

**VI МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ  
МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ:  
БИОФИЗИКОВ, БИОТЕХНОЛОГОВ,  
МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ И ВИРУСОЛОГОВ**

Сборник тезисов

Новосибирск  
Наукоград Кольцово  
2019

УДК 577.2:62.01:578+(001)

ББК 28.07:30.16:28.4

М431

**М431** VI Международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов — 2019: Сб. тез. / АНО «Иннов. центр Кольцово». — Новосибирск : ИПЦ НГУ, 2019. — 716 с.

ISBN 978-5-4437-0957-4

Сборник тезисов составлен на основе материалов, присланных российскими и иностранными учеными в оргкомитет Международной конференции молодых ученых биотехнологов, молекулярных биологов, вирусологов и биофизиков, проходящей в рамках площадки открытых коммуникаций OpenBio-2019.

Издание предназначено для преподавателей и научных сотрудников, аспирантов, магистрантов и студентов, интересующихся актуальными проблемами и разработками в области биотехнологии, вирусологии, молекулярной биологии и биофизики.

Тезисы публикуются в авторской редакции.

**УДК 577.2:62.01:578+(001)**

**ББК 28.07:30.16:28.4**

ISBN 978-5-4437-0957-4

© АНО «Инновационный центр  
Кольцово», 2019

## РАЗДЕЛ 1

**БИОТЕХНОЛОГИЯ**

---

**ПОИСК И ХАРАКТЕРИСТИКА  
МОРСКИХ БАКТЕРИЙ-ПРОДУЦЕНТОВ  
ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ И ВТОРИЧНЫХ  
МЕТАБОЛИТОВ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ В БИОТЕХНОЛОГИИ**

SEARCH AND CHARACTERISTICS OF MARINE BACTERIA  
PRODUCERS OF HYDROLYTIC ENZYMES AND SECONDARY  
METABOLITES, WHICH ARE PROSPECTIVE IN BIOTECHNOLOGY

М. Н. Абрамова, Д. В. Кищенко, В. В. Кумейко,  
А. М. Стенкова, Ю. Н. Сокольникова

*Дальневосточный федеральный университет (ДФУ),  
Школа биомедицины*

M. N. Abramova, D. V. Kishenko, V. V. Kumeiko,  
A. M. Stenkova, Y. N. Sokolnikova

*FEFU, Russia*

**Аннотация**

Морские микроорганизмы являются богатым источником новых вторичных метаболитов и гидролитических ферментов. Целью исследования было выделение и характеристика бактерий-продуцентов новых перспективных в биотехнологии и медицине биологически активных веществ. Используя комплексный под-

ход, включающий методы микробиологии, биохимии, генетики и филогении, мы обнаружили восемь перспективных штаммов-продуцентов антибактериальных веществ, полисахарид-деградирующих ферментов и пигментов. Обнаруженные и охарактеризованные в ходе работы, штаммы-продуценты послужат основой для дальнейших исследований данных биологически активных веществ и их биосинтетических кластеров.

### Abstract

Marine microorganisms represent a promising source of new secondary metabolites and hydrolytic enzymes. The aim of this study was the isolation and characterization of bacteria producing new promising biologically active substances for biotechnology and medicine. Using an integrated approach, including methods of microbiology, biochemistry, genetics and phylogeny, we found eight promising strains producing antibacterial substances, polysaccharide-degrading enzymes and pigments. The producer strains discovered and characterized during the work will serve as the basis for further studies of these biologically active substances and their biosynthetic clusters.

Морская биотехнология обладает огромным потенциалом в области производства биологически активных веществ для применения в биомедицине и промышленности. Океан занимает большую часть планеты и как среда обитания характеризуется сильными перепадами температуры, давления, света, концентрации органических и неорганических веществ и т. д. Таким образом, морские организмы вынуждены адаптироваться к этим суровым условиям, что приводит к богатому биологическому и генетическому разнообразию морской флоры и фауны. Целью исследования было выделение и характеристика бактерий-продуцентов новых перспективных в биотехнологии и медицине биологически активных веществ. Выделение микроорганизмов осуществляли из кишечника, псевдофекалий и ликвора двустворчатого моллюска *Anadara broughtonii*, выловленного в заливе Петра Великого Японского моря. Для культивирования использовали специализированную среду — Морской бульон (Marine broth 2216) или отфильтрованную морскую воду с добавлением или без добавления агара. Всего, из исследуемых образцов было получено 36 чистых культур микроорганизмов. С использованием стандартных микробиологических методов была изучена морфология колоний, подвижность, окраска по Граму. Далее для всех культур были установлены последовательности филогенетического маркера 16S рДНК. Большинство штаммов представляли группы Gammaproteobacteria (60 %) и Bacteroidetes (35 %), два штамма — Alphaproteobacteria (5 %). Четыре штамма обладали сильной агаролитической способностью. Один штамм *Pseudoalteromonas nigrifaciens* 702 ПК2(МВ6) продуцировал мелатонин. Для трех штаммов

---

родов *Shewanella*, *Olleya*, и *Vibrio* методом диффузии в агар с использованием стандартных тест-культур грамотрицательных, грамположительных и дрожжевых микроорганизмов, была выявлена антибактериальная активность против тестовых штаммов грамотрицательных бактерий.

Обнаруженные и охарактеризованные в ходе работы потенциальные штаммы-продуценты послужат основой для дальнейших исследований данных биологически активных веществ и их биосинтетических кластеров.

## ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ ЛАКТОБАЦИЛЛ \*

### CHARACTERIZATION OF ANTIBIOTIC RESISTANCE OF PROBIOTIC LACTOBACILLUS STRAINS

Е. А. Анисимова, Д. Р. Яруллина

*Казанский (Приволжский) федеральный университет,  
Институт фундаментальной медицины и биологии*

E. A. Anisimova, D. R. Yarullina

*KFU, Russia*

E-mail: Elizaveta-real@mail.ru

#### **Аннотация**

Среди исследованных 73 штаммов лактобацилл широко распространена устойчивость к ципрофлоксацину, ванкомицину, аминогликозидам, а также цефалоспорином 3 поколения. У одного штамма (*L. fermentum* 5-1) обнаружена устойчивость к эритромицину и у 5 (*L. fermentum* HF-A1, *L. fermentum* HF-B1, *L. fermentum* HF-A4, *L. fermentum* 3-4, *L. fermentum* 5-2) — к тетрациклину. В хромосомной ДНК *L. fermentum* 5-1 методом ПЦР-анализа обнаружен ген *ermB*, а в плазмидной ДНК — гены *tetM* и *tetK*. Гены *tetM* и *tetK* также были выявлены в плазмидной ДНК у пяти устойчивых к тетрациклину штаммов лактобацилл. Ген *blaTEM*, кодирующий β-лактамазы расширенного спектра (ESBL), обнаружен в геномах 28 штаммов лактобацилл, ген *parC*, детерминирующий устойчивость к ципрофлоксацину, обнаружен в геномной ДНК у 15 лактобацилл. У ряда штаммов, не проявляющих устойчивость к эритромицину и тетрациклину, показано наличие молчащих генов *ermC*, *mefA*, *ermB*, *tetK* и *tetL*. У четырех штаммов были найдены гены *aadA* и *aadE*, определяющие ферментативную инактивацию стрептомицина. Впервые установлено, что бактерии *S. freundii* способны приобретать ген устойчивости к тетрациклину *tetK* после электропорации плазмидной ДНК *L. fermentum* 5-1.

#### **Abstract**

Resistance to ciprofloxacin, vancomycin, aminoglycosides, and 3rd-generation cephalosporins were widespread among 73 tested lactobacilli. In *L. fermentum* strain 5-1 eryth-

---

© Е. А. Анисимова, Д. Р. Яруллина, 2019

\* Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 18-34-00268 в рамках Программы повышения конкурентоспособности КФУ.

romycin resistance was detected and five strains (*L. fermentum* HF-A1, *L. fermentum* HF-B1, *L. fermentum* HF-A4, *L. fermentum* 3-4, *L. fermentum* 5-2) were shown to be resistant to tetracycline. By PCR analysis, the *ermB* gene was detected in the chromosomal DNA of *L. fermentum* 5-1, while genes *tetM* and *tetK* were found in the plasmid DNA. The *tetM* and *tetK* genes were also identified in plasmid DNA from five tetracycline resistant *Lactobacillus* strains. The *bla*<sub>TEM</sub> gene encoding extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL) was found in the genomes of 28 lactobacilli strains, the *parC* gene that determines ciprofloxacin resistance was found in the genomic DNA of 15 lactobacilli strains. It was shown that some strains which do not exhibit resistance to erythromycin and tetracycline carry silent genes *ermC*, *mefA*, *ermB*, *tetK*, and *tetL*. The genes *aadA* and *aadE*, encoding the enzymatic inactivation of streptomycin, were detected in four strains. We have demonstrated that *C. freundii* was capable of acquiring the tetracycline resistance gene *tetK* after electroporation with *L. fermentum* 5-1 plasmid DNA.

Бактерии рода *Lactobacillus* являются важной составляющей естественной микробиоты кишечника человека и массово используются в пищевой промышленности в нормализующих микрофлору препаратах — пробиотиках, а также присутствуют во многих ферментированных продуктах и напитках.

Устойчивость к антибиотикам является важным фактором отбора пробиотических штаммов лактобацилл, так как такие препараты можно совмещать с антимикробной терапией при лечении кишечных инфекций или применять для профилактики антибиотикоассоциированной диареи. Однако важно исключить возможность создания в желудочно-кишечном тракте человека резервуара генов устойчивости к антибиотикам за счет бактерий с приобретенной устойчивостью. Поэтому целью данной работы является выяснение механизмов устойчивости новых штаммов лактобацилл к антибиотикам различных классов.

В данной работе у 73 штаммов лактобацилл, выделенных из кисломолочных продуктов, фекалий человека, пробиотиков и растительного материала, определены уровни устойчивости к 25 клинически распространенным антибиотикам. Среди исследованных лактобацилл широко распространена устойчивость к ципрофлоксацину, ванкомицину, аминогликозидам, а также цефалоспорином 3 поколения. У штамма *L. fermentum* 5-1 обнаружена устойчивость к эритромицину и у 5 штаммов (*L. fermentum* HF-A1, *L. fermentum* HF-B1, *L. fermentum* HF-A4, *L. fermentum* 3-4, *L. fermentum* 5-2) — к тетрациклину. Методом микроразведенный установили, что рост устойчивых к тетрациклину штаммов ингибируется при концентрации антибиотика 16–32 мкг/мл, а к эритромицину — при 1 мкг/мл, что позволяет отнести эти штаммы к устойчивым к тетрациклину и эритромицину, соответственно. В работе исследовали наличие 24 генов антибиотикорезистентности в геномах лактобацилл методом ПЦР. В хромосомной ДНК устойчивого к эритромицину штамма *L. fermentum* 5-1 обнаружен ген *ermB*, а в

