

Кукурузная крупа за период личиночной стадии была потреблена на 90%, в отличие от отрубей, что может быть связано с высоким содержанием в последних трудноперевариваемой клетчатки. Метагеномными методами анализа показано присутствие целлюлазного гена в кишечной микробиоте личинок Черной львинки [7, с 5], определяющего их принципиальную способность развиваться на клетчатковом субстрате. Однако продолжительность процесса конверсии личинками *Hermetia illucens* пшеничных отрубей оказалась существенно меньше, чем кукурузной крупы (10 и 14 суток соответственно).

Важным показателем процесса разложения субстрата является конечная масса личинок и суточный прирост массы. На более питательных субстратах личинки вырастают крупнее и их суточный прирост выше. Из таблицы видно, что большей массой обладали личинки, выращенные на кукурузной крупе.

Показано влияние кормового субстрата на продолжительность личиночной стадии. При одинаковых условиях разведения личиночная стадия *Hermetia illucens* завершилась переходом в стадию предкуколки при развитии на пшеничных отрубях через 10 дней, в то время как на кукурузной крупе этот процесс занял 14 дней. Превращение личинки в предкуколку и куколку происходит, когда концентрация ювенильного гормона снижается. На эндокринную систему, активность нейросекреторных клеток оказывают большое влияние внешние факторы, особенно условия питания. В проведенном нами эксперименте культивирование личинок *Hermetia illucens* на более питательном субстрате – кукурузной крупе вызвало увеличение сроков личиночной стадии, в то время как развитие на пшеничных отрубях с высоким содержанием клетчатки (доля белка клетчатки 8,6%) способствовало более быстрому переходу личиночной стадии на стадию предкуколки.

Полученные характеристики культуры *Hermetia illucens*, разводимой в ИПЭЭ РАН, продемонстрировали способность личинок активно развиваться на растительных субстратах при поддержании оптимальных параметров температуры воздуха (28⁰С) и влажности субстрата

(до 60%). Показана возможность использования личинок *Hermetia illucens* для биопереработки твердых растительных отходов АПК на примере отрубей.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ (ГК № 14.МО4.12.0005).

Список литературы:

1. S.Diener, C.Zurbrügg, K.Tockner, Conversion of organic material by black soldier fly larvae: establishing optimal feeding rates//Waste Management & Research 2009; 27: 603–610
2. Nguyen TT, Tomberlin JK, Vanlaerhoven S Influence of resources on *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) larval development//Journal of Medical Entomology. 2013, 50(4):898-906.
3. Diener S, Studt Solano N, Roa Gutiérrez F, Zurbrügg C, Tockner K. Biological treatment of municipal organic waste using black soldier fly larvae//Waste Biomass Valorization. 2011. V.2. N.4. P.357–363.
4. Diclaro J.W., Kaufman P.E. Black soldier fly *Hermetia illucens* Linnaeus (Insecta: Diptera: Stratiomyidae) // Uf University of Florida IFAS Extension. – 2009. – P. 1–4.
5. Hajibabaei M, Singer GA, Clare EL, Hebert PDN Design and applicability of DNA arrays and DNA barcodes in biodiversity monitoring // BMC Biol. – 2007. – V.5. – P.24.
6. Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., deWaard J.R. Biological identifications through DNA barcodes // Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences. – 2003. –V. 270. – P.313–321.
7. Lee, D. W., Seo, J. B., Nam, M. H., Kang, J. S., Kim, S. Y., Kim, A. Y., Kim, W. T., Choi, J. K., Um, Y., Lee, Y., Moon, I. S., Han, H. R., Koh, S. H., Je, Y. H., Lim, K. J., Lee, S. H. and Koh, Y. H. (2011) A combination of biochemical and proteomic analyses reveals Bx-LEC-1 as an antigenic target for the monoclonal antibody 3-2A7-2H5-D9-F10 specific to the pine wood nematode. Mol. Cell Proteomics. Мср.М900521-MCP 200, 1-13.

