

9. Резніков В.С. Ковила вздовж води. Нариси літопису природи РЛП «Клебан-Бик» / В.С. Резніков. – Луганськ: СПД – 2005. – С. 18-81.
10. Скубак Е.Н. К изучению птиц Константиновского района / Е.Н Скубак // Птицы бассейна Северского Донца. Вып. 8. Материалы 7-10 совещаний «Изучение и охрана птиц бассейна Северского Донца». – Донецк, 2003. – С. 36-37.
11. Скубак Е.Н. Новые данные о птицах Константиновского района Донецкой области / Е.Н. Скубак // Птицы бассейна Северского Донца. Вып. 9. Материалы 11 и 12 конференций «Изучение и охрана птиц бассейна Северского Донца». – Донецк, 2005. – С. 120-122.
12. Степанян Л.С. Конспект орнитологической фауны СССР / Л.С. Степанян. – М.: Наука. – 1990. – 568 с.
13. Фесенко Г.В. Анотований список українських наукових назв птахів фауни України (з характеристикою статусу видів) / Г.В. Фесенко, А.А. Бокотей. – К.-Л., 2007. – С. 20.
14. Фесенко Г.В. Птахи фауни України / Г.В. Фесенко, А.А. Бокотей – Київ, 2002. – 413 с.
15. Штегман Б.К. Основы орнитогеографического деления Палеарктики / Б.К. Штегман. // Фауна СССР. Птицы. – М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1938. – Т. 1. Вып. 2. – 156 с.

Чернобай Н.А.

*кандидат биологических наук,
младший научный сотрудник;*

Кадникова Н.Г.

*кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник;*

Шатилова Л.Е.

*младший научный сотрудник,
Институт проблем криобиологии и криомедицины
Национальной академии наук Украины*

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ РАСТВОРОВ
КРИОПРОТЕКТОРОВ НА КЛЕТКИ ASTASIA LONGA**

Микроводоросли являются не только важными представителями водных экосистем, но и незаменимыми биотехнологическими объектами, которые используются при производстве фармакологических препаратов, косметических и диетических продуктов, в развитии технологий по оздоровлению окружающей среды и т.д. Поэтому разработка способов длительного хранения микроводорослей является актуальным вопросом современной науки.

В последнее время количество работ по успешному криоконсервированию микроводорослей существенно увеличилось [1]. Однако часть таксонов водорослей до настоящего времени так и не удалось сохранить с помощью данного метода [2; 3; 4; 8].

Таким образом, поиск наиболее оптимальных условий криоконсервирования, является актуальной задачей, решение которой должно обеспечить успешное хранение микроводорослей в условиях ультранизких температур.

Целью данной работы было исследовать влияние 5% и 10% растворов этилового спирта и глицерина на состояние клеток в культуре *A.longa* после 5, 10 и 20 минут инкубации с исследуемыми веществами. Ранее нами уже было показано влияние растворов ДМСО, ПВП, сахарозы и времени экспозиции культуры с данными веществами на морфофункциональное состояние клеток в культуре *A.longa* [5].

Материалы и методы. В работе использовали клетки *Astasia longa* – одноклеточную флагелляту. Культуру микроводорослей брали в начале стационарной фазы роста, предварительно выращенную в условиях пассивной аэрации на модифицированной среде Крамера-Майерса (Крамер, 1952) в темновой фазе.

Для поиска оптимальных концентраций предполагаемых криопротекторов брали ликвоты этилового спирта и глицерина и добавляли к клеточным суспензиям до получения конечной концентрации 5% и 10%. Суспензии клеток инкубировались в течение 5, 10 и 20 минут в растворах предполагаемых криопротекторов при температуре 20-24°C.

Оценку жизнеспособности культуры клеток проводили с 0,5% трипановым синим (капля-на каплю). Также для определения жизнеспособности в популяции нативных клеток *A.longa* применяли метод конфокальной микроскопии, измеряя собственную флюоресценцию в диапазоне 450-520 нм со спектром эмиссии, имеющим максимум интенсивности 180 Вт/м². Собственную флюоресценцию мертвых клеток и органелл разрушенных клеток наблюдали в диапазоне 590-720 нм, в котором жизнеспособные клетки не имеют аутофлюоресценции, при воздействии на них лазером с длиной волны в 405 нм.

Комплексную оценку состояния клеток осуществляли под микроскопом «LSM510-META» (Carl Zeiss, Германия), используя компьютерную программу AimImageExaminer (Carl Zeiss MicroImaging).

Статистическую обработку полученных результатов проводили по методу Стьюдента для статической обработки данных (рассчитанное среднее значение \bar{x} доверительным интервалом $\bar{x} = (\pm \Delta)$, $P=0,95$).

