наведения в ходе роста нейронов [4]. Однако Sema4D широко представлен также в иммунной системе, где играет важную роль в индукции как гуморального, так и клеточного иммунного ответа. Он конститутивно экспрессируется на мембране Т-лимфоцитов [2], при активации клеток переходит в растворимую форму за счет протеолитического отщепления, сохраняя при этом функциональную активность [3]. Традиционно Т-лимфоцит рассматривался как источник Sema4D в иммунной системе, а мишенями его действия – клетки, экспрессирующие рецептор CD72 [5]. Мы в недавней работе [1] показали, что на иммуноцитах присутствует и второй рецептор для Sema4D, плексин В1, экспрессия которого ранее приписывалась неиммунным тканям; более того, Sema4D может выступать и как лиганд, и как рецептор, проводя сигнал в клетку, на которой экспрессируется [3]. В связи с этим, можно предположить, что Sema4D участвует в активации самих Т-лимфоцитов, что и определило цель данного исследования.

В работе использовали лейкоциты здоровых доноров. (n=10), которые выделяли из венозной крови центрифугированием в градиенте плотности фиколла-верографина (1.077 г/см³) («Pharmacia»). Далее из

полученной суспензии выделяли CD3⁺T-лимфоциты, с помощью иммуномагнитных частиц (“R&D Systems”). Т-клетки в концентрации 2×10^6 кл./мл (или 1×10^6 кл./мл для оценки пролиферации) культивировали 24 и 72ч в полной питательной среде на основе RPMI 1640 (“Gibco. Thermo Fisher Scientific”) при 37°C и 5% CO₂ в условиях поликлональной активации (анти-CD3/CD28, “Invitrogen”). Пролиферативный ответ оценивали по включению синтетического аналога тимидина, 5-бром-2'-дезоксинуридина (BrdU), который определяли через 72 ч культивирования иммуноферментным анализом («Amersham»). Апоптоз Т-лимфоцитов оценивался по экспрессии на мембране фосфатидилсерина (маркер раннего апоптоза) – с помощью соответствующего лиганда, аннексина V, меченого флуоресцеинизотиоцианатом (AnnV*FITC, “R&D Systems”), и по включению в клетку маркера позднего апоптоза пропидия йодида (PI, “Sigma-Aldrich”). Оценка производилась методом проточной цитометрии. Для определения роли Sema4D в активации лимфоцитов использовали его блокаду анти-Sema4D антителами (10 µg/mL, Santa Cruz Biotech), которые добавляли в культуру за 1ч до активации лимфоцитов. Статистическая обработка проводится с использованием t-критерия Стьюдента.

Показано, что Sema4D непосредственно участвует в регуляции пролиферативного ответа Т-лимфоцитов на поликлональную активацию (анти-CD3/CD28): в случае блокады Sema4D индекс пролиферации статистически значимо снижался как для CD4⁺, так и для CD8⁺Т-клеток (Таблица).

Таблица

Роль Sema4D в активации Т-лимфоцитов

Показатели		CD4 ⁺ Т-клетки		CD8 ⁺ Т-клетки	
		Без блокады	На фоне блокады	Без блокады	На фоне блокады
Пролиферация (индекс)		4,9±0,8	3,5±0,8*	4,3±0,7	3,7±0,9*
Апоптоз (%Ann ⁺ Т-клеток)	Монокульт.	6,7±1,7	8,8±3,1	6,6±0,8	5,4±1,5
	Совместная Т/В-культура	5,3±1,1	10,9±3,1*	5,4±1,5	8,8±2,9*

Примечание. * - $p < 0,05$ (в сопоставлении с соответствующим показателем без блокады Sema4D)

Наряду с этим, выявлено антиапоптатическое действие семафорина (Таблица). Уровень активационно-индуцированного апоптоза возрастал в случае блокады Sema4D и для CD4⁺, и для CD8⁺Т-лимфоцитов. Важно отметить, что данный эффект выявлялся в Т-лимфоцитах только в присутствии аутологичных В-клеток, тогда как в монокультуре Т-лимфоцитов уровень апоптоза имел лишь тенденцию к повышению. По-видимому, для реализации антиапоптотического

действия Sema4D требуется кооперативное взаимодействие Т-лимфоцитов с другими клетками, на которых уровень экспрессии рецепторов выше – В-лимфоцитами или дендритными клетками.

Полученные данные показывают, что Sema4D непосредственно участвует в активации Т-лимфоцитов – как за счет усиления пролиферативного ответа клеток на стимуляцию, так и за счет подавления альтернативного процесса – активационно-индуцированного апоптоза. Механизмами такой регуляции может быть ауто- или паракринное действие растворимого Sema4D на Т-клетки через соответствующие рецепторы или же сигнализация через мембранный семафорин.

Работа поддержана грантом РФФИ № 15-04-05694.

Библиографический список

1. Куклина Е. М., Некрасова И. В., Валиева Ю. В. Участие семафорина Sema4D в Т-зависимой активации В-лимфоцитов // БЭБиМ. 2017. Т. 163, N 4. С. 444-448.

2. Bougeret C., Mansur I.G., Dastot H., Schmid M., Mahouy G., Bensussan A., Bousmell L. Increased surface expression of a newly identified 150-kDa dimer early after human T lymphocyte activation // J. Immunol. 1992. Vol. 148. P. 318-323.

3. Hérold, C., G. Bismuth, A. Bensussan, L. and Bousmell. Activation signals are delivered through two distinct epitopes of CD100, a unique 150 kDa human lymphocyte surface structure previously defined by BB18 mAb // Int. Immunol. 1995. Vol. 7. P. 1-8

4. Kolodkin A.L., Matthes D.J., Goodman C.S. The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules // Cell. 1993. Vol. 75. P. 1389-1399.

5. Kumanogoh A., Kikutani H. The CD100-CD72 interaction: a novel mechanism of immune regulation // Trends Immunol. 2001. Vol. 22. P. 670-676.

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ И УПРАВЛЕНИЕ ДИНАМИКОЙ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

Гаврилова Анна Юрьевна¹, Бочаров Геннадий Алексеевич²,
Черешнев Валерий Александрович³

¹*ФГАОУ ВО Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», г. Москва, Россия*

²*Институт вычислительной математики РАН им. Г.И.Марчука, г. Москва, Россия*

Ключевые слова: вирус иммунодефицита человека, ВИЧ-инфекция, антиретровирусная терапия, математическое моделирование

В данной работе описывается процесс нахождения оптимального решения для модели развития вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) на основе обыкновенных дифференциальных уравнений (ОДУ). На основе биологических процессов строятся математические модели, описывающие взаимодействие организма человека с вирусами, в том числе вирусом иммунодефицита человека. С помощью моделирования найден режим приема лекарственных препаратов.

ВИЧ-инфекция признана одним из опаснейших инфекционных заболеваний человека, так как без вмешательства врачей гибель инфицированных наступает в среднем через 9-11 лет после заражения вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ). По официальным данным Федерального научно-методического Центра по профилактике и борьбе с синдромом приобретенного иммунного дефицита (СПИД) к 2016 году в Российской Федерации было зафиксировано 1 114 815 ВИЧ-инфицированных [1]. Для России это проблема актуальна, так как с каждым годом количество инфицированных растет примерно на 10% [1]. СПИД является последней стадией инфекции, вызываемой вирусом иммунодефицита человека. На этой стадии уровень иммунных клеток опускается настолько низко, что организм оказывается беззащитным перед многими болезнями.

В борьбе с ВИЧ применяется антиретровирусная терапия (АРТ). Благодаря терапии, достигнуты значительные успехи в снижении смертности и количества осложнений у ВИЧ-инфицированных лиц. В лечении используются сразу несколько препаратов, это приводит к огромному числу медикаментов, которые необходимо принимать пациентам на протяжении всей жизни.

Подобрать программу лечения крайне сложно, так как вирус обладает чрезвычайной изменчивостью. Лекарственные препараты способны подавить исходную форму, но она очень быстро заменяется другой формой, перед которой эти лекарства бессильны. Многие методы лечения настолько агрессивны, что последствия бывают крайне тяжелыми для больного.

В России, как и во всем мире, актуальна проблема лечения ВИЧ-инфекции, так как стоимость препаратов высокая, лекарства имеют огромный список побочных эффектов, а программу лечения приходится часто менять из-за изменчивости вируса. Поэтому очень важно грамотно подбирать схему лечения, минимизируя количество принимаемых препаратов и преодолевая устойчивость вируса к лекарствам.

В данной работе для разработки схемы лечения ВИЧ-инфекции используются вариационные вычислительные методы оптимального управления. Иммунная система - это сложный объект, поэтому мы в состоянии рассматривать только отдельные звенья и исследовать динамику с помощью математических моделей и численных методов. Использование математических методов может значительно продвинуть решение такой актуальной и важной проблемы, как ВИЧ-инфекция.

Математическое моделирование системы «ВИЧ-организм хозяина» позволяет на основе численного эксперимента проводить исследования динамики развития болезни, изучать внутриклеточные механизмы размножения вируса, прогнозировать течение инфекции в зависимости от индивидуальных особенностей пациента, подбирать оптимальные схемы лечения и сложные комбинации препаратов высокоактивной антиретровирусной терапии (англ. "highly active antiretroviral therapy").

Целью данной работы является построение оптимальной терапевтической программы для управляемой иммунологической модели динамики ВИЧ-инфекции на основе обыкновенных дифференциальных уравнений, реализовав численный метод решения задачи.

Базовая модель динамики острой фазы ВИЧ-инфекции, рассматриваемая во многих работах по данной теме, связывает ключевые популяции клеток и вируса: неинфицированные Т-клетки-мишени, инфицированные клетки и свободные вирусные частицы [1, 2, 3, 4, 5]. В качестве иммунного ответа организма на ВИЧ-инфекцию, во многих математических моделях рассматривается реакция клеток-эффекторов.

Основной задачей математического моделирования является нахождение оптимальных условий лечения, при которых достигаются: максимальное значения уровня здоровых CD4+ Т-клеток при минимизации стоимости лечения и уровня вирусной нагрузки [3, 4]; минимальный размер популяции ВИЧ в организме и минимальное побочное влияние терапии при максимальной силе иммунного ответа организма [1]; максимальный уровень здоровых CD4+ Т-клеток и силы иммунного ответа при минимальных затратах на лечение [3, 4] и т. д.

Высокая токсичность лекарственной терапии, а также обнаруженная лекарственная устойчивость ВИЧ мотивировали исследования управляемых математических моделей иммунологии ВИЧ, в которых выделены управляемые переменные, отвечающие за лечебные воздействия [2, 3].

Ранее большинство ученых рассматривали в данной проблеме действия лишь двух лекарственных препаратов. Обычно это ингибиторы ферментов вируса: протеазы и обратной транскриптазы.

Однако, в современной практике в схему лечения ВИЧ-инфицированных больных включают не менее трех - четырех препаратов. Отличием модели, построенной нами, является использование четырех лекарственных препаратов, что позволяет рассматривать данную модель, как более близкую к практике.

Таким образом, в ходе работы были рассмотрены необходимые понятия оптимального управления; на основе математической модели управления динамикой ВИЧ-инфекции с использованием четырех препаратов найдены условия для оптимального управления; выполнена программная реализация модели и численного метода поиска решения оптимизационной задачи управления.

Библиографический список

1. Гайнова И.А., Бажан С.И., Лихошвай В.А., Черешнев В.А., Бочаров Г.А. Возможности математического моделирования при исследовании инфекции ВИЧ-1. Российский иммунологический журнал. 2015 9(18), №4. С. 379-399.
2. Бочаров Г.А., Марчук Г.И. Прикладные проблемы математического моделирования в иммунологии. Журнал вычислительной математики и математической физики. 2000. Т.40, №12. С. 1905-1920.
3. Черешнев В.А., Бочаров Г.А., Ким А.В., Бажан С.И., Гайнова И.А., Красовский Н., Шагель Н.Г., Иванов А.В., Сафронов М.А., Третьякова Р.М. Введение в задачи моделирования и управления динамикой ВИЧ-инфекции. М.Ижевск: Институт компьютерных исследований. 2016. 230 с.
4. Черешнев В.А., Бажан С.И., Бахметьев Б.А., Гайнова И.А., Бочаров Г.А. Системный анализ патогенеза ВИЧ-инфекции. Успехи современной биологии. 2012. 132(2). С. 115-140.
5. Samji H., Cescon A., Hogg R. S., Modur S. P., Althoff K. N., et al. (2013) Closing the Gap: Increases in Life Expectancy among Treated HIV-Positive Individuals in the United States and Canada. PLoS ONE 8(12): e81355. DOI: 10.1371/ journal.pone.0081355.

МЕЛАТОНИН И БЕРЕМЕННОСТЬ

Глебездина Наталья Сергеевна

*«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал
ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: мелатонин, беременность, Т-лимфоциты, дифференцировка

Гормон шишковидной железы мелатонин модулирует широкий спектр физиологических функций организма. Плейотропность действий этого липофильного индоламина проявляется в контроле нервной, эндокринной и иммунной систем организма [1, 2]. Важное значение мелатонин имеет и для успешного развития беременности. В ходе гестации уровень гормона в сыворотке постепенно повышается за счет его активного синтеза яичниками и плацентой [2]. Мелатонин легко проникает через плаценту и защищает от окислительного повреждения плод, стимулируя его рост и развитие мозга, а также оказывает антиоксидантное действие на материнские ткани и плаценту, регулируя гомеостаз последней [1-3]. Помимо прочего, гормон участвует в контроле циркадных ритмов (в том числе у плода), гормонального фона при беременности, выступает как цитопротективный агент, а также обладает выраженным иммуномодулирующим действием [1, 2, 4]. На важную роль мелатонина в развитии беременности указывает тот факт, что изменения экспрессии и/или снижение уровня данного гормона ассоциировано с нарушениями или осложнениями в течении гестации, такими как аборт, преэклампсия и неонатальные неврологические расстройства, которые часто сопровождается преждевременными родами, а также являются причиной материнской или младенческой смертности [3]. Не случайно в настоящее время активно обсуждается перспектива фармакологического использования мелатонина при таких нарушениях. Так, в частности, проводятся пилотные исследования по применению экзогенного мелатонина для снижения уровня окислительных повреждений у беременных с повышенным риском развития преэклампсии с первыми результатами [5], для нейропротекции мозга плода при риске преждевременных родов [6], для лечения бессонницы у беременных [7]. В то же время во многих проектах с акцентом на позитивные антиоксидантные эффекты мелатонина не учитывается иммуномодулирующее действие гормона, хотя изменение его уровня в период гестации должно сказываться на активности иммунных процессов [4]. В этом плане особый интерес представляет вопрос, который никем из исследователей не поднимался вообще, ни в контексте беременности, ни без нее – о роли мелатонина в контроле соотношения двух Т-клеточных субпопуляций, Th17 и Treg: с одной стороны, этот баланс важен для успешного развития беременности; с другой стороны, CD4⁺ Т-лимфоциты находятся под непосредственным контролем индола, поскольку экспрессируют специфические мембранные рецепторы для гормона, MT1 и MT2, а транскрипционный фактор ROR α , который эффективно регулируется мелатонином и до недавнего времени

рассматривался как внутриклеточный рецептор для данного гормона, служит одним из двух основных дифференцировочных факторов для Th17 и в то же время является негативным регулятором дифференцировки Treg [1, 8, 9].

Данные наших исследований по оценке роли мелатонина в регуляции дифференцировки Th17/Treg на разных стадиях беременности, полученные как *ex vivo*, так и *in vitro*, указывают на участие эндогенного мелатонина в развитии и функционировании этих Т-клеточных субпопуляций, причем для Th17 такая регуляция была позитивной, для регуляторных Т-лимфоцитов - напротив, негативной [10]. Действие гормона было опосредовано сигналами с мембранных мелатониновых рецепторов, которые, вероятно, реализуют свои эффекты через ингибиторные G-белки (Gi-белки) и активацию цАМФ-зависимого сигнального пути [1].

В итоге, делая ставку на антиоксидантное действие гормона, можно вызвать сдвиг баланса Th17/Treg в направлении Th17, участвующего в развитии воспаления и в индукции аутоиммунных патологий, и создать осложнения в период гестации [3, 4]. Принимая во внимание, что мелатонин как в высокой физиологической, так и в фармакологической концентрациях способен индуцировать *in vitro* дифференцировку интактных CD4⁺Т-лимфоцитов в Th17 [11], важно учитывать иммунорегуляторные эффекты экзогенного гормона в зависимости от собственного гормонального фона.

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер госрегистрации темы: 01201353248.

Библиографический список

1. Mahmood D. Pleiotropic Effects of Melatonin // Drug Res (Stuttg). 2018. doi: 10.1055/a-0656-6643. [Epub ahead of print].
2. The universal nature, unequal distribution and antioxidant functions of melatonin and its derivatives / Reiter R.J., Tan D.X., Rosales-Corral S. et al. // Mini Rev Med Chem. 2013. V. 13 (3). P. 373-384.
3. Lanoix D., Guerin P., Vaillancourt C. Placental melatonin production and melatonin receptor expression are altered in preeclampsia: new insights into the role of this hormone in pregnancy // J Pineal Res. 2012. V. 53 (4). P. 417-425.
4. Beneficial pleiotropic actions of melatonin in an experimental model of septic shock in mice: regulation of pro-/anti-inflammatory cytokine network, protection against oxidative damage and anti-apoptotic effects / Carrillo-Vico A., Lardone P.J., Naji L. et al. // J Pineal Res. 2004. V. 39. P. 400-408.
5. Melatonin improves endothelial function in vitro and prolongs pregnancy in women with early-onset preeclampsia / Hobson S.R., Gurusinghe S., Lim R. et al. // J Pineal Res. 2018. e12508.

6. Wilkinson D., Shepherd E., Wallace E.M. Melatonin for women in pregnancy for neuroprotection of the fetus // Cochrane Database of Systematic Reviews. 2016. Issue 3. Art. No.: CD010527.

7. Chaudhry S.K., Susser L.C. Considerations in Treating Insomnia During Pregnancy: A Literature Review // Psychosomatics. 2018. V. 59. P. 341-348.

8. Th17 and regulatory T cells in women with recurrent pregnancy loss / Lee S.K., Kim J.Y., Lee M. et al. // Am J Reprod Immunol. 2012. V. 67 (4). P. 311-318.

9. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions / Slominski R.M., Reiter R.J., Schlabritz-Loutsevitch N. et al. // Molecular and Cellular Endocrinology. 2012. V. 351 (2). P. 152-166.

10. Роль эндогенного мелатонина в контроле баланса Th17/Treg при беременности / Глебездина Н.С., Олина А.А., Некрасова И.В. и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2017. Т. 164. № 10. С. 459-464.

11. Куклина Е.М., Глебездина Н.С., Некрасова И.В. Роль мелатонина в контроле дифференцировки Т-лимфоцитов, продуцирующих интерлейкин-17 (Th17) // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2015. Т. 160. № 11. С. 604-607.

РОЛЬ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК И ЕСТЕСТВЕННЫХ КИЛЛЕРОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ АЛКОГОЛЬНОГО ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ

Газатова Н.Д.¹, Юрова К.А.¹, Гаврилов Д.В.², Литвинова Л.С.¹

¹*«Балтийский федеральный университет им. И. Канта»,
г. Калининград, Россия*

²*ГБУЗ «Наркологический диспансер Калининградской области»,
г. Калининград, Россия*

Ключевые слова: алкогольный фиброз печени, регуляторные Т-клетки, естественные киллеры, воспаление

Фиброз печени, формирующийся вследствие воздействия различных гепатотоксических факторов, в том числе этанола, является результатом цикличного процесса повреждения-восстановления клеток печеночной паренхимы. Активация компонентов врожденного и адаптивного иммунитета является важным звеном фиброгенеза.

Регулируя воспалительный ответ на повреждение гепатоцитов, иммунные клетки, опосредуют трансформацию покоящихся звездчатых клеток печени (ЗКП) в пролиферирующие миофибробласты, продуцирующие компоненты экстрацеллюлярного матрикса [1]. В *нормальной печени* в ответ на постоянное поступление пищевых антигенов, эндотоксинов и патогенов, проникающих из кишечника в кровотоки, иммунные реакции, в основном, опосредованы разнообразным репертуаром клеток врожденного иммунитета; тогда как для предотвращения чрезмерной активации, печень поддерживает статус иммунной толерантности. На сегодняшний день представлены убедительные доказательства участия различных популяций лимфоцитов - естественных киллеров (NK) и регуляторных Т-клеток (Treg), основных модуляторов реакций врожденного и адаптивного иммунитета, в патогенезе фиброза печени [2,3]. Целью работы явилось исследование взаимосвязей между содержанием NK-клеток и Treg лимфоцитов в периферической крови у пациентов с алкогольным фиброзом печени (АФП), ранжированных по стадии процесса.

Разрешение на проведение исследования получено в локальном этическом комитете БФУ им. И. Канта от 26.12.2017 г. (г. Калининград). Материалом для исследования служила периферическая кровь, взятая из локтевой вены утром натощак с помощью стандартных вакуумных систем с гепарином у 62 больных алкогольным фиброзом печени (АФП, МКБ 10 - K70.2; 32 женщин и 30 мужчин в возрасте 46.4 ± 5.6 лет), 15 лиц, злоупотребляющих алкоголем без нарушений структуры и функций печени (*группа сравнения*) и 20 условно здоровых доноров (10 женщин и 10 мужчин в возрасте 38.3 ± 6.4 лет). Больные АФП были ранжированы на 4 группы, в зависимости от стадии фиброза. Все пациенты (без и с фиброзом), принявшие участие в исследовании, характеризовались как сильнопьющие (4200 – 5600 гр 100% этанола в месяц), со стажем употребления алкоголя не менее 3 и не более 10 лет. Число клеток, несущих поверхностные (CD45, CD3, CD4, CD16, CD56, CD25) и внутриклеточные (Foxp3⁺) маркеры определяли в лизированных образцах периферической крови методом проточной цитометрии с помощью моноклональных антител (Miltenyi Biotec, Германия; Abcam, Cambridge, Великобритания; e-Bioscience, США), согласно протоколам производителя. Регистрацию результатов проводили на проточном цитофлюориметре MACSQuant («Miltenyi Biotec», Германия) с использованием программы KALUZA Analysis Software (Beckman Coulter, США). Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью программы IBM SPSS Statistics 20 (Statistical Package for the Social Sciences).

Современная концепция регрессии фиброза печени основана на гибели активированных ЗКП, опосредованной индукцией механизмов

врожденного иммунитета, представленных, в частности, натуральными киллерами и системой интерферонов [1,3].

У больных I-II ст. АФП, относительное содержание НК-клеток (CD3⁺CD16⁺CD56⁺) в периферической крови достоверно ($p < 0,05$) превышало контроль и было сопоставимым с результатами группы сравнения, тогда как у больных III – IV ст. АФП, напротив, регистрировалось снижение относительного числа CD3⁺CD16⁺CD56⁺ лимфоцитов ($p < 0,05$). Наши результаты лишь частично подтверждают данные литературы, согласно которым хроническое употребление алкоголя сопровождается подавлением функций НК-клеток и уменьшением их числа, возможно, из-за избирательного хоуминга этих клеток в очаг воспаления, в сочетании с этанолиндукцированным нарушением их продукции в костном мозге [2,3].

Мы предполагаем, что наряду с иммуотропным действием этанола, прогрессии фиброза печени может способствовать дисрегуляция кооперативных взаимодействий между клетками врожденного и адаптивного иммунитета. В частности, при хроническом гепатите С установлено угнетающее влияние CD4⁺ Treg лимфоцитов на эффекторные функции НК-клеток печени, что способствует снижению цитотоксичности последних в отношении активированных ЗКП [3]. Содержание CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ клеток у обследованных нами больных АФП с I-II ст. не отличалось от контроля и группы сравнения, значительно повышаясь (относительное и абсолютное содержание) у пациентов с продвинутыми стадиями фиброза ($p < 0,05$). Выявленные нами негативные взаимосвязи между относительным содержанием CD3⁺CD16⁺CD56⁺ и CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ клеток в периферической крови у больных с III и IV ст. фиброза ($r = -0,763$, $-0,901$, $p < 0,001$) подтверждают угнетающее влияние Т-регуляторных клеток в отношении популяции естественных киллеров, что может способствовать снижению антифибротических эффектов последних с утратой контроля над процессами фиброгенеза на терминальных стадиях заболевания, индуцированного хроническим приемом алкоголя.

Библиографический список

1. Byun J.S., Yi H.S. Hepatic Immune Microenvironment in Alcoholic and Nonalcoholic Liver Disease // *Biomed Res Int*. 2017. doi: 10.1155/2017/6862439.
2. Spengler U., Nischalke H.D., Nattermann J., Strassburg C.P. Between Scylla and Charybdis: the role of the human immune system in the pathogenesis of hepatitis C // *World J Gastroenterol*. 2013. V.19. P.7852-7866.
3. Langhans B., Alwan A.W., Krämer B. et al. Regulatory CD4⁺ T cells modulate the interaction between NK cells and hepatic stellate cells by acting on either cell type // *J Hepatol*. 2015. V.62(2). P.398-404.

ЛЮМИНОЛЗАВИСИМАЯ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ КАК СРЕДСТВО ВЫЯВЛЕНИЯ МАРКЕРОВ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

Годовалов Анатолий Петрович¹, Шилов Юрий Иванович^{1,2}, Вавилов
Никита Васильевич¹, Карпунина Тамара Исаковна¹

¹ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им.
акад. Е.А. Вагнера» Минздрава России, г. Пермь, Россия

²«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» - филиал
ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия

Ключевые слова: окислительный стресс, свободные радикалы, люминол

В последнее время уделяется много внимания изучению механизмов развития окислительного стресса и его последствий для организма человека. Используют как прямые методы обнаружения свободных радикалов (СР), так и косвенные, основанные на определении продуктов взаимодействия СР с макромолекулами. Существенную сложность представляет для исследователей короткая «жизнь» СР, что ограничивает применение прямых методов их определения, особенно в клинических условиях. С другой стороны, отсутствуют четкие сведения о корреляции уровня СР и концентрации окисленных продуктов.

Цель исследования – изучить возможности метода люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ) в определении содержания СР и оценить зависимость концентрации окисленных белков от уровня активных форм кислорода.

Для моделирования продукции СР использовали реакцию Фентона в классическом варианте с варьированием концентрации перекиси водорода: 500, 250, 50, 25, 15, 10, 5 и 0 мкМ. Далее оценивали уровень люминесценции в пробах с люминолом и без него с помощью люминометра Luminoskan Ascent (Thermo Labsystems). Регистрацию вспышек осуществляли в течение 15 минут через каждую минуту. Уровень СР оценивали по интегральному показателю светосуммы вспышек. Для окисления белка сыворотки крови использовали реакцию Фентона с варьированием концентрации перекиси водорода: 500, 100, 30, 20, 10 и 0 мкМ. Оценку окислительной модификации белка (ОМБ) проводили по методу Reznick *et al.* в нашей модификации [1].

Измерение оптической плотности проводили с помощью планшетного спектрофотометра (PowerWave Bio-TEK Instruments, Inc.). Концентрацию окисленных белков выражали в нмоль/мг общего белка

сыворотки. Для определения концентрации белка использовали биуретовый метод (Вектор-Бест, Новосибирск). Тотальную концентрацию окисленных белков рассчитывали путем суммирования всех окисленных производных [2]. Статистический анализ результатов проводили с использованием методов описательной статистики, *t*-критерия Стьюдента, корреляционного анализа с вычислением коэффициента Пирсона (*r*).

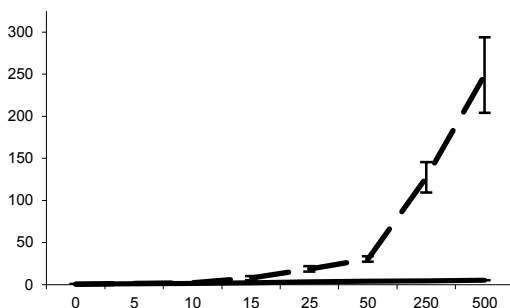


Рис. 1. Люминесценция в присутствии разных концентраций перекиси водорода (по оси ординат – уровень светосуммы вспышек, у.е.; по оси абсцисс – концентрация перекиси водорода, мкМ; сплошная линия – пробы без внесения люминола, пунктирная – вместе с люминолом).

Показана прямая сильная зависимость уровня светосуммы вспышек от концентрации перекиси водорода ($r=0,9$; $p<0,05$). Через 15 минут вспышки регистрировались на минимальном фоновом уровне. Добавление люминола существенно усиливает яркость и интенсивность вспышки (рис. 1).

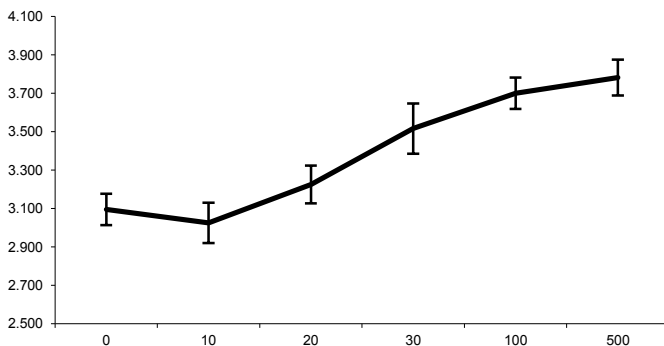


Рис. 2. Концентрация ОМБ при разных уровнях перекиси водорода (по оси абсцисс – концентрация перекиси водорода, мкМ; по оси ординат – уровень ОМБ, нмоль/мг общего белка).

При определении уровня ОМБ (рис. 2) установлена прямая сильная связь между количеством свободных радикалов и степенью окисления белка

($r=0,72$; $p<0,05$).

Показана взаимосвязь между показателями ЛЗХЛ и концентрацией окисленных белков в модельном эксперименте *in vitro*, что дополнительно подтверждает возможность использования определения концентрации окисленных белков для оценки свободнорадикального окисления в условиях целостного организма особенно в клинических условиях, требующих отсроченного исследования.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ №16-44-590429, №17-44-590404 и Администрации Пермского края, а также в рамках государственного задания «ИЭГМ УрО РАН», номер госрегистрации темы: 01201353248.