СТАБИЛЬНОСТЬ СВЯЗИ МЕЖДУ siРНК И ЛИПОФИЛЬНОЙ ТРАНСПОРТНОЙ ГРУППОЙ НЕ ВЛИЯЕТ НА КИНЕТИКУ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИНГИБИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ

Черников Иван Вячеславович,

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск

Буланов Денис Александрович,

Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН, г. Иркутск

Мещанинова Мария Ивановна

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск

Черноловская Елена Леонидовна

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск

Использование олигонуклеотидных конструкций, способных избирательно связываться с мРНК гена-мишени и инактивировать её, является прямым путем к ингибированию экспрессии терапевтически значимых генов. Наиболее эффективными агентами для направленного подавления экспрессии генов, действующими в наномолярных концентрациях, являются siРНК (малые интерферирующие РНК) [1]. Основными задачами создания лекарственных препаратов на основе siРНК являются ста-

билизация препарата в кровотоке, обеспечение его преимущественного накопления в клетках-мишенях и улучшение кинетики биологического действия биоконъюгатов. Ранее нами был создан алгоритм селективной адресной модификации нуклеазоустойчивых сайтов в составе siРНК, позволяющий получить siРНК с минимально необходимым числом модификаций, обладающую высокой стабильностью в присутствии сыворотки крови [2], а также липофильные аналоги нуклеазоустойчивых siРНК,

способные проникать в опухолевые клетки без использования трансфецирующего агента и подавлять экспрессию гена – мишени [3]. Было обнаружено, что по сравнению с siРНК, трансфецированными в клетку, ингибирующее действие липофильных siРНК без носителя проявляется через больший промежуток времени (5 дней по сравнению с 3 днями для трансфекции) и, таким образом, выход из эндосомы является одним факторов, лимитирующих скорость биологического действия таких препаратов siРНК. Целью настоящей работы было установить, влияет ли стабильность связи между siРНК и липофильной молекулой в составе конъюгата на кинетику ингибирующего действия липофильных siРНК.

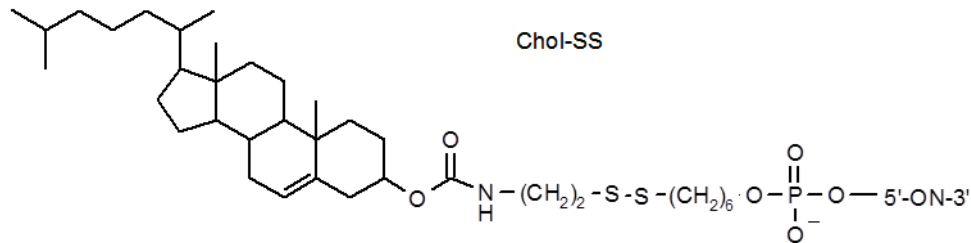


Рисунок 1. Структура 5'-холестеринсодержащего производного Chol-SS-siDm siРНК, содержащего биodeградируемую дисульфидную связь.

Модификацию олигорибонуклеотида проводили с использованием коммерчески доступного реагента путем введения на заключительном этапе синтеза Thiol-Modifier С6 S-S (Glen Research). Синтез 2-(пиридилдитио)-этиламина (PDA) проводили по аналогии с [4]. Далее получали N-(холестерилкарбонил)-2-(2-дипиридил)-аминоэтан (Chol-PDA), по аналогии с [5]. Полимерный носитель с 5'-модифицированным олигорибонуклеотидом обрабатывали дитиотреитом, затем Chol-PDA, после чего проводили стандартную процедуру деблокирования и выделяли конъюгат с помощью высокоэффективной обращенно-фазовой хроматографии. Для получения siРНК олигорибонуклеотиды и их модифицированные аналоги

смешивали в эквимолярных концентрациях (10 мМ) в буфере инкубировали при 95° С в течение 3 мин, охлаждали медленно до комнатной температуры и хранили при -20° С, для использования размораживали во льду.