Результаты и обсуждения. Клетки культуры *A.longa* имеют достаточно гибкую оболочку, что позволяет им принимать различную форму. В нормальных для культуры условиях изменение формы клеток происходит в течение нескольких секунд, тогда как при возникновении экологически неблагоприятных факторов, клетки теряют подвижность и приобретают сфероподобную форму. Действие стрессовых факторов может приводить к сбрасыванию жгутиков, что затем ведет к дальнейшей гибели клеток. Особенности данного биологического объекта привлекательны для экспериментальной работы, так как существует возможность в динамике наблюдать за видоизменением отдельных изолированных клеток под действием тех или иных факторов.

Учитывая актуальность поиска оптимальных условий, которые бы обеспечили высокую сохранность клеток при длительном хранении культуры *A. longa* в условиях низких температур, а также перспективность использования многокомпонентных сред [6; 7], целесообразно было оценить состояние данных клеток, после их экспозиции в растворах различных веществ.

После экспозиции клеток с растворами исследуемых веществ отмечалось заметное уменьшение размеров клеток. Интересен факт, что сразу после добавления в среду исследуемых растворов этилового спирта, относительная площадь клеток увеличивалась в сравнении с контролем, что свидетельствует о быстром проникновении данного вещества через клеточную оболочку, скорость проникновения которого в клетки культуры *A. longa* выше скорости выхода воды из клетки. Известно, что проницаемость клеточной оболочки для различных веществ является важным критерием в процессе выбора эффективного режима криоконсервирования: подбора криопротектора, времени предкультивирования и оптимальных скоростей охлаждения.

Кроме того, отмечалось изменение формы клеток – к 20 минуте экспозиции большая часть клеток имела округлую форму, что свидетельствует о морфологических изменениях в клетках под действием стресса (рис. 1).



Рис. 1. Примеры изменения формы, размеров, структуры клеток в культуре *A. longa* после их экспозиции в растворах 10% глицерина и 5% спирта в течение 5 и 10 минут соответственно

Важным критерием жизнеспособности клеток является их подвижность. Данный показатель снижался в зависимости от увеличения времени экспозиции и концентрации исследуемого вещества. Так при выдерживании клеток в 5% и 10% растворах этилового спирта после 20 минут экспозиции клетки сбрасывали жгутики, что свидетельствовало о негативном воздействии данного вещества в течение исследованного периода времени.

В результате проведенных экспериментов были рассчитаны средние значения относительной площади клеток после экспозиции их в растворах этилового спирта и глицерина различных концентраций в течение 5, 10 и 20 минут. Данные приведены в таблице и представлены на диаграммах (рис. 2). Было показано достоверное снижение значений относительной площади клеток во всех исследуемых образцах после их экспозиции в растворах этилового спирта и глицерина в сравнении с контролем. Однако достоверных различий в значениях относительной площади клеток от времени экспозиции в растворах этилового спирта не обнаружено. Тогда как при выдерживании клеточной суспензии в растворах глицерина, было зафиксировано достоверное снижение

относительной площади клеток после их экспозиции с 10% раствором исследуемого вещества в течение 20 минут в сравнении с результатами, полученными после инкубации с 5% раствором глицерина в течение аналогичного периода времени.

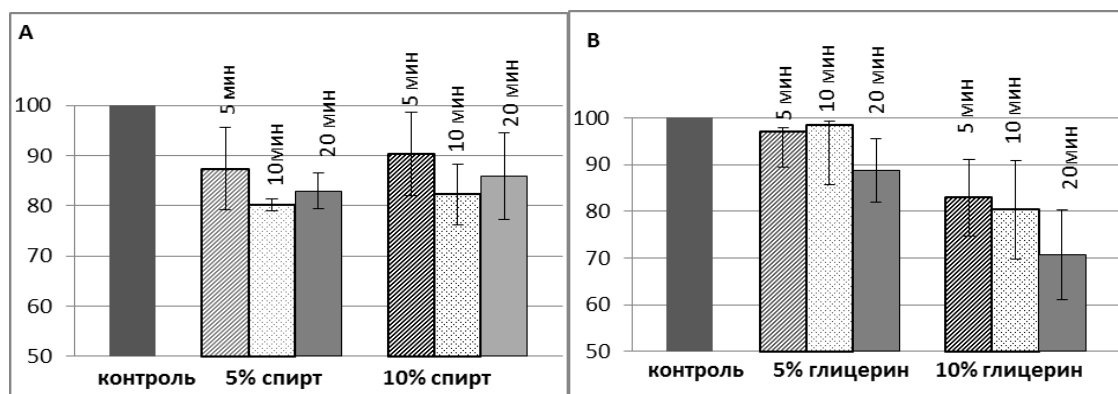


Рис. 2. Изменение относительной площади поверхности клеток в культуре *A. Longa* после их экспозиции в 5% и 10% растворах: А – этилового спирта в течение 5, 10 и 20 минут; В – глицерина в течение 5, 10 и 20 минут