Библиографический список

1. Вавилов Н.В., Шилов Ю.И. Модификация метода оценки окислительной модификации белков // Медицинская иммунология. – 2017. – Т. 19(SV). – С. 254.
2. Копытова Т.В., Пантелеева Г.А., Дмитриева О.Н., Коткова Е.В. Оценка окислительной модификации белков у больных хроническими распространёнными дерматозами // Клиническая лабораторная диагностика. – 2014. – Т. 2. – С. 41-44.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ГОНОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ: ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Годовалов Анатолий Петрович¹, Карпунина Тамара Исаковна¹,
Сперанская Вера Николаевна², Николаева Нина Владимировна¹

¹ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава России, г. Пермь, Россия

²Филиал АО «НПО «Микроген» «Пермское НПО «Биомед», г. Пермь, Россия

Ключевые слова: *Neisseria gonorrhoeae*, реакция коагулирования, лабораторная диагностика

Как известно, возбудителя гонореи – широко распространенного инфекционного венерического заболевания с воспалительными проявлениями в мочеполовых путях – открыл Альберт Нейссер в 1879 г. Несмотря на многолетнюю историю микробиологического изучения, *N. gonorrhoeae* остается одним из наиболее проблемных микроорганизмов для лабораторного исследования. В настоящее время разработаны

регламентирующие документы [1, 2], обязывающие специалистов изолировать и изучать свойства, прежде всего антиботикорезистентность штаммов, на основе культурального исследования. До последнего времени эти требования не реализуются, а в большинстве профильных лабораторий предпочтение отдается микроскопическому изучению препаратов из патологических выделений, окрашенных различными методами. Такой выбор продиктован целым рядом объективных и субъективных причин. При типичной форме острого гонорейного уретрита распознавание возбудителя в условиях лаборатории может быть ограничено бактериоскопией мазков гнойного отделяемого, что не связано со значительными трудо- и временными затратами. Однако, в исследуемом материале могут присутствовать другие грамотрицательные кокки, например, рода *Veillonella*, напоминающие гонококки. Микробное разнообразие в наиболее значительной степени снижает эффективность такого подхода при исследовании цервикально-вагинального содержимого, учитывая стертую симптоматику гонококковой инфекции у женщин. Дополнительные трудности связаны с полиморфизмом самого возбудителя, образованием *L*-форм под действием химиопрепаратов [1, 2]. Ранее нами отмечено усиление гетероморфизма по мере возрастания неблагоприятных воздействий на микроорганизмы.

Бактериологическая диагностика требует использования сложных и дорогостоящих питательных сред, создания специальных условий и продолжительного времени при культивировании образцов патологического материала, но и это далеко не всегда обеспечивают положительный результат. Затруднена и окончательная идентификация возбудителя гонореи ввиду того, что культуральные и биохимические свойства его даже в стандартных условиях не стабильны, а антигенная структура не однородна и меняется у дочерних популяций [2].

Технологии молекулярно-генетического анализа, доступные широкой практике, позволяют лишь констатировать факт наличия/отсутствия фрагментов нуклеиновых кислот *N. gonorrhoeae* в исследуемом материале.

Повысить достоверность лабораторного исследования на этапе скрининга при детекции возбудителя могут методы экспресс-анализа, в частности реакция коаггутинации. Для использования этой реакции в диагностике гонореи в Пермском НПО “Биомед” был разработан коаггутинационный диагностикум с использованием аффинно-очищенных кроличьих антител.

Целью нашего исследования явилось изучение эффективности такого подхода в диагностике гонореи.

Материалом для исследования служило отделяемое уретры, цервикального канала, полученное от 246 пациентов кожно-

венерологического диспансера. От 202 больных были выделены культуры *N. gonorrhoeae*, от 44 больных – другие виды микроорганизмов, в т.ч. трихомонады, *N. lactamica*. Реакция коаггутинации ставилась в классическом варианте на стекле с первичным материалом и с изолированными культурами. Каждое исследование сопровождалось постановкой контролей: на специфичность реакции, положительный контроль, контроль диагностикума и контроль спонтанной агглютинации.

Результаты. При исследовании мазков из первичного материала, нанесенного на стекло, после кратковременной экспозиции в физиологическом растворе с перемешиванием бактериологической петлей, положительные результаты были получены в 58,3% случаев. В ходе исследования изолированных культур, предположительно *N. gonorrhoeae*, 77,2% из них дали положительный результат в реакции коаггутинации.

При постановке реакции коаггутинации с другими видами микроорганизмов получены следующие результаты. Так, 50% проб от больных трихомониазом дали отрицательный результат, в 33,3% случаев наблюдалась неспецифическая реакция, которая также была расценена как отрицательный результат, а в 16,7% была положительная реакция. Такие микроорганизмы, как микоплазмы, уреаплазмы, дрожжеподобные грибки, *P. aeruginosa*, *N. lactamica* в реакции коаггутинации с гонококковым диагностикумом дали отрицательные результаты.

Таким образом, реакция коаггутинации, показавшая относительно высокую чувствительность и специфичность, большую экономию времени проведения анализа, может быть использована как для скринингового экспресс-исследования, так и для идентификации уже выделенных культур в качестве дополнительного вспомогательного теста. Дальнейшие разработки должны быть направлены на повышение специфичности апробированного метода.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №17-44-590404 и Администрации Пермского края.

Библиографический список

1. Хабижанов А.Б. Распространенность и клинико-лабораторная диагностика гонореи // Вопросы дерматологии и венерологии. – 2004. – №1-2. – С. 8-16.
2. Пунченко О.Е., Рищук С.В. Качество диагностики нейссеральной инфекции // TERRA MEDICA. – 2012. – № 3. – С. 21–24.

ВЗАИМОСВЯЗЬ ДЕПРЕССИИ С ОЖИРЕНИЕМ У КАРДИОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

Горбунова Екатерина Аркадьевна, Антонян Артур Андреевич,
Бобылев Юрий Михайлович

*ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им.
академика Е.А. Вагнера» Минздрава России, г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: депрессия, ожирение, артериальная гипертензия

Анализ эпидемиологических исследований, проведенных в России, свидетельствуют о прогрессирующем росте больных с ожирением, причем женщины превосходят мужчин по распространенности абдоминального ожирения [1]. В настоящее время ожирение рассматривается как независимый фактор риска, так как часто ведет к увеличению частоты сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) [2]. Кроме того, в последние годы высокую распространенность ожирения связывают с увеличением числа случаев депрессии.

В результате работы изучена взаимосвязь депрессии и ожирения в зависимости от степени ожирения, выяснена роль психологических факторов, объясняющих связь ожирения с депрессией.

Методом случайной выборки обследована 131 женщина в возрасте старше 50 лет с артериальной гипертензией. Ассоциацию клинически выраженного уровня дисперсии с ожирением оценивали с помощью расчета отношений шансов (ОШ) и их 95% доверительных интервалов.

По результатам тестирования самый высокий уровень депрессии наблюдался в группе пациентов с III степенью ожирения, а самый низкий - у пациентов с I степенью ожирения ($p < 0,01$), с нормальной массой тела (МТ) ($p < 0,02$) и с избыточной МТ ($p < 0,03$). При этом уровень депрессии пациентов с I степенью ожирения достоверно был ниже по сравнению с пациентами с нормальной МТ ($p < 0,02$) и избыточной МТ ($p < 0,03$). У пациентов с III степенью ожирения появилась связь с депрессией (ОШ – 1,27), но достоверно ассоциирована не была (95% ДИ: 0,70 – 2,32).

Следует отметить низкий уровень депрессии и низкую частоту депрессии у пациентов с I степенью ожирения (рисунок). Уровень депрессии в 3 группе с ожирением I степени достоверно был ниже 1 группы ($p < 0,02$), 2 группы - ($p < 0,03$), 4 группы – ($p < 0,05$) и 5 группы –

($p < 0,01$). В этой группе женщин депрессия была обратно пропорциональна массе тела, что поддерживает гипотезу "веселого жира" [3, 4].

Для объяснения связи между ожирением и депрессией высказано предположение о возможной роли психологических, социологических и биологических факторов [4-6]. Оказалось, что неадаптивный копинг преобладал у пациентов с III степенью ожирения на когнитивном уровне. При проведении корреляционного анализа выявлена статистически значимая зависимость между массой тела и неадаптивным копингом у пациентов с III степенью ожирения.

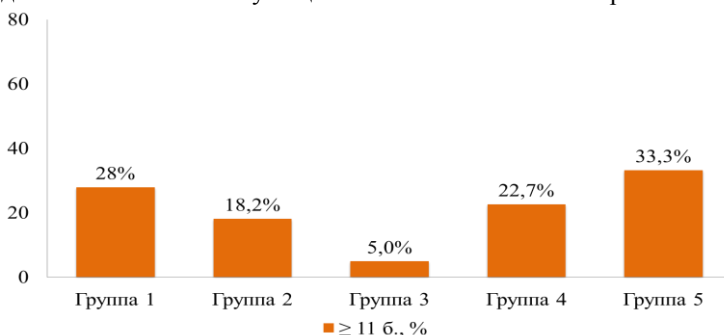


Рисунок. Частота клинически выраженной депрессии (≥ 11) по шкале HADS в зависимости от массы тела (в %): 1 группа – пациенты с нормальной МТ; 2 группа – пациенты с избыточной МТ; 3 группа – пациенты с I степенью ожирения; 4 группа – пациенты со II степенью ожирения; 5 группа – пациенты с III степенью ожирения

Таким образом, связь между ожирением и клинически выраженной депрессией зависит от тяжести ожирения. Распространенность депрессии у женщин 50 лет и старше с артериальной гипертензией II-III стадией, была самой высокой у лиц с тяжелым ожирением. У пациентов с I степенью ожирения наблюдался "защитный эффект" от депрессии, в этой группе частота депрессии была самой минимальной и была обратно пропорциональна массе тела. Связующим звеном между ожирением и депрессией у пациентов с высокой стадией ожирения является психологический фактор.

Библиографический список

1. Чазова И.Е. Распространенность факторов риска развития сердечно-сосудистых заболеваний в российской популяции больных артериальной гипертонией / И.Е. Чазова, Ю.В. Жернакова, Е.В. Ощепкова, С.А. Шальнова, Е.Б. Яровая, А.О. Конради, С.А. Бойцов // Кардиология. – 2014. – Т. 10. – С. 4-12.

2. Eskel R.H. American Heart Association call to action: obesity as a major risk factor for coronary heart disease / R.H. Eskel, R.M. Krauss // Circulation. – 1998. – V. 97. – P. 2099- 2100.

3. Crisp A.H. Jolly fat: relation between obesity and psychoneurosis in general population / A.H. Crisp, B. McGuiness // BMJ. - 1976. – V. 1. – P. 7-9.

4. Palinkas L.A. Depressive symptoms in overweight and obese older adults: a test of the 'jolly fat' hypothesis / L.A. Palinkas, D.L. Wingard, E. Barrett-Connor // J Psychosom Res. – 1996. – V. 40. – P. 59-66.

5. Ross C.E. Overweight and depression / C.E. Ross // J Health Soc Behav. – 1994. – V. 35. – P. 63-79.

6. Friedman, M.A. Psychological correlates of obesity: moving to the next research generation / M.A. Friedman, K.D. Brownell // Psychol Bull. – 1995. – V. 117. – P. 3-20.

ВЛИЯНИЕ КИСПЕПТИНА НА ФАГОЦИТАРНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ

Горбунова Ольга Леонидовна, Некрасова Ирина Валерьевна,
Ширшев Сергей Викторович

*«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» - филиал
ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: киспептин, нейтрофилы, фагоцитарная
активность

Киспептин играет важную роль в репродукции человека [1], регулируя гипоталамо-гипофизарно-гонадальную ось у людей. Агонисты рецептора к киспептину способны инициировать пубертатный период в случаях его задержки, и индуцировать овуляцию у женщин с ановуляторным циклом [2]. В кровообращении мужчин и небеременных женщин киспептин практически не обнаруживается, но заметно повышается при беременности. Источником циркулирующего киспептина является плацента [3]. Киспептин имеет специфические рецепторы на различных типах иммунокомпетентных клеток, в том числе и на нейтрофилах [4], обеспечивающих неспецифическую защиту организма. Показано, что рост численности общего числа лейкоцитов в период беременности, определяется главным образом увеличением содержания нейтрофильных лейкоцитов [5]. Однако в современной литературе отсутствуют данные об иммуномодулирующем действии

кисспептина на нейтрофилы. Целью данной работы явилась оценка влияния кисспептина на фагоцитарную активность нейтрофилов женщин.

В работе использована периферическая венозная кровь 10 здоровых небеременных женщин репродуктивного возраста (от 23 до 38 лет). Периферическую кровь забирали из кубитальной вены в фолликулярную фазу менструального цикла (5–11 день). Кисспептин (Кисспептин-54, Metastin, Synthetic, CALBIOCHEM, США) использовали в физиологических концентрациях, соответствующих его уровню в периферической крови в I, II и III триместрах беременности, – 1,3 пМ/л, 4,6 пМ/л и 9,6 пМ/л, соответственно [6]. Объектом изучения являлись сепарированные нейтрофилы периферической крови, выделенные на двойном градиенте плотности фиколл-верографина. Плотности верхнего и нижнего градиентов составили 1,077 и 1,112 г/мл, соответственно. Нейтрофилы ($5 \cdot 10^6$ /мл) инкубировали с кисспептином в течение часа при 37°C. В контрольные пробы вместо гормона вносили официальный растворитель. После инкубации с гормоном определяли фагоцитарную активность нейтрофилов по поглощению бактерий люминесцентного генно-инженерного штамма *E.coli lux⁺*, которые несут lux-оперон морской люминесцентной бактерии *V. fischeri* («Эколом-5») [7]. Рассчитывали индекс фагоцитарной активности (ИФА), отражающий процент гашения биолюминесценции в сравнении с исходным уровнем [8]. Измерение производилось на многофункциональном фотометре Synergy H1 («Bio-Tek Instrumens, Inc.», США). Статистическую обработку проводили с использованием парного t-критерия Стьюдента.

Выявлено, что часовая инкубация с кисспептином в концентрации, соответствующей I триместру беременности, снижает фагоцитарную активность нейтрофилов в динамике всего исследования, а в концентрациях, соответствующих II и III триместру, – начиная с 20 мин. Исследования (Табл.). Учитывая тот факт, что рост численности общего числа лейкоцитов в период беременности определяется, главным образом, увеличением содержания нейтрофильных лейкоцитов, то повышение фагоцитарной активности нейтрофилов в период беременности может иметь фатальные последствия для развития плода, поскольку выявлено, что активация нейтрофилов крови при беременности наблюдается при патологических состояниях [5]. Таким образом, можно предположить, что кисспептин является одним из факторов, который блокирует воспалительную реакцию на протяжении всей беременности.

Таблица

Влияние кисспептина на фагоцитарную активность
(ИФА, %) нейтрофилов

Время	Контроль	Кисспептин 1,3 пМ/л	Кисспептин 4,6 пМ/л	Кисспептин 9,6 пМ/л
10 мин.	47,27 ± 1,24	38,62 ± 1,66*	49,59 ± 2,25	50,74 ± 3,23
15 мин.	58,11 ± 1,79	43,48 ± 2,72*	56,18 ± 0,69	57,02 ± 0,71
20 мин.	62,02 ± 1,21	41,62 ± 2,32*	55,89 ± 1,80*	56,25 ± 1,96*
25 мин.	78,71 ± 1,77	51,52 ± 3,19*	66,73 ± 1,66*	66,31 ± 1,40*
30 мин.	80,14 ± 2,04	52,84 ± 1,55*	65,38 ± 1,89*	66,39 ± 2,21*

«Работа выполнена в рамках государственного задания номер госрегистрации темы: 01201353248»

Библиографический список

1. Dhillon W.S. Kisspeptin: a novel regulator of reproductive function // J. of Neuroendocrinol. 2008. V. 8. P. 963-970.

2. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54 / Kotani M., Detheux M., Vandenbogaerde A., Communi D. et al. // J. Biol. Chem. 2001. V. 37. P. 34631-34636.

3. Dramatic elevation of plasma metastin concentrations in human pregnancy: metastin as a novel placenta-derived hormone in humans / Horikoshi Y., Matsumoto H., Takatsu Y., Ohtaki T. et al. // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2003. V. 2. P. 914-919.

4. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1 / Muir A.I., Chamberlain L., Elshourbagy N.A., Michalovich D.J. et al. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. 28969–28975.

5. Study on nonspecific immunity in pregnant women: increased chemiluminescence response of peripheral blood phagocytes / Shibuya T, Izuchi K, Kuroiwa A., Okabe N. et al. // Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol. 1991. V. 26. P.76-81.

6. Horikoshi Y., Matsumoto H., Takatsu Y. et al. // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2003. V.2. P. 914-919.

7. Сенсорные биолуминесцентные системы на основе lux-оперонов разных видов люминесцентных бактерий / Данилов В.С., Зарубина А.П., Ерошников Г.Е., Соловьева Л.Н. и др. // Вестник Московского Университета. 2002. Серия 16, Биология, Т.3. С.20-24.

8. Способ определения фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови человека по степени гашения биолуминесценции / Ширшев С. В., Куклина Е. М., Заморина С. А., Никитина Н.М. и др. // Патент РФ. № 2292553. 2007.

ИЗМЕНЕНИЕ ОСМОТИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ИМПЛАНТАЦИИ ОБРАЗЦОВ ПОЛИУРЕТАНА

Гущин Максим Олегович, Карпунина Тамара Исаковна, Годовалов
Анатолий Петрович, Проскурнова Юлия Николаевна

*ФГБОУ ВО Пермский государственный медицинский университет
имени академика Е. А. Вагнера, г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: осмотическая резистентность эритроцитов, полиуретан, имплантация.

Полиуретаны – «изоцианатные полимеры» – это группа высокомолекулярных соединений, содержащих значительное количество уретановых, амидных, мочевиновых, эфирных групп, а также ароматических и алифатических радикалов [1]. Эти материалы широко используются в различных отраслях медицины, таких как стоматология, травматология, ортопедия, сердечно-сосудистая, пластическая и общая хирургия. Из них изготавливаются катетеры, трубки общего назначения, раневые повязки, имплантаты короткого и пролонгированного действия и многое другое.

Цель исследования - изучить изменение осмотической резистентности эритроцитов (ОРЭ) под влиянием образцов полиуретана, имплантируемых в брюшную полость белых крыс.

Синтез полиуретана и последующая модификация поверхности осуществлены сотрудниками Лаборатории структурно-химической модификации полимеров ИТХ УрО РАН (г. Пермь) под руководством к.х.н. Якушевой Д.Э. Получены 3 типа образцов полиуретана, из которых два подверглись модификации. Поверхность экземпляров №2 модифицировали ионно-лучевой обработкой (ИЛО). Экземпляры №3 выдерживали в растворе 1,6-диизоцианата, ацетона и аминопропанол. В работе использовали образцы одинаковой формы и размера (1 см).

Эксперимент выполнен на лабораторных беспородных белых крысах самцах массой от 176 до 183 г. Образцы полиуретана имплантировали в брюшную полость животных. До имплантации и спустя 14 дней после неё забирали кровь из хвостовой вены для изучения ОРЭ. Эритроциты – легкодоступные тест-объекты, мембраны которых наиболее чувствительны к повреждающим факторам. При определении ОРЭ был взят за основу метод Идельсона. Для сравнения

ОРЭ оценивали в изотоничных и гипотоничных условиях. Эритроциты трехкратно отмывали физиологическим раствором путем центрифугирования при 1500 об/мин (до появления бесцветной надосадочной жидкости). Полученную взвесь вносили в микропробирки, куда добавляли растворы *NaCl* (0,0; 0,45 и 0,9%), и центрифугировали 10 минут при 2000 об/мин. Надосадочную жидкость помещали в плоскодонный планшет и измеряли интенсивность гемолиза при помощи фотометра PowerWaveX при длине волны 405 нм, т.к. в видимой области спектра поглощения гемоглобина наиболее интенсивная полоса присутствует в области 400–430 нм [2].

Через 14 дней после введения всех типов полиуретана в брюшную полость крысам выявлено значимое увеличение ОРЭ (табл.1), причем модифицированные образцы оказывали более заметное действие ($p < 0,05$).

Ранее нами было установлено, что при концентрации 0,45% хлорида натрия зависимость ОРЭ от других повреждающих факторов проявляется более четко [2]. Именно при таком содержании *NaCl* прослежено разнонаправленное воздействие различных способов обработки полимеров (Таблица).

Таблица

Осмотическая резистентность эритроцитов периферической крови крыс при имплантации образцов полиуретана

Условия эксперимента	Концентрация <i>NaCl</i> при определении ОРЭ, %		
	0	0,45	0,9
До имплантации	4,04±0,09	2,46±0,19	0,28±0,03
Через 14 дней:			
Образцы №1	3,12±0,24 [#]	0,73±0,10 [#]	0,38±0,10
Образцы №2	2,33±0,31 ^{а, #}	0,61±0,13 [#]	0,10±0,01 ^{а, #}
Образцы №3	2,65±0,21	0,94±0,15	0,15±0,02 ^{а, #}

Примечание: а - $p < 0,05$ при сравнении с ОРЭ крыс, которым имплантировали немодифицированные образцы; # - $p < 0,05$ при сравнении ОРЭ интактных крыс.

Судя по уровню ОРЭ, образцы полиуретана, модифицированные ИЛО, вызывали более выраженную ответную реакцию в организме экспериментальных животных по сравнению с немодифицированными. В то же время, более высокие показатели ОРЭ, ассоциированные с обработкой полиуретана вторым способом, косвенно указывают на минимизацию повреждающего эффекта исходного полимера. Повышение ОРЭ на 14 сутки у всех животных с имплантами в первую очередь может быть связано с накоплением в популяции более молодых и высоко резистентных эритроцитов в ответ на стресс, обусловленный механической травмой при введении в организм животного инородного тела [3]. Кроме этого, ряд цитокинов, образующихся при

взаимодействии полимера с иммунными клетками, могут оказывать влияние на костный мозг, увеличивая число юных форм. Первый способ модификации, очевидно, вызывал более значительную ответную реакцию, чем второй, о чем свидетельствует сравнительный анализ с воздействием немодифицированного образца.

Таким образом, имплантация образцов из полиуретана приводит к увеличению ОРЭ, что, скорее всего, опосредовано действием полимера на синтез цитокинов и гормонов стресса. Тест-объекты, модифицированные ИЛО, обуславливают более значительный эффект.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №17-43-90904p_a и Администрации Пермского края.

Библиографический список

1. Насырова Ю.М. Получение полиуретана неизоцинатным путем // Инновационная наука в глобализующемся мире. – 2017. – № 1 (4). – С. 65-68.

2. Гушин М.О., Проскурнова Ю.Н. О повреждающем действии полиуретана на красные кровяные тельца // Университетская наука: взгляд в будущее. – 2018. – Т.1. – С. 129-133.

3. Михайлис А.А. Концептуальная модель стресс-индуцированной динамики кислотно-гемолитической стойкости эритроцитов // Современные наукоемкие технологии. – 2010. – №10. – С.19-23.

ПРОАПОПТОПИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКИХ А-СЕКОТРИТЕРПЕНОИДОВ

Ерошенко Дарья Владимировна, Конышева Анастасия Владимировна,
Крайнова Гульназ Фаизовна, Толмачева Ирина Анатольевна,
Гришко Виктория Викторовна

*«Институт технической химии УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН,
г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: тритерпеноиды, цитотоксичность, апоптоз, клеточный цикл

В настоящее время на фармацевтическом рынке широко представлены противоопухолевые препараты, действующее вещество которых получено на основе природных соединений. Недавно нами описан синтез 2,3-секолупанового бромзамещенного метилкетона **1** [1],

последующая функционализация которого привела к β -кетозэфиру уксусной кислоты **2** [2].

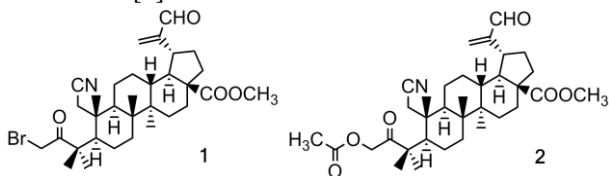


Рис. 1 . Структура соединений **1 и **2****

Цель настоящего исследования – сравнительная оценка проапоптотического потенциала А-секотритерпеноидов **1** и **2**. Цитотоксическую активность соединений определяли с помощью МТТ-теста в отношении линий опухолевых клеток человека: карциномы гортани НЕР-2, колоректальной карциномы НСТ 116, меланомы MS, рабдомиосаркомы RD TE32, немелкоклеточной карциномы легкого A549 и аденокарциномы молочной железы MCF7. Значение среднеэффективной ингибирующей концентрации (IC_{50}), вызывающей гибель 50% клеток в культуре, рассчитывали по кривой доза-эффект с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 6.0.

Как видно из таблицы, селективная модификация С31 атома А-секотритерпеноида **1** оказывает прямое влияние на цитотоксические свойства: замещение атома Вг сложноэфирным фрагментом приводит к увеличению целевой активности полученного продукта **2** в отношении клеток НСТ 116 и A549, в условиях сохранения целевых свойств в отношении клеток MS, RD TE32. При этом в случае соединения **1** как наиболее чувствительная выступает линия MS (IC_{50} 3,41 мкМ), тогда как соединение **2** активнее в отношении клеток НСТ 116 (IC_{50} 3,07 мкМ). В целом, соединение **2** более эффективно ингибирует пролиферацию тестируемых клеточных линий.

В дальнейших экспериментах в качестве модельной использовали линию НСТ 116. При изучении динамики гибели клеток НСТ 116 под действием соединений **1** и **2** в концентрации равной IC_{50} выявлено, что количество живых клеток существенно снижается после 18 ч инкубации (Рис. 2 А). Для оценки проапоптотического эффекта клетки НСТ 116 обрабатывали соединениями **1** и **2** в концентрации IC_{50} в течение 18 ч, затем плавающие и прикрепленные клетки отбирали и окрашивали набором Annexin A5 FITC/7-AAD (Beckman Coulter, Франция), оценивая распределение клеток по группам с помощью проточной цитометрии. Обработка клеток соединениями **1** и **2** приводила к увеличению ранней апоптотической популяции клеток и существенному снижению процента жизнеспособных клеток (Рис. 2 Б).

Таблица

Цитотоксическая активность соединений **1** и **2** в отношении
опухолевых клеточных линий человека

Клеточная линия	IC ₅₀ , мкМ		
	1	2	CPT
HEp-2	5,28±0,90	12,18±1,95	3,01±0,17
HCT 116	10,35±0,73	3,07±1,00	1,88±0,09
MS	3,41±0,31	3,61±0,76	0,77±0,34
RD TE32	3,84±0,74	3,50±1,22	1,72±0,37
A549	25,44±1,66	10,16±3,48	1,31±0,03
MCF7	6,34±1,02	9,68±0,75	0,04±0,01

Кроме того, анализ клеточного цикла культуры HCT 116 после 18 ч обработки соединением **2** выявил, что β-кетозфир **2** вызывает достоверное увеличение субпопуляции клеток с уменьшенным содержанием ДНК (sub-G₀). Данный факт также подтверждает индукцию апоптоза в клетках HCT 116 под действием соединения **2**.

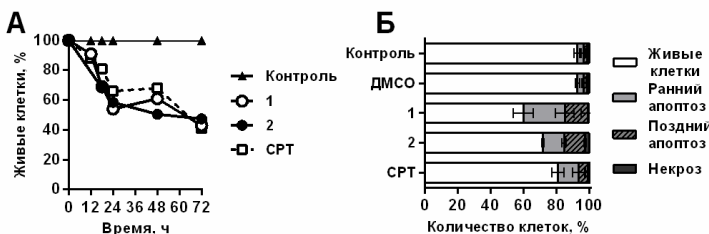


Рис. 2. Действие соединений **1** и **2** на клетки HCT 116: А) Динамика гибели клеток HCT 116 под действием соединений **1** и **2**; Б) Изменение количества живых, ранних и поздних апоптотических и некротических клеток в культуре HCT 116 после 18 ч обработки соединениями **1** и **2**

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о высокой цитотоксической активности синтезированных соединений и о перспективности их дальнейшего изучения.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 16-13-10245.

Библиографический список

1 Konyseva, A.V. Synthesis of cytotoxically active derivatives based on alkylated 2,3-seco-triterpenoids / A.V Konyseva, V.O. Nebogatikov, I.A. Tolmacheva, M.V. Dmitriev, V.V. Grishko // Eur. J. Med. Chem. – 2017. – Vol. 140. – P. 74-83.

2 Eroshenko, D.V. Synthesis, modification, and cytotoxic evaluation of 2,3-secotriterpenic β-ketoesters / D.V. Eroshenko, G.F. Krainova, A.V. Konyseva, M.V. Dmitriev, V.V. Grishko // Bioorg. Med. Chem. Lett. (in press).

ИЗУЧЕНИЕ АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА В КАЧЕСТВЕ РЕГУЛЯТОРА ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ СУБПОПУЛЯЦИИ Т-ХЕЛПЕРОВ (Th17)

Заморина С.А.^{1,3}, Тимганова В.П.¹, Литвинова Л.С.², Тодосенко Н.М.²,
Храмцов П.В.^{1,3}, Раев М.Б.^{1,3}, Бочкова М.С.¹, Шадрина К.С.³,
Черешнев В.А.^{1,3}

*¹«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» - филиал
ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия*

*²«Балтийский федеральный университет им. И. Канта»,
г. Калининград, Россия*

*³ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный
исследовательский университет, г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: АФП, цитокиновый профиль, мастер-регулятор ROR- γ t, интерлейкин-17, Т-хелперы, воспаление

Во время беременности иммунная система матери подвергается аллоиммунизации фетоплацентарными антигенами. В результате формируется динамическое состояние иммунной толерантности, в поддержании которого важную роль играют белки, ассоциированные с беременностью. АФП представляет собой гликопротеин (3-5% углеводов) с M_r 68-75 kDa, который синтезируется в период раннего развития эмбриона в желточном мешке, а затем в печени и желудочно-кишечном тракте плода. Во время беременности его уровень растет, достигая в крови беременных значений 150-250 МЕ/мл, после родов его уровень резко снижается [1]. АФП способен проникать через фетоплацентарный барьер в материнский кровоток, при этом часть его становится так называемым трансформированным АФП (tAFP). В сыворотке беременных женщин идентифицированы и полноразмерный АФП, и tAFP. Незвизирая на то, что иммуносупрессивные эффекты АФП известны, его роль в формировании иммунной толерантности в период беременности остается мало изученной [2]. В частности, роль АФП в регуляции функций и дифференцировки провоспалительной субпопуляции Th17 остается не исследованной. Известно, что нормальная беременность сопровождается снижением количества этих клеток, в то время как их повышение ассоциировано с патологическими процессами.

© Заморина С.А., Тимганова В.П., Литвинова Л.С., Тодосенко Н.М.,
Храмцов П.В., Раев М.Б., Бочкова М.С., Шадрина К.С.,
Черешнев В.А., 2018

Целью работы являлась оценка влияния АФП на дифференцировку и цитокиновый профиль Т-хелперов, индуцированных в фенотип Th17.

На исследование получено разрешение этического комитета ИЭГМ УрО РАН (IRB00010009) от 12.06.2016. Полученные методом иммуномагнитной сепарации CD4⁺ клетки (1x10⁶кл/мл) культивировали в ППС 48-луночных планшетах в течение 72 ч при 37⁰С, и 5% CO₂. Для индукции лимфоцитов в фенотип Th17 в культуры вносили рекомбинантные цитокины IL-1 β и IL-6 (по 10 нг/мл, здесь и далее все реаكتивы «Miltenyi Biotec», Германия). В работе использовали физиологические концентрации нативного АФП («Биалекса», Россия) 10, 50, 100 МЕ/мл. В качестве активатора Т-лимфоцитов использовали T-Cell Activation/Expansion Kit human. После 72 ч инкубации оценивали количество Th17 как процент CD4⁺-лимфоцитов, экспрессирующих транскрипционный фактор ROR- γ t (Clone REA278, PE). Измерения проводили на проточном цитофлуориметре «CytoFLEX» («Beckman Coulter», США). В супернатантах культур CD4⁺-лимфоцитов, индуцированных в фенотип Th17, определяли содержание 15 цитокинов и хемокинов: IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-17, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , MCP-1, MIP-1 α , TNF- α . Процедуры осуществляли согласно протоколу «Bio-Plex Pro Human Th17 Cytokine Panel». Результаты регистрировали с помощью автоматического фотометра для микропланшет Bio-Plex (Bio-Plex® 200 Systems, «Bio-Rad», США) и программы Bio-Plex Manager («Bio-Rad»).