Исследование влияния стабильности линкера между siРНК и липофильной группой на кинетику и эффективность ингибирующего действия конъюгата. Исследование кинетики ингибирующего действия холестерин-содержащих siРНК проводили на лекарственно-устойчивой линии клеток KB-8-5 по определению уровня продукта гена *MDR1* Р-гликопротеина (Р-gp) с помощью Вестерн блот анализа через 3 – 8 дней инкубации клеток с конъюгатами (5 □М) (Рис. 2).

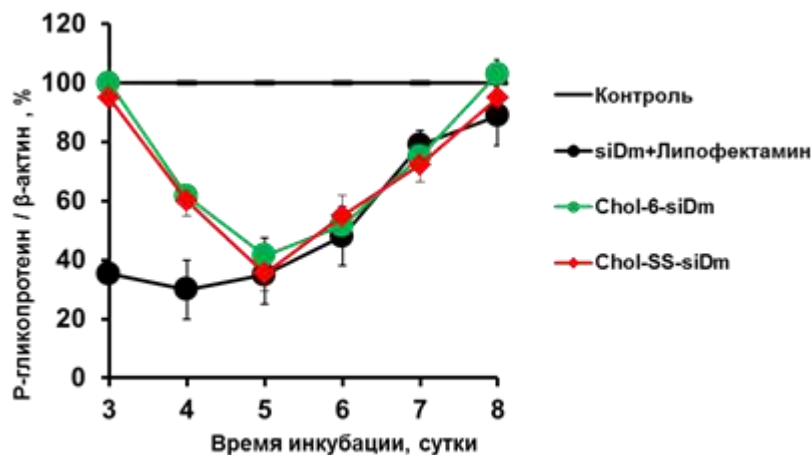


Рисунок 2. Кинетика подавления синтеза Р-гликопротеина в клетках KB-8-5 конъюгатами анти-MDR1 siРНК и холестерина Chol-6-siDm и Chol-SS-siDm (5 мкМ), а так же немодифицированной siDm (0.1 мкМ) в комплексе с Липофектамином 2000.

Показано, что эффективность подавления экспрессии гена-мишени конъюгатом, содержащим дисульфидную связь в линкере, достоверно не отличается от эффективности конъюгата с алифатическим амиолинкером длиной 6 метиленовых звеньев и составляет 60% на 5-е сутки инкубации клеток с конъюгатами. Данный результат подтверждает гипотезу о том, что расщепление дисульфидной связи происходит в цитоплазме клетки уже

после того, как конъюгат покидает эндосому, при помощи которой он проникает в клетку. Таким образом, показано, что присутствие липофильной группы в составе нерасщепляемого конъюгата siРНК не блокирует ее биологическую активность, при этом возможность расщепления конъюгата в цитоплазме клетки не увеличивает его биологическую активность и не влияет на кинетику проявления ингибирующего действия. Можно предположить,

что введение эндосомолитических групп в составе siРНК позволит улучшить кинетику их ингибирующего действия.

Работа выполнена при поддержке Интеграционного гранта СО РАН №85 и гранта Российского научного фонда №14-14-00697.

Список литературы:

1. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. // *Nature*. - 1998. - V. 391. - P. 806 – 811.
2. Volkov, A.A., Kruglova, N.S., Meschaninova, M.I., Venyaminova, A.G., Zenkova, M.A., Vlassov, V.V., Chernolovskaya, E.L. Selective protection of nuclease-sensitive sites in siRNA prolongs silencing effect // *Oligonucleotides*. - 2009. - V. 19. - P. 191-202.
3. Petrova, N., Chernikov, I., Meschaninova, M., Dovydenko, I., Venyaminova, A., Zenkova, M., Vlassov, V., Chernolovskaya, E. Carrier-free cellular uptake and the gene-silencing activity of the lipophilic siRNAs is strongly affected by the length of the linker between siRNA and lipophilic group // *Nucl. Acids Res.* - 2012. - V. 40. - P. 2330-2344.
4. Zugates G. T., Anderson D. G., Little S. R., Lawhorn I. E., Langer R. J. *Am. Chem. Soc.* - 2006. - V. 39. - № 128. - P. 12726-12734.
5. MacKellar C., Graham D., Will D. W., Burgess S., Brown T. *Nucleic Acids Res.* - 1992. - V. 20. - № 13. - P. 3411-3417.