плазмидной ДНК — гены *tetM*, *tetK*. Последние также были найдены в плазмидной ДНК у устойчивых к тетрациклину штаммов лактобацилл *L. fermentum* HF-A1, *L. fermentum* HF-B1, *L. fermentum* HF-A4, *L. fermentum* 3-4, *L. fermentum* 5-2. У ряда штаммов, не проявляющих устойчивость к эритромицину и тетрациклину, выявлены молчащие гены *ermC*, *mefA*, *ermB*, *tetK* и *tetL*. С помощью ПЦР-анализа и последующего секвенирования полученного ампликона в хромосомной ДНК *L. fermentum* 5-1 мы обнаружили ген устойчивости к эритромицину *ermB*, на 96 % гомологичный гену 23S рРНК метилазы *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pneumoniae* и *Staphylococcus aureus*. У штаммов *L. rhamnosus* I2L, *L. plantarum* FCa3L, *L. plantarum* AG1, *L. plantarum* AG10 были найдены гены *aadA* и *aadE*, определяющие ферментативную инактивацию стрептомицина. Ген *parC*, определяющий устойчивость к ципрофлоксацину за счет модификации субъединицы *ParC* топоизомеразы IV, был обнаружен в геномной ДНК у 15 штаммов лактобацилл. В геномах 28 устойчивых к цефалоспоринам бактерий детектировали наличие гена *bla*TEM, кодирующего β-лактамазы расширенного спектра (ESBL). По результатам молекулярно-генетического анализа генов антибиотикорезистентности были отобраны 6 штаммов лактобацилл (*L. fermentum* HF-A1, *L. fermentum* HF-B1, *L. fermentum* HF-A4, *L. fermentum* 3-4, *L. fermentum* 5-1 и *L. fermentum* 5-2) для проверки возможности передачи генов устойчивости к тетрациклину и эритромицину условно-патогенным бактериям. В качестве потенциальных реципиентов генов *erm* и *tet* с помощью метода градиентного агара были отобраны чувствительные к тетрациклину бактерии *Citrobacter freundii*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* и *Listeria monocytogenes* и чувствительные к эритромицину *S. haemolyticus*. В данной работе мы впервые показали, что бактерии *C. freundii* могут приобретать устойчивость к тетрациклину после электропорации и последующей обработки плазмидной ДНК *L. fermentum* 5-1. После такой обработки *C. freundii* приобретали способность расти на среде с тетрациклином, а в их геноме с помощью пары праймеров к гену *tetK* был получен ПЦР-продукт (с праймерами к гену *tetM*, присутствующему у *L. fermentum* 5-1, в геномной ДНК *C. freundii* ПЦР-продукт не образовывался). Таким образом, в данной работе мы обнаружили, что промежуточно устойчивые к тетрациклину бактерии *L. fermentum* 5-1, несущие гены устойчивости *tetM* и *tetK* на плазмидной ДНК, могут служить потенциальными векторами накопления и распространения генов антибиотикорезистентности в кишечном микробиоме.

Полученные данные расширяют представление о природе устойчивости лактобацилл к антибиотикам и будут полезны при организации безопасного производства пищевых продуктов на основе лактобацилл, а также в биотехнологии и здравоохранении.



**СРАВНЕНИЕ ТРЕХ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ МЕТОДОВ  
ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИЙ РЕКОМБИНАНТНЫХ  
МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ  
В КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ**

COMPARISON OF THREE CHROMATOGRAPHIC METHODS  
TO DETERMINE RECOMBINANT MONOCLONAL ANTIBODY TITERS  
IN CELL CULTURE MEDIA

А. Д. Аскретков<sup>1</sup>, Н. В. Орлова<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *ФГБУ ВО МИРЭА — Российский технологический университет*

<sup>2</sup> *ФГБУ Государственный научно-исследовательский институт  
генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального  
исследовательского центра «Курчатовский институт»*

A. D. Askretkov<sup>1</sup>, N. V. Orlova<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *MIREA — Russian technological university*

<sup>2</sup> *Scientific Center “Kurchatov Institute” — Research Institute for Genetics and  
Selection of Industrial Microorganisms*

E-mail: askretkov.a.d@gmail.com

**Аннотация**

В работе проводится сравнение трех хроматографических методов определения концентрации рекомбинантных моноклональных антител в культуральной жидкости, полученной культивированием культуры яйцеклеток китайского хомячка. Полученные результаты имеют хорошую воспроизводимость, а также коррелируют с данными, полученными методом биослойной интерферометрии.

**Abstract**

In this paper we conduct comparison of three chromatographic methods of determination of recombinant monoclonal antibodies concentration in cell culture media, obtained from Chinese hamster ovary cell line bioreactor process. Obtained results are reproducible and similar to those obtained by bio-layer interferometry.

## Введение

Анализ концентрации рекомбинантных моноклональных антител (pMAT) в культуральной жидкости (КЖ) имеет немалое значение, как в процессе разработки технологии культивирования, так и в рутинном производстве для мониторинга процесса. Для этого, имеется достаточно широкий набор методов, таких как иммуоферментный анализ, биослойная интерферометрия, капиллярный электрофорез, ВЭЖХ и др. ВЭЖХ среди других методов выделяется своей экспрессностью, относительно низкой стоимостью анализа, точностью и воспроизводимостью.

Целью данной работы является разработка трех аналитических методов: аффинной, обращенно-фазовой и эксклюзионной хроматографии для определения концентраций pMAT в КЖ и их сравнение.

Для решения данной цели были поставлены следующие задачи:

- разработать три хроматографические методики определения концентраций pMAT в КЖ;
- осуществить сравнение методик определения концентрации pMAT в КЖ.

Экспериментальная часть

Эксперименты проводились на ВЭЖХ системе Dionex Ultimate 3000 оснащенной диодно-матричным детектором.

В эксперименте использовалась КЖ pMAT: Адалimumаб, Инфликсимаб и Экулизумаб, производства ООО «Фармапарк».

Для обращенно-фазовой хроматографии использовалась колонка YMC Pack C4 200 Å. 250 × 4,6 мм, 5 мкм (YMC, Япония). Анализ осуществлялся при температуре колонки 70 °С при скорости потока 1 мл/мин, в системе вода/смесь 60 % ацетонитрила, 20 % изопропанола и 20 % воды (элюент Б) с добавкой 0,1 % трифторуксусной кислоты. Элюирование осуществлялось в градиентном режиме от 5 до 70 % элюента Б за 4 минуты, после 4 мин изократического элюирования. Детекция осуществлялась при 214 нм. Общее время анализа составляло 20 минуты.

Аффинная хроматография осуществлялась на колонке TSKgel Protein A-5PW (Tosoh, Япония) при 25 °С при скорости потока 1,5 мл/мин, в системе: 50 мМ фосфат натрия pH 7,5 и 100 мМ раствор глицина pH 2,5 (HCl) в качестве элюента Б. После 2 минут изократического элюирования при 0 % Б, следовало элюирование при 100 % Б в течение 2,4 минут и уравнивание колонки для последующего анализа при начальных условиях в течение 2 минут. Детекция осуществлялась при 280 нм. Общее время анализа составляло 6,5 минут.

Эксклюзионная хроматография осуществлялась на колонке YMC-Pack Diol-120 500x8 мм, 5 мкм (YMC, Япония). Скорость потока подвижной фазы (0,1 М фосфат натрия, 0,15 М хлорид натрия pH 7,0) составляла 0,5 мл/мин. Детекция осуществлялась при 214 нм. Общее время анализа составляло 50 минут.

Для всех аналитических методик использовался супернатант КЖ, при необходимости, разведенный очищенной водой.

## Результаты

### *Обращенно-фазовая хроматография*

Подбор элюентов для хроматографирования начинали с системы вода/ацетонитрил, однако ввиду преципитации белка и низкой эффективности пика рМАТ, в систему ввели изопропанол.

### *Афинная хроматография*

Изначально для анализа моноклонального антитела использовали систему рекомендуемую производителем — 20 мМ фосфат натрия pH 7,4 (связывающий буфер) и 20 мМ фосфат натрия pH 2,5 (элюирующий буфер). В данной системе пик антитела имел чрезвычайно низкую эффективность, при этом иммуноглобулины G1 подкласса имели очень хороший и эффективный пик в данной системе (Адалimumаб, Инфликсимаб). Смена элюирующего буфера на 20–100 мМ цитрат натрия также не дала улучшения результатов. Наиболее подходящей системой для Экулизумаба оказался 20 мМ фосфат натрия pH 7,5 как связывающий буфер и 100 мМ глицин pH 2,5 как элюирующий буфер.

### *Эксклюзионная хроматография*

Изначально для определения концентрации рМАТ в КЖ использовались колонка TSKgel G3000 SWx1, однако происходило быстрое ухудшение разделяющих свойств колонки и критическое ухудшение эффективности пика аналита, по-видимому, из-за необратимого удерживания компонентов КЖ в порах. При использовании колонки TSKgel G4000 SWx1 данного эффекта не наблюдалось. Помимо целых рМАТ, данная колонка позволяла полу-количественно оценить присутствие его фрагментов — тяжелой и легкой цепи в КЖ.

## Сравнение методов

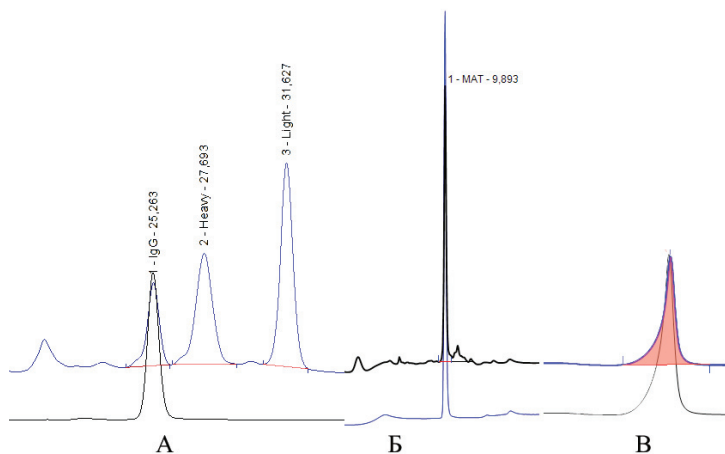
В таблице приведено сравнение результатов определения в КЖ концентрации рМАТ, полученных при помощи различных аналитических методов.

### Результаты определения концентраций рМАТ в КЖ

Образец	Метод и полученные данные			
	Хроматография			Биослойная интерферометрия
	Обращенно-фазовая	Аффинная	Эксклюзионная	
Инфликсимаб КЖ	3,10	3,07	3,05	3,10
Адалиму-маб КЖ	2,28 (3,89)*	2,01	1,94	1,99
Экулизумаб КЖ	4,17	4,18	4,15	4,11

\* Для анализа использовалась колонка с сорбентом — октилсиликагель вместо бутилсиликагеля, т.к. на последнем наблюдалось коэлюирование примеси из КЖ и происходило завышение результата определения (данные в скобках).

На рисунке приведены типичные хроматограммы для разработанных методов.



Хроматограммы, которые были получены несколькими методами хроматографии: эксклюзионной (А), обращенно-фазовой (Б), аффинной (В). Нижняя хроматограмма — стандартный образец Экулизумаба, верхняя — образец КЖ Экулизумаба. На рис 1.А видно присутствие значительных количеств легкой и тяжелой цепи в КЖ

Аффинная хроматография имеет значительные преимущества в виде экспрессности и несравненной специфичности, а так же является наилучшим решением для определения концентраций других антител в рутинном контроле и на поздних этапах разработки. В то же время недостаток ее заключается в неспособности определять фрагментированные части антитела — легкую и тяжелую цепи, что может решаться использованием методов обращенно-фазовой, или эксклюзионной хроматографии. Аналитические диапазоны методик: 0,1–4 мг/мл для аффинной, 0,05–0,5 мг/мл для обращенной фазовой, 0,1–0,8 мг/мл — для эксклюзионной хроматографии. RSD повторяемости для всех методов не превышает 5 %. Как видно из таблицы, сравнимые значения концентраций наблюдаются для всех аналитических методов и согласуются со значениями, полученными методом биослойной интерферометрии.

Проведена разработка и сравнение трех аналитических методов определения концентрации рекомбинантных моноклональных антител — Экулизумаб, Адалimumаб, Инфликсимаб в культуральной жидкости методами аффинной, обращенно-фазовой и эксклюзионной хроматографии.

**ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭКСТРАКЦИИ  
С-ФИКОЦИАНИНА ИЗ КЛЕТОК ЦИАНОБАКТЕРИИ  
ARTHROSPIRA PLATENSIS B-12619\***

ESTIMATION OF EFFICIENCY OF EXTRACTION OF C-PHYCOCYANIN  
FROM CELLS OF CYANOBACTERIA ARTHROSPIRA PLATENSIS  
B-12619

Н. П. Бабиченко, Я. Э. Сергеева

*Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»*

N. P. Babichenko, Ya. E. Sergeeva

*NRC «Kurchatov Institute», Russia*

E-mail: babichenko28@gmail.com

**Аннотация**

Цианобактерии являются богатым источником биологически активных соединений. Например, у рода *Arthospira* (синоним *Spirulina*) одним из наиболее интересных компонентов является С-фикоцианин. С-фикоцианин (С-РС) — фикобилипротеин, пигмент белкового строения фотосинтетического аппарата, обладающий противовоспалительным, противораковым, заживляющим, смягчающим и омолаживающим свойствами благодаря своей высокой антиоксидантной активности [1]. В настоящее время общая рыночная стоимость фитобилипротеин-продуктов оценивается в более чем 60 миллионов долларов США. Коммерческая ценность фикоцианина напрямую связана со степенью его чистоты [2].

Целью данной работы было проведение сравнительного анализа различных экстрагентов, влияющих на эффективность выделения С-фикоцианина из свежесобранной цианобактерии *Arthospira platensis* B-12619.

**Abstract**

Cyanobacteria are a rich source of bioactive compounds. For example, in the genus *Arthospira* (a synonym *Spirulina*) one of the most interesting components is the C-phycoanin one of the most interesting components is the C-phycoyanin. C-phycoyanin (C-PC)

---

© Н. П. Бабиченко, Я. Э. Сергеева, 2019

\* Работа выполнена при поддержке Министерства Науки и Высшего Образования Российской Федерации. Номер соглашения No. 14.616.21.0079, уникальный идентификационный номер прикладного исследования RFMEFI61617X0079.

is a phycobiliprotein, a pigment of the protein structure of the photosynthetic apparatus, which has anti-inflammatory, anti-cancer, healing, softening and anti-aging properties due to its high antioxidant activity [1]. Currently, the total market value of phytobiliprotein products is estimated to be over US\$ 60 million. The commercial value of phycocyanin is directly related to its degree of purity [2].

The aim of this work was a comparative analysis of various extractants that affect the efficiency of isolation of C-phycocyanin from freshly collected cyanobacteria *Arthrospira platensis* B-12619.

Культивирование цианобактерии *A. platensis* B-12619 проводили на среде Зарукка [3] в течение 7 суток при температуре 30 °С, круглосуточной освещенности 1900 лк, перемешивании 140 об./мин на шейкере-инкубаторе New Brunswick™ Innova® 42/42R, Eppendorf (Германия) в колбах Эрленмейера на 1 л с 240 мл питательной среды (рН 9,61). Рост биомассы *A. platensis* (по оптической плотности OD при длине волны 750 нм) и рН среды контролировали в течение 7 суток (рис. 1.).

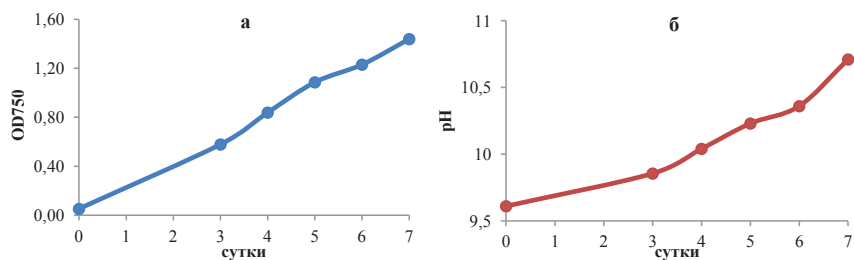


Рис. 1. Кривая роста (а) и зависимость рН среды (б) от времени культивирования биомассы *A. platensis* B-12619

Основываясь на ранее проведенных опытах по выращиванию *A. platensis*, сбор биомассы (5 сутки) проводили центрифугированием (7500 об./мин, 7 мин).

Поскольку С-РС является водорастворимым белком, для его выделения используют экстрагенты — водные растворы, среди них наиболее широкое применение получил натрий-фосфатный буфер (рН 7,0). На основании анализа литературных данных [4] были выбраны следующие экстрагенты:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Экстрагент	натрий-фосфатный буфер	деионизированная вода	хлорид аммония	хлорид натрия	хлорид кальция	хлорид натрия	хлорид кальция	хлорид натрия	сульфат аммония	
Молярность, М	0,1	—	0,05	0,1	0,05	0,1	0,05	0,1	0,05	0,1
рН	7,03	6,97	6,36	6,45	7,6	7,62	5,83	6,31	6,54	6,34

Исчерпывающую экстракцию С-РС проводили согласно [5] с предварительной обработкой биомассы — трехкратным циклом замораживания-оттаивания. Спектр поглощения С-РС снимали на спектрофотометре Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis (США), количественное содержание С-РС и его чистоту рассчитывали, основываясь на [6, 7]. Концентрация биомассы *A. platensis* в каждом эксперименте составляла 10 мг/мл.

В результате экспериментов были получены данные, представленные на (Рис. 2.).

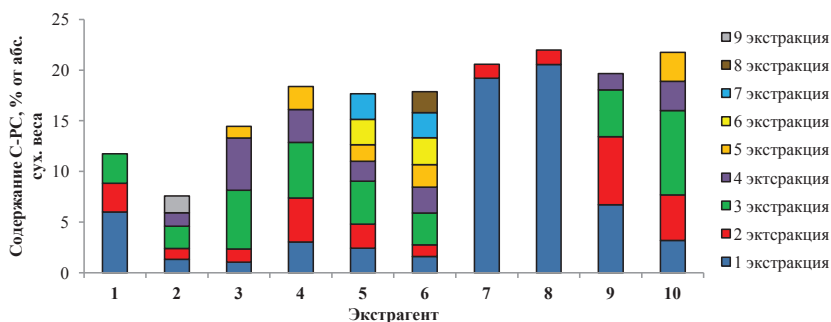


Рис. 2. Влияние экстрагента на количественное извлечение С-фикоцианина при его выделении из биомассы *A. platensis*

Таким образом, был проведен сравнительный анализ водных растворов солей, их влияние на степень извлечения С-РС из *A. platensis* В-12619.

Согласно полученным результатам, наибольшая степень извлечения С-РС была достигнута при использовании экстрагентов: растворов хлорида кальция (С-РС 20,58 % и 21,97 % при концентрации 0,05 и 0,1 М соответственно), сульфата аммония (С-РС 19,65 % и 21,74 %), хлорида натрия (С-РС 17,67 % и 17,88 %) и 0,1 М хлорида аммония (С-РС 18,37 %). Также отмечено, что при использовании в качестве экстрагента хлорида кальция (чистота 1,64 и 1,57) и 0,05 М хлорида аммония (чистота 1,6) чистота С-РС была значительно выше, чем при использовании остальных экстрагентов. Однако, стоит обратить внимание, что при использовании хлорида кальция полное извлечение С-РС было достигнуто всего лишь за одну повторность/экстракцию, что несомненно выигрышно по времени в отличие от остальных экстрагентов.

## Литература

1. Ruiz-Domínguez M. C. et al. Rapid Green Extractions of C-Phycocyanin from *Arthrospira maxima* for Functional Applications. // Applied Sciences. 2019. Vol. 9. №. 10. P. 1987.



2. Borowitzka M. A. High-value products from microalgae their development and commercialization. //Journal of applied phycology. 2013. Vol. 25. №. 3. P. 743–756.
3. Zarrouk C. Contribution a l'étude d'une Cyanophycee. Influence de Divers Facteurs Physiques et Chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina mixima*. // Thesis. University of Paris, France. 1966.
4. Manirafasha E. et al. Ammonium chloride: a novel effective and inexpensive salt solution for phycocyanin extraction from *Arthrospira (Spirulina) platensis*. //Journal of Applied Phycology. 2017. Vol. 29. №. 3. P. 1261–1270.
5. Liu Y., Feng Y., Lun J. Aqueous two-phase countercurrent distribution for the separation of c-phycocyanin and allophycocyanin from *Spirulina platensis*. //Food and bioproducts processing. 2012. Vol. 90. №. 2. P. 111–117.
6. Bennett A., Bogorad L. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. //The Journal of cell biology. 1973. Vol. 58. №. 2. P. 419–435.
7. Boussiba S., Richmond A. E. Isolation and characterization of phycocyanins from the blue-green alga *Spirulina platensis*. //Archives of Microbiology. 1979. Vol. 120. №. 2. P. 155–159.

## ОПИСТОРХОЗ — ПАРАЗИТОЗ, СПОСОБНЫЙ ВЫЗЫВАТЬ РАЗВИТИЕ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ\*

OPISTHORCHOSIS — PARASITOSIS, ABLE TO CAUSE THE  
DEVELOPMENT OF ONCOLOGICAL DISEASES

О. А. Базалий<sup>1</sup>, М. С. Евтифеева<sup>1</sup>, Е. А. Лейб<sup>1</sup>, О. И. Бибик<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Кемеровский государственный медицинский университет*

<sup>2</sup>*Кемеровский государственный медицинский университет, доктор биологических наук, профессор кафедры биологии с основами генетики и паразитологии*

O. A. Bazaliy<sup>1</sup>, M. S. Evtifeeva<sup>1</sup>, E. A. Leyb<sup>1</sup>, O. I. Bibik<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Students of Kemerovo State Medical University*

<sup>2</sup>*Doctor of Biological Sciences, Professor of the Department of Biology with the basics of genetics and parasitology*

### Аннотация

Описторхоз отнесен к группе наиболее опасных биогельминтозов, две трети мирового ареала которого приходится на территорию России. Поэтому в России описторхоз по-прежнему остается актуальной проблемой здравоохранения. Зараженность *O. felineus* населения эндемичных регионов в Западной Сибири по разным оценкам варьирует от 10 % и до 45 %. Описторхоз, как биогельминтоз-эндемик в Кемеровской области (Кузбассе) занимает третье место по распространённости заболеваний гельминтозами среди населения [1, 8]. Родственные виды — *O. viverrini*, *S. sinensis* — являются основными факторами развития холангиокарциномы в эндемичных регионах Юго-Восточной Азии.

### Abstract

Opisthorchiasis is assigned to the group of the most dangerous biohelminthoses, two thirds of the world range of which are in Russia. Therefore, opisthorchiasis in Russia remains an urgent public health problem. According to various estimates, the infection of *O. felineus* in the population of endemic regions in Western Siberia varies from 10% to 45%. Opisthorchiasis, as biohelminthiasis-endemic in the Kemerovo region (Kuzbass), takes the third place in the prevalence of helminthiasis among the population [1, 4, 6, 8].

Related species — *O. viverrini*, *C. sinensis* — are the main factors in the development of cholangiocarcinoma in the endemic regions of Southeast Asia.

На данный момент строгой эндемичности возбудителей описторхоза нет, что связано с увеличением потока иммигрантов, развитием туристических поездок и увеличением импорта продуктов рыболовства [9], так как при вывозе рыбы заражение возможно и за пределами этих очагов. Специфические этнические или традиционные особенности поведения, связанные с пищей и питанием, определяют характер распространения и уровень пораженности населения эндемичных очагов. Заражение возбудителем заболевания происходит при приеме сырой или плохо приготовленной рыбы, которая содержит метацеркарии трематод. Основным источником яиц описторхов по мнению ряда исследователей являются человек, домашние плотоядные и всеядные животные (кошки, собаки, свиньи), а дикие животные (норка, соболь, лиса, хорёк, волк, водяная крыса, бобры, медведь и другие) играют лишь дополнительную роль в поддержании очагов инвазии. Основными источниками инвазии при описторхозе считаются кошка и собака.