Таблица

Влияние различных концентраций растворов этилового спирта и глицерина на изменение относительной площади поверхности *A. longa* в зависимости от времени экспозиции

		контроль	5% р-р			10% р-р		
			5 мин	10 мин	20 мин	5 мин	10 мин	20 мин
Относительная площадь, %	этиловый спирт	100	87,36± 8,26	80,25± 1,2	82,88± 3,55	90,26± 8,35	82,21± 6,08	85,93± 8,59
	глицерин	100	96,9± 7,37	98,4± 12,67	88,8± 6,8	82,9± 8,2	80,3± 10,46	70,8± 9,61

Список использованных источников:

1. Poncet J.M, Véron B. Cryopreservation of the unicellular marine alga, *Nannochloropsis oculata* // *Biotechnol Lett.*, 2003. – 25:2017–2022.
2. Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E. et al. Commercial applications of microalgae // *J. Biosci. Bioeng.*, 2006. – 101, № 2. – P. 87–96.
3. Taylor R., Fletcher R.L. Cryopreservation of eukaryotic algae – a review of methodologies, *J. Appl. Phycol.*, 1998. – 10, p. 481-501.
4. Hubalek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms // *Cryobiology*, 2003. – V. 46. – P. 205–229.
5. Кадникова Н.Г., Коваленко И.Ф., Овсянников С.Е., Высеканцев И.П., Шатилова Л.Е., Коваленко Г.В. Оценка морфофункционального состояния клеток водоросли *Astasia longa* методом конфокальной микроскопии в условиях индуцированного стресса // *Материалы III Международной конференции «Регуляция роста и развития растений: физиолого-биохимические и генетические аспекты»*, 11-12 ноября 2014, г. Харьков. – С. 115-116.
6. Дерябин А.Н., Синькевич М.С., Дубинина И.М., Бураханова Е.А., Трунова Т.И. Влияние сахаров на развитие окислительного стресса, вызванного гипотермией (на примере

растений картофеля, експресуючих ген інвертази дрожжей) // Физиология растений, 2007. – Т. 54, № 1. – С. 39-46.

7. Роговская Е.Ю., Муценко В.В., Петренко Ю.А. Криоконсервирование мезенхимальных стромальных клеток человека с использованием олигосахаридов // Тезисы конференции молодых ученых «Холод в биологии и медицине. Актуальные вопросы криобиологии, трансплантологии и биотехнологии», 20–21 мая 2013, г. Харьков. – С. 166.

8. Day J.G. Cryopreservation and the problem of freeze-recalcitrance, in algal culture collections. In: Culture Collections and Environmental Research, 2005. – P. 73-86.

Чорна І.В.

здобувач,

Харківський політехнічний інститут

ВПЛИВ ГЕНЕТИЧНО МОДИФІКОВАНОЇ СОЇ НА ІНДИВІДУАЛЬНИЙ РОЗВИТОК ТА СТАТЕНЕ ДОЗРІВАННЯ ЩУРІВ

Прискорений ріст населення планети поставило перед людством дві основні проблемами: проблема харчування та екологічної безпеки. Для подолання голоду науковцями було створені генетично модифіковані організми, які мали властивості не притаманні відомим на той час видам [1]. Генетично модифіковані організми є результатом застосування технологій генної інженерії, що дозволяють вбудовувати гени або сегменти ДНК одного організму в інший. Такі організми ще називають трансгенними, таким чином можна надати організму ознаки, які йому були до цього часу не властиві (морозостійкість, посухостійкість, стійкість до гербіцидів та інше). Такі ознаки організми не можуть набути шляхом селекції, чи схрещування [2].

Вперше генетично модифікований організм був створений у 1973 році, таким організмом стала вже існуюча бактерія *E. coli*, якій внесли ген *Сальмонелли* [3]. На сьогодні вже створено багато генетично модифікованих продуктів таких як: кукурудза, соя, картопля, рис, тютюн, ріпак та інші. Кожного року створюються все нові і нові генетично модифіковані організми, які в подальшому запроваджуються у широке промислове виробництво. Генетично модифіковані продукти використовуються вже багато років, але їх безпечність на організм тварин та людини залишається під сумнівом [4; 5].

Противники генетично модифікованих організмів вважають що ГМ-продукти можуть викликати не лише алергію, хвороби шлунку та онкозахворювання, а також порушення обміну речовин, що в свою чергу призводить до передчасної смертності та стерильності тварин, крім того порушення розвитку у наступних поколіннях. Все це є на думку вчених причиною віддалених наслідків – мутагенів [6; 7; 8; 9].

На думку деяких вчених внесені гени можуть викликати ряд незапланованих ефектів: утворення нових біологічно активних речовин та білків, чи зміною специфічних властивостей білків, які характерні для даного