Основным транскрипционным фактором Th17 является ROR- γ t (RORC2) (retinoid orphan nuclear receptor). IL -17, являясь основным цитокином Th17, вызывает синтез IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8 и ряда других воспалительных факторов. Таким образом, IL-17 участвует в развитии аутоиммунных заболеваний и остром отторжении трансплантата. Известно, что физиологическая беременность сопровождается снижением Th17 в периферической крови в сравнении с небеременными женщинами. Повышение уровня Th17 может вести к преждевременным родам или спонтанному аборту [3].

При изучении роли АФП в регуляции дифференцировки Th17, было показано, что белок не влиял на уровень экспрессии ROR- γ t в CD4⁺-клетках. При анализе цитокинового профиля было установлено, что АФП не влиял на IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-17, IFN- γ , MCP-1, MIP-1 α , TNF- α . Однако, показано, что АФП в концентрациях 50 и 100 МЕ/мл стимулировал продукцию IL-2 активированными Т-хелперами. Помимо этого, низкая концентрация АФП (10 МЕ/мл) снижала продукцию колониестимулирующих факторов G-CSF и GM-CSF.

Таким образом, в используемой экспериментальной модели не выявлено эффектов АФП на дифференцировку Th17 и продукцию этими клетками провоспалительных цитокинов. По-видимому, на снижение уровня Th17 во время нормальной беременности оказывают влияние другие факторы. Тем не менее, АФП повышал продукцию IL-2 активированными Т-хелперами, а известно, что этот цитокин необходим для развития Т-регуляторных лимфоцитов, увеличение количества которых ассоциировано с успешной беременностью [2]. В целом, полученные данные расширяют представления о роли АФП в формировании иммунной толерантности во время беременности.

Исследование поддержано грантом РФФИ 16-44-590971 и программой повышения конкурентноспособности («дорожной карты») и субсидии «Организация проведения научных исследований 20.4986.2017/ВУ» БФУ им. И. Канта.

Библиографический список

1. Terentiev A.A., Moldogazieva N.T. Alpha-fetoprotein: A renaissance // Tumor Biol. 2013. V. 34, P. 2075-2091.
2. Schumacher A., Costa S.D., Zenclussen A.C. Endocrine factors modulating immune responses in pregnancy // Front. Immunol. 2014. doi: 10.3389/fimmu.2014.00196
3. Saito S., Nakashima A., Shima T., Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy // Am. J. Reprod. Immunol. 2010. V. 63. P.601–610.

МИЕЛОПЕПТИДЫ В РЕГУЛЯЦИЯ ФУНКЦИЙ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГОВ ПРИ СТРЕССЕ

Кадочникова Яна Алексеевна¹, Гейн Оксана Николаевна³, Гейн Сергей Владимирович^{1,2}, Гаврилова Татьяна Валерьевна⁴

¹ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия

²«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» - филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия

³ФГБОУ ВО Пермская государственная фармацевтическая академия МЗ РФ, г. Пермь, Россия

⁴ФГБОУ ВО Пермский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Пермь, Россия

Ключевые слова: миелопептиды, антителообразование, цитокины, стресс, макрофаги

Миелопептиды представляют собой группу короткоцепочных биорегуляторных пептидов костномозгового происхождения, обладающих иммунорегуляторной активностью в отношении клеток как адаптивного, так и врожденного иммунитета. В настоящее время описано шесть отдельных фракций (МП-1, МП-2, МП-3, МП-4, МП-5, МП-6), первоначально выделенных из супернатантов культур клеток костного мозга, которые отличаются друг от друга по аминокислотному составу, направленности действия и точкам приложения [1].

Цель настоящей работы - исследовать влияние миелопептидов МП-5 и МП-6 на количество антителообразующих клеток в селезенке, продукцию активных форм кислорода, IL-1 β и IL-10 перитонеальными макрофагами мышей на фоне 6 ч иммобилизационного стресса.

Эксперименты в системе *in vivo* выполнены на 24 мышцах-самцах породы Swiss, массой 17-22г. В качестве стрессорного воздействия использовался 6 ч иммобилизационный стресс. МП-5 или МП-6 вводили внутрибрюшинно за 30 минут до начала стресса в дозе 40 мкг/кг. Животные были разделены на 4 группы: 1 – контрольная; 2 – стресс; 3 – стресс+МП-5 или МП-6; 4 – введение МП-5 или МП-6. Одну половину животных после окончания стрессорного воздействия иммунизировали ЭБ внутрибрюшинно однократно (10^8 клеток в 0,2 мл 0,9% NaCl). На 5-е сутки оценивали клеточность и количество антителообразующих клеток (АОК) в селезенке методом локального гемолиза в геле агарозы по Jerne [2]. Вторую половину животных после окончания стрессорного воздействия животных выводили из эксперимента методом декапитации под эфирным наркозом. Для получения перитонеальных макрофагов животным внутрибрюшинно вводили 2 мл раствора Хэнкса с добавлением гепарина 20 ед/мл и ЭТС (эмбриональная телячья сыворотка) 50 мкл/мл. Оценку продукции активных форм кислорода перитонеальными клетками производили с помощью реакции люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ). Реакцию проводили в 96-луночных плоскодонных планшетах ("Greiner", Германия), каждая лунка содержала клетки в концентрации $2 \cdot 10^5$ клеток/0,2 мл р-ра Хенкса. В качестве индуктора ЛЗХЛ использовали опсонизированный зимозан в концентрации 150 мкг/мл. В качестве маркера выраженности реакции ЛЗХЛ использовался люминол 10^{-5} М. Регистрация результатов велась в течение часа с интервалом в 5 минут с помощью многофункционального спектрофотометра ("Tecan Trading AG", Швейцария).

Для оценки продукции цитокинов перитонеальные макрофаги культивировали в 24-луночных планшетах ("Costar", США) 10^6 клеток в 1 мл полной культуральной среды, которую готовили *ex tempore* на основе среды RPMI 1640 (Gibco), с добавлением 10 mM HEPES (Sigma), 2 mM L-глутамин ("Sigma-Aldrich"), 100 мкг/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 10% ЭТС ("Биолот", Россия). В качестве

индуктора продукции провоспалительных цитокинов использовали опсонизированный зимозан в концентрации 150 мкг/мл. Супернатанты 24-часовых культур собирали, замораживали и хранили при - 20°C. Количественное определение IL-1 β и IL-10 проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью наборов ("R&D", США) согласно методике, предложенной производителем.

Статистический анализ проводили с помощью непарного t-критерия Стьюдента.

Установлено, что интенсивность спонтанной продукции активных форм кислорода при 6 ч иммобилизации статистически значимо не изменялась. Эффектов МП-5, МП-6 через 6 ч после введения на спонтанную продукцию АФК по сравнению с контролем не зарегистрировано (данные не приводятся). Стимулированная зимозаном продукция АФК при стрессе угнеталась по сравнению с животными контрольной группы практически в течение всего периода наблюдений. Изолированное введение как МП-5, так и МП-6 выражено усиливало продукцию АФК перитонеальными макрофагами. Введение животным МП-5 и МП-6 на фоне стресса отменяло стрессиндуцированное угнетение продукции АФК. Шестичасовой иммобилизационный стресс не приводил к изменениям продукции IL-1 β и IL-10. Введение на фоне стресса миелопептидов также не изменяло продукцию IL-1 β и IL-10. Однако через 6 ч после изолированного введения миелопептидов отмечена стимуляция спонтанной и стимулированной продукции IL-1 β под воздействием МП-5, и активация стимулированной продукции данного цитокина под воздействием МП-6. Статистически значимых изменений продукции IL-10 выявлено не было. Введение МП-5 и МП-6 на количество АОК показало отмену стрессиндуцированного угнетения абсолютного количества антителообразующих клеток.

Таким образом, МП-5 и МП-6 через 6 ч после введения стимулировали продукцию АФК и продукцию IL-1 β перитонеальными макрофагами. Миелопептиды нивелировали угнетающее влияние 6 ч иммобилизационного стресса на индуцированную зимозаном продукцию АФК макрофагами перитонеальной полости и образование АОК в селезенке. Ранее было показано, что миелопептиды МП-5 и МП-6 способны модулировать продукцию АФК и цитокинов при более коротком двухчасовом иммобилизационном стрессе [3]. Выраженное модулирующее действие на стрессиндуцированное изменение показателей иммунной системы оказывал и МП-3 [4]. Полученные данные указывают на однонаправленное действие миелопептидов (МП-3, МП-5 и МП-6). Возможно, схожесть эффектов данных миелопептидов обусловлена их общими мишенями и механизмами иммунорегуляторного действия.

Таким образом, полученные нами данные указывают на перспективность исследования иммуномодулирующих свойств миелопептидов МП-5 и МП-6 и механизмов их действия.

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-44-590156-р-а.

Библиографический список

1. Mikhailova A., Fonina L., Kirilina E. et al. // Regulatory Peptides, 1994, 53, 203–209.
2. Jerne N.K., Nordin A.A. // Science. 1963. V. 140, N 3365. P. 405–405.
3. Гейн С.В., Гаврилова Т.В., Журавлёва Л.С. и др. // Доклады Академии наук, 2014, 455(2), 232–234.
4. Гейн С.В., Гаврилова Т.В., Гейн О. Н. и др. // Доклады Академии наук, 2017, 475(6), 710–713.

КОЛОНИЗАЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ УРОПАТОГЕННЫХ *ESCHERICHIA COLI* В ПОЛИМИКРОБНЫХ АССОЦИАЦИЯХ

Каримова Нина Вячеславовна, Гизатуллина Юлия Сагитовна, Демаков
Виталий Алексеевич

*«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» - филиал
ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: уропатогенные *Escherichia coli* (UPEC), биопленки, смешанная инфекция

Проблема инфекций мочевыводящих путей актуальна для современной медицины. Большинство из них вызвано полимикробными ассоциациями бактерий, основной представитель которых – *Escherichia coli* (до 90%). Часто обнаруживаются также *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* [1]. Ранее было показано, что жизнеспособность клеток и массивность биопленок уропатогенной *E. coli* (UPEC) на абиотических поверхностях различаются [2].

Цель исследования – изучить жизнеспособность и биопленкообразование уропатогенной *E. coli* в полимикробных ассоциациях.

В работе были использованы уропатогенные штаммы *E. coli* Amp^r, выделенные от пациентов с инфекциями мочевыводящих путей (n=6), коллекционные штаммы *E. coli* K12 TG1 lux+, *K. pneumoniae* ATCC 700693 и *E. faecalis* ATCC 23212. Для экспериментов были выбраны следующие модели: монокультура *E. coli*, *K. pneumoniae*,

E. faecalis и их ассоциации. Биопленки формировали в плоскодонных иммунологических 96-луночных планшетах («Медполимер», Россия) и на фрагментах урологических катетеров из латекса и силикона («Арехмед International BV», Нидерланды) в течение 24 часов. Оценку числа жизнеспособных клеток проводили методом подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ) на селективных средах. Биомассу биопленок оценивали согласно J.H. Merritt et al. [3]. Гидрофобность поверхности определяли по тесту с нафталином [4].

Предварительное моделирование микробных ассоциаций на полистироле выявило следующие особенности. Количество Me[Q1-Q3] жизнеспособных клеток *E. coli* в обоих вариантах – *E. coli*+*K. pneumoniae* и *E. coli*+ *E. faecalis* – статистически значимо не отличалось от моноварианта: 1,81E+07 [1,71E+06-7,13E+07] и 5,58E+06 [2,86E+06-6,89E+06] против 8,30E+06 [4,79E+06-9,78E+06]. При этом, в модели *E. coli*+*K. pneumoniae* достоверно выше было число клеток клебсиеллы (*W*-test: $p=0,027$), тогда как в биопленке с энтерококком различий между представителями двух видов по данному показателю не выявлено. Коэффициент корреляции между числом жизнеспособных клеток *E. coli* в моно- и смешанной культуре с *K. pneumoniae* и *E. faecalis* составил 0,223 и 0,431, что свидетельствует о небольшой роли эшерихий в первой ассоциации и более значимом вкладе во вторую. Массивность биопленки, образованной ассоциацией *E. coli*+*K. pneumoniae*, была выше, чем у монокультуры кишечной палочки (*W*-test: $p=0,046$), но меньше по сравнению с моновидовой биопленкой *K. pneumoniae*. Совместный рост *E. coli* с *E. faecalis* не имел существенных преимуществ для биопленкообразования.

Следует отметить, что показатель pH среды, где формировались биопленки, в ассоциациях смещался в щелочную сторону до 8,5 – с *K. pneumoniae* и 8,4 – с *E. faecalis*, по сравнению с моновариантом (pH 7,5). При нейтральной реакции среды мокультура *E. coli* имела более высокую биопленкообразующую способность, чем при pH 8,0 [2], в ассоциациях, наоборот, массивность биопленки была выше или имела тенденцию к увеличению в щелочных значениях.

На поверхности латекса и силикона число жизнеспособных клеток *E. coli* в смешанных и моновидовой культуре также не различалось. Кроме того, в обеих ассоциациях, число эшерихий в биопленках, сформированных на поверхности двух катетеров, оказалось сопоставимым, тогда как в моновидовой биопленке число клеток на силиконе было выше, чем на латексе. В модели с *K. pneumoniae* количество бактерий обоих видов было сопоставимо, с *E. faecalis* – последний оказался не конкурентоспособным при совместном росте на поверхности латексного катетера. Биомасса биопленки на обоих катетерах не различалась между моновидовым и смешанным вариантам. При этом в ассоциациях данный показатель был

выше на латексе, чем на силиконе (0,393[0,362-0,496] vs 0,110[0,077-0,110] в модели с *K. pneumoniae* и 0,394[0,342-0,442] vs 0,137[0,111-0,141] – с *E. faecalis*), что связано с более высоким показателем гидрофобности латексного катетера по сравнению с силиконовым (20 мкг/мл vs 11,26 мкг/мл).

Колонизационная активность *E. coli* на различных абиотических поверхностях в составе изученных микробных ассоциаций сохраняется на высоком уровне: бактерии оказались конкурентоспособными в модели как с грамположительным, так и с грамотрицательным микроорганизмами. Более массивные биопленки, образованные несколькими видами бактерий, обеспечивают защиту клеток эшерихий в условиях щелочной среды.

Работа выполнена в рамках государственного задания ГР № 01201353249.

Библиографический список

1. Nicolle L.E. Catheter associated urinary tract infections. Antimicrob Resist Inf Control. 2014. V. 3(23). P. 1-8.

2. Гизатуллина Ю.С., Кузнецова М.В. Формирование биопленок уропатогенными штаммами *Escherichia coli* на различных абиотических поверхностях // Вестник Пермского Университета. 2017. № 2. С. 185-192.

3. Merritt J. H., Kadouri D.E., O'Toole G.A. Growing and Analyzing Static Biofilm // Curr Protoc Microbiol. 2005. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4568995/>

4. Приготовление и исследование нанопористых углеродных носителей на катализаторе Ni/сибунит / Коваленко Г.А. [и др.]. Кинетика и катализ. 2009. Т. 50, № 4. С. 618-626.

МОДЕЛЬ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА ИЗ ОБРАБОТАННОГО ПОЛИУРЕТАНА МЕТОДОМ ПЛАЗМЕННО-ИММЕРСИОННОЙ ИОННОЙ ИМПЛАНТАЦИИ

Комар Людмила Андреевна

ИМСС УрО РАН, г. Пермь, Россия

Ключевые слова: диффузия, полимер, лекарство, химический потенциал

В работе рассматривается одна из проблем, представляющих интерес в ортопедической хирургии, связанная с использованием

имплантатов, содержащих лекарственные препараты. Имплантат, помещенный в организм пациента должен равномерно выделять лекарственный препарат для снижения воспалительных процессов в близкорасположенных тканях в послеоперационный период. Важно отметить следующее. Выход лекарственного препарата будет неравномерным, если он пойдет по классическим законам диффузии, по закону Фика и классическим для диффузионных процессов граничным условиям. Изменить ситуацию может создание слоев со специфическими условиями для прохождения выделяющегося вещества. Создать специальные условия можно с помощью слоя другого материала на границе имплантата, например, карбонизированного нанослоя, получаемого на полимерном материале с помощью обработки поверхности методом плазменно–иммерсионной ионной имплантации (ПИИИ) [1]. В зависимости от способа обработки может изменяться толщина слоя и количество в нем трещин, разрывов, через которые будут происходить массообменные процессы [2].

Для простоты проведения численных расчетов в данной работе предполагается, что трещины в карбонизированном слое располагаются параллельно друг другу в периодическом порядке. В этом случае задача может быть приведена к двумерной постановке.

Используемая в работе математическая модель основана на теории смеси взаимопроникающих континуумов. Полагается, что в каждой точке пространства находятся элементы любого из этих континуумов. Движение каждого из континуумов осуществляется в соответствии с уравнениями движения, неразрывности. При этом континуумы активно взаимодействуют друг с другом. Для описания высвобождения лекарства использовался закон сохранения массы, преобразованный к следующему уравнению диффузии

$$\frac{\partial \rho_1^0}{\partial t} + \overset{0}{\nabla} \cdot \left[-\rho_1^0 \mathbf{F}^{-1} \cdot \mathbf{F}^{-T} \cdot \frac{a_1 \rho_1^0}{m_1^0 J} \cdot \overset{0}{\nabla} \mu_1 \right] = 0, \quad (1)$$

где ρ_1^0 – объемная плотность жидкой компоненты смеси (лекарства) в точках, двигающихся вместе с полиуретановой компонентой смеси (масса отнесенная к объему в момент времени t); $\mathbf{F}$ – градиент деформации; $\overset{0}{\nabla} \dots$ – оператор набла, определяемый с помощью базисных векторов прямоугольной декартовой системы координат и координат точки рассматриваемой части смеси в начальный момент времени x_i^0 ; μ_1 – химический потенциал жидкой компоненты смеси; m_1^0 – масса одного моля жидкого континуума; a_1 – функция параметров состояния; J – относительное изменение объема.

Для упрощения математических выкладок, предположим, что лекарственного средства в пленке содержится небольшое количество, и изменением объема пленки при высвобождении лекарства можно пренебречь. В этом случае, деформационный градиент будет представлять собой единичный тензор и дифференциальное уравнение (1) приобретет новый вид

$$\frac{\partial \rho_1^0}{\partial t} - \sum_{i=1}^2 \frac{\partial}{\partial x_i^0} \left[\frac{a_1}{m_1^0} (\rho_1^0)^2 \frac{\partial \mu_1}{\partial \rho_1^0} \frac{\partial \rho_1^0}{\partial x_i^0} \right] = 0.$$

Результаты численного эксперимента показали, что равномерность выхода достигается при увеличении доли карбонизированной поверхности материала. Например, выход лекарства через трещину шириной 5 нанометров близок к равномерному закону при равенстве величине 0.001 отношения ширины трещины к ширине карбонизированного слоя (рис., нижняя линия). Однако, при этом начальная объемная доля лекарства должна была увеличена в 1.27 по сравнению с начальной объемной долей лекарства в необработанном полиуретане. Следует заметить, что применение построенной модели к описанию высвобождения лекарственного препарата из необработанной полиуретановой пленки демонстрирует неравномерность этого процесса (рис., верхняя линия).

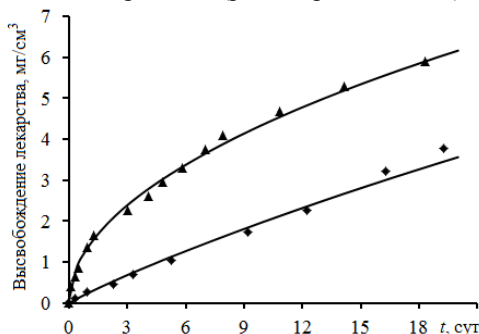


Рисунок. Выход лекарственного средства через единицу объема полиуретановой пленки. Верхняя линия соответствует выходу лекарства из необработанной пленки, нижняя — полиуретану, обработанному методом ПИИИ. Маркерами показаны значения экспериментальных данных

Работа выполнена при поддержке РФФИ в рамках проекта № 16-08-00910_а.

Библиографический список

1. Kondyurin A.V., Maitz M.F., Romanova V.A., Begishev V.P., Kondyurina I.V., Guenzel R. Drug release form polyurethane coating modified by plasma immersion ion implantation. // Biomaterials Science. Polymer Edition. – 2004. – V.15. – P. 145–159.
2. Morozov I.A., Mamaev A.S., Osorgina I.V., Beliaev A.Y., Izumov R.I., Oschepkova T.E. Soft polyurethanes treated by plasma immersion ion implantation: structural-mechanical properties of surface modified layer // Applied Polymer Science. – 2017. – DOI:10.1002/app.45983.

СИНТЕЗ И ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ 3-ЭТИЛЗАМЕЩЕННЫХ 18 α H-ОЛЕАНАНОВЫХ ТРИТЕРПЕНОИДОВ

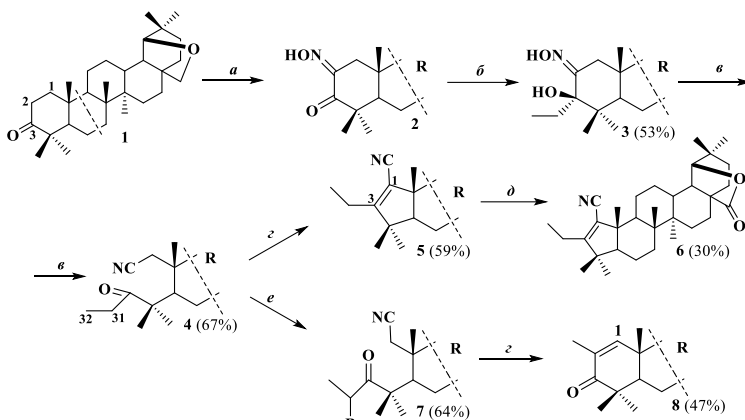
Коньшева Анастасия Владимировна, Жукова Анастасия Евгеньевна,
Гришко Виктория Викторовна

*«Институт технической химии УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН,
г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: тритерпеноиды, реакция Гриньяра, нитрил-анионная циклизация, цитотоксичность, МТТ тест

Перспективным подходом к синтезу новых биологически активных агентов и/или их интермедиатов служит восстановительное алкилирование тритерпеноидов. Так, С-3 алкилирование растительных метаболитов бетулина и бетулиновой кислоты в условиях реакции Гриньяра приводит к значительному повышению их антидиабетической и цитотоксической активности [1-3].

Согласно схеме 1, с использованием в качестве ключевой стадии восстановительного алкилирования по Гриньяру на основе доступного полусинтетического тритерпеноида аллобетулона синтезированы соответствующие 1-циано-2,3-секо-18 α H-олеанановые 3-этил-3-кетон **4** и его 31-монобромпроизводное **7**. Последующая внутримолекулярная циклизация 3-этил-3-кетона **4** в условиях основного катализа протекала по оксо-нитрильному пути с образованием C(1)-C(3) двойной связи в А-пентациклическом 1-циано-3-этил-1(3)-алкене **5**. Тогда как циклизация бром-замещенного 3-этил-3-кетона **7** в аналогичных условиях протекала по нитрил-анионному механизму с образованием C(1)-C(31) связи и сопровождалась отщеплением цианогруппы с формированием шестичленного α,β -ненасыщенного кетона **8**.



Реагенты и условия реакции:

(a) $C_5H_{11}ONO/t-BuOK/t-BuOH$; (b) $C_2H_5MgI / (C_2H_5)_2O$; (c) $SOCl_2/CH_2Cl_2$;
(d) $t-BuOK/t-BuOH$; (e) $K_2Cr_2O_7/H_2SO_4/CH_3COOH$; (f) $C_5H_6Br_3/NH_3COOH$.

Схема 1.

Скрининг цитотоксической активности синтезированных тритерпеноидов в отношении культур опухолевых клеток HEP-2, HCT116, MS, RD TE32, A549, MCF-7, PC3 проведен с помощью МТТ теста [4]. В качестве соединений с умеренной цитотоксичностью отобраны: 3 β -гидроксис-2-гидроксимино-3 α -этил-19 β ,28-эпоксис-18 α H-олеанан 3, активный в отношении клеток HEP-2 и MS (IC₅₀ 39 мкМ), а также 1-циано-3-этил-19 β ,28-эпоксис-2,3-секо-2-нор-18 α H-олеан-3-он 4 и 3-[1-бромэтил]-1-циано-19 β ,28-эпоксис-2,3-секо-2-нор-18 α H-олеан-3-он 7, цитотоксичные в отношении клеток MCF-7 (IC₅₀ 39 и 37 мкМ соответственно).

Работа выполнена при финансовой поддержке Комплексной программы УрО РАН (проект № 18-7-3-4) и гранта РФФИ № 16-03-00865.

Библиографический список

- Genet, C. Structure-activity relationship study of betulinic acid, a novel and selective TGR5 agonist, and its synthetic derivatives: potential impact in diabetes / C. Genet, A. Strehle, C. Schmidt, G. Boudjelal, A. Lobstein, K. Schoonjans, M. Souchet, J. Auwerx, R. Saladin, A. Wagner // J. Med. Chem. – 2010. – Vol. 53 – P. 178-190.
- Genet, C. Redefining the TGR5 Triterpenoid Binding Pocket at the C-3 Position / C. Genet, C. Schmidt, A. Strehle, K. Schoonjans, J. Auwerx, R. Saladin, A. Wagner // ChemMedChem – 2010. – Vol. 5. – P. 1983-1988.
- Csuk, R. Synthesis of antitumor-active betulinic acid-derived hydroxypropargylamines by copper-catalyzed mannich reactions / R. Csuk, C. Nitsche, R. Sczepek, S. Schwarz, B. Siewert // Arch. Pharm. (Weinheim). – 2013. – Vol. 346. – № 3. – P. 232-246.
- Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and

СИНТЕЗ, МОДИФИКАЦИЯ И ПРОТИВОВИРУСНЫЕ СВОЙСТВА 2,3-СЕКОТРИТЕРПЕНОВЫХ β-КЕТОЭФИРОВ

Крайнова Гульназ Фаизовна¹, Конышева Анастасия Владимировна¹,
Еремин Владимир Федорович², Бореко Евгений Иванович²,
Гришко Виктория Викторовна¹

¹«Институт технической химии УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН,
г. Пермь, Россия

²РНПЦ эпидемиологии и микробиологии Минздрава РБ, г. Минск,
Республика Беларусь

Ключевые слова: А-секотритерпеноиды, β-кетозфиры, вирусингибирующая и противовирусная активность

β-Кетозфиры широко используются в качестве биологически активных агентов или как ключевые интермедиаты в процессе их синтеза [1, 2].

Reagents and conditions:

- (a) $R^1-H / Et_3N / K_2CO_3 / (CH_3)_2CO$;
(b) $CH_3COOH / Et_3N / K_2CO_3 / (CH_3)_2CO$;
(c) $NaBH_4 / MeOH$; (d) KOH / C_2H_5OH .

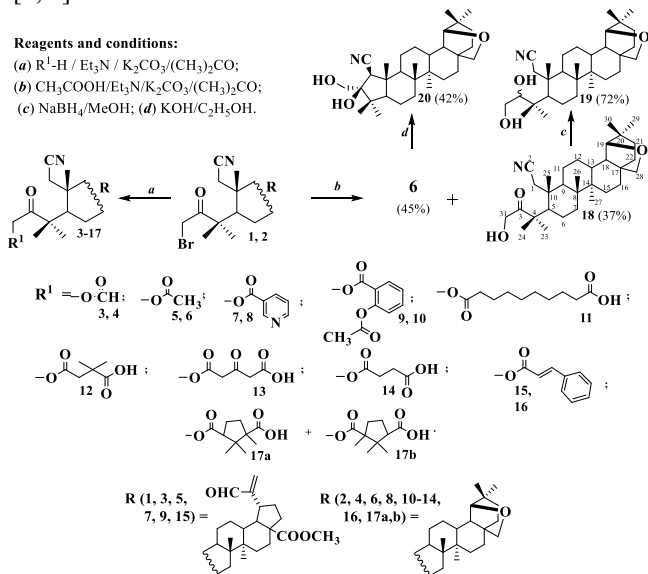
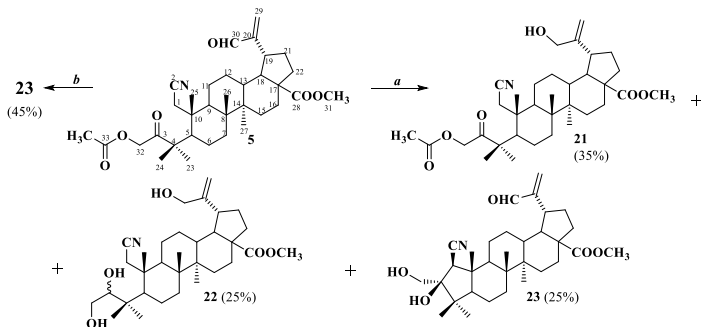


Схема 1.

Нами осуществлен синтез серии тритерпеновых β -кетозэфиров **3-17** на основе бромметилкетонов 2,3-секо-18 α H-олеананового и 2,3-секолупанового типов (схема 1). Исследована возможность модификации β -кетозэфиров в условиях восстановления или щелочного гидролиза на примере лупанового и олеананового производных с фрагментом уксусной кислоты **5**, **6** (схемы 1, 2).



Reagents and conditions: (a) $\text{NaBH}_4/\text{MeOH}$; (b) $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$.

Схема 2.

В результате оценки противовирусных свойств синтезированных β -кетозэфиров в отношении вирусов герпеса простого I и II типов (ВГП-1, ВГП-2) и ВИЧ-1 отобран 18 α H-олеанановый β -кетозэфир ацетилсалициловой кислоты **10**, сочетающий *in vitro* ингибирующую активность в отношении репродукции штаммов исследуемых вирусов и обладающий одновременно вирулицидными свойствами. Так, при относительно слабых ингибирующих свойствах соединения **10** в отношении ВИЧ-1 (15,5–154,8 мкМ) уровень его вирулицидных свойств в отношении данного вируса оказался высоким – показатель жизнеспособности клеток МТ-4 при 5–30 мин экспозиции составил $\geq 60\%$, $\text{ET}_{50} = 0,03$ мин, $\text{EC}_{50} < 154,8$ мкМ. Исследования в отношении вирусов ВГП-1 и ВГП-2 выявили сочетание высокой ингибирующей (таблица) и вирулицидной ($\text{ET}_{50} = 6,4$ мин, $\text{EC}_{50} < 1,6$ мкМ) активности β -кетозэфира **10** (Таблица).

Таблица

Вирусингибирующая активность соединения 10 в отношении репродукции вирусов герпеса простого I и II типов

Показатель	ВГП-1	ВГП-2
EC_{50} , мкМ	75,9 (82,8÷69,4)	69,5 (74,5÷64,9)
EC_{90} , мкМ	187,6 (205,3÷171,7)	125,9 (134,9÷117,7)
МПК/ EC_{50}	4,5	2,2
МПК/ EC_{90}	1,6	1,2

Работа выполнена при финансовой поддержке Правительства Пермского края в рамках научного проекта «МИГ» №С-26/056 и гранта РФФИ № 16-03-00865.