Течение описторхоза может быть острым и хроническим, при любой форме заболевания развиваются серьёзные осложнения — цирроз печени, гепатоцеллюлярная карцинома и другие [1]. В 2009 году *O. viverrini* признан Международным агентством по исследованию рака как биологический канцероген [4]. Канцерогенная роль *O. felineus* еще недостаточно изучена [7]. Однако жизненные циклы, морфология, локализация в организме человека *O. viverrini* и *O. felineus* схожи.

**Цель исследования** — провести анализ на способность описторхоза вызывать развитие онкологических заболеваний. Изучение заболеваемости в неблагоприятных регионах.

**Материалы и методы:** анализ обзора литературы и научных статей российских и зарубежных учёных за последние 10 лет, изучение статистики заболеваемости описторхозом.

### Результаты и их обсуждение

При описторхозе преимущественно происходит поражение гепатобилиарной системы человека и поджелудочной железы с длительным течением и частыми обострениями [2]. Установлено, что низкомолекулярные продукты возбудителя описторхоза оказывают патогенное действие на окружающие ткани хозяина, включая индукцию холангиокарциногенеза [3,6,9]. Холангиокарцинома считается фатальной опухолью и распространена в эндемичных районах присутствия возбудителя описторхоза. Рак может развиваться через 30–40 лет после заражения, а смерть наступает через 3–6 месяцев по-

сле постановки диагноза [8]. Находясь вблизи эпителия желчных протоков и продуцируя продукты своего метаболизма, являющиеся токсичными и иммуногенными для организма человека, описторхи вызывают гиперплазию эпителия желчного протока. Возможно, гельминты участвуют в активации окислительного стресса тканей желчевыводящих путей, что приводит к их патоморфологическим изменениям и играет существенную роль в формировании предракового состояния эпителия желчевыводящих путей — дисплазии и неоплазии холангиоцитов.

Механическое повреждение во время процессов присасывания описторхов, отрыве эпителия и миграции паразита приводит к изъязвлению ткани. Яйца гельминтов, проникая в ткани, вызывают гранулематозное воспаление. Инфильтрация воспалительными клетками связана с присутствием антигенов гельминта. Гиперплазию и воспалительный процесс относят к предопухолевым состояниям. Немалую роль играют активные вещества, такие как NO, а также кислородные радикалы, такие как супероксид ( $O_2^-$ ), вырабатываемые в хронически воспаленных тканях в качестве иммунного ответа. NO увеличивает возможность канцерогенеза через ингибирование репарации ДНК [7]. Продукты окисления липидов могут реагировать с основаниями ДНК с образованием аддуктов. Эти поражения могут инициировать канцерогенез посредством специфических замен пар оснований.

Факторы риска, связанные с образом жизни (алкоголь, курение), могут взаимодействовать с эффектами инвазии и усиливать потенциальные канцерогенные эффекты.

Мы изучили заболеваемость описторхозом с 1993 года по 2019 г. По данным Роспотребнадзора общая заболеваемость описторхозом к 2017 году снизилась на 6 %, при этом 65 % случаев было зафиксировано во время профилактических медицинских осмотров.

Самые высокие показатели заболеваемости регистрировались в 1991 г. (31,1) (на 100 тыс. населения) и в 2000 г. (29,8), а самые низкие — в 1993 г. (22,6). В 2005 г. (28,3 на 100 тыс. населения). К 2012 году общий показатель 22,1. К 2018 году средний уровень заболеваемости по России составил 26,3 (на 100 тыс.), в то время как в отдельных регионах зафиксирован рост заболеваемости до 156,2 (на 100 тыс. населения), такими регионами стали Челябинская область, Тюменская область и Томская область. Также в данных областях отмечен рост онкологических заболеваний ЖКТ на 12 % за последние 5 лет.

Сравнивая статистику пораженного населения за последние 25 лет, можно отметить волнообразный характер заболеваемости, наличие «вспышек» заболеваемости, при этом причина подъема уровня заболеваемости до сих пор остается не известной.

## Выводы

Заболевание описторхоз в настоящее время является одной из серьёзных проблем здравоохранения, так как представители семейства *Opisthorchiidae* *Opisthorchis viverrini* и *O. felineus* кроме основного заболевания — гельминтоза, паразитируя в гепатобилиарном тракте человека, продуцируя токсичные и иммуногенные продукты своей жизнедеятельности, нарушая метаболизм клеток способствуют развитию канцерогенеза и являются факторами развития его стадий.

В связи с опасной эпид. обстановкой в Сибирских регионах необходимо более детально изучить влияние паразитоза на канцерогенез, выявление ФР, наследственной предрасположенности на канцерогенез, чтобы в будущем успешно бороться с онкологическими заболеваниями билиарного тракта.

## Литература

1. Бибик, О. И. Гельминтозы встречаются гораздо чаще чем принято об этом думать / О. И. Бибик, Д. В. Кирсанова, В. И. Барсукова // Организм и среда жизни: Материалы 2 межрегион. науч.-практ. конф., посвящ. 205 со дня рождения К. Ф. Рулье, Кемерово, 15 февраля 2019. С. 9–17.
2. Каприна, А. Д. Злокачественные новообразования в России в 2014 году (заболеваемость и смертность) / А. Д. Каприн, В. В. Старинский, Г. В. Петрова. М.: МНИ-ОИ им. П. А. Герцена филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2016. 250 с.
3. Начева, Л. В. Описторхоз в Кемеровской области / Л. В. Начева, Т. Е. Старченкова, О. И. Бибик, М. В. Додонов // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2007. № 1. С. 25–28.
4. Нестерок, Ю. А. Оценка эпидемиологической ситуации по описторхозу Кемеровской области / Ю. А. Нестерок, М. С. Боборыкин // Проблемы фундаментальной медицины и биологии: Материалы Международной научно-практической конференции молодых учёных и студентов. Кемерово: КемГМУ, 2018. С. 118–121.
5. Плотникова, Е. Ю. Описторхоз: осложнения и проблемы лечения / Е. Ю. Плотникова, Е. Н. Баранова // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. Из-во: ООО «Гастрор», 2018. С. 14–18.
6. Andrews, R. H. *Opisthorchis viverrini*: an underestimated parasite in world health / R. H. Andrews, P. Sithithaworn, T. N. Petney // Trends Parasitol. 2008. 24(11):497–501
7. Honjo, S. Genetic and environmental determinants of risk for cholangiocarcinoma via *Opisthorchis viverrini* in a densely infested area in Nakhon Phanom, northeast Thailand / S. Honjo, P. Srivatanakul, H. Sriplung et al // Int. J. Cancer. 2010. 117:854–860
8. Laha, T. Asparaginyl endopeptidase from the carcinogenic liver fluke, *Opisthorchis viverrini*, and its potential for serodiagnosis / T. Laha, J. Sripa, B. Sripa et al // Int. J. Infect. Dis. 2009. 12:49–59
9. Marcos, L. A. Update on hepatobiliary flukes: fascioliasis, opisthorchiasis and clonorchiasis / L. A. Marcos, A. Terashima, E. Gotuzzo // Curr. Opin. Infect. Dis. – 2008. 21(5):523–30.

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ПОТЕНЦИАЛА РАСТВОРИМЫХ И ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ ДЛЯ РАЗРУШЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БИОПЛЕНОК \*

### COMPARATIVE ASSESSMENT OF CAPABILITIES OF SOLUBLE AND IMMOBILIZED ENZYMES FOR THE DESTRUCTION OF BACTERIAL BIOFILMS

Д. Р. Байдамшина<sup>1</sup>, Е. Ю. Тризна<sup>1</sup>, М. Г. Холявка<sup>2</sup>, А. Р. Каюмов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

D. R. Baidamshina<sup>1</sup>, E. Yu. Trizna<sup>1</sup>, M. G. Kholiyavka<sup>2</sup>, A. R. Kayumov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *KFU, Russia*

<sup>2</sup> *VSU, Russia*

E-mail: [prosto-di@mail.ru](mailto:prosto-di@mail.ru)

#### Аннотация

На сегодняшний день общепризнано, что бактерии существуют как в планктонной форме, так и в форме биопленок. В составе биопленок клетки не поддаются воздействию иммунной системы хозяина и антибиотиков, что усложняет борьбу с ними. Разрушение матрикса биопленки является мощным подходом к уничтожению микробных биопленок. По сравнению с иммобилизованными на хитозане, растворимые фицин и трипсин значительно эффективнее разрушали матрикс биопленки большинства исследованных бактерий. Значимая деструкция иммобилизованным фицином наблюдалась только в отношении биопленок стафилококка. Однако, учитывая высокую стабильность иммобилизованного фицина, можно рассматривать препарат для использования в перевязочном материале.

#### Abstract

To the date, this is generally recognized that bacteria are existing in both planktonic form and in the biofilms. While in biofilms, bacteria are not susceptible to the host immune system and antibiotics that complicates their treatment. Disrupting components of biofilm matrix is a promising approach for microbial biofilms eradication. When compared with chitosan-immobilized enzymes, a soluble ficin and trypsin were significantly more efficient when destroying the biofilm matrix of the most of investigated bacteria. The im-

mobilized ficin was efficient only against staphylococcal biofilms. Nevertheless, taking in account high stability of immobilized ficin, it can be considered for topical application in wound dressing materials.

На сегодняшний день общепризнано, что клетки различных бактерий могут существовать не только в планктонной форме, но и форме биопленок. Биопленки представляют собой функциональные многослойные сообщества микроорганизмов, прикрепившиеся к поверхности и встроенные в самосинтезированный внеклеточный матрикс. В составе биопленок клетки не поддаются воздействию иммунной системы хозяина и антибиотиков, что усложняет борьбу с ними. Поэтому нарушение матрикса биопленки является мощным подходом к уничтожению микробных биопленок.

Для этого, нами был проведен анализ деструкции микробных биопленок различными растворимыми и иммобилизованными ферментами. Для определения эффективности разрушения биопленок клетки условно-патогенных бактерий *S.aureus*, *S.epidermidis*, *M.luteus*, *B.subtilis*, *E.coli* и *P.aeruginosa* выращивали в 96-луночных планшетах при 37°C на среде БМ для образования прочной биопленки. После 48 часов культивирования, удаляли культуральную жидкость, вносили свежую среду и ферменты в различных концентрациях, после продолжали инкубирование в течение 24 часов. В наших экспериментах ферменты вносились до конечных концентраций 10, 100, 1000 мкг/мл, тогда как для существующих коммерческих препаратов ферментов для ранозаживления рекомендована концентрация 2000–5000 мкг/мл. Затем проводилось окрашивание остаточной биопленки кристаллическим фиолетовым (рис. 1).

Наиболее эффективным был растительный фермент фицин, уже при концентрации 10 мкг/мл он действовал на биопленки всех штаммов за исключением *P. aeruginosa*. Наиболее эффективно разрушались биопленки бактерий *S. aureus* и *S. epidermidis*. При этом трипсин (коммерческий препарат) был менее эффективен по сравнению с фицином. Обработка биопленок иммобилизованным фицином оказывала механическое удаление адгезированных клеток и биопленка разрушалась лишь частично, биопленки *S. aureus* разрушались на 30 % при концентрациях 100 мкг/мл (в пересчете на белок). Иммобилизованный трипсин практически не вызывал достоверного разрушения биопленок.