К ИЗМЕНЕНИЮ МЕСТООБИТАНИЙ ПРОМЫСЛОВЫХ ЖИВОТНЫХ В ПРЕДБАЙКАЛЬЕ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

Деловеров Александр Тагирович

аспирант кафедры технологии и продукции охотничьего хозяйства, Иркутская государственная сельскохозяйственная академия, г. Иркутск

Кутателадзе Ираклий Вахтангович

аспирант кафедры технологии и продукции охотничьего хозяйства, Иркутская государственная сельскохозяйственная академия, г. Иркутск

Исайкина Мария Михайловна

аспирант кафедры технологии и продукции охотничьего хозяйства, Иркутская государственная сельскохозяйственная академия, г. Иркутск

Среди действующих на среду обитания охотничьих животных факторов в Предбайкалье первостепенно значимыми являются рубки и пожары. Под их воздействием происходит трансформация местообитаний промысловых животных до степени изначальной непригодности. Рубка леса – ведущий фактор воздействия на охотничьих животных [8, с. 153]. Изучение процесса восстановления лесов как местообитаний охотничьих животных после них отличается особой актуальностью.

Основанная на структурно - динамическом ландшафтоведении [6, с. 57-58], ландшафтно-видовая концепция охотничьей таксации позволяет прогнозировать динамику местообитаний животных и связанное с ней состояние их численности [2, с. 222-224; 3, с. 28-29]. Она и послужила концептуальной основой наших исследований.

Преобладающие на территории Иркутской области светлохвойные леса, представляя особый интерес для лесозаготовителей, наиболее подвержены промышленным рубкам и пожарам. Толчком к их более экстенсивной эксплуатации послужило строительство в начале прошлого века Транссибирской железнодорожной магистрали. Резкий подъем объемов промышленных рубок, связанный с дальнейшим развитием региона, произошел в начале 1960-х гг., и к 1990 г. они достигали практически 40 млн. м³ [1, с. 9; 4, с. 44]. В пересчете на площадь это давало около 200 тыс. га вырубок ежегодно. Резкое увеличение объемов рубок было связано с очисткой ложа Братского водохранилища, вводом в эксплуатацию Братского ЛПК, строительством участка БАМа «Гайшет-Лена», последующей лесопереработкой в Усть-Илимске. Все это привело к выраженному росту лесозаготовок, которые примерно в тех же объемах конца 1980-х гг. осуществляются в современности.

Это указывает на то, что заготовка древесины является в регионе преобладающим видом лесопользования. Лесозаготовки, трансформируя среду обитания, существенно изменяют жизненные условия охотничьей фауны. Это сказывается на состоянии численности промысловых млекопитающих региона [2, с. 15]. Для большинства видов копытных животных возобновившиеся вырубки и лесные гари до жердняковой возрастной стадии древостоя привлекательны обилием травянистых и древесно-веточных кормов.

Экстенсивный характер лесопользования в регионе проявляется экспансией рубок в более отдаленные уголья. Наряду с этим мелкими арендаторами эксплуатируются недорубленные леса территорий, уже пройденных промышленными рубками. Тем самым сокращается лесопокрываемая площадь и увеличивается захламленность порубочными остатками. Все это усугубляется самовольным порубками «черных лесорубов». Лесные пожары каждый год проходят площадь, сопоставимую с площадью вырубок.

По нашим наблюдениям, в бассейне р. Голоустной низовые лесные пожары, уничтожая подрост, выгоранием подлеска стимулируют появление его молодой поросли, в частности, в светлохвойных (сосново-лиственничных) лесах с рододендром даурским (*Rhododendron daurica*) в подлеске.

Кроме трансформации местообитаний в воздействии промышленного лесопользования целесообразно выделить другой аспект: непосредственное воздействие на охотничью фауну, в т. ч. через изменение условий добывания животных за счет увеличения доступности угодий при строительстве лесовозных дорог [2, с. 9].

Именно подзона южной тайги и подтайги претерпела с начала резкого роста объемов рубок в