Библиографический список

1. Souza, G. Synthesis, characterization and *in vitro* anticancer activity of novel 8,4'-oxyneolignan analogues / G. Souza, G. Franchi Jr., A. Nowill, L. Santos, C. Alves, L. Barata, C. Andrade // J. Braz. Chem. Soc. – 2017. – Vol. 28. – P. 2229–2243.
2. Ragavan, R.V. β -Keto esters from ketones and ethyl chloroformate: a rapid, general, efficient synthesis of pyrazolones and their antimicrobial, *in silico* and *in vitro* cytotoxicity studies / R.V. Ragavan, K.M. Kumar, V. Vijayakumar, S. Sarveswari, S. Ramaiah, A. Anbarasu, S. Karthikeyan, P. Giridharan, N.S. Kumari // Org. Med. Chem. Lett. – 2013. – Vol. 3. – P. 6.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI*, ВЫЗЫВАЮЩИХ КОЛИБАКТЕРИОЗ У ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ

Кузнецова Марина Валентиновна¹, Масленникова Ирина Леонидовна¹,
Гизатуллина Юлия Сагитовна¹, Нестерова Лариса Юрьевна¹,
Predojevič Luka², Starčič Erjavec Marjanca²

¹«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия

²Люблянский университет, г. Любляна, Словения

Ключевые слова: avian pathogenic *Escherichia coli*, филогруппы, бактериоцины, антибиотикостойчивость, биопленки

Птичьи патогенные *Escherichia coli* (avian pathogenic *E. coli*, АРЕС) являются основной причиной колибактериоза бройлеров при их промышленном выращивании, что приводит к экономическим потерям в птицеводстве [1, 2]. Наличие сходных генов вирулентности, обнаруженных в штаммах ЕхРЕС и АРЕС, показало, что последние могут служить «резервуаром маркеров патогенности» и являться возбудителями антропозоонозов [3].

Цель работы – охарактеризовать биологические свойства штаммов *E. coli*, выделенных при системной коли-инфекции цыплят-бройлеров.

Штаммы *E. coli* изолировали из внутренних органов вынужденно убитой птицы в период 2016-18 гг. на крупном птицеводческом хозяйстве Пермского края. Все изоляты были идентифицированы согласно Приказу МЗ СССР №535 от 22.04.1985 г. Генотипирование осуществляли методом гер-ПЦР с праймерами ERIC 1/2. Филогенетическую принадлежность определяли методом мультиплексной ПЦР согласно O. Clermont et al. (2013). Скрининг культур на продукцию и чувствительность к бактериоцинам (14 колицинов и 6 микроцинов) проводили с помощью техники «двойного слоя» по методу «отсроченного антагонизма» [4], в качестве индикаторного штамма использовали *E. coli* DH5 α . Оценку биомассы биопленок проводили методом, описанным J.H. Merritt et al. (2005) [5]. Чувствительность штаммов к антибактериальным препаратам определяли диско-диффузионным методом согласно МУК 4.2.1890-04.

За период 2016-18 гг. из внутренних органов цыплят-бройлеров с системной коли-инфекцией было изолировано 50 культур АРЕС. Наиболее часто были поражены печень и легкие. ERIC-типирование позволило установить, что органы одной птицы инфицированы идентичными изолятами. В большинстве случаев на птицефабрике персистировали несколько штаммов *E. coli*, при этом максимальная длительность циркуляции одного штамма – 4 месяца. Всего выявлено 29 индивидуальных геномвариантов АРЕС.

Среди штаммов *E. coli* (n=29) детектированы представители семи распознаваемых филогрупп: чаще всего встречались В1 – 8 (28,57%) штаммов, В2 и Е – по 4 (14,28%) штамма, А, С и F – по 2 (7,14%) штамма, D – 1 (3,57%) штамм. Не идентифицированными оказались 5 (7,14%) культур. Биопленки формировали 42,85% штаммов *E. coli*. Продукция бактериоцинов обнаружена у 20 (71,43%) АРЕС. Двадцать два (78,57%) штамма были чувствительны к трем и более колицинам. Наиболее сильное ингибирующее действие оказывали ColE4, ColE6, к ним были чувствительны 75,0% и 67,86% АРЕС, соответственно. Чувствительность птичьих *E. coli* к микроцинам была менее выражена, за исключением ColE-8J (71,43% чувствительных штаммов). Устойчивость к 10 и более колицинам выявлена у 50% АРЕС и у 82,14% к 5 и более микроцинам. В большинстве случаев штаммы АРЕС были устойчивы к ампициллину (82,14%), тогда как к цефатоксиму и цефтазидиму не чувствительны были 25,0% и 28,57% культур соответственно. Устойчивость к аминогликазидам варьировала от 10,71% к амикацину до 46,43% к гентамицину. Уровень резистентности к фторхинолонам, напротив, был сходным для ципрофлоксацина (50,0%) и левофлоксацина (46,43%). К фуразолидону, тетрациклину, налидиксовой кислоте и триметоприм-сульфаметоксазолу были не чувствительны практически все исследованные культуры АРЕС.

Так как фторхинолоносодержащие препараты применяются в птицеводческом хозяйстве на протяжении длительного периода времени, штаммы АРЕС были распределены в две группы: устойчивые и чувствительные к ципрофлоксацину. Ципрофлоксацинорезистентные *E. coli* были чаще полиантибиотикорезистентными ($p=0,023$). Кроме того, в большинстве случаев они продуцировали колицины (78,57%), были устойчивы не менее чем к восьми бактериоцинам (78,57%) и имели высокую удельную биопленкообразующую способность (42,85%). Связи между принадлежностью к филогруппе В2, которая ассоциируется с патогенным потенциалом *E. coli*, и изученными свойствами не выявлено как в отдельно сравниваемых группах, так и в общей выборке АРЕС.

Бактериальную обсемененность различных органов цыплят-бройлеров можно рассматривать как генерализацию инфекционного процесса, что обусловлено особенностями их вскармливания и содержания. Длительное применение фторхинолонов в качестве кормовых добавок для профилактики инфекций у птиц, по-видимому, является фактором риска, приводящим к селекции устойчивых бактерий, которые обладают комплексом факторов патогенности и антагонистической активности.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Правительства Пермского края в рамках научного проекта №С-26/792.

Библиографический список

1. Diagnostic strategy for identifying avian pathogenic *Escherichia coli* based on four patterns of virulence genes / Schouler C. [et al.]. J Clin Microbiol. 2012. V. 50(5). P. 1673-1678.
2. Кожемяка Н. Эшерихиоз бройлеров. Животноводство России. 2008. № 11. С. 15-16.
3. Comparative genomics of European avian pathogenic *E. coli* (АРЕС) / Cordon G. BMC Genomics. 2016. V. 17. P. 2-21.
4. *Escherichia coli* bacteriocins: 248 antimicrobial efficacy and prevalence among isolates from patients with bacteraemia / Budič M. [et al.]. PLoS One. 2011. V. 6. P. 1-7.
5. Merritt J.H., Kadouri D.E., O'Toole G.A. Growing and Analyzing Static Biofilm // Curr Protoc Microbiol. 2005. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4568995>.

МЕМБРАННЫЙ СЕМАФОРИН SEMA4D КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ РЕГУЛЯТОР АКТИВНОСТИ Т-ЛИМФОЦИТОВ

Куклина Елена Михайловна

*«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал
ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: Sema4D, Т-лимфоциты, CD72, плексин В1

Семафорины – это сигнальные молекулы, участвующие в процессах аксонального наведения и выступающие преимущественно как репульсивные факторы, что определило название семейства [1]. В отличие от других семафоринов, Sema4D впервые был описан в иммунной системе – как трансмембранная молекула, конститутивно экспрессируемая Т-лимфоцитами, способная протеолитически отщепляться от мембраны и участвовать в иммунорегуляции. При этом Т-лимфоциты традиционно рассматриваются как источник семафорина, тогда как мишенями для него служат клетки, несущие на мембране рецептор для Sema4D в иммунной системе, низкоаффинный CD72, – преимущественно В-лимфоциты и дендритные клетки [4, 3]. Показано, что CD72-зависимые эффекты Sema4D задействованы в ключевых событиях адаптивного иммунного ответа – в антигенной активации В-лимфоцитов [3], в созревании дендритных клеток и в процессах примирования Т-лимфоцитов [4].

Однако участие Sema4D в иммунорегуляции не ограничивается использованием специфических рецепторов для реализации своих эффектов: ряд данных, как наших собственных, так и имеющихся в литературе, показывают, что Sema4D служит не только лигандом – он сам может выступать в качестве рецептора, проводя сигнал в клетку, на которой экспрессирован [5, 6, 7, 2]. Обеспечивается такая способность как минимум двумя факторами: во-первых, цитоплазматический домен семафорина содержит консенсусные сайты для серинового фосфорилирования [8]; во-вторых, у Т-лимфоцитов Sema4D ассоциирован с тирозиновой фосфатазой CD45, которая также может участвовать в передаче семафорин-зависимого сигнала в клетку [9]. А поскольку CD45 участвует в ответе Т-клетки на антиген, мембранный Sema4D должен вносить вклад этот ответ. При этом все известные на сегодня эффекты, инициируемые семафорином как рецептором, являются костимулирующими. Так, показано, что перекрестное связывание Sema4D на мембране Т-лимфоцитов вызывает

активирующий сигнал в самих Т-клетках, в частности, усиливает пролиферацию этих клеток в ответ на субоптимальные дозы антител к CD3 (компоненту Т-клеточного рецепторного комплекса) и к CD2 (Т-клеточному мембранному антигену, взаимодействующему с LFA-3) [7], а в эпидермальных $\gamma\delta$ T-лимфоцитах Sema4D-зависимый сигнал в ответ на связывание с плексином B2, представленным на мембране кератиноцитов, инициирует морфологические изменения, такие как вытягивание дендритов и округление клеток, что необходимо для их пролиферации и миграции в сайт повреждения [6]. Участие мембранного Sema4D косвенно подтверждается и нашими исследованиями, в которых блокада эндогенного семафорина сопровождалась снижением пролиферативного ответа Т-лимфоцитов на поликлональную активацию в культуре [2]. Аналогичные эффекты продемонстрированы для В-лимфоцитов, также экспрессирующих семафорин на мембране, хотя и с меньшей интенсивностью: в экспериментах *in vitro* связывание Sema4D, экспрессируемого на мембране CD5⁺В-клеток, с плексином B1, представленным на линии клеток мышинного эпителия, повышало пролиферативную активность и подавляло апоптоз В-лимфоцитов, а блокада плексина B1/Sema4D-зависимого взаимодействия за счет введения растворимого семафорина отменяла костимуляцию [5].

По механизмам реализации сигнала с мембранного Sema4D данных очень мало. Фактически, имеется только одна работа, в которой сделана попытка их расшифровать – на эпидермальных $\gamma\delta$ T-лимфоцитах: показано, что связывание Sema4D на мембране этих клеток сопровождается фосфорилированием экстраклеточно-регулируемой киназы (extracellular signal-regulated kinase, ERK), ключевого элемента каскада митоген-активируемых протеинкиназ, дефосфорилированием актин-связывающего белка кофилина и активацией $\alpha 6$ - и $\beta 4$ -интегринов, причем активация ERK – необходимое условие для Sema4D-зависимых морфологических изменений в клетке, обеспечивающих ее миграцию и пролиферацию [6].

Представленные выше данные указывают на необходимость пересмотра роли Sema4D в иммунорегуляции, с учетом участия мембранного семафорина в этом процессе. Актуальность такого подхода диктуется участием Sema4D в целом спектре патологических процессов и перспективой его использования в качестве мишени для терапии опухолевых, аутоиммунных, нейровоспалительных заболеваний: применение такой терапии требует как можно более полного представления о возможных проявлениях активности семафорина.

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер госрегистрации темы: 01201353248.

Библиографический список

1. Куклина Е.М., Байдина Т.В., Данченко И.Ю., Некрасова И.В. Семафорин Sema4D в иммунной системе при рассеянном склерозе // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2014. N 157. С. 198-201.
2. Куклина Е.М., Некрасова И.В. Новые аспекты Sema4D-зависимого контроля активации лимфоцитов // Доклады Академии наук. 2017. Т. 473, N 1. С. 1-5.
3. Besliu A., Banica L., Predeteanu D., Vlad V., Ionescu R., Pistol G., Opris D., Berghes F., Stefanescu M., Matache C. Peripheral blood lymphocytes analysis detects CD100/SEMA4D alteration in systemic sclerosis patients // Autoimmunity. 2011. Vol. 44. P. 427-436.
4. Bougeret C., Mansur I.G., Dastot H., Schmid M., Mahouy G., Bensussan A., Boumsell L. Increased surface expression of a newly identified 150-kDa dimer early after human T lymphocyte activation // J. Immunol. 1992. Vol. 148. P. 318-323.
5. Fukata, Y., Amano, M., and Kaibuchi, K. Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells // Trends Pharm. Sci. 2001. Vol. 22. P. 32-39.
6. Furuyama N., Inagaki S., Kosugi A., Noda W., Saitoh S., Ogata M., Iwahashi Y., Miyazaki N., Hamaoka T., Tohyama M. Identification of a novel transmembrane semaphorin expressed on lymphocytes // J. Biol. Chem. 1996. Vol. 271. P. 33376-33381.
7. Galon J., Angell K., Bedognetti D., Marincola M. The continuum of cancer immunosurveillance: prognostic, predictive, and mechanistic signatures // Immunity. 2013. Vol. 25. P. 11-26.
8. Liu B., Ma Y., Zhang Y., Zhang C., Yi J., Zhuang R., Yu H., Yang A., Zhang Y., Jin B. CD8low CD100- T Cells Identify a Novel CD8 T Cell Subset Associated with Viral Control during Human Hantaan Virus Infection // JviSM org. 2015. Vol. 89. P. 11834-11844.
9. Liu Y., Hou Y., Ma L., Sun C., Pan J., Yang Y., Zhou H., Zhang J. Regulation of semaphorin 4D expression and cell proliferation of ovarian cancer by ERalpha and ERbeta // Braz J Med Biol Res. 2017. Vol. 50. P. 1-10.

ВЛИЯНИЕ ПИОЦИАНИНА *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* НА МИКРОБИЦИДНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ НЕЙТРОФИЛОВ

Масленникова Ирина Леонидовна

*«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал
ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: пиоцианин, *Pseudomonas aeruginosa*, нейтрофилы

Нейтрофилы являются первой линией защиты врожденного иммунитета, функциональная активность которых в зоне воспаления может определять направление исхода инфекционного процесса по острому или хроническому типу [1]. Не исключено, что микроокружение, в частности присутствие бактериальных экзопродуктов может оказывать влияния на примирование нейтрофилов. Пеоцианин определяет вирулентный потенциал *Pseudomonas aeruginosa* и обладает антибактериальными свойствами по отношению к другим видам бактерий и грибам. Поскольку данный экзопродукт представляет собой окислительно-восстановительное соединение феназиновой природы [2], не исключено его влияние и на клетки врожденного иммунитета.

Цель исследования: изучить воздействие пеоцианина на микробицидный потенциал нейтрофилов человека.

Нейтрофилы здоровых мужчин (20-39 лет; n=8), выделенные на двойном градиенте плотности фиколл-верографина, инкубировали в течение часа с пеоцианином ("SIGMA"; Israel) в концентрациях 10, 20, 40, 80 мкМ в RPMI и LB средах. После удаления пеоцианина у нейтрофилов оценивали фагоцитоз с использованием *Escherichia coli* lux⁺ [3] по ингибированию их свечения на мультипланшетном ридере Synergy H1 (Biotek, США) в течение 60 мин [4]. Окислительную активность нейтрофилов определяли в тесте люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ). В качестве стимулятора использовали опсонизированные бактерии *E. coli* K12. В супернатантах нейтрофилов определяли активность миелопероксидазы (МПО) спектрофотометрическим методом [5]. Статистическая обработка данных проводилась в программе Statistica 6.0.

Результаты проведенных исследований позволили выявить, что при концентрации пеоцианина 20 мкМ, 80 мкМ индекс фагоцитарной активности нейтрофилов повышался, начиная с 30 мин. Вышеуказанные эффекты также отмечались при активации нейтрофилов пеоцианином в LB среде. Однако, поскольку среда LB способна сама непосредственно усиливать фагоцитоз нейтрофилов из-за наличия в ней растворимого β -глюкана, который активирует клетки врожденного иммунитета, [6] фагоцитоз нейтрофилов при действии пеоцианина был ниже, чем на среде РРМИ.

Изучение окислительной активности нейтрофилов при действии пеоцианина не выявило влияния на спонтанную хемилюминесценцию нейтрофилов. При стимулировании опсонизированными бактериями пеоцианин ингибировал выделение активных форм кислорода (АФК) нейтрофилами в РРМИ среде ($r = -0.98$; $p \leq 0.05$). Напротив, повышение

концентрации экзопродукта в активирующей нейтрофилы LB среде вызывало усиление продукции АФК ($r = 0.89$; $p \leq 0.05$), что согласуется с ранее полученными результатами [7].

МПО содержится в азурофильных гранулах нейтрофилов. Показано, что с увеличением концентрации пиоцианина (5-80 мкМ) в РПМИ увеличивался уровень секреции МПО ($r = 0.89$; $p \leq 0.05$). Влияние пиоцианина в невысоких концентрациях (5-40 мкМ) на МПО нейтрофилов на LB среде не отмечено.

Таким образом, влияние пиоцианина на фагоцитоз и окислительную активность нейтрофилов может нивелироваться в определенном микроокружении, обусловленное особенностями ответа клеток врожденного иммунитета на бактериальные инфекции.

«Работа выполнена в рамках государственного задания номер госрегистрации темы: 01201353248».

Библиографический список

1. An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration / Selders G.S. [et al.]. Regen. Biomater. 2017 V. 4. P. 55-68.

2. Catabolite repression control of pyocyanin biosynthesis at an intersection of primary and secondary metabolism in *Pseudomonas aeruginosa* / Huang J. [et al.]. Appl. Environ. Microbiol. 2012. V. 78. P. 5016-5020.

3. Сенсорные биолюминесцентные системы на основе lux-оперонов разных видов люминесцентных бактерий / Данилов В.С. [с соавт] Вестник МГУ. 2002. № 3. С. 20-24.

4. Способ определения фагоцитарной активности лейкоцитов по степени гашения биолюминесценции / Ширшев С.В. [с соавт.]. Иммунология. 2014. № 6. С. 312-317.

5. Бакуев М.М., Саидов М.З. Особенности секреции миелопероксидазы в хемилюминесцентном ответе нейтрофилов человека при контакте со стимуляторами различной природы // Иммунология. 1991. № 1. С. 15-19.

6. Purification of soluble beta-glucan with immune-enhancing activity from the cell wall of yeast / Lee J.N. [et al.]. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2001. V. 65. P. 837-841.

7. Effect of bacterial components of mixed culture supernatants of planktonic and biofilm *Pseudomonas aeruginosa* with commensal *Escherichia coli* on the neutrophil response *in vitro* / Maslennikova I.L. [et al.]. Pathog. Dis. 2017. V. 30. ftx105.

СИНТЕЗ, ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДОКИНГ ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКИХ «ТРИТЕРПЕНОИД-СТЕРОИДНЫХ» ГИБРИДОВ

Назаров Алексей Витальевич, Толмачева Ирина Анатольевна,
Ерошенко Дарья Владимировна, Жукова Анастасия Евгеньевна,
Гришко Виктория Викторовна

*«Институт технической химии УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН,
г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: тритерпеноиды, «тритерпеноид-стероидные» гибриды, цитотоксичность, молекулярный докинг

С целью разработки новых фармакологически активных агентов или повышения эффективности известных лекарственных средств активно развивается одно из направлений современной медицинской химии, связанное с синтетическими превращениями стероидов. Биогенетически близкие стероидам полициклические тритерпеноиды представлены в природе соединениями с разнообразными углеродными остовами, химическая модификация которых позволяет значительно расширить спектр стероидных производных. В настоящей работе исследована возможность использования лупановых и 18 α Н-олеанановых 2-циано-3,4-секо-тритерпеноидов в качестве ключевых интермедиатов в синтезе так называемых «тритерпеноид-стероидных» гибридов.

Окислительной трансформацией двойных связей 2-циано-3,4-секопроизводных типа **1** и последующим кислотнo- катализируемым α -бромированием образующихся метилкетонoв **2** получен ряд бромозамещенных кетонoв **3-5** с различной степенью галогенирования, а также 3,23,24-тринор-3,4-секо-18 α Н-олеанановая кислота **6** как продукт элиминирования фрагмента бромoформа трибромкетона. В условиях основного катализа внутримолекулярной нитрил-анионной циклизацией метилового эфира 3,23,24-тринор-3,4-секо-18 α Н-олеанановой кислоты синтезирован А-пентациклический кетонитрил, дегидрированием которого получен соответствующий цианоенон **7**, структурный аналог цитотоксичного агента CDDO [1]. 3,4-Секотритерпеновые бромгидрины **8**, **9**, синтезированные стереоселективным восстановлением 18 α Н-олеанановых моно- и

© Назаров А.В., Толмачева И.А., Ерошенко Д.В., Жукова А.Е.,
Гришко В.В., 2018

дибромкетонов, в условиях системы *t*-BuOK/*t*-BuOH подвергаются дегидробромированию с образованием терминальных C4 эпимерных 4,23-эпоксидов **10**, **11**, которые были инертны в реакции нитрил-анионной циклизации (схема 1).

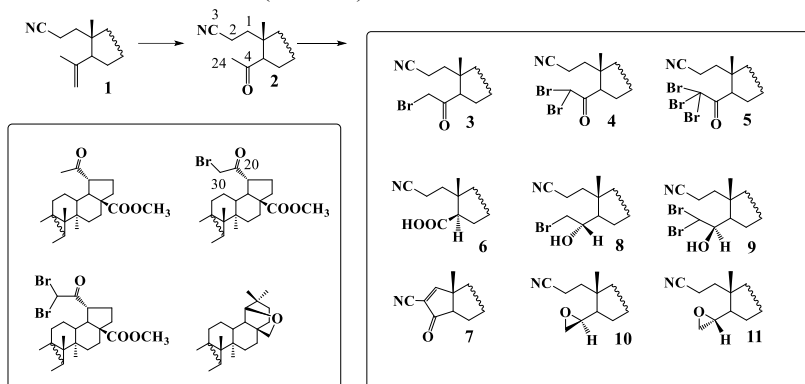


Схема 1.

В условиях аллильного бромирования или окисления по C24 атому из 2-циано-3,4-секотритерпеноидов типа **1** синтезированы соответствующие бром-алкены **12** или альдегиды **13**, на основе которых в условиях нитрил-анионной циклизации разработаны альтернативные способы синтеза «тритерпеноид-стероидных» гибридов с редуцированной 4,4-гемдиметильной группой **14-17**. Для полученных циклических производных реализованы реакции регио- и стереоселективной модификации по C3, C4 и/или C5 положениям цикла A, а также в случае лупановых тритерпеноидов – по C20, C28 и C30 положениям изопропилиденового фрагмента **18-25** (схема 2).

Проведена оценка *in vitro* цитотоксического эффекта синтезированных соединений в отношении семи линий опухолевых клеток HEP-2, HCT 116, MS, RD TE32, A549, MCF7 и PC3. Для отобранных в процессе скрининга соединений с микромолярным уровнем цитотоксичности с помощью метода молекулярного докинга идентифицированы потенциальные клеточные мишени.

Исследования *in silico* свидетельствуют о высоком родстве соединения **13** (R=CN), проявившего наиболее высокую цитотоксичность в отношении протестированных линий опухолевых клеток (IC₅₀ 0,64-3,17 мкМ), к активным сайтам киназ CDK6 и HER2/неу, сверхэкспрессия которых часто наблюдается в опухолевых клетках.

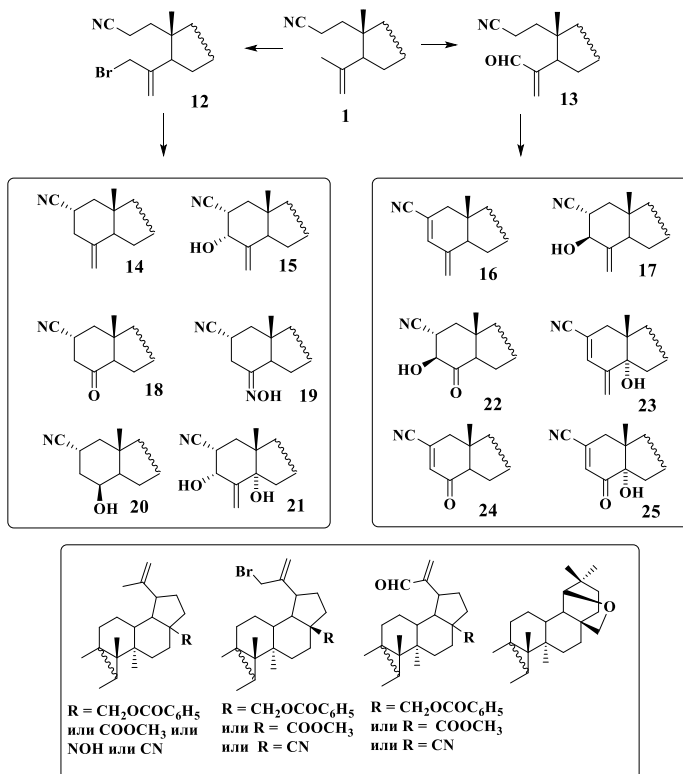


Схема 2.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ № 16-13-10245.

Библиографический список

1. Liby K.T. Synthetic oleanane triterpenoids: multifunctional drugs with a broad range of applications for prevention and treatment of chronic disease / K.T. Liby, M.B. Sporn // Pharmacol. Rev. – 2012. – Vol. 64. – P. 972–1003.

СИНТЕЗ, РЕАКЦИИ КОНДЕНСАЦИИ И ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ТРИТЕРПЕНОВЫХ АЛЬДЕГИДОВ

Назаров Михаил Андреевич, Ерошенко Дарья Владимировна,
Толмачева Ирина Анатольевна, Гришко Виктория Викторовна

«Институт технической химии УрО РАН», г. Пермь, Россия

Ключевые слова: тритерпеноиды, альдегиды, альдольно-кетоновая конденсация, гидразоны

Одним из основных методов разработки новых лекарственных средств является химическая функционализация/модификация фармакофорными группами доступных природных соединений с высоким уровнем биологической активности. В химии тритерпеноидов удобными синтонами являются оксосоединения, в частности альдегиды, а к простым и эффективным методам модификации можно отнести реакцию альдольно-кетоновой конденсации, а также взаимодействие с азотсодержащими соединениями, например гидразинами.

На основе бетулина через образование промежуточных 3-оксопроизводных **1-3** по известным методикам синтезированы соответствующие 2-гидроксиметиленовые **4, 5** [1] и 3,28-дibenзоильные **6** [2], **7** производные. В результате окисления селенистой кислотой соединений **4-7** получены тритерпеновые альдегиды лупанового **8, 10**, 18 α H-олеананового **9** и 18 α ,19 β H-урсанового **11** типа. Щелочной гидролиз альдегида **11** приводил к альдегиду **12** (схема 1).

Проведена оценка синтетического потенциала тритерпеновых альдегидов **8-12** в реакциях альдольно-кетоновой конденсации с ацетоном в условиях щелочного катализа (NaOH, KOH, NaOCH₃). Применение системы ацетон-бензол для альдегидов **8-10** привело к образованию альдолей **13a-в** с последующим переходом в кетоны **14a-в** (схема 2). В случае альдегидов **11** и **12** из реакции в качестве единственных продуктов выделены кетоны **14 г, д**.

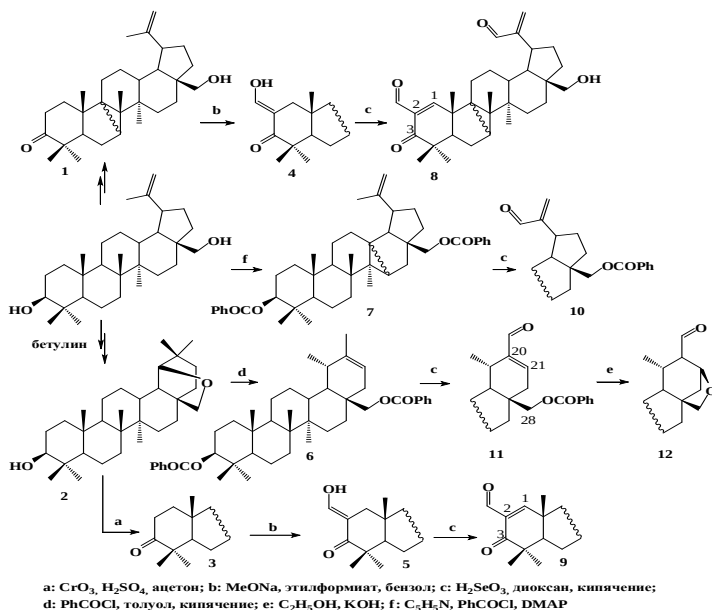


Схема 1.

Взаимодействием альдегидов **9**, **11** с ацетилгидразином получены тритерпеновые ацетилгидразоны **15а,г** (схема 2).

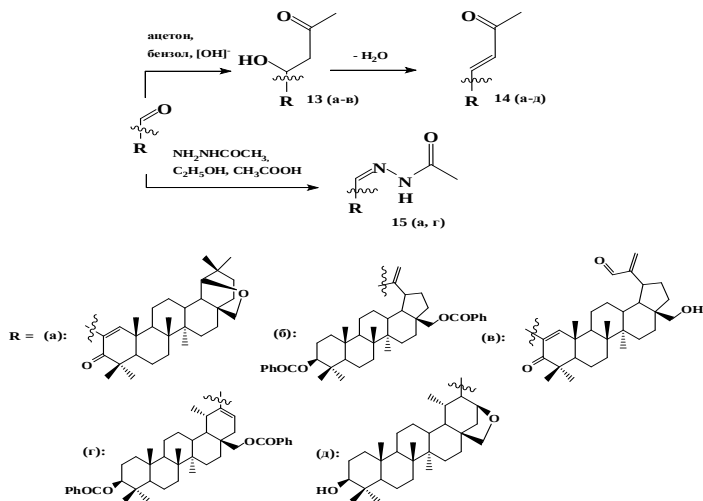


Схема 2.

По данным исследований цитотоксической активности синтезированных тритерпеновых соединений в отношении линий

опухолевых клеток человека (HEp 2, RD TE 32, A549, MS, HCT 116, MCF-7, PC-3) высокую активность (IC_{50} 0.74-9.45 мкМ) проявляют олеанановый альдегид **9** и его продукты конденсации **13a**, **14a**, **15a**.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант РФФИ № 18-03-00050).

Библиографический список

1. Klinot J., Světlý J., Kudláčková D., Buděšínský M., Vystrčil A. Collection Czechoslov. Chem. Commun. 1979. Vol. 44. P. 211-225.
2. Klinot J., Vystrčil A. Nebenprodukte bei der umsetzung von allobetulin zu heterobetulin [Byproducts in the reaction of allobetulin to heterobetulin]. Coll. Czech. Chem. Commun. 1964. Vol.29. P. 516-530.