Но, несмотря на эффективное действие растворимого фицина на биопленки, ферменты показали повышенную стабильность в иммобилизованном виде. В ходе выполнения работы нами были оптимизированы методики и получены фицин и трипсин иммобилизованные на хитозанах с молекулярной массой 200 и 350 кДа. В физиологических условиях (0.9 % NaCl, 35°C)

ферменты показали повышенную стабильность в иммобилизованном виде, при этом стабильность не зависела от молекулярной массы хитозана (Рисунок 2). За счет иммобилизации время сохранения половины ферментативной активности возросло в 2–4 раза.

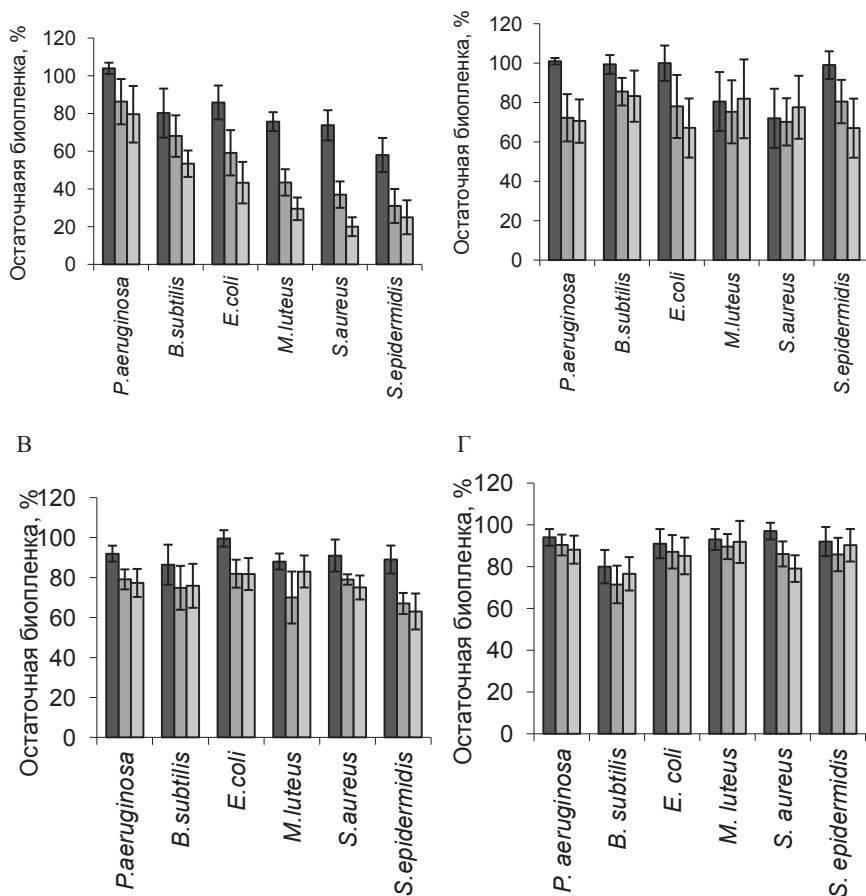


Рис. 1. Разрушение бактериальных биопленок растворимыми (А,Б) и иммобилизованными на среднемoleкулярном хитозане (В,Г) фицином и трипсином. Оценка остаточной биопленки с помощью окрашивания кристаллическим фиолетовым



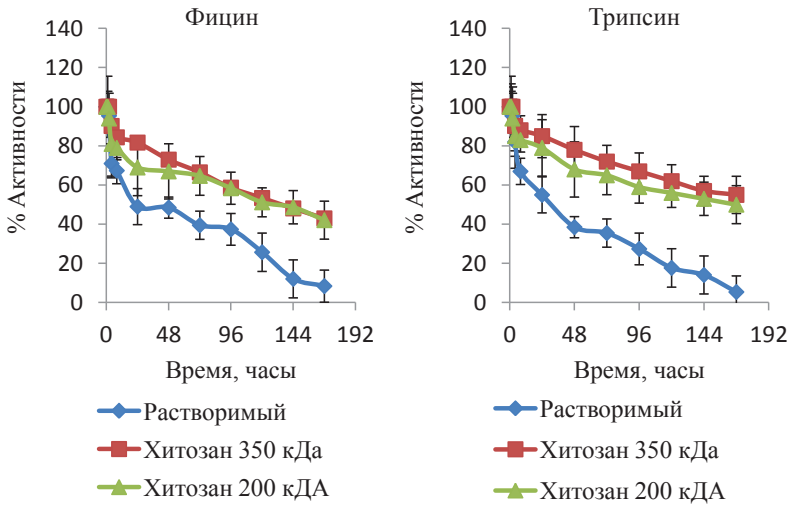


Рис. 2. Стабильность протеолитических ферментов, иммобилизованных на хитозанах с молекулярными массами 200 и 350 кДа

С другой стороны, эффективность разрушения матрикса биопленки ферментами в иммобилизованном виде значительно снизилась. Тем не менее биопленки *S.aureus* разрушались на 30 % при концентрациях иммобилизованного фицина 100 мкг/мл (в пересчете на белок). Иммобилизованный трипсин практически не вызывал достоверного разрушения биопленок.

Несмотря на это, иммобилизованные ферменты более стабильны, что позволяет использовать их в течение большего времени и позволяет предложить для разрушения бактериальных биопленок на поверхности ран.

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ГРИБНЫХ И БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ОВОЩНЫХ КУЛЬТУР \*

### MOLECULAR GENETIC DIAGNOSTICS OF FUNGAL AND BACTERIAL DISEASES AMONG VEGETABLE CROPS

А. А. Барейко<sup>1</sup>, Д. С. Потуремский<sup>1,2</sup>, В. Н. Купцов<sup>1</sup>, Л. Н. Валентович<sup>1</sup>,  
А. В. Сидоренко<sup>1</sup>, М. А. Титок<sup>2</sup>, Э. И. Коломиец<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси,  
Республика Беларусь*

<sup>2</sup>*Белорусский государственный университет, Республика Беларусь*

H. A. Bareika<sup>1</sup>, D. S. Poturemskij<sup>1,2</sup>, V. N. Kuptsov<sup>1</sup>, L. N. Valentovich<sup>1</sup>,  
A. V. Sidarenka<sup>1</sup>, E. I. Kolomiets<sup>1</sup>, M. A. Titok<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*The Institute of Microbiology NAS of Belarus, Belarus*  
<sup>2</sup>*BSU, Belarus*

E-mail: bareiko.hanna@gmail.com

#### **Аннотация**

Одной из причин, приводящих к потерям урожая различных овощных культур и снижению экономической эффективности их выращивания в условиях защищённого грунта, является подверженность растений многочисленным заболеваниям бактериальной и грибной этиологии. Благоприятный микроклимат, который поддерживается в теплицах, способствует не только активному росту овощных культур, но также развитию фитопатогенных микроорганизмов. С целью раннего определения возбудителей бактериальных и грибных заболеваний (гнилей, увяданий и пятнистостей) в ходе работы была разработаны подходы для диагностики, основанных на методике ПЦР. Данные системы позволяют быстро и эффективно производить раннюю детекцию наличия патогена в растительном, поливочном и семенном материале.

#### **Abstract**

One of the reasons that leads to the loss of various types of vegetable crops and the economic efficiency of their cultivation in protected ground, is plant exposure to numerous bacterial and fungal diseases. Favorable microclimate, which is maintained in greenhouses,

es, is favorable not only for the growth of vegetable crops, but also for the development of phytopathogenic microorganisms. In order to do the early identification of bacterial and fungal causal agents of diseases (rots, wilt and blight) during work diagnostic PCR-based approaches were developed. Such systems allow fast and effective early detection the pres-ents of the pathogens in plant material, water and seeds.

Овощеводство занимает одну из ведущих ролей в агропромышленном комплексе как в Беларуси, так и в странах СНГ в целом [1]. Тем не менее, развитие торговых связей и, как следствие, активный импорт растениеводческой продукции тесно связан с угрозой ввоза и распространения патогенных микроорганизмов [2]. Этот факт актуализирует необходимость разработки быстрых и эффективных систем диагностики и раннего предотвращения заболеваний различной этиологии [3].

При этом, классические физиолого-биохимические методы не дают возможность точно определить патоген, так как зачастую схожа симптоматика может наблюдаться при заболеваниях как грибной, так и бактериальной этиологии. Поэтому, молекулярно-генетическая диагностика приобретает в настоящее время все большую популярность в связи с тем фактом, что позволяет проводить быструю и качественную идентификацию патогена в растительном материале по сравнению с методами, использовавшимися ранее. Методы, основанные на детекции ДНК патогена, позволяют достоверно идентифицировать возбудителя при наличии всего лишь одной либо нескольких клеток в растении или другом материале, то есть на стадии бессимптомного течения заболевания [4].

Цель данной работы была разработка метода ПЦР-диагностики наиболее распространенных и вредоносных бактериальных и грибных возбудителей заболеваний овощных культур в условиях открытого и защищенного грунта.

В ходе работы определен перечень видов фитопатогенных грибов и бактерий, вызывающих заболевания многих овощных культур в Республике Беларусь и странах ближнего зарубежья: *Alternaria* sp. (альтернариоз или сухая пятнистость листьев, альтернариозный рак стебля), *Cladosporium cladosporioides* (кладоспориоз или бурая оливковая пятнистость), *Fusarium* sp. и *F. oxysporum* (фузариозное увядание, фузариозная гниль), *Botrytis cinerea* (серая гниль), *Sclerotinia sclerotiorum* (белая гниль), *Didymella bryoniae* (чёрная стеблевая гниль), *Colletotrichum coccodes* (антрактноз), *Verticillium dahliae* (вертициллезное увядание), *Pseudomonas syringae* (бактериальная пятнистость), *Pseudomonas corrugata* (некроз сердцевины или пустостебельность), *Pectobacterium carotovorum* (водянистая гниль плодов), *Clavibacter michiganensis* (бактериальный рак), *Agrobacterium tumefaciens* (корневой рак). На основании нуклеотидных последовательностей кон-

сервативных участков генома (внутренние транскрибируемые спейсеры), а также генов, кодирующих факторы патогенности (протезы, пектиназы, целлюлазы, др.), доступных в базах данных NCBI, сконструированы родо- и видоспецифичные праймеры для детекции и идентификации целевых фитопатогенных микроорганизмов.

Проверка специфичности праймеров с использованием геномной ДНК 40 коллекционных штаммов грибов *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *F. oxysporum*, *Cl. cladosporioides*, *B. cinerea*, *S. sclerotiorum*, *C. coccodes*, *V. dahlia*, *D. bryoniae* и 38 штаммов бактерий *Ps. syringae*, *Ps. corrugata*, *P. carotovorum*, *C. michiganensis*, *A. tumefaciens* подтвердила, что ампликоны ожидаемого размера получаются только при постановке ПЦР с нуклеиновыми кислотами микроорганизмов целевого вида (рода). Ложноположительных и ложноотрицательных результатов ПЦР не выявлено. В некоторых случаях отмечено образование неспецифических продуктов ПЦР, однако их наличие не препятствовало выявлению целевого патогена. Чувствительность ПЦР для детекции *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *P. carotovorum*, *Ps. corrugata*, *Ps. syringae* составила  $10^3$  гЭ/мл, *C. cladosporioides*, *A. tumefaciens*, *C. michiganensis*, *X. campestris* —  $10^4$  гЭ/мл, *B. cinerea*, *S. sclerotiorum*, *C. coccodes*, *V. dahlia*, *F. oxysporum*, *D. bryoniae* —  $10^5$  гЭ/мл.

Часто заболевания томата со схожей симптоматикой могут вызывать различные патогены. Для увеличения производительности диагностики разработана мультиплексная ПЦР для детекции в одной реакции фитопатогенных грибов и бактерий, вызывающих гнили (*B. cinerea*, *S. sclerotiorum*, *P. carotovorum*), пятнистости (*Alternaria* sp., *C. cladosporioides*, *Ps. syringae*, *X. campestris*), увядания (*Fusarium* sp., *C. michiganensis*, *Ps. corrugata*). Подтверждена возможность выявления целевых патогенов в присутствии в реакционной смеси как ДНК одного, так и ДНК трех-четырех видов микроорганизмов. Чувствительность метода для детекции фитопатогенных бактерий составляет  $10^3$ – $10^4$  ГЭ/мл, фитопатогенных грибов —  $10^3$ – $10^5$  ГЭ/мл в зависимости от патогена.

С помощью видоспецифичной и мультиплексной ПЦР проведен анализ 26 растений томата, огурца, чеснока, капусты, перца, предоставленных тепличными комбинатами и частными хозяйствами. В 3 пораженных растениях (увядание, гниль плодов) и 4 растениях без симптомов болезни обнаружены фитопатогенные грибы *F. oxysporum*, *C. cladosporioides* и *P. carotovorum*, при этом других бактериальных и грибных фитопатогенов не выявлено. Результаты ПЦР-анализа во всех случаях подтверждены данными культурального фитопатологического исследования. При этом патогенность полученных штаммов вида *F. oxysporum* была подтверждена в условиях модельного эксперимента. Полученные результаты свидетельствуют о воз-

возможности применения разработанных методов ПЦР-диагностики для выявления и идентификации бактериальных и грибных возбудителей болезней овощных культур непосредственно в растительном материале, в том числе на ранних стадиях до появления видимых симптомов поражения, а также о возможностях применения данного метода для комплексной предпосевной диагностики семенного материала, субстрата и жидкостей для полива.

### Литература

1. Государственная программа развития аграрного бизнеса в Республике Беларусь на 2016–2020 годы [Электронный ресурс]: Постановление Совета Министров Республики Беларусь, 11 мар. 2016 г., № 196 // Министерство сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь. Режим доступа: <http://mshp.gov.by/programms/a868489390de4373.html#podprogramma1>. Дата доступа: 01.09.2019.
2. Чужеродные растения и фитопатогенные микромицеты в Беларуси: реальная и потенциальная опасность / В. Д. Поликсенова [и др.] // Вестник БГУ. Сер. 2. 2016. № 3. С. 60–67.
3. Dun-chun, H. Problems, challenges and future of plant disease management: from an ecological point of view / H. Dun-chun, Z. Jia-sui, X. Lian-hui // J. Integrat. Agricult. 2016. Vol. 15, № 4. P. 705–715.
4. Fang Y., Ramasamy R. P. Current and prospective methods for plant disease detection / Y. Fang R. P. Ramasamy // Biosensors. 2015. V. 4. P. 537–561.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЦР ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ *SALMONELLA ENTERICA* В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ \*

### USING PCR TEST SYSTEMS FOR DETECTING *SALMONELLA ENTERICA* IN FOOD

С. М. Бармак<sup>1,2</sup>, Ю. А. Синявский<sup>2</sup>,  
А. Б. Бердыгалиев<sup>2</sup>, И. Х. Менденхалл<sup>3</sup>, Е. В. Жолдыбаева<sup>4</sup>

<sup>1</sup> *Казахский Национальный университет им. аль-Фараби, г. Алматы*

<sup>2</sup> *ТОО «ОО Казахская академия питания», г. Алматы*

<sup>3</sup> *Медицинская школа Duke-NUS, Сингапур*

<sup>4</sup> *Национальный центр биотехнологии, г. Астана*

S. M. Barmak<sup>1,2</sup>, Yu. A. Sinyavskiy<sup>2</sup>,  
A. B. Berdygaliyev<sup>2</sup>, I. H. Mendenhall<sup>3</sup>, E. V. Zholdybayeva<sup>4</sup>

<sup>1</sup> *al-Farabi Kazakh National university, Almaty*

<sup>2</sup> *«Kazakh academy of nutrition» LPP, Almaty*

<sup>3</sup> *Duke-NUS Medical School, Singapore*

<sup>4</sup> *National Center for Biotechnology, Nur-Sultan*

E-mail: sabyr95@mail.ru

#### Аннотация

Объектами исследований являются биопробы, полученные из цепи производства пищевых продуктов, зараженные штаммами бактерии сальмонелла. Разработанная тест-система используется для мониторинга циркуляции сальмонеллеза в пищевых продуктах. При исследовании биопроб, полученных из цепи производства пищевых продуктов с использованием ПЦР тест-системы были обнаружены *Salmonella enterica* в 54,5 % образцах, особенно в куриных яйцах, утином мясе и курином мясе.

Собранные данные исследований позволят разработать меры для снижения распространённости сальмонеллеза.

---

© С. М. Бармак, Ю. А. Синявский, А. Б. Бердыгалиев, И. Х. Менденхалл, Е. В. Жолдыбаева, 2019

\* Работа выполнена в рамках проекта грантового финансирования «Генотипирование патогенных микроорганизмов в пищевом сырье и продуктах питания реализуемых на рынках и супермаркетах Республики Казахстан, разработка рекомендаций для снижения риска заболеваемости детей дошкольного и школьного возраста», 2018–2020 гг., № AP05131147.

---

Область применения — медицинская микробиология.

### **Abstract**

The objects of research are bioassays obtained from the food production chain infected with strains of *Salmonella* bacteria. The developed test system is used to monitor the circulation of salmonellosis in foods. In the study of bioassays obtained from the food production chain using a PCR test system, *Salmonella enterica* was detected in 54.5% of the samples, especially in chicken eggs, duck meat and chicken meat.

Collected research data will allow the development of measures to reduce the prevalence of salmonellosis.

Application area — medical microbiology.

Бактерии рода *Salmonella spp.* широко распространены в окружающей среде и, соответственно, в пищевом сырье. Основная проблема состоит в том, что контроль качества продуктов крупных производителей осуществляется более регулярно, что нельзя сказать о контроле качества продуктов мелких производителей

Изучение распространения патогенных микроорганизмов, проведение анализа их ДНК и их генотипирование в пищевом сырье и продуктах питания, реализуемых в торговых учреждениях, позволит выявить источники заражения человека.

Заражение сальмонеллезом происходит при употреблении в пищу загрязненных продуктов, что определяет необходимость постоянного бактериологического контроля продуктов питания. Традиционно наличие сальмонелл и их чувствительность к антибактериальным препаратам определяется с помощью классических бактериологических методов в соответствии с рекомендациями CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Наряду с тем, что эти методы обладают хорошей достоверностью и точностью, они имеют существенный недостаток, время получения результата составляет от 4 до 5 суток. В последнее время в мировой науке появились новые биоинженерные технологии, в частности, технологии, позволяющие создавать высокоэффективные средства диагностики на основе олигонуклеотидов, позволяющие получать результат в течение короткого времени.

Целью исследований является использование в практике ПЦР тест-системы для обнаружения *Salmonella enterica* в пищевых продуктах в сети их реализации.

Заражение сальмонеллезом может произойти при употреблении загрязненного молока, термически необработанных куриных яиц, инфицированных до снесения, а также продуктов, приготовленных из них. Дру-

гой фактор передачи — недостаточно обработанное мясо птицы, говядины, свинины. Поэтому необходимо строго соблюдать санитарно-гигиенические правила продажи, приготовления и потребления пищевых продуктов. Опасность таится не только в самом присутствии сальмонелл в продуктах питания, но и в наличии в пище продуктов их жизнедеятельности, которые являются причиной токсических отравлений.

По данным литературы с наибольшей частотой сальмонеллы обнаруживаются в мясе птицы (тушках и желудках цыплят-бройлеров; курином фарше, печени, голени и крылышках; голени и сердце индейки) — 31,43 %, рыбе (сазан, лещ, судак и сельдь) — 13, 16 % и яйцах — 10 %.

Разработанная ПЦР тест-система используется для мониторинга циркуляции сальмонеллеза на молекулярном уровне. Диагностическая ПЦР тест-система является новым биопрепаратом в биотехнологии Казахстана, где впервые с использованием молекулярных инструментов внедряется в практику Республики Казахстан для ранней лабораторной диагностики сальмонеллеза.

Нами при исследовании биопроб, полученных из цепи производства пищевых продуктов с использованием ПЦР тест-системы *Salmonella enterica* была обнаружена в 54,5 % образцах — в зараженных сальмонеллезом куриных яйцах, утином мясе и курином мясе.

Использование ПЦР тест-системы для обнаружения *Salmonella enterica* в практике здравоохранения позволит оптимизировать эпидемиологический надзор за сальмонеллезом за счёт значительного снижения времени и трудоемкости исследования.



## СРАВНЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ HEK 293T И HEK 293FT В КАЧЕСТВЕ КЛЕТОК-УПАКОВЩИКОВ ДЛЯ НАРАБОТКИ ЛЕНТИВИРУСНЫХ КОНСТРУКЦИЙ \*

### COMPARISON OF HEK 293T AND HEK 293FT CELL LINES AS PACKAGING CELLS FOR THE PRODUCTION OF LENTIVIRAL CONSTRUCTS

У.И. Батлук<sup>1</sup>, А. Е. Лемза<sup>2</sup>, Г. А. Степанов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Новосибирский государственный университет, Россия

<sup>2</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Россия

U. I. Batluk<sup>1,2</sup>, A. E. Lemza<sup>2</sup>, G. A. Stepanov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Novosibirsk State University, Russia

<sup>2</sup>Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Russia

#### Аннотация

Лентивирусные векторы являются удобным способом доставки трансгенов, обеспечивая их эффективную, стабильную и длительную экспрессию в делящихся и неделящихся клетках. Для производства лентивирусных векторов в больших объемах используют клеточные линии, способные упаковывать вирусные частицы и устойчивые к их цитотоксическому действию. Клеточные линии HEK 293T и HEK 293FT являются наиболее удобными клетками-упаковщиками для наработки лентивирусных частиц.

#### Abstract

Lentiviral vectors are convenient for transgenes delivery, ensuring efficient, stable and long-lasting expression in dividing and non-dividing cells. Cell lines capable of packaging viral particles and resistant to their cytotoxic effect are used for the large-scale production of lentiviral vectors. The HEK 293T and HEK 293FT cell lines are the most convenient packaging cells for lentiviral particles production.

---

© У.И. Батлук, А. Е. Лемза, Г. А. Степанов, 2019

\* Работа выполнена при частичной поддержке проекта базового бюджетного финансирования Минобрнауки РФ (0245-2019-0001).

Трансфекцию клеток-упаковщиков векторами лентивирусной системы проводят для получения лентивирусных частиц, вирулентность которых затем проверяют посредством трансдукции компетентных клеточных линий.

Для подбора наиболее эффективного способа доставки лентивирусной конструкции была проведена трансфекция клеточных линий НЕК 293Т и НЕК 293FT трансфецирующими агентами *Lipofectamin*, *DreamFect Gold* и кальций-фосфатным методом. Оценку проводили по интенсивности флуоресценции репортерного белка mKate2. Было показано, что кальций-фосфатный метод обеспечивает наибольшую эффективность трансфекции. Общий титр полученных вирусных частиц в культуральной среде трансфецированных кальций-фосфатным методом клеток линий НЕК 293Т и НЕК 293FT определяли с помощью ОТ-ПЦР. Наибольшую продуктивность в отношении лентивирусных частиц показала клеточная линия НЕК 293FT.

Вирусные частицы, полученные с помощью всех перечисленных методов, были использованы для трансдукции клеточной линии НЕК 293Т. Так как используемая лентивирусная конструкция содержала ген люциферина (*Luc2*) для оценки эффективности трансдукции использовали люциферазную реакцию. По интенсивности люминесценции люциферина, экспрессируемого в трансдуцированных клетках, было показано, что клетки линии НЕК 293FT продуцировали большее количество вирулентных псевдовирусных частиц, чем клетки линии НЕК 293Т.