РОЛЬ ЭСТРИОЛА В ФОРМИРОВАНИИ ТОЛЕРОГЕННОГО ФЕНОТИПА НК-КЛЕТОК

Некрасова Ирина Валерьевна, Горбунова Ольга Леонидовна,
Ширшев Сергей Викторович

*«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал
ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: эстриол, НК-клетки, беременность

Естественные киллерные (НК) клетки представляют собой популяцию лимфоцитов врожденного иммунитета, способных к проявлению цитотоксической, а также регуляторной активности. НК-клетки доминируют среди лимфоидных клеток, локализованных в децидуальной оболочке во время беременности [1]. Фетотрофические функции НК-клеток проявляются под воздействием специфических регуляторных сигналов, к которым, в первую очередь, можно отнести гормоны фетоплацентарного комплекса. Эстриол (E_3) является одним из ключевых гормонов беременности. Его уровень возрастает с 7-й нед беременности вплоть до родов практически в 10 раз [2]. Показано, что данный гормон эффективно регулирует функции не только репродуктивных тканей, но и иммунных клеток [3].

Целью данного исследования явилось изучение влияния E_3 на функциональную активность НК-клеток.

В работе использованы НК-лимфоциты, выделенные из периферической крови женщин репродуктивного возраста методом иммуномагнитной сепарации. E_3 использовали в физиологических

концентрациях, соответствующих I и III триместрам беременности – 2 и 20 нг/мл, соответственно [2]. Для стимуляции развития NK-клеток при культивировании *in vitro* применяли интерлейкины (IL)-2, IL-12 и IL-15. NK-клетки культивировали в полной питательной среде в присутствии E_3 3-х суток, после чего оценивали их фенотип методом проточной цитометрии. Определяли следующие маркеры: для идентификации NK-клеток – CD56, NKp46, для оценки уровня активации – CD94/NKG2A, для оценки хоминга NK-клеток – экспрессия L-селектина (CD62L). В клеточных супернатантах иммуноферментным методом определяли уровень цитокинов: IFN- γ , IL-4, IL-10, TGF- β , IL-17. Методом real-time PCR оценивали экспрессию микроРНК (hsa-miR-155, hsa-miR-29a, hsa-miR-30c-1*, hsa-miR-378b) в сепарированных NK-клетках.

Установлено, что инкубация NK-клеток с E_3 вне зависимости от концентрации достоверно увеличивает долю CD56^{bright} клеток относительно контроля, параллельно снижая уровень CD56^{dim}. Децидуальные NK-клетки созревают из периферических CD16⁺CD56^{bright} лимфоцитов, мигрирующих в матку благодаря экспрессии на их поверхности молекул L-селектина (CD62L) [1]. E_3 вне зависимости от концентрации достоверно увеличивает долю CD56^{bright}CD62L⁺ NK-клеток. Одновременно E_3 в высокой концентрации снижает процент CD56^{dim}CD62L⁺ NK-клеток. E_3 вне зависимости от концентрации статистически значимо увеличивает процент NK-клеток, экспрессирующих ингибиторную молекулу NKG2A. Повышенная экспрессия CD56, L-селектина и NKG2A рассматривается как трансформация NK-клеток в регуляторный тип, не способный к цитотоксическому действию [4].

Известно, что CD56^{bright} NK-клетки способны продуцировать значительные количества различных цитокинов, что послужило основанием для выделения субтипов периферических и децидуальных NK-клеток. Так, NK1 продуцируют IFN- γ и TNF- α ; NK2 – IL-4, IL-5, IL-6, IL-13; NK3 – TGF- β ; NKr1 – IL-10 [4]. Установлено, что в супернатантах периферических NK-клеток преобладает IFN- γ , что согласуется с литературными данными [4]. При этом E_3 вне зависимости от концентрации достоверно угнетает его продукцию и параллельно в высокой концентрации усиливает секрецию противовоспалительного цитокина TGF- β . Таким образом, гормон выступают физиологическим индуктором дифференцировки NK1 клеток в регуляторный субтип NK3. E_3 вне зависимости от концентрации достоверно снижает уровень IL-17 в супернатантах NK-клеток. Продукция цитокинов IL-4 и IL-10 изначально была на низком уровне и угнеталась под влиянием исследуемого гормона.

Позитивными регуляторами функциональной активности NK-клеток являются miR-155 и miR-30c-1*, стимулирующие их выживаемость и цитолитическую активность [5]. Супрессорами

цитотоксичности NK-клеток являются miR-29a и miR-378, угнетающие экспрессию перфорина и гранзимов [6, 7]. Мы обнаружили, что Е₃ вне зависимости от концентрации угнетал экспрессию miR-155 и miR-30c-1*, при этом стимулируя экспрессию miR-378. На экспрессию miR-29a гормон не оказал статистически значимого действия.

Таким образом, выявленное действие исследуемого гормона, проявляющееся в формировании толерогенного фенотипа NK-клеток и снижении их цитотоксического потенциала, может реализоваться как на уровне самих лимфоцитов, так и транскрипции специализированных микроРНК, регулирующих их функциональную активность.

Работа выполнена в рамках государственного задания номер госрегистрации темы: 01201353248.

Библиографический список

1. Koopman L.A., Korcow H.D., Rybalov B. et al. Human decidual natural killer cells are a unique NK subset with immunomodulatory potential // J. Exp. Med. 2003. V. 198. P. 1201–1212.
2. Kase N.G., Reyniak J.V. Endocrinology of pregnancy // Mount. Sinai J. Med. 1985. V. 52. P. 11–34.
3. Ширшев С.В., Некрасова И.В. Комплексное исследование иммуномодулирующей активности эстриола // Иммунология, 2011. Т. 32, № 2. С. 72–74.
4. Saito S., Nakashima A., Myojo-Higuma S., Shiozaki A. The balance between cytotoxic NK cells and regulatory NK cells in human pregnancy // J. Reprod. Immunol. 2008. V. 77. P. 14–22.
5. Liua X., Wang Y., Suna Q. et al. Identification of microRNA transcriptome involved in human natural killer cell activation. Immunol. Lett. 2012. V. 143. P. 208 – 217.
6. Elemam N.M., Mekky R.Y., El-Ekiaby N.M. et al. Repressing PU.1 by miR-29a in NK cells of HCV patients, diminishes its cytolytic effect on HCV infected cell models // Hum. Immunol. 2015. V. 76. P. 687–694.
7. Liu S., Chen L., Zeng Y. et al. Suppressed expression of miR-378 targeting gzmB in NK cells is required to control dengue virus infection. Cell. Mol. Immunol. 2016. V. 13. P. 700–709.

ЛЕПТИН РЕГУЛИРУЕТ ЭКСПРЕССИЮ МЕМБРАННЫХ МОЛЕКУЛ В-ЛИМФОЦИТАМИ

Орлова Екатерина Григорьевна

*«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал
ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: В-лимфоциты, лептин

Пептидный гормон лептин, синтезируемый жировой тканью, регулирует аппетит, жировой и энергетический обмен, обладает иммуномодулирующей активностью, контролирует процессы гестации. [1,2]. Беременность характеризуется толерантностью иммунной системы матери к антигенам плода, что обусловлено преобладанием гуморального иммунного ответа, увеличением доли регуляторных клеток с иммуносупрессорной активностью [3]. В-лимфоциты, благодаря продукции супрессорных цитокинов (IL-10) и контактных взаимодействий, также обладают регуляторной активностью, участвуют в индукции Т-регуляторных лимфоцитов (Treg), поляризации иммунного ответа, формировании периферической толерантности [4]. Количество В-регуляторных лимфоцитов нарастает при беременности, а при спонтанных абортах падает [4]. Вопрос о фенотипических маркерах и механизмах индукции формирования В-регуляторных лимфоцитов в периферической крови остается открытым. Показано, что $CD19^+CD25^+$ В-лимфоциты продуцируют большие количества IL-10, иммуноглобулинов и костимулирующих молекул по сравнению с $CD19^+CD25^-$ [5], экспрессируют FOXP3 [6]. Лептин в концентрациях, характерных для беременности, контролирует функции Treg и индукцию периферической толерантности [7]. Но лишь в единичных работах описаны эффекты лептина на В-клетки. Цель работы - изучить роль лептина в регуляции экспрессии молекул, контролирующих иммуносупрессорную и антиген-презентирующую функцию В-лимфоцитов. Объектами исследования являются $CD19^+CD25^+$ - и $CD19^+CD25^-$ -клетки, полученные из суспензии мононуклеаров периферической крови (МПК) условно здоровых небеременных женщин репродуктивного возраста ($n=8$) методом иммуномагнитной сепарации (MagCelect Human B Cell Isolation Kit, «R&D», США; $CD25^+$ Isolation Kit, «R&D», США). МПК получали центрифугированием в градиенте плотности фиколл-верографина ($1,077 \text{ г/см}^3$). Чистота выделения $CD19^+CD25^+$ - и $CD19^+CD25^-$ -, контролируемые по экспрессии CD19 и CD25 методом проточной цитометрии составляли - 92% и 95% соответственно. Далее клетки дважды отмывали раствором Хэнкса и ресуспендировали в полной питательной среде (среда RPMI-1640, содержащая 10% ЭТС, 1 мМ буфера HEPES, 2 мМ L-глутамин, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина), затем вносили по 1 мл ($1-5 \cdot 10^5$ /мл) в лунки 24-луночного полистиролового планшета и инкубировали с лептином 72 ч при 37°C и 5% CO_2 . Лептин («Sigma», Израиль) добавляли в концентрации 35 нг/мл, соответствующей его уровню во II-III триместрах беременности [2]. В контрольные пробы вместо лептина

добавляли физиологический раствор, используемый для растворения гормона. После инкубации клетки отмывали и оценивали количество CD19⁺CD25⁺- и CD19⁺CD25⁻-лимфоцитов (Anti-Human CD19 FITC, clone CatNFAB486F, «R&D», США; Anti-Human CD25 PE, clone BC96, «eBioscience», США), экспрессирующих внутриклеточный IL-10 (Anti-Human IL-10 AlexaFluor® 488, clone JES3-9D7, «eBioscience», США), транскрипционный фактор FOXP3 (Mouse Anti-Human FoxP3 PerCP Cy5.5, clone 236A/E7, «BD Pharmingen™», США), CD86 (Anti-Human CD86 (B7-2) PE, clone IT2.2, «eBioscience», США), являющейся костимулирующей молекулой в реализации антиген-презентирующей функции В-клетками и PD-L1 (Anti-Human CD274 (B7-H1) PE, clone MIN1, «eBioscience», США), индуцирующей апоптоз Т-лимфоцитов. Статистический анализ проводили по парному W-критерию Вилкоксона (p<0,05). Нормальность распределения в выборке оценивалась тестом χ^2 -квадрат. Установлено, что большее количество CD19⁺CD25⁺-лимфоцитов по сравнению с CD19⁺CD25⁻-клетками экспрессируют иммуносупрессорные молекулы FOXP3, PDL1, IL-10, что позволяет их отнести к регуляторным В-лимфоцитам (таблица). Инкубация CD19⁺CD25⁺-лимфоцитов с лептином повышает количество клеток, экспрессирующих IL-10 и FOXP3, но снижает уровень CD19⁺CD25⁺CD86⁺-лимфоцитов. Тогда как на CD19⁺CD25⁻ В-клетки гормон оказывает противоположный эффект, повышая количество CD19⁺CD25⁻CD86⁺-лимфоцитов, но снижая процент клеток, несущих PDL1, IL-10.

Таким образом, в аспекте беременности лептин регулируют функциональную активность В-регуляторных лимфоцитов, усиливая их супрессорные и толерогенные свойства.

Таблица

Влияние лептина на экспрессию мембранных молекул CD19⁺CD25⁺ - и CD19⁺CD25⁻ В-лимфоцитами

	CD86 ⁺ , %	IL-10 ⁺ , %	FOXP3 ⁺ , %	PDL1 ⁺ , %
CD19 ⁺ CD25 ⁺ контроль 1	3,58 (3,22-4,14)	1,49 (1,25-1,74)	55,29 (35,74-56,70)	3,23 (1,71-5,28)
CD19 ⁺ CD25 ⁺ + лептин	2,99* (2,34-3,41)	2,60* (1,41-3,50)	59,97* (30,67-62,99)	1,73 (1,59-5,12)
CD19 ⁺ CD25 ⁻ контроль 2	1,92 [#] (1,25-4,08)	0,68 [#] (0,35-0,89)	13,38 [#] (11,52-15,25)	1,49 [#] (1,06-1,91)
CD19 ⁺ CD25 ⁻ + лептин	3,02* (2,09-5,27)	0,24* (0,14-0,41)	14,80 (11,23-18,36)	0,38* (0,26-0,50)

Результаты представлены в виде медианы с нижней и верхней квартилью – Me (LQ; UQ),

* - p<0,05 к соответствующему контролю; [#] - p<0,05 к пробе CD19⁺CD25⁺ контроль 1

«Работа выполнена в рамках государственного задания номер госрегистрации темы: 01201353248»

Библиографический список

1. Tena-Sempere M. Interaction between energy homeostasis and reproduction: central effects of leptin and ghrelin on the reproductive axis. //Horm. Metab. Res. 2013.V.45. P. 919-927.
2. Hardie L. Circulating leptin in women: longitudinal study during pregnancy // Clin. Endocrinol. 1997. V. 47. P. 101 - 106.
3. Ширшев С.В. Иммунология материнско-фетальных взаимодействий. Екатеринбург: УрО РАН, 2009. 582 с.
4. IL-10-producing regulatory B cells in human pregnancy / L. Rolle et al. // Am. J. Reprod. Immunol. 2013. V. 70. P. 448–453.
5. Phenotypic and functional characterization of human CD25+ B cells / M. Brisslert, et al // J. Immunology. 2006. V. 117. P. 548–557.
6. Noh G., Lee J.H. Regulatory B cells and allergic diseases // Allergy Asthma Immunol. Res. 2011. V. 3. P. 168–177.
7. Орлова Е.Г., Ширшев С.В. Роль PKA и PI3K в регуляции лептином и грелином формирования регуляторных CD4⁺T-лимфоцитов // Биохимия. 2017. Т. 82. С. 1361-1373.

ПРИМИРОВАННЫЕ ГРЕЛИНОМ ДЕНДРИТНЫЕ КЛЕТКИ ТИМУСА КОНТРОЛИРУЮТ ФОРМИРОВАНИЕ iNKT

Орлова Екатерина Григорьевна, Ширшев Сергей Викторович,
Логинова Ольга Александровна

*«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал
ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: дендритные клетки, iNKT, тимус, грелин

Дендритные клетки (ДК) тимуса играют ведущую роль в презентации аутоантигенов, отрицательной селекции тимоцитов, индукции ауто толерантности и формировании регуляторных субпопуляций лимфоцитов [1]. Пептидный гормон грелин, регулирующий аппетит и энергетический баланс, контролирует возрастную инволюцию тимуса, восстанавливая клеточность и архитектуру органа у стареющих животных [2]. В концентрациях, характерных для беременности, грелин модулирует формирование регуляторных субпопуляций лимфоцитов (Treg, Th17, iNKT) в тимусе [3, 4].

Цель работы – изучить влияние примированных грелином миелоидных (м) ДК и плазмцитоподобных (п) ДК тимуса на генерацию

инвариантных (i) НКТ, при совместной инкубации мДК и пДК с аутологичными интактными тимоцитами.

мДК, пДК и тимоциты получали из фрагментов тимусов, удаляемых в ходе сердечно-сосудистых операций у детей до года при коррекции врожденных пороков сердца в соответствии с существующей хирургической практикой Федерального краевого центра сердечно-сосудистой хирургии г. Перми. Исследования проводились согласно Хельсинской Декларации ВМА 2000 г. и Конвенции Совета Европы «О правах человека и биомедицине» 1999 г. Обязательным критерием включения являлось наличие добровольного согласия со стороны законных представителей несовершеннолетних. мДК и пДК выделяли из суспензии тимоцитов методом иммуномагнитной сепарации (MACS «Miltenyi Biotec», Германия) в модификации [5]. Чистота выделения мДК, оцениваемая по маркеру CD11c составляла 96,5%, пДК, контролируемая по экспрессии CD303 - 91,7%. Полученные мДК и пДК суспендировали в 1мл ППС (среда RPMI-1640, 10% ЭТС, 1мМ HEPES, 2мМ L-глутамин, пенициллина G (100 ЕД/мл)-стрептомицина (0,1 мг/мл)) и инкубировали по $0,1-1 \times 10^6$ кл/мл в присутствии грелина 24 ч при 37°C и 5% CO₂. Грелин вносили в культуры в концентрации 1,25 нг/мл, соответствующей его максимальному уровню в периферической крови при беременности [6]. После 24ч инкубации к мДК и пДК добавляли суспензию аутологичных интактных тимоцитов ($0,1-1 \times 10^7$ кл/мл в 1мл ППС) и инкубировали клетки совместно 72ч, после чего анализировали фенотип iNKТ на проточном цитометре. Количество iNKТ определяли как процент CD3^{hi}Vα24Jα18⁺-клеток (Anti-Human CD3 PE-Cy5, clone UCNT1, «eBioscience», США; Anti-Human Vα24Jα18 TCR PE, clone 6B11, «eBioscience», США) в гейте лимфоцитов. Нормальность распределения в выборке оценивалась тестом χ-квадрат. Для выявления статистических отличий использовался парный W-критерий Вилкоксона ($p < 0,05$).

В результате проведенных исследований установлено, что инкубация с грелином влияет на способность мДК и пДК клеток регулировать формирование iNKТ. Примированные грелином мДК усиливают формирование iNKТ, а примированные грелином пДК, напротив, препятствуют формированию iNKТ (*таблица*).

В ранее проведенных нами исследованиях показано, что инкубация интактных тимоцитов с грелином, в концентрации характерной для беременности, снижает количество iNKТ-клеток [3] и Th17 [4] в культуре тимоцитов. НКТ-клетки – уникальная популяция аутореактивных Т-лимфоцитов с функциями натуральных киллеров, которые объединяют в себе основные характеристики клеток врожденного и адаптивного иммунитета [7].

Таблица

Влияние грелина на способность мДК и пДК тимуса индуцировать формирование iNKT, $n=7$

	iNKT, % от гейта CD3 ⁺ -лимфоцитов	
	Контроль	Грелин 1,25 нг/мл
мДК+timoциты	1,16(1,11-1,28)	1,95(1,26-1,98)*
пДК+timoциты	1,95(1,74-3,30)	1,22(1,21-2,09)*

Примечание: Результаты представлены в виде медианы с нижней и верхней квартилью – Ме (LQ; UQ), * - $p<0,05$ по парному W -критерию Вилкоксона к контрольной пробе мДК и пДК соответственно

Количество NKT-клеток играет существенную роль для нормального протекания беременности. У пациентов с периодическими спонтанными абортами неясного генеза, отмечается увеличение числа NKT-клеток в периферической крови и децидуальной оболочке [8]. Учитывая, что количество пДК практически в 2 раза превосходит уровень мДК в тимусе [9], можно полагать, что угнетение грелином тимического этапа формирования iNKT-клеток объясняется эффектами гормона на именно на пДК. Таким образом, выявлен новый механизм регуляции грелином тимопоэза в аспекте беременности.

Работа поддержана грантом РФФИ 16–04–590631.

Библиографический список

1. Линия дендритных клеток из тимуса человека / Шарова Н.И. др. // Иммунология. 2011. Т.32, № 6. С.296-300.
2. Baatar D, Patel K., Taub D.D. The effects of ghrelin on inflammation and the immune system // Mol. Cell Endocrinol. 2011. V.340. P.44-58.
3. Гормональная регуляция тимического этапа дифференцировки инвариантных NKT-клеток / Шириев С.В. др // ДАН. 2012. Т. 446, № 5. С.587-589
4. Гормональная регуляция тимического этапа дифференцировки IL-17-продуцирующих и Т-регуляторных лимфоцитов / Шириев С.В. и др. // ДАН. 2014. Т. 454, № 1. С.103-106.
5. Isolation of myeloid dendritic cells and epithelial cells from human thymus / Stoeckle C. et al. // J. of visualized experiments. 2013. V.79. pp:e50951.
6. Ghrelin and its relationship to growth hormones during normal pregnancy / Fuglsang J. et al. // Clin. Endocrinol. 2005. V.62, №5. P.554-559.
7. Акинфиева О.В., Бубнова С.С., Бессемельцев Л.Н. NKT-клетки: характерные свойства и значимость для регуляции иммунного ответа // Онкогематология. 2010. Т.4. С.39-47.
8. Yuan J., Li J., Huang S.Y., Sun X. Characterization of the subsets of human NKT-like cells and the expression of Th1/Th2 cytokines in patients

with unexplained recurrent spontaneous abortion // J. Reprod Immunol. 2015. Vol. 110. P. 81-88.

9. Characteristics of distribution and quantity of dendritic cells subtypes in hyperplastic thymus in patients with myasthenia gravis / Huang H. et al. // Zhonghua Yi Xue Za Zhi. 2017. V.97(19). P.1463-1468.

РОЛЬ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ТИМУСА В РЕГУЛЯЦИИ ФОРМИРОВАНИЯ Treg

Орлова Екатерина Григорьевна¹, Ширшев Сергей Викторович¹,
Логинова Ольга Александровна¹, Логинова Наталья Павловна²,
Шехмаматьев Роман Маратович³

¹*«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия*

²*ФГБОУ ВО Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России, г. Пермь, Россия*

³*Федеральный краевой центр сердечно-сосудистой хирургии имени С.Г. Суханова, г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: ВПС, тимус, дендритные клетки, Treg

Врожденный порок сердца (ВПС) – одна из наиболее распространенных патологий среди новорожденных. ВПС развиваются в результате нарушения эмбриогенеза и сопровождаются развитием гипоксии на клеточном, тканевом, органном и системном уровнях, что приводит, в том числе, к иммунному дисбалансу. Тимус – центральный орган иммунной системы, где дендритные клетки (ДК), совместно с эпителиальными клетками тимуса, создают условия для антигеннезависимой дифференцировки Т-лимфоцитов тимуса (timoцитов). Миелоидные (м) ДК тимуса, в основном, осуществляют негативную селекцию timoцитов, а плазмoцитoидные (п) пДК, в большей степени, отвечают за индукцию регуляторных Т-клеток (Treg) [1]. Однако, практически не исследовано влияние мДК и пДК, при различных типах ВПС, регуляции числа Treg в тимусе.

Цель работы – изучить роль мДК и пДК тимуса в регуляции формирования Treg в зависимости от типа ВПС.

мДК, пДК тимуса и timoциты получали из фрагментов тимусов, удаляемых в ходе сердечно-сосудистых операций у детей до года при коррекции врожденных пороков сердца в соответствии с

существующей хирургической практикой Федерального краевого центра сердечно-сосудистой хирургии г. Перми. Исследования проводились согласно Хельсинской Декларации ВМА 2000 г. и Конвенции Совета Европы «О правах человека и биомедицине» 1999 г. Обязательным критерием включения являлось наличие добровольного согласия со стороны законных представителей несовершеннолетних. По клиническим проявлениям цианоза ВПС дифференцируют на две группы – белые пороки, ассоциированные с лево-правым сбросом без смешивания артериальной и венозной крови, и синие, с право-левым сбросом и смешиванием артериальной и венозной крови [2].

мДК и пДК выделяли из суспензии тимоцитов методом иммуномагнитной сепарации («Myeloid dendritic cell isolation kit, Human», «Diamond plasmacytoid dendritic cells isolation kit II, Human», MACS «Miltenyi Biotec», Гремания) в модификации [3]. Чистота выделения мДК, оцениваемая по маркеру CD11c составляла в среднем 96,5%, пДК, контролируемая по экспрессии CD303, – 91,7%. Полученные мДК и пДК суспендировали в 1мл ППС (среда RPMI-1640, 10% ЭТС, 1мМ HEPES, 2мМ L-глутамина, пенициллина G (100 ЕД/мл)-стрептомицина (0,1 мг/мл)) и инкубировали по $0,1-1 \times 10^6$ кл/мл 24 ч при 37°C и 5% CO₂. Затем к мДК и пДК вносили суспензию аутологичных интактных тимоцитов ($0,1-1 \times 10^7$ кл/мл в 1мл ППС). После совместной 72 ч инкубации анализировали фенотип клеток методом проточной цитометрии. Количество Treg оценивали как процент CD25⁺FOXP3⁺-клеток в гейте CD4⁺-лимфоцитов (Human CD4⁺ CD25⁺regulatory T cell staining reagent, «R&D», США; Anti-Human FOXP3, «eBioscience», США). Нормальность распределения в выборке оценивалась тестом χ^2 -квадрат. Для выявления статистических отличий использовался непараметрический U-критерий Манна-Уитни для парных независимых выборок ($p < 0,05$).

Таблица

Количество Treg в гейте тимоцитов после совместного культивирования с мДК и пДК. Результаты представлены в виде медианы с нижней и верхней квартилью – Me (LQ-UQ), белый тип ВПС ($n=3$), синий тип ВПС ($n=3$)

	Белый тип ВПС	Синий тип ВПС
% Treg, в совместной культуре с мДК	2,74 (2,54-2,75)	1,96 (1,87-2,23)
% Treg, в совместной культуре с пДК	2,10 (1,99-3,02)	2,67 (2,38-2,81)

При оценке влияния мДК и пДК в регуляции формирования Treg в тимусе, при белом и синем типах ВПС, статистически значимых отличий не обнаружено (таблица). Ранее показано, что гипоксия, сопутствующая синему типу ВПС, сопровождается инволюционными

изменениями [4-5], но способствует более интенсивному формированию Treg [6]. Таким образом, инволюционные изменения в структуре органа, сопряженные с патологией сердечно-сосудистой системы, в большей степени влияют на созревающие клетки, и в меньшей – на функциональную активность мДК и пДК, принимающих участие в регуляции негативной селекции тимоцитов и индукции Treg [6-7].

«Работа выполнена в рамках государственного задания номер госрегистрации темы: 01201353248»

Библиографический список

1. Линия дендритных клеток из тимуса человека / Шарова Н.И. и др. // Иммунология. 2011. Т. 32., № 6. С.296-300.
2. Зиньковский М. Ф. Врожденные пороки сердца // Киев: Книга плюс, 2009. 1168 с.
3. Isolation of myeloid dendritic cells and epithelial cells from human thymus / Stoeckle C. et al. // J. of visualized experiments. 2013. V.79. pp:e50951.
4. Изменения в структуре тимуса при врождённых пороках сердца | Овсянникова А. В. и др. // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2012, № 1, 1 с.
5. Логинова Н. П., Четвертных В. А., Хромцова Г. А. Морфологические и иммуногистохимические особенности строения тимуса у новорожденных детей с врожденными пороками сердца // Архив патологии. 2013. Т. 75, № 4. С. 9-14.
6. Особенности экспрессии FOXP3 и RORγt CD4⁺-timoцитами у детей в зависимости от сложности врожденных пороков сердца / Логинова Н.П. // Биологические мембраны. 2016. Т. 33, № 1. С. 98-104.
7. Особенности становления иммунной системы у детей с врожденными пороками сердца / Четвертных В.А. и др. // Вестник Пермского научного центра. 2013. №.3. С. 67-77.

АНАЛИЗ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ ПРОИЗВОДНЫХ ИЗОХИНОЛИНА

Пьянков Иван Алексеевич¹, Кононова Людмила Ивановна²,
Смоляк Андрей Алексеевич³, Шкляев Юрий Владимирович³,
Коробов Владимир Павлович^{1,2}

*¹ФГБОУ ВО Пермский национальный исследовательский
политехнический университет, Пермь, Россия*

© Пьянков И.А., Кононова Л.И., Смоляк А.А., Шкляев Ю.В.,
Коробов В.П., 2018

²«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

³Институт технической химии УрО РАН, Пермь, Россия

Ключевые слова: стафилококки, ванкомицин, варнерин, хоминин, изохинолин

Быстрое формирование резистентности бактерий к антибиотикам является глобальной проблемой, определяющей необходимость перманентного создания новых антибактериальных препаратов. Одним из подходов к ее решению является анализ комбинированного действия различных антибактериальных соединений, источниками которых могут быть химические модификации уже известных антибактериальных аналогов. В настоящей работе представлены результаты изучения нового антимикробного препарата, синтезированного на основе изохинолина – структурного ядра природных алкалоидов. В результате поэтапного превращения изохинолина по методике, разработанной в Институте технической химии УрО РАН, был получен препарат “СА”, представляющий собой ((2,3,5,6-тетрагидрооксазоло[2,3-а]изохинолин-4-ил-м-метил)ртуть(II) хлорид. Целью настоящих исследований явилось изучение антибактериальной активности этого соединения для оценки перспектив его использования в качестве нового антисептического препарата, а также возможностей его применения в сочетании с другими антибактериальными препаратами для повышения эффективности их действия на бактерии, обладающие множественной устойчивостью к клинически значимым антибиотикам.

В работе использованы выделенный из клинических изолятов штамм коагулазонегативных стафилококков (КНС) *S. haemolyticus* 18, а также полученный путем лабораторной селекции его производный штамм *S. haemolyticus* 18₃₃, обладающий выраженной устойчивостью к ванкомицину. В качестве референтных служили штаммы *S. aureus* ATCC 25923 и *S. epidermidis* 33 GISK. Бактерии культивировали в колбах на среде LB с перемешиванием. Для определения чувствительности бактерий к антибиотикам использовали дискодиффузионный метод, а также метод двукратных серийных разведений в бульоне. Выявление возможного синергидного действия препаратов проводили методом “шахматной доски” [1], используя комбинации двукратных серийных разведений исследуемого препарата “СА” с разведениями ванкомицина, даптомицина, хлорамфеникола, рифампицина и низкомолекулярных катионных пептидов варнерина и хоминина. Диапазон концентраций каждого антимикробного агента в комбинациях составлял от 1/32×МИК до 4×МИК [2]. Эффективность

комбинаций определяли при помощи индекса фракционной ингибиторной концентрации (ФИК) и изоболографического анализа [3].

Для изучения физиологических особенностей исследуемых штаммов была произведена оценка динамики роста их культур, согласно которой штамм *S.haemolyticus* 18 обладает большей скоростью роста и развития, нежели его производный штамм *S.haemolyticus* 18_{зз}. Возможно, это связано с утолщением клеточной стенки бактерий *S.haemolyticus* 18_{зз}, определяющим его большую устойчивость к ванкомицину, но замедляющим скорость роста бактериальной культуры. Сравнительный анализ исследуемых штаммов выявил перекрестную устойчивость бактерий к группе бета-лактамовых антибиотиков, макролидам, аминогликозидам и хинолонам. При этом, оба штамма характеризовались одинаковой чувствительностью к препарату “СА”, хлорамфениколу и рифампицину. Следует особо отметить, что производный штамм *S.haemolyticus* 18_{зз}, обладающий устойчивостью к ванкомицину, становился также нечувствительным к даптомицину и более устойчивым к обоим катионным пептидам варнерину и хоминину. При исследовании совместного действия препарата “СА” и антибиотиков методом “шахматной доски” обнаружено выраженное индифферентное действие большинства пар антибактериальных препаратов против исследуемых штаммов стафилококков при индексе ФИК от 0,5039 до 0,75. Исключением явился эффект сочетания “СА” с рифампицином, которое приводило к проявлению антагонизма, индекс ФИК при этом составлял 1,03 для обоих штаммов. Важно отметить, что некоторые сочетания препарата “СА” с ванкомицином, хлорамфениколом, варнерином и хоминином по результатам изоболографического анализа обладали синергидным эффектом против исследованных штаммов. Из полученных использованием метода “шахматной доски” экспериментальных данных видно, что результаты расчетов индексов ФИК и изоболографического анализа носят противоречивый характер.