Из проанализированных клеточных линий при проведении трансфекции кальций-фосфатным методом, показавшим наибольшую эффективность доставки трансгенной конструкции, наибольшей продуктивностью для наработки лентивирусных частиц обладают клетки линии НЕК 293FT.

**ПОИСК АПТАМЕРОВ К РАЗНЫМ ЭПИТОПАМ ТРОПОНИНА I \***SCREENING OF APTAMERS AGAINST VARIOUS EPITOPES  
OF TROPONIN IЕ. Е. Башмакова<sup>1</sup>, Н. С. Гончарова<sup>2</sup>, В. В. Красицкая<sup>1</sup><sup>1</sup> *Институт биофизики СО РАН*<sup>2</sup> *Сибирский федеральный университет*E. E. Bashmakova<sup>1</sup>, N. S. Goncharova<sup>2</sup>, V. V. Krasitskaya<sup>1</sup><sup>1</sup> *IBP SB RAS, Russia*<sup>2</sup> *Siberian federal university, Russia*

E-mail: bashmakovae@ibp.ru

**Аннотация**

Проведен поиск аптамеров, аффинных к разным эпитомам кардиомаркера тропонина I, пригодных для его высокочувствительного выявления в анализе сэндвич-типа. Скрининг аптамеров проводили биолюминесцентным твердофазным анализом на основе Ca<sup>2+</sup>-регулируемого фотопротейна обелина. Выбранные пары аптамеров протестированы в твердофазном анализе тропонина I в модельных образцах сыворотки.

**Abstract**

The search for aptamers affine to different epitopes of the cardiomarker troponin I was performed and applicability of those for sandwich-type analysis was shown. The screening was carried out by bioluminescent solid-phase assay with Ca<sup>2+</sup>-regulated photoprotein obelin as a reporter. The suitability of the selected pairs as independent troponin I-specific molecules was tested in analysis of model sera samples.

ДНК аптамеры — короткие одноцепочечные фрагменты ДНК, способные с высокой аффинностью и специфичностью связываться с молекулами различной природы. По сравнению с антителами аптамеры как биоспецифические молекулы имеют ряд преимуществ, главными из которых являются

---

© Е. Е. Башмакова, Н. С. Гончарова, В. В. Красицкая, 2019

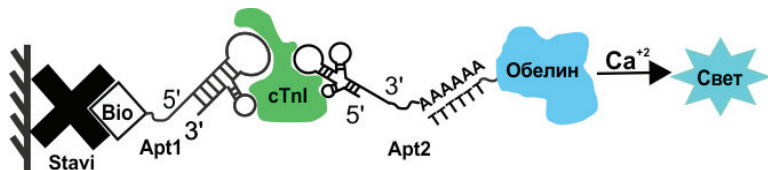
\* Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ, проект № 18-38-00531.

ся возможность их химического синтеза и модификации, а также стабильность при хранении.

Ранее направленным отбором *in vitro* из комбинаторной библиотеки ДНК олигонуклеотидов авторами был получен ряд аптамеров, специфично и высокоаффинно связывающих сердечный тропонин I (сTnI) [1]. сTnI представляет собой высокоспецифичный кардиомаркер, присутствующий исключительно в сердечной мышце. Его появление в периферической крови свидетельствует о повреждении кардиомиоцитов при инфаркте миокарда. Низкие диагностические уровни сTnI (от 0,01 мкг/л) при раннем выявлении повреждений миокарда предъявляют высокие требования к чувствительности методов его обнаружения. Чувствительность и специфичность детекции кардиомаркера могут быть значительно улучшены при использовании пары аптамеров, независимо связывающихся с мишенью, либо специально сконструированного бивалентного аптамера на их основе.

Отбор аптамеров, аффинных к разным эпитопам сTnI проводили биолюминесцентным твердофазным анализом с применением  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемого фотопротейна обелина в качестве репортера. Биолюминесцентный сигнал обелина возникает при присоединении ионов кальция и не зависит от присутствия других соединений — кислорода, каких-либо субстратов или кофакторов. Благодаря высокому квантовому выходу реакции и низкому уровню фонового свечения метки на основе обелина обеспечивают выявление мишени с чувствительностью, сравнимой с изотопной меткой.

Группу высокоаффинных аптамеров к сTnI исследовали на попарное связывание с мишенью с помощью твердофазного биолюминесцентного анализа по схеме, представленной на рисунке. Поверхность активировали одним из аптамеров через стрептавидин-биотиновое взаимодействие. Затем в лунку вносили раствор сTnI и второй аптамер, активированный с 3' конца полиаденилатом. Если исследуемые аптамеры аффинны к разным эпитопам, образующийся при этом комплекс обнаруживали с помощью полицидилатного производного обелина.



Анализ по выявлению пары аптамеров, аффинных к разным эпитопам сTnI.

Stavi — стрептавидин; Bio — биотинил;

Apt1, Apt2 — исследуемая пара аптамеров

---

Полученные пары аптамеров тестировали в модельном твердофазном биолуминесцентном анализе сэндвич-типа и определили его аналитические показатели. Выбранные пары аптамеров могут быть использованы для разработки высокоаффинных и специфичных бивалентных вариантов, а также создают основу для разработки безметочных способов высокочувствительного выявления сТnI.

### **Литература**

Frank L. A., Bashmakova E. E., Goncharova N. S., Krasitskaya V. V. Bioluminescent binding microassay using aptamers as biospecific elements. *J. Sib. Fed. Univ. Biol.*, 2019, 12(3), 244–252.

**ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ХИМОЗИНА МАРАЛА  
(*CERVUS ELAPHUS SIBIRICUS*) И ОПРЕДЕЛЕНИЕ  
ЕГО МОЛОКОСВЕРТЫВАЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ\***

**RECOMBINANT CHYMOSIN OF MARAL (*CERVUS ELAPHUS SIBIRICUS*)  
AND IT'S MILK-CLOTTING ACTIVITY**

С. В. Беленькая<sup>1,2</sup>, А. А. Бондарь<sup>3</sup>, В. В. Ельчанинов<sup>4</sup>, Д. Н. Щербаков<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup> *ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора*

<sup>2</sup> *Новосибирский государственный университет*

<sup>3</sup> *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН*

<sup>4</sup> *Федеральный Алтайский научный центр  
агробиотехнологий, Сибирский НИИ сыроделия*

<sup>5</sup> *Алтайский государственный университет*

S. V. Belenkaya<sup>1,2</sup>, A. A. Bondar<sup>3</sup>, V. V. Elchaninov<sup>4</sup>, D. N. Shcherbakov<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup> *FBRI SRC VB «Vector», Rospotrebnadzor, Russia*

<sup>2</sup> *Novosibirsk State University, Russia*

<sup>3</sup> *ICBFM SB RAS, Novosibirsk, Russia*

<sup>4</sup> *FSBSI «FASCA» Barnaul, Russia*

<sup>5</sup> *Altai State University, Russia*

**Аннотация**

Впервые установлена нуклеотидная последовательность и экзон/интронная организация гена химозина (СУМ) марала. С использованием структуры СУМ выведена последовательность мРНК химозина марала и сконструирован плазмидный вектор, обеспечивающий продукцию рекомбинантного прохимозина (рПроХн) марала в системе экспрессии *E. coli* (штамм BL21(DE3)). В итоге, путем очистки, рефолдинга и активации рПроХн был получен препарат активного рХн. Общая молокосвертывающая активность (МА) рХн марала, составила  $2330 \pm 10$  условных единиц (УЕ)/мл, удельная МА равнялась  $52955 \pm 227$  УЕ/мг.

**Abstract**

For the first time sequenced full length maral chymosin (СУМ) gene and determined

© С. В. Беленькая, А. А. Бондарь, В. В. Ельчанинов, Д. Н. Щербаков, 2019

\* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-44-543018 р\_мол\_а.

it's exon/intron organization. Deduced maral CYM mRNA structure and developed plasmid vector to produce recombinant maral prochymosin (rProCN) in the expression system of *E. coli* (BL21(DE3)). After rProCN purification, refolding and activation, the active sample of rCN have been obtained. Total milk-clotting activity (MA) of the maral rCN was  $2330 \pm 10$  arbitrary units (AU)/ml, specific MA was  $52955 \pm 227$  AU/mg.

Химозин (Хн) коровы традиционно считался эталонным молокосвертывающим ферментом (МФ) для сыроделия [1]. Однако открытие и внедрение в сыродельную практику рекомбинантного химозина (рХн) верблюда, превосходящего рХн коровы по некоторым технологическим свойствам, послужило стимулом для поиска новых молокосвертывающих ферментов (МФ) не коровьего происхождения. До момента развития методов генной инженерии и молекулярной биотехнологии, производство и поиск натуральных химозинов для сыроделия были ограничены несколькими видами сельскохозяйственных животных, поголовье которых могло обеспечить достаточную сырьевую базу для промышленного производства МФ. Методы генной инженерии позволили вести поиск новых МФ (в первую очередь, химозинов) среди любых видов млекопитающих, с любой численностью популяции. В период с 1980 по 2019 год, были получены рХн овцы [2], козы [3] одногорбого верблюда [4], яка [5,6], буйвола [7] и альпака [8]. Однако, среди этих ферментов только рХн одногорбого верблюда (*Camelus dromedarius*) [4] и альпака [8], по некоторым технологическим характеристикам, превосходят химозин коровы.

Целью данной работы было получение, и начальная биохимическая характеристика химозина марала (сибирского подвида благородного оленя — *Cervus elaphus sibiricus*), как потенциального коагулянта молока для сыроделия.

Для реализации поставленной цели из лимфоцитов крови марала выделяли геномную ДНК с помощью TRIzol («Thermo Fisher Scientific», США), согласно рекомендациям производителя. Результаты сравнительного анализа СУМ млекопитающих из GenBank позволили выявить наиболее консервативные области гена СУМ и выбрать несколько пар праймеров для амплификации фрагментов гена на геномной ДНК марала. В процессе подбора условий ПЦР было установлено, что наилучшим вариантом является амплификация двух перекрывающихся частей гена химозина марала (~6–7 тысяч н.п.). ДНК таких фрагментов гена была наработана, очищена от компонентов ПЦР и подвергнута прямому секвенированию по методу Сэнгера на автоматических генных анализаторах ABI3130XL. Полученные секвенограммы гена СУМ марала выравнивали с известными структурами СУМ из GenBank, для подтверждения принадлежности к гену химозина,

и рассчитывали праймеры для следующего шага секвенирования. В последовательности левой половины гена СУМ марала были установлены две области точечных делеций, несколько однонуклетидных полиморфизмов (SNP), среди которых пара замен находится в белок-кодирующей области и не приводит к замене аминокислот при трансляции. Для того чтобы определить сцепление SNP разделяли аллели клонированием соответствующего ПЦР фрагмента гена препрохимозина марала в вектор pJET и секвенировали их. В результате сборки полученных секвенограмм идентифицировано два аллельных варианта СУМ и впервые установлена структура гена химозина марала размером 11482 н.п. С помощью сравнительного анализа и выравнивания с последовательностями известных генов СУМ и мРНК, локализованы границы экзонов/интронов исследуемого гена СУМ марала и выведена структура соответствующей мРНК, кодирующей препрохимозин марала.