Полученные данные определяют необходимость проведения дополнительных экспериментов для более точного установления эффективности взаимодействующих препаратов путем анализа их совместного бактерицидного действия в опытах “кривых гибели во времени”.

Работа выполнена в рамках проекта №18-7-8-8, поддержанного Комплексной программой Уральского отделения Российской академии наук.

Библиографический список

1. Н.О. Hallander, K. Dornbusch, L. Gezelius, K. Jacobson, I. Karlsson. Synergism between aminoglycosides and cephalosporins with antipseudomonal activity: interaction index and killing curve method // Int. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1982. V. 22. No. 5. P. 743-752.

2. R.L. White, D.S. Burgess, M. Manduru, J.A. Bosso. Comparison of three different *in vitro* methods of detecting synergy: Time-Kill, Checkerboard, and E test // Int. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1996. V. 40. No. 8. P. 1914-1918.

3. R.J. Tallarida. An overview of drug combination analysis with isobolograms // Int. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2006 V.319. No. 1. P. 1-7.

ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНАЯ ЯМР-ДИАГНОСТИКА ПРИ ПОМОЩИ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ

Раев Михаил Борисович^{1,2}, Храмцов Павел Викторович^{1,2},
Кропанева Мария Дмитриевна¹, Бочкова Мария Станиславовна¹,
Тимганова Валерия Павловна¹, Заморина Светлана Анатольевна^{1,2}

¹«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» –
филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия

²ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный
исследовательский университет, г. Пермь, Россия

Ключевые слова: магнитные наночастицы, углеродные наночастицы, онкомаркеры, ядерно-магнитный резонанс, диагностика

В современных методах лабораторной *in vitro* диагностики используются различные методы: иммуноферментные, флуоресцентные, колориметрические, агглютинационные и т.д. Эти методы отличаются друг от друга способом оценки аналитического сигнала, который в свою очередь зависит от природы используемой метки: фермента, флуорофора, микро- или наночастицы. Наиболее популярным современным методом анализа является иммуноферментный анализ, в ходе которого происходит ферментативная реакция, сопровождающаяся превращением бесцветного субстрата в окрашенный продукт, по концентрации которого (то есть по интенсивности цветной реакции) и делается вывод о наличии и концентрации аналита в образце.

Наше исследование посвящено особому виду анализов, которые базируются на оценке сигнала другого рода. Этим сигналом является время спин-спиновой релаксации протонов воды (T_2). При попадании протонов воды в магнитное поле и воздействии на них радиочастотным импульсом векторы намагниченности протонов начинают вращаться в

плоскости перпендикулярной направлению внешнего магнитного поля в одной фазе. С течением времени происходит смещение фаз вращения вектора намагниченности протонов, так, что в конце концов векторы всех протонов будут двигаться в разных фазах. Этот процесс и называется спин-спиновой релаксацией, а время необходимое для расфазировки 37% протонов воды – именуется T_2 . Ключевой особенностью анализа является то, что при наличии в водной среде магнитных наночастиц время T_2 будет изменяться. Агрегация наночастиц приводит к уменьшению T_2 протонов, окружающих наночастицы, распадение агрегатов, напротив, приводит к его увеличению. Таким образом, если создать условия, при которых наличие анализита в образце будет провоцировать агрегацию магнитных наночастиц, то наличие и концентрацию анализита можно оценить по изменению времени T_2 .

В настоящее время разработано множество методов гомогенного анализа на основе описанного подхода [1]. Целью настоящей работы являлась разработка метода синтеза конъюгатов железных наночастиц, инкапсулированных углеродом ($Fe@C$), с аффинными молекулами для применения в *in vitro* ЯМР-диагностике рака предстательной железы.

Принцип синтеза конъюгатов заключался в следующем. В структуру поверхности $Fe@C$ вводили аминокислотные группы при помощи реакции диазотирования. Аминированные наночастицы ($Fe@C-NH_2$) нековалентно покрывали слоем бычьего сывороточного альбумина (БСА). Наночастицы $Fe@C-NH_2/БСА$ обрабатывали раствором глутаральдегида, молекулы которого осуществляли поперечную сшивку молекул БСА на поверхности наночастиц. Обработанные глутаральдегидом $Fe@C-NH_2/БСА$ экспонировали свободные альдегидные группы, к которым ковалентно пришивали моноклональные мышиные антитела, специфичные к простатспецифическому антигену человека – маркеру рака простаты.

В ходе исследований была оптимизирована процедура синтеза, продемонстрирована возможность контроля размеров магнитных железоуглеродных наночастиц. Средний размер функционализированных антителами наночастиц составлял от 100 до 180 нм. Было показано, что в ходе месяца хранения при температуре +4°C размеры наночастиц не изменились. Релаксивность наночастиц составляла от 300 до 450 $1/s \cdot mM$ в зависимости от партии наночастиц. Была продемонстрирована возможность использования синтезированных конъюгатов для детекции простатспецифического антигена при помощи твердофазного ЯМР-анализа на пористой подложке с использованием портативного релаксометра.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №17-15-01116)

Библиографический список

1. Zhang Y., Yang H., Zhou Z., Huang K., Yang S., Han G. Recent Advances on Magnetic Relaxation Switching Assay-Based Nanosensors // Bioconjugate Chemistry. 2017. № 4. С. 869–879.

ИММУНОФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ ПЕРСПЕКТИВЫ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ФЕТОПЛАЦЕНТАРНЫХ БЕЛКОВ

Раев Михаил Борисович, Заморина Светлана Анатольевна

*«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал
ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия*

Ключевые слова: фетоплацентарные белки, фармакологический препарат, аутоиммунные заболевания, трансплантация, пептидомиметики, рекомбинантные белки

Для создания препаратов, тонко регулирующих иммунную систему, логично использовать эндогенные молекулы, которые возникли в ходе естественной эволюции. К ним относятся фетоплацентарные белки, синтезируемые во время беременности. Концептуально, состояние беременности можно охарактеризовать как иммунную толерантность к аллоантигенам эмбриона. Фетоплацентарные белки реализуют один из механизмов формирования иммунной толерантности во время беременности, поскольку они целенаправленно модулируют иммунную систему матери таким образом, чтобы она подавляла иммунитет матери по отношению к антигенам эмбриона, но эффективно справлялась с инфекционными агентами. Именно поэтому препараты на основе фетоплацентарных белков, а также их пептидомиметики рационально применять в терапии аутоиммунных заболеваний, а также в случае пересадки органов, тканей и клеток, то есть в случаях, когда надо точно подавить иммунный ответ.

На данный момент считается, что лишь несколько молекул, из более чем 450, появляющихся во время беременности, регулируют иммунную толерантность матери, среди них – трофобластический β 1-гликопротеин (ТБГ), хорионический гонадотропин (ХГ), гликоделин и альфа-фетопrotein (АФП)) [1].

Так, в последние годы продемонстрирован терапевтический эффект рекомбинантного ТБГ в экспериментах на животных с индуцированными аутоиммунными патологиями, который был связан с

индукцией антигенспецифических Т-регуляторных лимфоцитов (Treg). Это не первая историческая попытка применить ТБГ в терапии аутоиммунных заболеваний, однако мы сосредоточимся на рекомбинантных формах белка. Более того, для ТБГ возможно создание препарата с аналогичной активностью на основе коротких пептидов [2].

Относительно недавно стало известно, что рекомбинантный гликоделин, полученный из клеточной линии НЕК (эпителий почек человека) в экспериментах *in vitro* снижает эффекторные функции Т-клеток наряду с индукцией антигенспецифических Treg [3]. По-видимому, рекомбинантный гликоделин можно применять в перепрограммировании Treg в контексте персонализированной терапии аутоиммунных заболеваний.

АФП - это транспортный белок, который доставляет питательные вещества через рецептор-опосредованный эндоцитоз в эмбриональные клетки. В принципе, АФП может являться естественным наноконтейнером для выбранных гидрофобных лигандов [4]. Однако, вопрос о том, насколько оправдана терапия ряда заболеваний с применением АФП до сих пор дискутируется, поскольку есть вероятность, что препарат может провоцировать рост опухолевых клеток при их наличии в организме. Невзирая на то, что показана эффективность применения АФП при ряде аутоиммунных и онкологических заболеваний, не существует четкой концепции, объясняющей механизм его иммуномодулирующего действия. Тем не менее, в перспективе именно транспортная функция АФП может стать востребованной в терапии ряда состояний [4].

Что касается препаратов ХГ, применять их как самостоятельные иммуномодуляторы нерационально из-за выраженного эффекта на уровне репродуктивных тканей. Тем не менее, существуют попытки применять короткие пептидные фрагменты этого белка как противовоспалительное средство [5].

При разработке фармакологических средств важно понимать, что эффекты фетоплацентарных белков зависят от их «правильного» гликозилирования, поскольку именно гликозирование определяет стереохимию взаимодействия белок-рецептор. Поэтому для внедрения таких препаратов в практику необходимо развитие рекомбинантных технологий на уровне клеточных линий млекопитающих, что позволит получить «работающую» конфигурацию молекулы. Помимо этого, стоит отметить, что довольно перспективен вариант применения пептидомиметиков на основе фетоплацентарных белков, которые при относительно простом синтезе могут имитировать эффект белковой молекулы.

Таким образом, использование иммуномодулирующих свойств фетоплацентарных белков, которые возникли в ходе эволюционного процесса, в перспективе может привести к созданию новых

лекарственным форм, применимых в терапии аутоиммунных заболеваний, а также в случае трансплантации органов и тканей.

Работа выполнена в рамках государственного задания, N госрегистрации темы: 01201353248.

Библиографический список

1. Dong M., Ding G., Zhou J., Wang H., Zhao Y., Huang H. The effect of trophoblasts on T lymphocytes: possible regulatory effector molecules--a proteomic analysis // *Cell Physiol. Biochem.* 2008, V. 21, N. 5-6.-P. 463-72.
2. Moldogazieva N.T., Mokhosoev I.M., Terentiev A.A. Pregnancy-Specific β 1-Glycoproteins: Combined Biomarker Roles, Structure/Function Relationships and Implications for Drug Design. // *Curr. Med. Chem.* 2017, V. 24, N. 3.-P. 245-267.
3. Ochanuna Z., Geiger-Maor A., Dembinsky-Vaknin A., Karussis D., Tykocinski M.L., Rachmilewitz J. Inhibition of effector function but not T cell activation and increase in FoxP3 expression in T cells differentiated in the presence of PP14. // *PLoS One.* 2010 V. 5, N.9. -P. e12868.
4. Pak V.N. The use of alpha-fetoprotein for the treatment of autoimmune diseases and cancer // *Ther. Deliv.* 2018, V.9, N. 1.-P.37-46.
5. Khan N.A., Benner R. Human chorionic gonadotropin: a model molecule for oligopeptide-based drug discovery // *Endocr Metab. Immune Disord. Drug Targets.* 2011, V. 11, N. 1.- P. 32-53

ОСОБЕННОСТИ КИНЕТИКИ РОСТА ШТАММОВ *LACTOBACILLUS* SPP.

Суслов Никита Сергеевич

ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава России, г.Пермь, Россия

Ключевые слова: *Lactobacillus* spp., кинетика роста, пробиотики

Лактобактерии являются наиболее многочисленными представителями микрофлоры кишечника, влагалища, полости рта человека, которые обычно не вызывают патологических процессов. Лактобациллы выполняют большую роль в поддержании нормального биоценоза данных органов за счет высокой конкуренции и антагонизма по отношению к патогенным и условно патогенным бактериям [1]. Защитные функции этих микроорганизмов объясняются способностью продуцировать перекись водорода и лизоцим. *Lactobacillus* spp.

обладают высокой адгезией к вагинальным эпителиоцитам, препятствующей колонизации патогенов и ограничивающей излишнюю пролиферацию условно патогенных бактерий [2]. Среди механизмов, обеспечивающих колонизационную резистентность вагинального биотопа, существенное место принадлежит кислотообразованию. Однако, изучению кинетики роста лактобактерий уделено мало внимания.

Цель исследования – изучение изменения кинетики роста штаммов *Lactobacillus* spp. при внесении в среду крахмала.

При проведении эксперимента использовали свежевыделенные пробиотические штаммы *Lactobacillus* spp., полученные из препарата Флороваг: *L. acidophilus*, *L. crispatus* и *L. brevis*, а также Лактобактерин – *L. plantarum*. Кроме этого в исследовании включили 5 штаммов, выделенных из вагинального биотопа. Для изучения кинетики роста тест-штаммы и питательные среды вносили в лунки плоскодонного полистиролового планшета. Для каждого штамма использовали лунки, содержащие МРС, а также лунки, где в МРС был добавлен крахмала в концентрации 0,4 мг/мл. Культивирование осуществляли в течении 72 часов при 37°C. Каждый час проводили измерение оптической плотности при длине волны 580 нм на планшетном фотометре. Статистический анализ результатов проводили с использованием методов описательной статистики, *t*-критерия Стьюдента.

В среде с крахмалом у всех штаммов лактобактерий изначально наблюдается некоторое снижение плотности бактериальной суспензии, что может быть обусловлено их частичной гибелью. В дальнейшем они адаптируются к условиям окружающей среды и начинают процесс деления, который в среднем занимает 9-17 часов.

Фаза логарифмического роста в МРС занимает больше всего времени у штаммов, полученных из препаратов Флороваг и Лактобактерин. Этот период продолжителен и у всех клинических штаммов. При добавлении в среду крахмала фаза логарифмического роста у клинических штаммов укорачивается, а у *L. plantarum* и *L. crispatus* увеличивается в два раза. За период наблюдения у всех штаммов стационарная фаза так и не началась.

При сравнении кинетики роста пробиотических и клинических штаммов *Lactobacillus* spp. в среде с добавлением крахмала, выявлено, что численность бактерий, полученных от пациентов, больше лишь в первые 24 часа культивирования - $1,071 \pm 0,019$ (пробиотические – $0,458 \pm 0,215$ у.е.; $p < 0,05$). В последующие часы объем биомассы всех штаммов выравнивается.

Обсуждение. *Lactobacillus* spp. являются важнейшим представителем нормофлоры человека, обеспечивая, благодаря симбиотическим отношениям, поддержание нормального функционирования макроорганизма. Кроме этого, данный род

микроорганизмов представляет собой перспективный источник получения препаратов, содержащих как сами лактобактерии, так и продукты их жизнедеятельности. Однако, без изучения кинетики роста решить ряд проблем невозможно. Так, например, в настоящем исследовании показана зависимость роста микроорганизмов от присутствия полимерного вещества – крахмала. Изначально при попадании в такую среду они испытывают стресс, часть из них погибает, а затем, адаптировавшись, успешно вступают в фазу логарифмического роста.

При сравнении кинетики роста пробиотических и клинических штаммов *Lactobacillus* spp. в среде с добавлением крахмала, нами было выявлено, что плотность бактерий, полученных от пациентов, больше лишь в первые 36 часов их жизнедеятельности. В последующие часы культивирования объем биомассы всех штаммов выравнивается. Это можно объяснить тем, что штаммы, полученные в клинических условиях, более адаптированы к условиям окружающей среды, и поэтому фаза логарифмического роста начинается быстрее.

Заключение. Таким образом, на рост лактобактерий оказывает существенное влияние источник их получения, наличие ряда питательных веществ в среде культивирования. Изучение особенностей роста штаммов может быть полезно при проведении модельных экспериментов, а в клинических условиях при проведении терапии пробиотическими препаратами.

Библиографический список

1. Годовалов А.П., Карпунина Т.И., Гушин М.О. Особенности межмикробных отношений в микробиоте влагалища инфертильных женщин // Медицинский академический журнал. – 2017. – Т. 17, № 4. – С. 53-54.
2. Усатых Е.А., Быкова Л.П., Годовалов А.П. Некоторые особенности биопленкообразования *Lactobacillus* spp. // Проблемы медицинской микологии. – 2016. – Т. 18, № 2. – С. 119.

СИНТЕЗ И ОЦЕНКА ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ А-СЕКОТРИТЕРПЕНОИДОВ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ

Толмачева Ирина Анатольевна¹, Галайко Наталья Владимировна¹,
Игошева Екатерина Викторовна¹, Конышева Анастасия
Владимировна¹, Назаров Алексей Витальевич¹, Крайнова Гульназ
Фаизовна¹, Еремин Владимир Федорович², Бореко Евгений Иванович²,
Гришко Виктория Викторовна¹

¹«Институт технической химии УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН,
г. Пермь, Россия

²РНПЦ эпидемиологии и микробиологии Минздрава РБ, г. Минск,
Республика Беларусь

Ключевые слова: тритерпеноиды, А-секотритерпеноиды,
противовирусная активность

Фрагментацией по Бекману А-цикла доступных производных бетулина (бетуллона, бетулоновой кислоты, ее метилового эфира и аллобетуллона) получены оригинальные 1,10-секо-, 2,3-секо- и 3,4-секотритерпеноиды (схема 1).

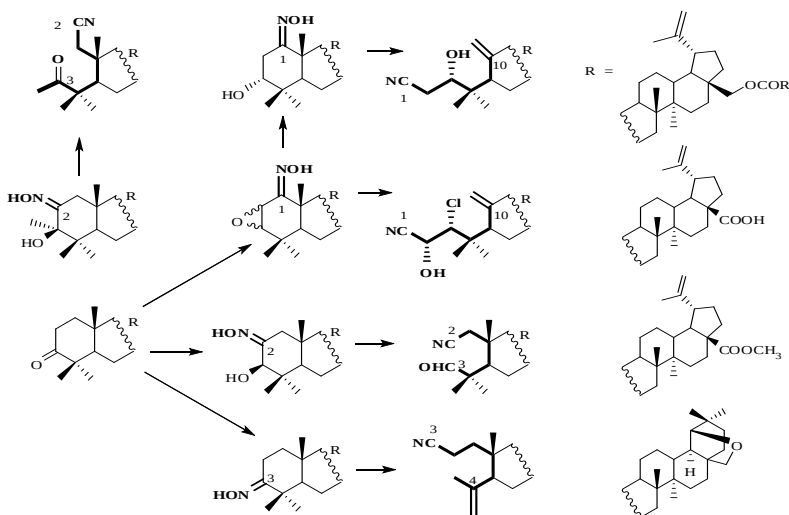


Схема 1.

© Толмачева И.А., Галайко Н.В., Игошева Е.В., Конышева А.В.,
Назаров А.В., Крайнова Г.Ф., Еремин В.Ф., Бореко Е.И.,
Гришко В.В., 2018

В результате направленной химической модификации базовых А-секотритерпеноидов синтезирован широкий спектр их моно- и бифункционализированных производных, а также продукты гетероциклизации и сужения А-цикла, среди которых выявлены соединения с высокой противовирусной (в том числе микробицидной) активностью в отношении вирусов ветряночного стоматита, гриппа, герпеса простого и ВИЧ-1 (схема 2).

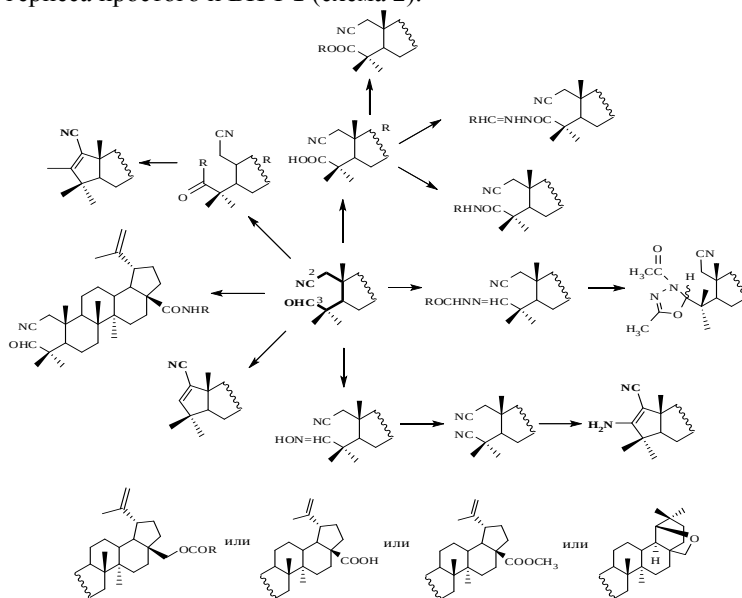


Схема 2.

Работа выполнена при финансовой поддержке Правительства Пермского края в рамках научного проекта № С-26/056.

МАГНИТНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ ДЛЯ ЯМР-АНАЛИЗА, ПОКРЫТЫЕ БИОСОВМЕСТИМЫМИ ПОЛИМЕРАМИ

Храмцов Павел Викторович^{1,2}, Раев Михаил Борисович^{1,2}, Кропанева Мария Дмитриевна¹, Бочкова Мария Станиславовна¹, Тимганова Валерия Павловна¹, Заморина Светлана Анатольевна^{1,2}

¹«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия

Ключевые слова: магнитные наночастицы, конъюгаты, ядерно-магнитный резонанс

Магнитные наночастицы используются в биомедицине как метки в *in vivo* и *in vitro* диагностике, носители ферментов-амплификаторов аналитического сигнала, хорошо известно их применение для концентрирования образцов при пробоподготовке в ходе анализов. Настоящая работа посвящена функционализации поверхности магнитных наночастиц состава железное ядро – углеродная оболочка (Fe@C) молекулами трех белков: бычьего сывороточного альбумина, казеина и желатина. Белковые молекулы обеспечивают коллоидную стабильность наночастиц, предоставляют функциональные группы, к которым можно ковалентно пришивать биомолекулы, обеспечивающие таргетное взаимодействие с необходимыми мишенями, а также расширяющие спектр функциональной активности наночастиц (например, флуорофоры, ферменты). Целью нашей работы является создание нанокомпозитов, которые могут быть использованы в *in vivo* и *in vitro* диагностике, в частности основанной на принципе ядерно-магнитного резонанса. Покрытие наночастиц биополимерами имеет существенное значение для применения *in vivo*, поскольку снижает их токсичность, улучшает агрегативную устойчивость в сыворотке крови и тканевой жидкости. С точки зрения применения магнитных наночастиц в лабораторной ЯМР-диагностике, покрытие поверхности наночастиц белками может приводить к улучшению чувствительности анализа путем увеличения релаксивности наночастиц. Известно, что казеин и желатин обладают способностью снижать способность молекул воды к диффузии, что является одним из механизмов повышения релаксивности наночастиц [1].

В ходе проведенных нами исследований мы функционализировали железоуглеродные наночастицы белками, оценили их коллоидную стабильность и влияние таких факторов как pH, ионная сила, концентрация сшивающего агента. Произведена оценка релаксивности наночастиц и сорбции белков сыворотки крови на их поверхности.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №17-15-01116).

Библиографический список

1. Cowger T.A., Tang W., Zhen Z., Hu K., Rink D.E., Todd T.J., Wang G.D., Zhang W., Chen H., Xie J. Casein-coated Fe₅C₂ nanoparticles with superior r₂ relaxivity for liver-specific magnetic resonance imaging // *Theranostics*. 2018. №11. С. 1225–1232.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВНУТРЕННЕЙ ПОВЕРХНОСТИ ПОЛИМЕРНОГО КАПИЛЛЯРА, МОДИФИЦИРОВАННОГО ИОННО-ПЛАЗМЕННЫМ МЕТОДОМ. ЧАСТЬ 1

Чудинов Вячеслав Сергеевич^{1,2}, Кондюрина Ирина Викторовна³,
Шардаков Игорь Николаевич¹, Терпугов Виктор Николаевич²,
Кондюрин Алексей Викторович⁴

¹*ФГБУН Институт механики сплошных сред УрО РАН, г. Пермь, Россия*

²*ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия*

³*Школа медицины, Университет Сиднея, г. Сидней, Австралия*

⁴*Школа физики, Университет Сиднея, г. Сидней, Австралия*

Ключевые слова: биосовместимость, сосудистый протез, полиуретан, ионно-плазменная обработка, карбонизированный слой

На сегодняшний день применение в области протезирования мягких тканей сердечно-сосудистой системы искусственных имплантатов несет ряд ограничений и проблем. Например, в ангиохирургии актуальным вопросом остается применение протезов вен и артерий малого диаметра, т.к. это может быть обусловлено дефицитом собственных сосудов для замещения пораженных участков [1]. Применение синтетических протезов приводит к тромбозу, поддержанию воспаления, гиперплазии неоинтимы и требует постоянной антикоагулянтной терапии [2].

При разработке искусственных медицинских гемосовместимых материалов для сердечно-сосудистых имплантатов необходимо учитывать механизм взаимодействия чужеродной поверхности с кровью на основе адсорбции белков [3].

Ранее в наших работах было показано, что модифицированный плазменно-ионной обработкой на установке с планарной геометрией электрода полиуретан содержит поверхностный карбонизированный слой толщиной около 50-70 нм и обладает активностью, что обеспечивается за счет наличия свободных радикалов. Высокая активность и гидрофильность модифицированного поверхностного слоя полимера обеспечивает стабильную адсорбцию белка на поверхности полиуретана с образованием ковалентной связи и с сохранением биологической активности адсорбированного протеина [4, 5].

Однако протезы сосудов являются имплантатами сложной формы с закрытыми полостями, которые не могут быть обработаны с помощью планарной геометрии электрода. В данной работе рассматривается капилляр внутренним диаметром 2 мм из медицинского полиуретана, используемого ранее в наших работах [4, 5], с обработанной внутренней поверхностью ионно-плазменным методом. Электрод располагался вокруг капилляра, в котором создавалось повышенное давление относительно всего вакуумного реактора с помощью подводящей трубки от газового вакуумного ввода, соединённого с баллоном с азотом.

Результат обработки ионами азота высокой энергии внутренней поверхности капилляра наблюдался по спектрам микро-ИК МНПВО. Спектры регистрировались на спектрометре Bruker Vertex со спектральным микроскопом. Использовался детектор МСТ охлажденный жидким азотом.

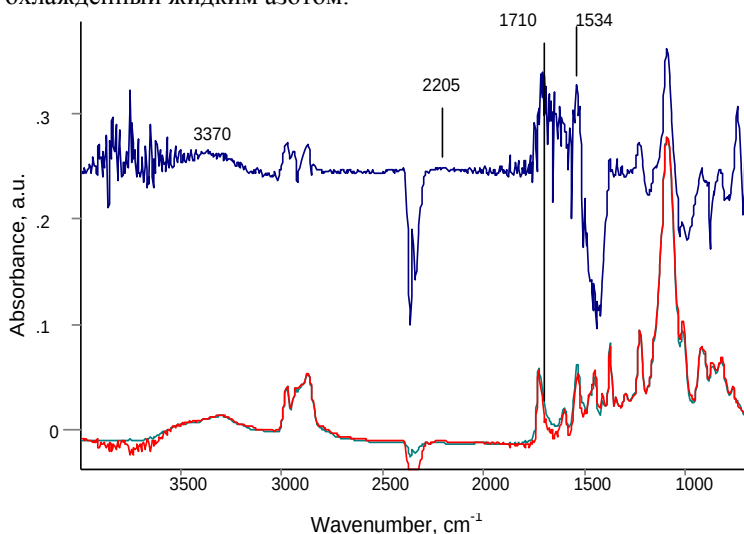


Рисунок. Спектр микро-ИК МНПВО внутренней поверхности полиуретанового капилляра обработанного ионами азота с энергией 12 кВ (снизу, красный спектр). Для сравнения приведен спектр внутренней поверхности необработанного капилляра (снизу, зеленый). Разностный спектр приведен для детального анализа (сверху, синий)

На рисунке в разностном спектре видны широкая линия с центром 3370 см⁻¹ колебаний гидроксильной и аминной групп, широкая полоса в области 1750-1600 см⁻¹ колебаний двойных связей C=O, C=N и C=C, а также 1534 см⁻¹ колебаний аминной группы. Спектры показали карбонизацию, окисление и аминирование внутренней поверхности капилляра в результате ионной обработки такое же, как это

наблюдалось ранее для пленок полиуретана и других полимеров в планарной геометрии [4].

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект №16-48-590767_р_Урал_а) и субсидии (гранта) Пермского края (соглашение № С-26/057 от 11 марта 2016 г.).

Библиографический список

1. Veith F.J., Moss C.M., Sprayregen S., Montefusco C. Preoperative saphenous venography in arterial reconstructive surgery of the lower extremity // Surgery. 1979. Vol. 85. № 3. P. 253–256.

2. Попова И.В., Степанова А.О., Сергеевичев Д.С. и др. Сравнительное исследование трех типов протезов, изготовленных методом электроспиннинга в эксперименте in vitro и in vivo // Патология кровообращения и кардиохирургия. 2015. Т. 19. № 4. С. 63–71

3. Биосовместимость / Под ред. В.И. Севастьянова. М.: ИЦ ВНИИгеосистем, 1999.

4. В.С. Чудинов, И.В. Кондюрина, И.Н. Шардаков и др. Полиуретан для медицинского применения, модифицированный плазменно-ионной обработкой // Биофизика. 2018. Т : 63, № 3. - С. 444-454.

5. И.В. Кондюрина, В.С. Чудинов, В.Н. Терпугов, А.В. Кондюрин Химическая пришивка альбумина на поверхность полиуретанового имплантата, модифицированного ионным пучком // Медицинская техника. 2018. №4, с. 19-21.

ИССЛЕДОВАНИЕ АДСОРБЦИИ БЕЛКА ТРОПОЭЛАСТИНА НА ВНУТРЕННЕЙ ПОВЕРХНОСТИ ПОЛИМЕРНОГО КАПИЛЛЯРА, МОДИФИЦИРОВАННОГО ИОННО- ПЛАЗМЕННЫМ МЕТОДОМ. ЧАСТЬ 2

Чудинов Вячеслав Сергеевич^{1,2}, Кондюрина Ирина Викторовна³,
Шардаков Игорь Николаевич¹, Терпугов Виктор Николаевич²,
Кондюрин Алексей Викторович⁴

¹ФГБУН Институт механики сплошных сред УрО РАН, г. Пермь, Россия

²ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия

³Школа медицины, Университет Сиднея, г. Сидней, Австралия

⁴Школа физики, Университет Сиднея, г. Сидней, Австралия

© Чудинов В.С., Кондюрина И.В., Шардаков И.Н., Терпугов В.Н.,
Кондюрин А.В., 2018

Ключевые слова: биосовместимость, сосудистый протез, полиуретан, ионно-плазменная обработка, карбонизированный слой

Применение сосудистых протезов малого диаметра в современной ангиохирургии остается актуальным вопросом, по одной из причин, возможного дефицита собственных сосудов для замещения пораженных участков вен и артерий [1]. Применение искусственных имплантатов приводит к тромбозу, протеканию воспаления, гиперплазии неоинтимы и требует постоянной терапии антикоагулянтами [2].

При разработке искусственных медицинских кардиоваскулярных имплантатов, обладающих необходимой гемосовместимостью, требуется учитывать высокую роль адсорбции белков в механизме взаимодействия инородной поверхности материала с кровью пациента [3].

В наших предыдущих работах было показано, что после обработки ионно-плазменным методом на установке с планарной геометрией электрода полиуретан содержит поверхностный карбонизированный слой толщиной около 50-70 нм, за счет обогащения свободными радикалами в ходе обработки, обладает высокой активностью. Гидрофильность и высокая активность модифицированного поверхностного слоя полиуретана обеспечивает стабильную адсорбцию белка на поверхности полимера с образованием ковалентной связи и с сохранением биологической активности адсорбированного протеина [4, 5].

В данной работе рассматривается капилляр внутренним диаметром 2 мм из медицинского полиуретана, используемого ранее в наших работах [4, 5], с обработанной внутренней поверхностью ионно-плазменным методом. Электрод располагался вокруг капилляра, в котором создавалось повышенное давление относительно всего вакуумного реактора с помощью подводящей трубки от газового вакуумного ввода, соединённого с баллоном с азотом.

Активность внутренней поверхности полиуретана связывать белок была проверена нанесением белка тропоэластина в буферном растворе, введением его в капилляры без и после обработки. После этого капилляры промывались буферным раствором и деионизированной водой для удаления солей буферного раствора и сушились в течение суток на воздухе. Далее регистрировались спектры ИК МНПВО внутренней поверхности капилляров.

В разностных спектрах обработанного и необработанного полиуретана (Рисунок) наблюдаются линии Амид 1 и Амид 2, относящиеся к колебаниям белковой молекулы тропоэластина. Интенсивность линий белка в спектре обработанного полиуретана намного выше, чем в спектре необработанного полиуретана.

Интенсивность линий Амид 1 и 2 очень низкая на фоне естественного шума спектра и близка по порядку величины к монослою белка на поверхности обработанного полиуретана. Такая же разница в адсорбции белка наблюдалась ранее для плоских образцов полиуретана. Таким образом, обработка внутренней поверхности капилляра обеспечила способность связывать белок на поверхности, как это наблюдалось для плоских образцов [4].

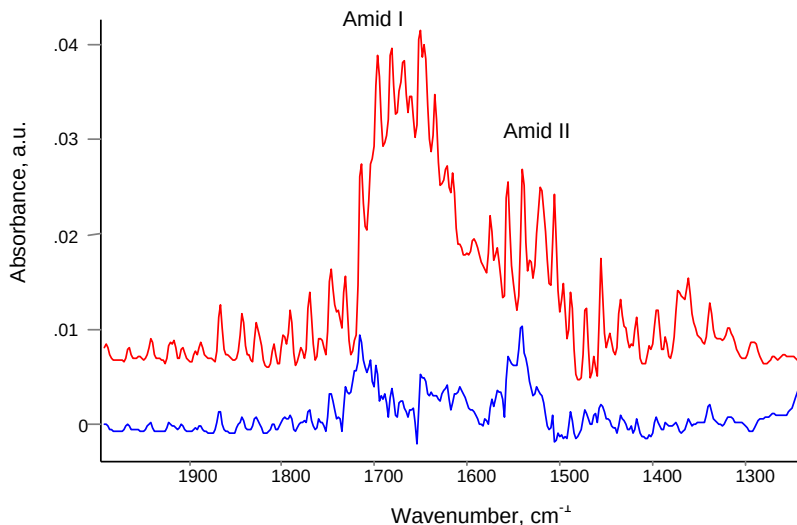


Рисунок. Спектры микро-ИК МНПВО внутренней поверхности полиуретанового капилляра с нанесенным монослоем белка тропозластина. Спектры контрольных образцов выдержанных в буферном растворе без белка вычтены. Красный спектр соответствует полиуретану, обработанному ионами азота с энергией 12 кВ. Синий спектр соответствует необработанному полиуретану. Показана только область колебаний белковой молекулы Амид 1 и 2

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект №16-48-590767_p_Урал_a) и субсидии (гранта) Пермского края (соглашение № С-26/057 от 11 марта 2016 г.).

Библиографический список

1. Veith F.J., Moss C.M., Sprayregen S., Montefusco C. Preoperative saphenous venography in arterial reconstructive surgery of the lower extremity // Surgery. 1979. Vol. 85. № 3. P. 253–256.
2. Попова И.В., Степанова А.О., Сергеевичев Д.С. и др. Сравнительное исследование трех типов протезов, изготовленных

методом электроспиннинга в эксперименте in vitro и in vivo // Патология кровообращения и кардиохирургия .2015. Т. 19. № 4. С. 63–71

3. Биосовместимость / Под ред. В.И. Севастьянова. М.: ИЦ ВНИИГеосистем, 1999.

4. В.С. Чудинов, И.В. Кондюрина, И.Н. Шардаков и др. Полиуретан для медицинского применения, модифицированный плазменно-ионной обработкой // Биофизика. 2018. Т : 63, № 3. - С. 444-454.

5. И.В. Кондюрина, В.С. Чудинов, В.Н. Терпугов, А.В. Кондюрин Химическая пришивка альбумина на поверхность полиуретанового имплантата, модифицированного ионным пучком // Медицинская техника. 2018. №4, с. 19-21.

ВЛИЯНИЕ ОСТРОГО И ХРОНИЧЕСКОГО ХОЛОДОВОГО СТРЕССА НА ОКИСЛИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГОВ МЫШИ В УСЛОВИЯХ БЛОКАДЫ ОПИАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

Шаравьева Ирина Леонидовна¹, Гейн Сергей Владимирович^{1,2},
Тендрякова Светлана Петровна^{1,2}

¹«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия

²ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия

Ключевые слова: холодовой стресс, макрофаги, хемилюминесценция, налоксон

В процессе развития стресс-реакции, обусловленной действием низких температур окружающей среды, отмечаются изменения характерные для процесса адаптации в целом. В периферической крови повышаются уровни адреналина и норадреналина, глюкокортикоидов, катехоламинов, эндогенных опиоидных пептидов [1].

В адаптации организма к низким температурам важную роль играет эндогенная опиоидная система. Эффекты холодового воздействия, такие как анальгезия, терморегуляция модуляция иммунного ответа опосредуются через изменения в функционировании опиоидной системы [2, 3].

Под действием низких температур также отмечаются изменения в функционировании иммунной системы. В результате действия

острого холодового стресса может наблюдаться как активация, так и угнетение отдельных функций клеток иммунной системы, а также состояния иммунного ответа в целом.

Цель работы – исследовать влияние острого и хронического переохлаждения на продукцию активных форм кислорода перитонеальными макрофагами в условиях блокады опиатных рецепторов у мышей *in vivo*.

Объектом исследования служили белые мыши самцы массой тела 20-22 г. Животных содержали в условиях лабораторного вивария при естественном освещении, неограниченном доступе к воде и кормам. Эксперименты проведены в соответствии с этическими нормами и рекомендациями по гуманизации работы с лабораторными животными, отраженными в «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

В работе использовали два варианта холодового стресса – острый и хронический. В первом случае мышей охлаждали при 4°C в течение 4 часов однократно, во втором – по той же схеме 7 раз в день на протяжении 7 сут. Антагонист опиатных рецепторов налоксона гидрохлорид вводили в дозе 0,2 мг/кг подкожно за 20 мин до охлаждения и повторно через 3 час от первого введения. Все животные были разбиты на следующие группы: 1-я – контрольная, 2-я – стресс (острое или хроническое переохлаждение), 3-я – стресс на фоне налоксона, 4-я – введение одного налоксона. Клетки перитонеального смыва выделяли по стандартной методике.

Оценку продукции активных форм кислорода (АФК) перитонеальными макрофагами осуществляли с использованием реакции люминолзависимой хемилюминесценции (ЛХЗЛ). В качестве индуктора ЛХЗЛ использовали опсонизированный зимозан в концентрации 150 мкг/мл. В качестве маркера выраженности реакции ЛХЗЛ использовался люминол 10⁻⁵М (Sigma). Регистрация результатов проводилась в течение часа с интервалом в 5 мин с помощью многофункционального спектрофотометра TECAN (Австрия).

Статистическая обработка результатов проведена с использованием непарного t-критерия Стьюдента для межгруппового сравнения.

При оценке влияния острого холодового стресса (на протяжении 4-х часов при 4°C), а также стресса на фоне блокады опиатных рецепторов не отмечалось изменения продукции активных форм кислорода в спонтанных культурах перитонеальных клеток.

В стимулированных зимозаном культурах острое переохлаждение оказывало угнетающее воздействие на динамику кислородного взрыва на всем протяжении наблюдения. На фоне

блокады опиатных рецепторов угнетение продукции АФК отмечалось с 20 минуты наблюдения.

Хронический холодовой (4°C , 4 часа на протяжении 7 сут) стресс не оказывал влияния на спонтанную продукцию АФК перитонеальными макрофагами мыши. В стимулированных зимозаном культурах под действием хронического холодowego стресса происходит усиление продукции АФК с 15 по 60 минуту исследования. В 3-й группе животных, при воздействии хронического холода на фоне блокады опиатных рецепторов отмечается усиление кислородзависимой микробицидности с 10 по 25 минуту исследования, что всвидетельствует о том, что блокада опиатных рецепторов приводила к частичной отмене эффектов холодowego стресса на продукцию АФК макрофагами.

Таким образом, можно отметить модулирующее действие холодowego стресса на функции макрофагов, данное воздействие может приводить как к стимуляции, так и к угнетению окислительной активности макрофагов. Эндогенная опиоидная система принимает важное участие в регуляции функций макрофагов при переохлаждении.

Работа выполнена в рамках целевой программы AAA-A18-118030790046-9.

Библиографический список

1. McEwen B.C., Wingfield J.C., 2011. What's in a name? Integrating homeostasis, allostasis and stress. V. 57. №2. P. 1-16.
2. Suckow M.A., Terril L.A., Grigdesby C.F., March P.A. Evaluation of Hypothermia-Induced Analgesia and Influence of Opioid Antagonists in Leopard Frogs (*Rana pipiens*) // Pharmacology Biochemistry and Behavior. 1999. V. 63(1). P. 39–43.
3. Salmi P., Kela J., Arvidsson U., Wahlestedt C. Functional interactions between δ - and μ -opioid receptors in rat thermoregulation // European Journal of Pharmacology. 2003. V. 458(1–2). P. 101-106.

ИНТЕГРАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРОЛИФЕРАТИВНОГО ОТВЕТА ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ВТОРИЧНОЙ ИММУННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ С ПОМОЩЬЮ МАТРИЧНОГО МЕТОДА

Шилов Станислав Юрьевич^{1,2}, Шилова Наталья Александровна^{1,2},
Шилов Юрий Иванович^{1,2}, Рыжаенков Вадим Геннадьевич¹, Черникова
Ирина Александровна^{1,2}

*¹«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» –
филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия*

*²ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет
им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава России, г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: пролиферативный ответ лимфоцитов, иммунная
недостаточность

Исследование пролиферативного ответа лимфоцитов в культурах с митогенами является одним из основных методов клинической иммунологии. Однако высокая индивидуальная вариабельность результатов затрудняет их интерпретацию. В этом плане перспективен матричный метод, позволяющий оценить не только групповые, но и индивидуальные изменения показателей, а также степень их выраженности по интегральным индексам [1, 2].

Цель исследования – анализ информативности применения интегральной оценки показателей пролиферативного ответа лимфоцитов при вторичной иммунной недостаточности с помощью матричного метода

Проведен анализ ранее полученных результатов иммунологического обследования пациентов с вторичной иммунной недостаточностью, развивающейся в условиях вирусной инфекции при клещевом энцефалите (КЭ), а также при злокачественных опухолях женской половой сферы преимущественно 1-й стадии, не подвергавшихся до исследования хирургическим методам лечения, химиотерапии или лучевой терапии. Пролиферативный ответ лимфоцитов оценивали в культурах с фитогемагглютинином-П (ФГА) в среде 199 с добавлением 2 мМ L-глутамина, 10 мМ HEPES, 100 мкг/мл гентамицина и 10% аутоплазмы (2×10^5 клеток на лунку круглодонного 96-луночного планшета, общий объем культуры 200 мкл). Через 48 ч культивирования при 37°C в атмосфере 5% CO₂ вносили по 1 мкКи ³H-метилтимидина (Радиевый Институт им. В.Г. Хлопина, С.-Петербург). Уровень пролиферации оценивали через 72 ч после осаждения клеток на мембранные фильтры

Супрог и подсчета числа импульсов на жидкостном сцинтилляционном счетчике Wallac 1414 (Финляндия, США).

В дополнении к стандартным методам статистики использовали матричный метод оценки иммунного статуса [1, 3, 4]. Первоначально проводили нормирование показателей контрольной группы по формуле: $N_p = (X_p - M) / SD$, где N_p - нормированное значение, X_p - действительная величина показателя у данного обследуемого, M - средняя арифметическая, SD - стандартное отклонение. Затем рассчитывали нормированные показатели больных по приведенной выше формуле, но в качестве M и SD использовали соответствующие величины контрольной группы. В результате величину показателя у каждого больного выражали в виде положительных и отрицательных стандартизованных величин, кратных стандартному отклонению от средней арифметической нормированного показателя контрольной группы. Доверительный интервал для нормированных показателей рассчитывали по формуле: $M \pm m * t / SD$, где M - средняя арифметическая контрольной группы (принимая после нормирования значение, близкое к нулю), m - стандартная ошибка средней, t - табличное значение t -критерия Стьюдента. Дополнительно рассчитывали суммарный индекс ответа на митоген - среднюю арифметическую нормированных значений показателей $\log_{10}$ имп · мин⁻¹ для всех культур с ФГА. При оценке выраженности степени изменения параметра у больного или в группе его считали слабым при отклонении от границ доверительного интервала (при $p < 0,05$) до $\pm 1,00$, выраженным - при отклонении в интервале более $\pm 1,00$ до $\pm 2,00$, резко выраженным - при отклонении более $\pm 2,00$.

При анализе результатов традиционными методами описательной статистики установлено, что при самой тяжелой (очаговой) форме КЭ наблюдается глубокая супрессия бласттрансформации лимфоцитов со сдвигом оптимума концентрации митогена в сторону более высоких концентраций. Менее выраженное, но статистически значимое угнетение пролиферативного ответа отмечается при менингеальной форме, т.е. выявляется прямая взаимосвязь между тяжестью клещевого энцефалита и выраженностью угнетения Т-клеточного пролиферативного ответа. Рассчитанные с помощью матричного метода нормированные показатели пролиферативного ответа лимфоцитов резко снижены при очаговой форме КЭ. При менингеальной форме также отмечается выраженное снижение нормированных показателей пролиферативного ответа лимфоцитов при всех концентрациях ФГА. Суммарный индекс ответа на митоген резко снижен при обеих формах КЭ. Показана возможность индивидуальной оценки выраженности супрессии пролиферации лимфоцитов при КЭ и злокачественных новообразованиях женской половой сферы по нормированным показателям, кратным стандартному

отклонению от средних контрольной группы. Для интегральной оценки изменений пролиферативного ответа лимфоцитов информативен расчет не только показателей зависимости доза-эффект от концентрации ФГА, но и суммарного индекса ответа на митоген.

Работа выполнена в рамках государственного задания «ИЭГМ УрО РАН», номер госрегистрации темы: 01201353248.

Библиографический список

1. Златев С.П., Димитров И.Д. Анализ и оценка иммунного статуса при помощи матричного статистического метода // Иммунология. – 1991. – № 2. – С. 46-49.
2. Zlatev S., Dimitrov I. A methodological approach for integral assessment of the immune status // Folia Med. (Plovdiv). – 1993. – Vol. 35(1-2). – P. 45-51.
3. Черешнева М.В., Шилов Ю.И., Баданина О.Н., Черешнев В.А., Кеворков Н.Н., Пономарева Т.Б., Шилов С.Ю. Иммунокоррекция при ранении глаза. – Екатеринбург: УрО РАН, 2001. – 148 с. ISBN 5-7631-1101-1.
4. Черешнева М.В., Шилов Ю.И., Черешнев В.А., Кеворков Н.Н., Шилов С.Ю., Бусырева В.Н. Иммунологические нарушения и их иммунокоррекция при проникающем ранении глаза // Аллергология и иммунология. – 2000. – Т. 1, № 3. – С. 49-60.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ЗИМОЗАНОВОГО ПЕРИТОНИТА У КРЫС И ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В НЕЙРОИММУНОЛОГИИ И ФАРМАКОЛОГИИ

Шилов Юрий Иванович^{1,2}, Шилов Станислав Юрьевич^{1,2},
Туляев Ярослав Александрович¹, Барков Сергей Юрьевич^{1,2},
Шилова Наталья Александровна²

¹*«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия*

²*ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава России, г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: воспаление, стресс, бета-адренорецепторы, надолол, дегидроэпиандростерон

Зимозановый перитонит (ЗП) как экспериментальная модель острого

стерильного воспаления в настоящее время начинает привлекать внимание все большего числа исследователей, т.к. отличается воспроизводимостью и отражает развитие всех основных событий при воспалении. Так, в PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) при поиске на ключевые слова «zymosan peritonitis» на 24 августа 2018 г. найдено 380 публикаций (первая публикация датируется 1977 г.), из них в 2014-2018 гг. опубликовано 88 статей. Зимозан как нерастворимый полисахарид клеточной стенки грибов *Saccharomyces cerevisiae* является классическим патогенассоциированным молекулярным паттерном (PAMP, англ. pathogen-associated molecular pattern), который взаимодействует с паттернраспознающими рецепторами: дектином-1 (бета-глюканраспознающий рецептор), TLR2, а также активирует белки системы комплемента по альтернативному механизму, что и приводит к развитию острого воспалительного ответа [1, 2]. Хотя экспериментальная модель ЗП широко используется для оценки противовоспалительного действия новых лекарственных средств, в большинстве работ авторы часто ограничиваются оценкой лишь количества клеток в экссудате без оценки их функций, только в единичных работах эта модель применяется для выяснения патогенеза заболеваний, например сахарного диабета [3]. Учитывая ведущую роль фагоцитирующих клеток как основных эффекторов при развитии воспаления, дальнейшее расширение возможностей экспериментальной модели ЗП представляется нам в обосновании необходимости дифференцированной оценки функций фагоцитов, в том числе с использованием современных инструментальных методов.

Цель работы – совершенствование экспериментальной модели зимозанового перитонита у крыс и оценка возможности ее использования в экспериментальной нейроиммунологии и фармакологии.

В первой серии исследований на нелинейных крысах-самцах оценивали динамику изменения количественного состава фагоцитирующих клеток перитонеального экссудата, крови и костного мозга, их поглотительной активности, ацидификации фагосом по интенсивности свечения поглощенного зимозана, меченого pH-сенситивным флуорохромом зеленым pHrodo™, кислородзависимой микробицидности в реакции люминолзависимой хемилюминисценции (ЛЗХЛ). Для индукции перитонита животным вводили стерильную суспензию зимозана А внутривентриально в дозе 50 мг/кг массы тела. Животных выводили из эксперимента через 4, 12, 21 и 72 ч. Во второй серии исследовали влияние острого стресса на эти же показатели при 21-часовом перитоните в условиях введения антагониста периферических бета-адренорецепторов надолола. Для моделирования общего адаптационного синдрома использовали модель 24-часового иммобилизационного стресса в сочетании с дозированной кровопотерей. Для фармакологической блокады периферических бета-

адренорецепторов за 30 мин до начала иммобилизации животным вводили внутривенно 0,25 % раствор надолола (Sigma-Aldrich, США) в дозе 5 мг/кг массы тела однократно. В третьей серии исследовали изменения вышеперечисленных показателей в условиях 12-часового перитонита при старении самцов крыс и регуляторного воздействия дегидроэпиандростерона у старых животных. Дегидроэпиандростерон (DHEA, Sigma-Aldrich, США) вводили старым животным (старше 1,5 лет) подкожно через день (всего 4 инъекции по 2 мг/кг массы тела, последнее введение за 24 ч до конца эксперимента).

Установлено, что максимальная выраженность активации фагоцитирующих клеток отмечается через 12 ч от начала воспаления. Клетки перитонеального смыва в этот срок представлены преимущественно нейтрофильными гранулоцитами. Фагоцитоз введенного зимозана *in vivo* в этот срок еще не закончен. Через 21 и 72 ч наблюдается увеличение в экссудате количества перитонеальных макрофагов (при этом через 21 ч в экссудате сохраняется повышенный уровень нейтрофилов, который через 72 ч не отличается от исходного уровня). Острый стресс приводит к статистически значимому снижению показателей ЛЗХЛ, а введение надолола в условиях стресса отменяет этот эффект. Полученные результаты указывают на важную роль сигнала с периферических бета-адренорецепторов, функциональная экспрессия которых повышается при стрессе под действием глюкокортикоидов, в супрессии воспалительной мобилизации фагоцитирующих клеток при развитии зимозанового перитонита. У старых самцов крыс в сравнении с молодыми отмечается усиление воспалительного ответа через 12 ч после индукции зимозанового перитонита. При введении DHEA старым крысам выявлен выраженный противовоспалительный эффект.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-44-590995 и Администрации Пермского края, а также в рамках государственного задания «ИЭГМ УрО РАН», номер госрегистрации темы: 01201353248.

Библиографический список

1. Cash, J.L., White, G.E., Greaves, D.R. Zymosan-induced peritonitis as a simple experimental system for the study of inflammation // *Methods Enzymol.* – 2009. – Vol. 461. – P. 379-396.
2. Mizuno M., Ito Y., Hepburn N., Mizuno T., Noda Y., Yuzawa Y., Harris C.L., Morgan B.P., Matsuo S. Zymosan, but not lipopolysaccharide, triggers severe and progressive peritoneal injury accompanied by complement activation in a rat peritonitis model // *J. Immunol.* – 2009. – Vol. 183 (2). – P. 1403-1412.
3. Niu S., Bian Z., Tremblay A., Luo Y., Kidder K., Mansour A., Zen K., Liu Y. Broad infiltration of macrophages leads to a proinflammatory state in streptozotocin-induced hyperglycemic mice // *J. Immunol.* – 2016. – Vol. 197 (8). – P. 3293-3301.

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Andreeva D., 31

Cunningham C.J., 22

Erdani Kreft M., 35

Gavrin A., 29

Gizatullina Y.S.,
(Гизатуллина Ю.С.), 181, 221,
230

Glebov G., 30

Henriquez F., 33

Ivshina I.,
(Ившина И.Б.), 30, 31, 60, 62,
119, 137

Keše D., 35

Knapp C., 33

Kolesova O.V.,
(Колесова О.В.), 20, 81

Kuzyukina M.,
(Куюкина М.С.), 30, 31, 62
Kuznetsova M.V.,
(Кузнецова М.В.), 89, 145, 181,
230

Lalande E., 30

Maslennikova I.L.,
(Масленникова И.Л.), 145, 181,
230, 235

Peshkur T., 33, 34

Phoenix V., 34

Predojević L., 35, 230

Rodgers K., 33

Sandalli S., 31

Schornack S., 29

Simonetti G., 20

Starčić Erjavec M., 35, 181, 230

Tonner R., 33

Žgur-Bertok D., 35, 181

Ананьина Л.Н., 37, 39

Аношкин А.Н., 148

Антонян А.А., 206

Ахова А.В., 115, 183

Багаутдинова Н. А., 185

Бажутин Г.А., 41

Бакиева Э.Р., 119

Барков С.Ю., 276

Безматерных К.В., 43

Белов В.Г., 150

Беляев А.Ю., 162

Беляева П.Г., 46

Бобылев Ю.М., 206

Боков К.А., 154

Большагин Н.Н., 151, 172, 178

Бореко Е.И., 26, 228, 263

Боталова К.И., 48

Бочаров Г.А., 192

Бочкова М.С., 187, 216, 256, 264

Бузмакова Г.В., 159

Бузмакова М.М., 154, 156

Вавилов Н.В., 201

Валиева Ю.В., 190

Васильева Ю.С., 140

Вихарева Е.В., 130

Воронина А.О., 52

Воронков А.А., 175

Гаврилов Д.В., 198

Гаврилова А.Ю., 192

Гаврилова Т.В., 218

Газатова Н.Д., 198

Галайко Н.В., 263

- Гаришин О.К., 162
 Гейн О.Н., 218
 Гейн С.В., 218, 271
 Гилев В.Г., 156, 162, 167
 Глебездина Н.С., 195
 Годовалов А.П., 201, 203, 211
 Гончаров А.Е., 55
 Горбунов, А.А., 37
 Горбунова Е.А., 206,
 Горбунова О.Л., 208, 243
 Гришко В.В., 137, 213, 226, 228,
 238, 241, 263
 Гуцин М.О., 211
- Дегтярев В.В., 150
 Демаков В.А., 86, 221
 Демидова М.И., 110
 Дубовикова Ю.А., 110
- Егорова Д.О., 57, 91
 Елькин А.А., 60
 Еремин В.Ф., 22, 228, 263
 Ерошенко Д.В., 72, 103, 213, 238,
 241
- Жукова А.Е., 226, 238
 Жуланов А.А., 140
- Загуляева И.Ю., 62
 Заморина С.А., 187, 216, 256,
 258, 264
 Зорина А.С., 64
- Игошева Е.В., 263
 Истомина А.В., 74
- Кадочникова Я.А., 218
 Каримова Н.В., 221
 Карпунина Т.И., 201, 203, 211
 Кашапова Л.Э., 67
 Кашеварова Н.М., 69, 117, 127
 Кириченко Л.В., 89
 Кнутова Н.С., 174
 Колегов Р.Н., 151, 172, 178
- Комар Л.А., 223
 Кондюрин А.В., 167, 266, 268
 Кондюрина И.В., 266, 268
 Кононова Л.И., 253
 Конышева А.В., 213, 226, 228,
 263
 Коробов В.П., 72, 98, 103, 253
 Коромыслов Е.В., 174
 Корсакова Е.С., 67, 74
 Крайнова Г.Ф., 213, 228, 263
 Кропанева М.Д., 256, 264
 Куклина Е.М., 233
 Кустов О.Ю., 164
- Лемкина Л.М., 72
 Литасова А.С., 76, 78, 81
 Литвиненко Л.В., 119
 Литвинова Л.С., 198, 216
 Логинова Н.П., 251
 Логинова О.А., 248, 251
 Лучникова Н.А., 137
- Максимов А.Ю., 76, 78, 81, 84,
 108, 110, 142
 Максимова Ю.Г., 64, 84, 86, 142
 Маммаева М.Г., 89
 Митракова Н.В., 100
 Мочалова Е.М., 86
 Мулазянова Э.Э., 84
- Назаров А.В., 238, 263
 Назаров М.А., 241
 Назарова Э.А., 91
 Негорелова Е.В., 94
 Некрасова Е.В., 76
 Некрасова И.В., 190, 208, 243
 Нестерова Л.Ю., 94, 96, 135, 230
 Николаева Н.В., 203
- Октябрьский О.Н., 43, 112, 124
 Орлова Е.Г., 245, 248, 251
 Отинов Г.Д., 98

- Павлова Ю.А., 78, 81
 Пахоруков И.В., 100
 Пеленев К.А., 175
 Пестренин В.М., 159
 Пестренина И.В., 159
 Пименова Е.В., 105
 Писарев П.В., 148
 Плотникова Е.Г., 52, 67, 74, 185
 Полюдова Т.В., 72, 103, 105
 Попов Л.А., 60
 Попова И.В., 105
 Пришневская Я.В., 140
 Проскурнова Ю.Н., 211
 Пьянков И.А., 253
 Пьянкова А.А., 37, 67

 Раев М.Б., 187, 216, 256, 258, 264
 Ремезовская Н.Б., 108, 110
 Русаков С.В., 156, 159, 167, 169
 Рыжаенков В.Г., 274
 Рычкова М.И., 130

 Савинова О.В., 26
 Самойлова З.Ю., 43, 112
 Свистков А.Л., 162, 167
 Секацкая П.А., 115
 Селянинов А.А., 130
 Семёнов В.А., 169
 Сидоров Р.Ю., 117, 127
 Синер А.А., 150, 151, 172, 174, 178
 Смирнова Г.В., 43, 112, 124
 Смоляк А.А., 253
 Соломенный А.П., 55
 Сперанская В.Н., 203
 Стед Т., 62
 Суслов Н.С., 260

 Тендрякова С.П., 271
 Терпугов В.Н., 266, 268
 Тимганова В.П., 187, 216, 256, 264
 Тихонова А.А., 175

 Тищенко А.В., 119
 Ткаченко А.Г., 69, 94, 96, 115, 117, 127, 135, 183
 Тодосенко Н.М., 216
 Толмачева И.А., 213, 238, 241, 263
 Трапезников Я.П., 121
 Тудвасева М.С., 62
 Туляев Я.А., 276
 Тюмина Е.А., 41

 Ушаков В.Ю., 124

 Федотов Е.С., 164
 Филатова Л.Б., 98

 Хаова Е.А., 127
 Храмцов И.В., 164
 Храмцов П.В., 187, 216, 256, 264
 Хренков А.Н., 130

 Цещинская Е.М., 133
 Цыганов И.В., 135

 Черемных К.М., 137
 Черешнев В.А., 5, 192, 216
 Черешнева М.В., 5
 Черникова И.А., 274
 Чертов Н.В., 140
 Четина О.А., 48
 Чудинов В.С., 167, 266, 268

 Шадрина К.С., 216
 Шаравьева И.Л., 271
 Шардаков И.Н., 266, 268
 Шерстобитова Н.П., 89, 145
 Шестакова Е.А., 37, 39
 Шестакова К.Н., 175
 Шехмаматьев Р.М., 251
 Шилов С.Ю., 274, 276
 Шилов Ю.И., 201, 274, 276
 Шилова А.В., 78, 81, 142
 Шилова Н.А., 274, 276

Шипунов Г.С., 175
Ширшев С.В., 208, 243, 248, 251
Шишкин М.А., 89, 145
Шкляев Ю.В., 253
Шуваев Н.В., 151, 172, 178
Шумков М.С., 127

Щеголев С.Ю., 11

Юрова К.А., 198

Ястребова О. В., 185

СОДЕРЖАНИЕ

ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ

ЭКОЛОГИЯ И ПАТОЛОГИЯ

Черешнев В.А., Черешнева М.В. 5

О БИОРАЗНООБРАЗИИ ПРОКАРИОТ И ОСОБЕННОСТЯХ ЕГО ТАКСОНОМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Щеголев С.Ю. 11

MICROBIAL BIOFILMS: STRUCTURE AND FUNCTIONAL FEATURES, APPLICATION IN BIOCATALYTIC PROCESSES AND INDUSTRIAL WASTE DISPOSAL PROCESSES

Simonetti G., Kolesova O.V. 20

AN EXPERT EVALUATORS GUIDE TO WRITING A SUCCESSFUL FUNDING PROPOSAL

Cunningham C.J. 22

ГЕНОТИПЫ/ПОДГЕНОТИПЫ/ПОДТИПЫ И МУТАЦИИ В ГЕНОМЕ ВИЧ, ВГВ и ВГС

Еремин В.Ф. 22

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОТИВОВИРУСНЫХ СВОЙСТВ ВЕЩЕСТВ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Савинова О.В., Бореко Е.И. 26

СЕКЦИЯ I: БИОТЕХНОЛОГИЯ, ЭКОЛОГИЯ И ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИЕ

STUDYING GENE FAMILIES ASSOCIATED WITH PLANT PATHOGEN INTERACTIONS TO UNCOVER NEW PLAYERS IN MEDICAGO-*RHIZOBIUM* SYMBIOSIS

Gavrin A., Schornack S. 29

COMBINED CLSM/AFM STUDY OF *RHODOCOCCUS* CELL INTERACTIONS WITH ZINC OXIDE NANOPARTICLES

Glebov G., Lalande E., Kuyukina M., Ivshina I. 30

SCREENING OF <i>RHODOCOCCUS</i> ACTINOBACTERIA FROM THE IEGM COLLECTION FOR THEIR RESISTANCE TO INDENE Kuyukina M., Andreeva D., Sandalli S., Ivshina I.	31
THE POLLUTION LEGACY AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE Peshkur T., Knapp C., Henriquez F., Rodgers K., Tonner R.	33
ENHANCING THE PROPERTIES OF BACTERIAL BIOMINERALS FOR ENGINEERING: OPTIMIZATION OF ARAGONITE PRECIPITATION Peshkur T., Phoenix V.	34
NEW SET UP FOR PATHOGENICITY EVALUATION OF HUMAN UROPATHOGENIC <i>ESCHERICHIA COLI</i> STRAINS BASED ON BIOMIMMETIC MODEL OF NORMAL PORCINE UROTHELIUM <i>IN VITRO</i> Predojević L., Žgur-Bertok D., Keše D., Erdani Kreft M., Starčić Erjavec M.	35
СКРИНИНГ БАКТЕРИЙ СЕМЕЙСТВА <i>HALOMONADACEAE</i> НА СПОСОБНОСТЬ НАКАПЛИВАТЬ ЭКТОИН Ананьина Л.Н., Пьянкова А.А., Шестакова Е.А., Горбунов А.А.	37
ИЗУЧЕНИЕ БАКТЕРИЙ КЛАССА <i>ACTINOBACTERIA</i> НА СПОСОБНОСТЬ СИНТЕЗИРОВАТЬ ЭКТОИН В УСЛОВИЯХ ВЫСОКОЙ СОЛЕНОСТИ СРЕДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ Ананьина Л.Н., Шестакова Е.А.	39
БИОДЕСТРУКЦИЯ ИБУПРОФЕНА КЛЕТКАМИ <i>RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS</i> ИЭГМ 501 Бажутин Г.А., Тюмина Е.А.	41
ВЛИЯНИЕ КВЕРЦЕТИНА НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ЦИПРОФЛОКСАЦИНУ БАКТЕРИЙ <i>ESCHERICHIA COLI</i> Безматерных К.В., Самойлова З.Ю., Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н.	43
РАССЕЛЕНИЕ ЧУЖЕРОДНЫХ ВИДОВ ВОДОРΟΣЛЕЙ В ВОДОХРАНИЛИЩАХ СРЕДНЕЙ КАМЫ Беляева П.Г.	46

ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ ПЕРОКСИДА И ПЕРОКСИДАЗНОЙ
АКТИВНОСТИ В ЛИСТЬЯХ КУЛЬТУРНЫХ ЗЛАКОВ ПРИ
ИЗМЕНЕНИИ РЕАКЦИИ КОРНЕВОЙ СРЕДЫ

Боталова К.И., Четина О.А. 48

БАКТЕРИИ-ДЕСТРУКТОРЫ БИФЕНИЛА В МИКРОБНЫХ
СООБЩЕСТВАХ ТЕХНОГЕННОЗАГРЯЗНЁННЫХ
ТЕРРИТОРИЙ ПОЛУОСТРОВА КРЫМ

Воронина А.О., Плотникова Е.Г. 52

БЕЛКИ ХОЛОДОВОГО ШОКА БАКТЕРИЙ РОДА
ACINETOBACTER

Гончаров А.Е., Соломенный А.П. 55

БИОДЕСТРУКЦИЯ МОНО- И ТРИХЛОРИРОВАННЫХ
БИФЕНИЛОВ НОВЫМ БАКТЕРИАЛЬНЫМ СООБЩЕСТВОМ

Егорова Д.О. 57

УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩАЯ
И СУЛЬФИДОКИСЛЯЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ
ШТАММА *RHODOCOCCLUS QINGSHENGII* ИЗГМ 1359

Елькин А.А., Попов Л.А., Ившина И.Б. 60

АНТИБИОТИКОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КАК
ТАКСОНОМИЧЕСКИЙ МАРКЕР ВИДОВОЙ ДИАГНОСТИКИ
АКТИНОБАКТЕРИЙ РОДА *RHODOCOCCLUS*

Загуляева И.Ю., Тудвасева М.С., Стед Т., Куюкина М.С.,
Ившина И.Б. 62

МИНЕРАЛЬНЫЕ И УГЛЕРОДНЫЕ ВОЛОКНА КАК НОСИТЕЛИ
БАКТЕРИАЛЬНЫХ БИОПЛЕНОК ДЛЯ БИОКАТАЛИЗА И
БИОЛОГИЧЕСКОЙ ОЧИСТКИ

Зорина А.С., Максимова Ю.Г. 64

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ИЗУЧЕНИЮ
МИКРООРГАНИЗМОВ ГЛУБИННОЙ ПОРОДЫ КАРНАЛЛИТА
ВЕРХНЕКАМСКОГО МЕСТОРОЖДЕНИЯ СОЛЕЙ

Кашапова Л.Э., Пьянкова А.А., Корсакова Е.С.,
Плотникова Е.Г. 67

ОБЕСПЕЧЕННОСТЬ ПИТАТЕЛЬНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ ВЛИЯЕТ НА ДИНАМИКУ ПЕРСИСТООБРАЗОВАНИЯ В ПЕРИОДИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЕ <i>ESCHERICHIA COLI</i> Кашеварова Н.М., Ткаченко А.Г.	69
ИЗУЧЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БИОПЛЕНОК РЕЗИСТЕНТНЫХ К АНТИБИОТИКАМ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ <i>PROPIONIBACTERIUM ACNES</i> К НОВЫМ КАТИОННЫМ ПЕПТИДАМ СЕМЕЙСТВА ЛАНТИБИОТИКОВ Коробов В.П., Полудова Т.В., Ерошенко Д.В., Лемкина Л.М.	72
ГАЛОТОЛЕРАНТНЫЕ БАКТЕРИИ-ДЕСТРУКТОРЫ АРОМАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ РОДА <i>PSEUDOMONAS</i> Корсакова Е.С., Истомина А.В., Плотникова Е.Г.	74
ВЫДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИЙ И ГРИБОВ – ФИТОПАТОГЕНОВ КАРТОФЕЛЯ И МОДЕЛИРОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ НА ИХ РОСТ СОЛЕНАСЫЩЕННОЙ АТМОСФЕРЫ Литасова А.С., Некрасова Е.В., Максимов А.Ю.	76
СЕЛЕКЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ, МЕТАБОЛИЗИРУЮЩИХ ОРГАНИЧЕСКИЕ НИТРОСОЕДИНЕНИЯ Литасова А.С., Павлова Ю.А., Шилова А.В., Максимов А.Ю.	78
МИКРОБНАЯ БИОДЕГРАДАЦИЯ ДРЕВЕСНЫХ ОТХОДОВ Максимов А.Ю., Шилова А.В., Литасова А.С., Павлова Ю.А., Колесова О.В.	81
БАКТЕРИИ ЩЕЛОЧНЫХ БИОТОПОВ АНТРОПОГЕННОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ, ГИДРОЛИЗУЮЩИЕ НИТРИЛЫ И АМИДЫ Максимова Ю.Г., Мулазянова Э.Э., Максимов А.Ю.	84
СПОСОБЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКРИЛАМИДА В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ Максимова Ю.Г., Мочалова Е.М., Демаков В.А.	86
МИКРОБНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ НАЗЕМНЫХ СОЛЯНЫХ СООРУЖЕНИЙ ПЕРМСКОГО КРАЯ Маммаева М.Г., Кириченко Л.В., Шишкин М.А., Шерстобитова Н.П., Кузнецова М.В.	89

АССОЦИАЦИЯ БАКТЕРИЙ ДЕСТРУКТОРОВ ЛИНДАНА (Г-ГЕКСАХЛОРЦИКЛОГЕКСАНА), ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ДЛИТЕЛЬНО ЗАГРЯЗНЕННОЙ ГЕКСАХЛОРЦИКЛОГЕКСАНОМ ПОЧВЫ Назарова Э.А., Егорова Д.О.	91
ПОЛИАМИНЫ СТИМУЛИРУЮТ БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЕ И ПРОДУКЦИЮ АУТОИНДУКТОРА-2 У ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ Негорелова Е.В., Нестерова Л.Ю., Ткаченко А.Г.	94
ВЛИЯНИЕ ПОЛИАМИНОВ НА ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЕНОК И ПОВЕРХНОСТНЫЕ СВОЙСТВА <i>ESCHERICHIA COLI</i> Нестерова Л.Ю., Ткаченко А.Г.	96
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СПОСОБОВ АКТИВАЦИИ АУТОЛИЗИНОВ БАКТЕРИЙ <i>STARHYLOCOCCUS</i> <i>COHNII</i> ВКМ-3165 Отинов Г.Д., Филатова Л.Б., Коробов В.П.	98
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ТЕХНОГЕННО-ЗАСОЛЕННЫХ АЛЛЮВИАЛЬНЫХ ПОЧВ Пахорук И.В., Митракова Н.В.	100
ДЕЙСТВИЕ КАТИОННЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА БИОПЛЕНКИ <i>MUCOVACTERIUM SMEGMATIS</i> MC ² 155 Полудова Т.В., Ерошенко Д.В., Коробов В.П.	103
ДЕЙСТВИЕ ЭФИРНЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ МАСЕЛ НА СТАФИЛОКОККИ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ Попова И.В., Полудова Т.В., Пименова Е.В.	105
ЗАВИСИМОСТЬ ЭФФЕКТИВНОСТИ КОНВЕРСИИ ЭФИРОВ СВОБОДНЫМИ И ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ КЛЕТКАМИ ШТАММА <i>RHODOCOCCUS</i> <i>ERYTHROPOLIS</i> ПЗ-8 ОТ СТАДИИ РОСТА КУЛЬТУРЫ Ремезовская Н.Б., Максимов А.Ю.	108

ХАРАКТЕРИСТИКА ДДТ-ДЕГРАДИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЗАГРЯЗНЕННОЙ ПОЧВЫ ДОБРЯНСКОГО РАЙОНА ПЕРМСКОГО КРАЯ Ремезовская Н.Б., Максимов А.Ю., Демидова М.И., Дубовикова Ю.А.	110
ИЗМЕНЕНИЕ ТОЛЕРАНТНОСТИ БИОФИЛЬМОВ <i>ESCHERICHIA COLI</i> К ДЕЙСТВИЮ АНТИБИОТИКОВ В ПРИСУТСТВИИ ЭКСТРАКТОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ Самойлова З.Ю., Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н.	112
ВЛИЯНИЕ ФТОРХИНОЛОНОВ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ СИНТЕЗА КАДАВЕРИНА Секацкая П.А., Ахова А.В., Ткаченко А.Г.	115
ВОВЛЕЧЕННОСТЬ БЕЛКА Rel, МЕТАБОЛИЗИРУЮЩЕГО ГУАНОЗИНТЕТРАФОСФАТ, В МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ АНТИБИОТИКОВ, НАЦЕЛЕННЫХ НА ПЕРСИСТОРНЫЕ КЛЕТКИ <i>Mycobacterium smegmatis</i> Сидоров Р.Ю., Кашеварова Н.М., Ткаченко А.Г.	117
УСТОЙЧИВОСТЬ АКТИНОБАКТЕРИЙ <i>DIETZA MARIS</i> К ТЯЖЕЛЫМ МЕТАЛЛАМ Тищенко А.В., Бакиева Э.Р., Литвиненко Л.В., Ившина И.Б.	119
ДИНАМИКА РОСТА <i>STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS</i> В ПРИСУТСТВИИ ХОЛЕСТЕРИНА Трапезников Я.П.	121
ДИНАМИКА ВОССТАНОВЛЕННЫХ НЕОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ СЕРЫ (SO_3^{2-} , H_2S) В АЭРОБНО РАСТУЩИХ КУЛЬТУРАХ <i>ESCHERICHIA COLI</i> ПРИ СТРЕССАХ И ДЕЙСТВИИ АНТИБИОТИКОВ Ушаков В.Ю., Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н.	124
УЧАСТИЕ ГЕНОВ СТАЦИОНАРНОЙ ФАЗЫ <i>rpoS</i> , <i>rmf</i> , <i>relA</i> И <i>spoT</i> В БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПЕРСИСТЕНЦИИ Хаова Е.А., Кашеварова Н.М., Шумков М.С., Сидоров Р.Ю., Ткаченко А.Г.	127

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И КИНЕТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА БИОДЕСТРУКЦИИ АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ Хренков А.Н., Вихарева Е.В., Рычкова М.И., Селянинов А.А.	130
ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ГАММАПРОТЕОБАКТЕРИЙ СЕМЕЙСТВА <i>HALOMONADACEAE</i> В ТЕХНОГЕННЫХ ВОДАХ НА ТЕРРИТОРИИ ВЕРХНЕКАМСКОГО МЕСТОРОЖДЕНИЯ КАЛИЙНЫХ СОЛЕЙ Цещинская Е.М.	133
НОВЫЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ ЭФФЕКТА ОГРАНИЧЕНИЯ СКОЛЬЖЕНИЯ У МИКРООРГАНИЗМОВ Цыганов И.В., Нестерова Л.Ю., Ткаченко А.Г.	135
НАПРАВЛЕННАЯ БИОТРАНСФОРМАЦИЯ ЭКОТОКСИЧНОЙ ДЕГИДРОАБИЕТИНОВОЙ КИСЛОТЫ АКТИНОБАКТЕРИЯМИ Черемных К.М., Лучникова Н.А., Гришко В.В., Ившина И.Б.	137
ИНФОРМАТИВНОСТЬ ISSR-МАРКЕРОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ЛИСТВЕННИЦЫ СИБИРСКОЙ (<i>LARIX SIBIRICA</i> LEDEB.) НА УРАЛЕ Чертов Н.В., Васильева Ю.С., Пришнинская Я.В., Жуланов А.А.	140
ЛИПОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИЗОЛЯТОВ ИЗ ЩЕЛОЧНЫХ ЭКОТОПОВ С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ СОЛЕЙ Шилова А.В., Максимов А.Ю., Максимова Ю.Г.	142
ИЗУЧЕНИЕ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ПОЧВЕННОГО ПОКРОВА Г. ПЕРМИ Шишкин М.А., Шерстобитова Н.П., Масленникова И.Л., Кузнецова М.В.	145

СЕКЦИЯ II: ТЕХНОЛОГИИ АЭРОКОСМИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛОВЕДЕНИЯ

ПРОБЛЕМЫ СОЗДАНИЯ ЗВУКОПОГЛАЩАЮЩИХ КОНСТРУКЦИЙ ПЕРСПЕКТИВНЫХ АВИАЦИОННЫХ ДВИГАТЕЛЕЙ

Аношкин А.Н., Писарев П.В. 148

ЧИСЛЕННЫЙ РАСЧЕТ СКАЧКА УПЛОТНЕНИЯ ВРАЩАЮЩЕГОСЯ С ЛОПАТОЧНЫМ КОЛЕСОМ ВЕНТИЛЯТОРА АВИАЦИОННОГО ДВИГАТЕЛЯ

Белов В.Г., Дегтярев В.В., Синер А.А. 150

ЧИСЛЕННЫЙ РАСЧЕТ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ВРАЩАЮЩЕГОСЯ ЛОПАТОЧНОГО КОЛЕСА ТУРБОМАШИНЫ С ОТДЕЛЬНОЙ АКУСТИЧЕСКОЙ МОДОЙ

Большагин Н.Н., Колегов Р.Н., Синер А.А., Шуваев Н.В. 151

МОДЕЛИРОВАНИЕ НАНОКОМПОЗИТА, ПОЛУЧАЕМОГО ПУТЕМ МОДИФИКАЦИИ ЭПОКСИД-ПОЛИМЕРА НАНОЧАСТИЦАМИ

Боков К.А., Бузмакова М.М. 154

РЕОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭПОКСИДНОЙ КОМПОЗИЦИИ МОДИФИЦИРОВАННОЙ Фуллеренами

Бузмакова М.М., Гилев В.Г., Русаков С.В. 156

КОЛЕБАНИЯ КРУПНОГАБАРИТНОЙ ЦИЛИНДРИЧЕСКОЙ ОБОЛОЧКИ ПРИ ЕЕ РАЗВЕРТЫВАНИИ ВНУТРЕННИМ ДАВЛЕНИЕМ

Бузмакова Г.В., Пестренин В.М., Пестренина И.В., Русаков С.В. 159

ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРЕПРЕГОВ СЭПОКСИДНЫМ СВЯЗУЮЩИМ ДЛЯ НАДУВНЫХ АНТЕНН НАНОСПУТНИКОВ

Гаришин О.К., Свистков А.Л., Беляев А.Ю., Гилев В.Г. 162

ВЛИЯНИЕ ТОЧНОСТИ ГЕОМЕТРИИ ОБРАЗЦОВ РЕЗОНАНСНЫХ ЗПК НА ИХ АКУСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Кустов О.Ю., Храпцов И.В., Федотов Е.С. 164

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ПРОЦЕССА ПОЛИМЕРИЗАЦИИ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО ОТВЕРЖДАЕМОГО ЭПОКСИД-ПОЛИМЕРА Русаков С.В., Кондюрин А.В., Свисков А.Л., Гилев В.Г., Чудинов В.С.	167
ЭЛЕКТРОПРОВОДНОСТЬ ЭПОКСИДНОЙ МАТРИЦЫ С УГЛЕРОДНЫМИ НАНОТРУБКАМИ Семёнов В.А., Русаков С.Ю.	169
РАЗРАБОТКА РАСЧЕТНОЙ МЕТОДИКИ ОЦЕНКИ РЕЗОНАНСНЫХ ПРОЦЕССОВ В ОБЛАСТЯХ СЛОЖНОЙ ФОРМЫ НА ОСНОВЕ НЕСТАЦИОНАРНОГО ГАЗОДИНАМИЧЕСКОГО РАСЧЕТА Синер А.А., Большагин Н.Н., Колегов Р.Н., Шуваев Н.В.	172
РАСЧЕТ ГЕНЕРАЦИИ ЗВУКА ВЕНТИЛЯТОРНОЙ СТУПЕНЬЮ АВИАЦИОННОГО ДВИГАТЕЛЯ МЕТОДАМИ ВЫСОКОГО ПОРЯДКА ТОЧНОСТИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ GPU Синер А.А., Коромыслов Е.В., Кнутова Н.С.	174
ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ МЕХАНИЧЕСКОГО ПОВЕДЕНИЯ НОВЫХ ЯЧЕИСТЫХ РЕЗОНАТОРОВ ДЛЯ КОНСТРУКЦИЙ ЗВУКОПОГЛОЩАЮЩЕГО КОНТУРА Шипунов Г.С., Воронков А.А., Тихонова А.А., Пеленев К.А., Шестакова К.Н.	175
ЧИСЛЕННЫЙ РАСЧЕТ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ВРАЩАЮЩЕГОСЯ ЛОПАТОЧНОГО КОЛЕСА ТУРБОМАШИНЫ С ОТДЕЛЬНОЙ АКУСТИЧЕСКОЙ МОДОЙ Шуваев Н.В., Синер А.А., Большагин Н.Н., Колегов Р.Н.	178

СЕКЦИЯ III: ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ И МЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

EFFECTIVENESS OF CONJUGATION TRANSFER OF THE F-PLASMID DERIVATIVE pOX38 TO UROPATHOGENIC <i>ESCHERICHIA COLI</i> STRAINS Gizatullina Y.S., Kuznetsova M.V., Maslennikova I.L., Žgur-Bertok D., Starčič Erjavec M.	181
ВЛИЯНИЕ РАСТВОРИТЕЛЕЙ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ СТРЕССОВЫХ ОТВЕТОВ <i>ESCHERICHIA COLI</i> Ахова А.В., Ткаченко А.Г.	183
НОВЫЙ ГАЛОТОЛЕРАНТНЫЙ ШТАММ-ДЕСТРУКТОР ФТАЛАТОВ <i>IDIOMARINA</i> SP. PSH17-1 Багаутдинова Н. А., Ястребова О. В., Плотникова Е.Г.	185
ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА СРЕДЫ ЗАМОРОЗКИ И ХРАНЕНИЯ КЛЕТОК ГИБРИДОМЫ ВАРЗ Бочкова М.С., Заморина С.А., Тимганова В.П., Храмцов П.В., Раев М.Б.	187
РОЛЬ SЕМА 4D В ОТВЕТЕ Т-ЛИМФОЦИТОВ НА ПОЛИКЛОНАЛЬНУЮ СТИМУЛЯЦИЮ Валиева Ю.В., Некрасова И.В.	190
МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ И УПРАВЛЕНИЕ ДИНАМИКОЙ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ Гаврилова А.Ю., Бочаров Г.А., Черешнев В.А.	192
МЕЛАТОНИН И БЕРЕМЕННОСТЬ Глебездина Н.С.	195
РОЛЬ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК И ЕСТЕСТВЕННЫХ КИЛЛЕРОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ АЛКОГОЛЬНОГО ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ Газатова Н.Д., Юрова К.А., Гаврилов Д.В., Литвинова Л.С.	198
ЛЮМИНОЛЗАВИСИМАЯ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ КАК СРЕДСТВО ВЫЯВЛЕНИЯ МАРКЕРОВ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА Годовалов А.П., Шилов Ю.И., Вавилов Н.В., Карпунина Т.И.	201

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ГОНОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ: ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ Годовалов А.П., Карпунина Т.И., Сперанская В.Н., Николаева Н.В.	203
ВЗАИМОСВЯЗЬ ДЕПРЕССИИ С ОЖИРЕНИЕМ У КАРДИОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ Горбунова Е.А., Антонян А.А., Бобылев Ю.М.	206
ВЛИЯНИЕ КИСПЕПТИНА НА ФАГОЦИТАРНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ Горбунова О.Л., Некрасова И.В., Ширшев С.В.	208
ИЗМЕНЕНИЕ ОСМОТИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ИМПЛАНТАЦИИ ОБРАЗЦОВ ПОЛИУРЕТАНА Гущин М.О., Карпунина Т.И., Годовалов А.П., Проскурнова Ю.Н.	211
ПРОАПОПТОПИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКИХ А-СЕКОТРИТЕРПЕНОИДОВ Ерошенко Д.В., Конышева А.В., Крайнова Г.Ф., Толмачева И.А., Гришко В.В.	213
ИЗУЧЕНИЕ АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА В КАЧЕСТВЕ РЕГУЛЯТОРА ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ СУБПОПУЛЯЦИИ Т-ХЕЛПЕРОВ (Th17) Заморина С.А., Тимганова В.П., Литвинова Л.С., Тодосенко Н.М., Храмцов П.В., Раев М.Б., Бочкова М.С., Шадрина К.С., Черешнев В.А.	216
МИЕЛОПЕПТИДЫ В РЕГУЛЯЦИЯ ФУНКЦИЙ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГОВ ПРИ СТРЕССЕ Кадочникова Я.А., Гейн О.Н., Гейн С.В., Гаврилова Т.В.	218
КОЛОНИЗАЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ УРОПАТОГЕННЫХ <i>ESCHERICHIA COLI</i> В ПОЛИМИКРОБНЫХ АССОЦИАЦИЯХ Каримова Н.В., Гизатуллина Ю.С., Демаков В.А.	221
МОДЕЛЬ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА ИЗ ОБРАБОТАННОГО ПОЛИУРЕТАНА МЕТОДОМ ПЛАЗМЕННО–ИММЕРСИОННОЙ ИОННОЙ ИМПЛАНТАЦИИ Комар Л.А.	223

СИНТЕЗ И ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ 3-ЭТИЛЗАМЕЩЕННЫХ 18αH-ОЛЕАНАНОВЫХ ТРИТЕРПЕНОИДОВ Коньшева А.В., Жукова А.Е., Гришко В.В.	226
СИНТЕЗ, МОДИФИКАЦИЯ И ПРОТИВОВИРУСНЫЕ СВОЙСТВА 2,3-СЕКОТРИТЕРПЕНОВЫХ β-КЕТОЭФИРОВ Крайнова Г.Ф., Коньшева А.В., Еремин В.Ф., Бореко Е.И., Гришко В.В.	228
БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ <i>ESCHERICHIA COLI</i>, ВЫЗЫВАЮЩИХ КОЛИБАКТЕРИОЗ У ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ Кузнецова М.В., Масленникова И.Л., Гизатуллина Ю.С., Нестерова Л.Ю, Predojevič L., Starčič Erjavec M.	230
МЕМБРАННЫЙ СЕМАФОРИН СЕМА4D КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ РЕГУЛЯТОР АКТИВНОСТИ Т-ЛИМФОЦИТОВ Куклина Е.М.	233
ВЛИЯНИЕ ПИОЦИАНИНА <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> НА МИКРОБИЦИДНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ НЕЙТРОФИЛОВ Масленникова И.Л.	235
СИНТЕЗ, ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДОКИНГ ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКИХ «ТРИТЕРПЕНОИД-СТЕРОИДНЫХ» ГИБРИДОВ Назаров А.В., Толмачева И.А., Ерошенко Д.В., Жукова А.Е., Гришко В.В.	238
СИНТЕЗ, РЕАКЦИИ КОНДЕНСАЦИИ И ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ТРИТЕРПЕНОВЫХ АЛЬДЕГИДОВ Назаров М.А., Ерошенко Д.В., Толмачева И.А., Гришко В.В.	241
РОЛЬ ЭСТРИОЛА В ФОРМИРОВАНИИ ТОЛЕРОГЕННОГО ФЕНОТИПА НК-КЛЕТОК Некрасова И.В., Горбунова О.Л., Ширшев С.В.	243
ЛЕПТИН РЕГУЛИРУЕТ ЭКСПРЕССИЮ МЕМБРАННЫХ МОЛЕКУЛ В-ЛИМФОЦИТАМИ Орлова Е.Г.	245

ПРИМИРОВАННЫЕ ГРЕЛИНОМ ДЕНДРИТНЫЕ КЛЕТКИ ТИМУСА КОНТРОЛИРУЮТ ФОРМИРОВАНИЕ iNKT Орлова Е.Г., Ширшев С.В., Логинова О.А.	248
РОЛЬ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ТИМУСА В РЕГУЛЯЦИИ ФОРМИРОВАНИЯ Treg Орлова Е.Г., Ширшев С.В., Логинова О.А., Логинова Н.П., Шехмаметьев Р.М.	251
АНАЛИЗ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ ПРОИЗВОДНЫХ ИЗОХИНОЛИНА Пьянков И.А., Кононова Л.И., Смоляк А.А., Шкляев Ю.В., Коробов В.П.	253
ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНАЯ ЯМР-ДИАГНОСТИКА ПРИ ПОМОЩИ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ Раев М.Б., Храмцов П.В., Кропанева М.Д., Бочкова М.С., Тимганова В.П., Заморина С.А.	256
ИММУНОФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ ПЕРСПЕКТИВЫ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ФЕТОПЛАЦЕНТАРНЫХ БЕЛКОВ Раев М.Б., Заморина С.А.	258
ОСОБЕННОСТИ КИНЕТИКИ РОСТА ШТАММОВ <i>LACTOBACILLUS</i> SPP. Суслов Н.С.	260
СИНТЕЗ И ОЦЕНКА ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ А-СЕКОТРИТЕРПЕНОИДОВ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ Толмачева И.А., Галайко Н.В., Игошева Е.В., Коньшева А.В., Назаров А.В., Крайнова Г.Ф., Еремин В.Ф., Бореко Е.И., Гришко В.В.	263
МАГНИТНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ ДЛЯ ЯМР-АНАЛИЗА, ПОКРЫТЫЕ БИОСОВМЕСТИМЫМИ ПОЛИМЕРАМИ Храмцов П.В., Раев М.Б., Кропанева М.Д., Бочкова М.С., Тимганова В.П., Заморина С.А.	264
ИССЛЕДОВАНИЕ ВНУТРЕННЕЙ ПОВЕРХНОСТИ ПОЛИМЕРНОГО КАПИЛЛЯРА, МОДИФИЦИРОВАННОГО ИОННО-ПЛАЗМЕННЫМ МЕТОДОМ. ЧАСТЬ 1 Чудинов В.С., Кондюрина И.В., Шардаков И.Н., Терпугов В.Н., Кондюрин А.В.	266

ИССЛЕДОВАНИЕ АДсорбции БЕЛКА ТРОПОЭЛАСТИНА НА
ВНУТРЕННЕЙ ПОВЕРХНОСТИ ПОЛИМЕРНОГО КАПИЛЛЯРА,
МОДИФИЦИРОВАННОГО ИОННО-ПЛАЗМЕННЫМ МЕТОДОМ.
ЧАСТЬ 2

Чудинов В.С., Кондюрина И.В., Шардаков И.Н.,
Терпугов В.Н., Кондюрин А.В. 268

ВЛИЯНИЕ ОСТРОГО И ХРОНИЧЕСКОГО ХОЛОДОВОГО
СТРЕССА НА ОКИСЛИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ
ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГОВ МЫШИ В УСЛОВИЯХ
БЛОКАДЫ ОПИАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

Шаравьева И.Л., Гейн С.В., Тендрякова С.П. 271

ИНТЕГРАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ
ПРОЛИФЕРАТИВНОГО ОТВЕТА ЛИМФОЦИТОВ ПРИ
ВТОРИЧНОЙ ИММУННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ
С ПОМОЩЬЮ МАТРИЧНОГО МЕТОДА

Шилов С.Ю., Шилова Н.А., Шилов Ю.И., Рыжаенков В.Г.,
Черникова И.А. 274

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ЗИМОЗАНОВОГО
ПЕРИТОНИТА У КРЫС И ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В
НЕЙРОИММУНОЛОГИИ И ФАРМАКОЛОГИИ

Шилов Ю.И., Шилов С.Ю., Туляев Я.А., Барков С.Ю.,
Шилова Н.А. 276

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ 279

Научное издание

**ВЫСОКИЕ ТЕХНОЛОГИИ,
ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ КАЧЕСТВО ЖИЗНИ**

Материалы II Международной научной конференции
(17–19 сентября 2018 г.)

Публикуется в авторской редакции
Компьютерная верстка *А. А. Елькина*

Подписано в печать 19.09.2018. Формат 60×84/16
Усл. печ. л. 17,20. Тираж 130 экз. Заказ №

Издательский центр
Пермского государственного
национального исследовательского университета
614990, г. Пермь, ул. Букирева, 15

Отпечатано в ООО «Учебный центр “Информатика”»
614990, г. Пермь, ул. Букирева, 15

ООО «Мелитэк» - крупнейший поставщик исследовательского оборудования и сервисных услуг. Основным направлением деятельности является комплексное решение задач производственных и исследовательских организаций в области материаловедения, химического и фазового анализа, а так же физико-механических испытаний.



Компания «Мелитэк» является официальным дистрибьютором **Bruker** (анализаторы состава и структуры материалов), **Struers** (пробоподготовка для микроскопических исследований), **Olympus** (микроскопические исследования), **Phenom World** (настольная электронная микроскопия), **FEI** (электронная микроскопия), **EmcoTest** (твердомеры), **Nanovea** (исследования в нанодиапазоне), **Walter+Bai AG** (испытательные машины), **RUMUL** (высокочастотные испытательные системы), **NSI** (компьютерная томография), **Analytik Jena** (элементный анализ).

Контакты: 620075, Екатеринбург, ул. Тургенева 18, офис 701
E-mail: infoural@melytec.ru
Тел./факс: +7 (343) 287-12-85
www.melytec.ru