После «удаления» участка кодирующего пре-фрагмент и интронов из полученной нуклеотидной последовательности, её кодонный состав оптимизировали под систему экспрессии в *E.coli*. Для этого был использован онлайн сервис Integrated DNA Technologies [<https://eu.idtdna.com/CodonOpt>]. Нуклеотидная последовательность прохимозина (ПроХн) марала синтезировали в ООО «ДНК-синтез» (Россия) в составе экспрессирующего вектора pET21a. Для получения целевого белка, проводили химическую трансформацию штамма BL21(DE3) *E.coli*. Индивидуальные колонии *E.coli*, содержащие рекомбинантную плазмиду, культивировали в шейкер-инкубатор в среде LB при 37 °С и 180 об/мин, до оптической плотности D600 = 0,8. Затем проводили индукцию синтеза белка добавлением IPTG до конечной концентрации 1 мМ. Колбы вновь помещали в шейкер-инкубатор и продолжали культивирование 12 часов при 25°С и 160 об/мин. В результате, после солюбилизации, очистки и рефолдинга целевого белка, которые проводили по методикам, описанным в работе [9], был получен рекомбинантный ПроХн марала.

Активацию рПроХн марала проводили путем ступенчатого изменения рН [10]. В результате получали препарат рХн марала и определяли в нем концентрацию белка по методу Брэдфорда [11].

Общую молокосвертывающую активность (МА) рХн марала определяли по методу [12]. Смешивали прогретые до 35 °С растворы 10 % стандартизованного молочного субстрата (ОАО «МЗСФ», Россия) и исследуемого МФ в соотношении 10:1. Определение общей МА проводили не менее чем в 3-х повторностях, удельную активность выражали в УЕ/мг. Результаты определения МА рХн марала представлены в таблице.



### Молокозвертывающая активность препаратов рХн марала

Препарат	Общая МА (УЕ/мл)	Концентрация белка (мг/мл)	Удельная МА (УЕ/мг)
рХн марала	2330 ± 10	0,044 ± 0,002	52955 ± 227

### Литература

1. Белов, А.Н., А. Д. Коваль, Е. А. Авданина, В. В. Ельчанинов. Влияние молокозвертывающего препарата на органолептические показатели сыра // Сыроделие и маслоделие. 2009. № 1, С. 22–24.
2. Rogelj I. et al. Recombinant lamb chymosin as an alternative coagulating enzyme in cheese production // *Journal of dairy science*. 2001. Т. 84. №. 5. С. 1020–1026.
3. Eskandari M. H., Hosseini A., Aminlari M. Nucleotide sequence of cDNA encoding for preprochymosin in native goat (*Capra hircus*) from Iran // *Iranian Journal of Veterinary Research*. 2008. Т. 9. №. 3. С. 262–265.
4. Kappeler S.R. et al. Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006. Т. 342. №. 2. С. 647–654.
5. Ersöz F., İnan M. Large-scale production of yak (*Bos grunniens*) chymosin A in *Pichia pastoris* // *Protein expression and purification*. 2019. Т. 154. С. 126–133.
6. Luo F. et al. Cloning and Expression of Yak Active Chymosin in *Pichia pastoris* // *Asian-Australasian journal of animal sciences*. 2016. Т. 29. №. 9. С. 1363.
7. Vallejo J. A. et al. Cloning and expression of buffalo active chymosin in *Pichia pastoris* // *Journal of agricultural and food chemistry*. 2008. Т. 56. №. 22. С. 10606–10610.
8. Беленькая, С. В. Некоторые биохимические свойства рекомбинантного химозина альпака (*Vicugna pacos* L.) / С. В. Беленькая, А. П. Рудометов, Д. Н. Щербаков, Д. В. Балабова, А. В. Кригер, А. Н. Белов, А. Д. Коваль, В. В. Ельчанинов // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2018. Т. 54. № 6. С. 585–593
9. Chongjuan W. E. I. et al. Oxidative refolding of recombinant prochymosin // *Biochemical Journal*. 1999. V. 340. №. 1. P. 345–351.
10. Рудометов А. П. Исследование ферментативной стабильности жидких препаратов рекомбинантного химозина коровы (*Bos taurus taurus* L.) / А. П. Рудометов, С. В. Беленькая, Д. Н. Щербаков, Д. В. Балабова, А. В. Кригер, В. В. Ельчанинов // *Сыроделие и маслоделие*. 2017. № 6. С. 40–43.
11. Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem*. 1976. V. 72. P. 248–254.
12. Ельчанинов, В. В. Исследование молокозвертывающего фермента из сычугов северных оленей: дис. ... канд. техн. наук: 05.18.04: защищена 23.01.06; утв. 07.04.06 / Ельчанинов Вадим Валентинович. Кемерово, 2006. 172 с. Библиогр. С. 121–147.

**ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ  
Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> И ИХ КОМПОЗИТОВ КАК КОМПОНЕНТОВ  
СИСТЕМ ДОСТАВКИ\***

OBTAINING AND RESEARCH OF MAGNETIC Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NANOPARTICLES  
AND THEIR COMPOSITES AS COMPONENTS OF DELIVERY SYSTEMS

Е. Н. Бобрикова, Е. В. Дмитриенко

*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,  
Новосибирск, Россия  
Новосибирский государственный университет, Новосибирск Россия*

E. N. Bobrikova, E. V. Dmitrienko

*ICBFM SB RAS, NSU, Russia*

e-mail: elena.dmitrienko@niboch.nsc.ru

**Аннотация**

В ходе данной работы получены и охарактеризованы магнитные наночастицы на основе оксида железа и их композиты. Предложен подход к получению магнитных наночастиц с полимерным покрытием на основе нейлона-6, а также полых нанокapsул, полученных в результате удаления магнитной сердцевины. Все полученные материалы охарактеризованы методами динамического светорассеивания (ДСР) и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Исследована эффективность взаимодействия наночастиц с модельным лекарственным препаратом доксорубицином, определены оптимальные условия сорбции и десорбции лекарственного препарата, ёмкость полученных наноматериалов, а также для всех образцов проведена оценка токсичности *in vitro* и *in vivo*.

**Abstract**

In this work, magnetic nanoparticles based on iron oxide and their composites were obtained and characterized. An approach to the production of magnetic nanoparticles with a polymer coating based on nylon-6, as well as hollow nanocapsules obtained by removing the magnetic core, is proposed. All obtained materials were characterized by dynamic light scattering (DLS) and transmission electron microscopy (TEM). The effectiveness of inter-

---

© Е. Н. Бобрикова, Е. В. Дмитриенко, 2019

\* Работа выполнена в рамках государственного задания 0309-2016-0004 и при поддержке проекта № 0309-2018-0017.

action nanoparticles with the model drug doxorubicin was studied, the optimal conditions for the sorption and desorption of the drug, the capacity of the obtained nanomaterials were determined, and toxicity was evaluated *in vitro* and *in vivo* for all samples.

В настоящее время рак остается основной причиной смертности людей, поэтому исследование причин возникновения, диагностики заболевания, а также лечения стоят на первом месте исследований учеными по всему миру. Химиотерапия является основным способом лечения пациентов, однако стандартные противоопухолевые препараты обладают высокой токсичностью и разрушают не только больные, но и здоровые клетки по всему организму, вызывая пагубные явления не только от болезни, но и от лечения. Разработка систем доставки лекарственных препаратов может обеспечить точное нацеливания на мишень, что позволит снизить концентрацию вводимого препарата и решить ряд проблем связанных с токсичностью и усвояемостью. Наночастицы являются одними из основных компонентов систем доставки лекарственных препаратов [1]. За последние два десятилетия использование наночастиц в медицине резко возросло, и было разработано несколько новых стратегий терапевтической и диагностической визуализации, одним словом тераностики, на основе нанотехнологий для различных заболеваний и органов. Самое базовое определение «тераностической» наночастицы — это наночастица, в которой на одной платформе имеются как терапевтические, так и диагностические агенты [2].

Одним из представителей тераностических наночастиц являются магнитные наночастицы. Магнитные наночастицы (МНЧ) обычно содержат элементы с магнитными свойствами, такие как железо, никель, кобальт и их соединения. Введение магнитных наночастиц в фармацевтические препараты позволяет получить магнитную систему доставки биологически активного вещества, которая создает инновационные методы для лекарственной терапии. МНЧ на основе оксида железа, такие как  $Fe_3O_4$  или его окисленная и более стабильная форма  $\gamma-Fe_2O_3$ , являются наиболее часто используемыми МНЧ для биомедицинских применений. К преимуществам наночастиц на основе оксида железа можно отнести простоту и воспроизводимость результатов синтеза, низкая стоимость исходных реагентов и большой выход образца, использование стандартного оборудования, стабильность полученных материалов, а так же биосовместимость и биоразлагаемость [3]. Однако МНЧ склонны к быстрому окислению и разложению, поэтому для продления времени циркуляции в организме МНЧ применяют защитные покрытия, которые можно разделить на 3 основные группы: органические, неорганические и биоактивные.

Наша работа посвящена синтезу и характеристике магнитных наночастиц на основе оксида железа и их композитов, покрытых полимерной оболочкой из нейлона-6, а также полимерных нанокапсул, полученных путем удаления магнитного коа. Ранее нами было показано, что материалы на основе нейлона-6 нетоксичны, биосовместимы, обладают высокой сорбционной ёмкостью [4]. Таким образом, целью данной работы является разработка способа получения наноматериалов на основе магнитных наночастиц и их композитов, исследование физико-химических параметров полученных материалов, а также оценка перспективы использования в качестве компонентов систем доставки лекарственных средств.

Магнитные наночастицы на основе оксида железа получали методом осаждения, с помощью метода ДСР для полученных материалов были определены размер ( $29 \pm 2$  нм), индекс полидисперсности ( $0,278 \pm 0,003$ ) и дзета-потенциал ( $31 \pm 2$  мВ). Полученные параметры позволяют сделать вывод о том что, синтезированные нами МНЧ монодисперсны, малого размера, стабильны при хранении и не склонны к агрегации. Данные ПЭМ полностью коррелируют с результатами ДСР.

Покрытие МНЧ полимерной оболочкой состоит из четырех последовательных этапов: взаимодействие наночастиц оксида железа с тетраортосиликатом в спиртовом растворе в щелочных условиях приводит к появлению на магнитных частицах силикатной оболочки, которая может быть модифицирована с использованием функционализированных силанов. Появление на поверхности частиц первичных аминогрупп позволяет ковалентно присоединить нейлон-6 с использованием бифункционального реагента. Полые полимерные нанокапсулы получали путем удаления магнитной сердцевины в кислых условиях при высоких температурах. Полученные композитные магнитные наночастицы и нанокапсулы также были охарактеризованы методами ДСР и ПЭМ.

Для всех полученных наноматериалов было проведено исследование перспективности использования в качестве носителей для систем доставки активных веществ на примере противоопухолевого препарата — доксорубицина. Определены оптимальные условия сорбции и десорбции доксорубицина, значения сорбционной ёмкости, а также проведена оценка токсичности *in vitro* и *in vivo*.

Показано, что профили высвобождения доксорубицина из состава всех полученных наноматериалов являются рН-зависимыми. В ходе проведения оценки токсичности полученных материалов продемонстрировано отсутствие выраженной токсичности как *in vitro*, так и *in vivo*. Полученные результаты позволяют сделать выводы о перспективности использования исследуемых наноматериалов как для терапии, так и для диагностики заболеваний.

### Литература

1. Kudr J., Haddad Y., Richtera L., et al. Magnetic nanoparticles: From design and synthesis to real world applications // *Nanomaterials*. 2017. V. 7. №. 9. P. 243.
2. Yoo D., Lee J. H., Shin T. H., et al. Theranostic magnetic nanoparticles // *Accounts of chemical research*. 2011. V. 44. №. 10. P. 863–874.
3. Silva V. A. J., Andrade P. L., Silva M. P. C., et al. Synthesis and characterization of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles coated with fucan polysaccharides // *J. Magn. Magn. Mater.* 2013. V. 343. P. 138–143.
4. Бобрикова, Е.Н., Разум К. В., Дмитриенко Е. В. Получение новых материалов с регулируемым высвобождением биологически активных соединений на основе нейлона-6 и его композитов: V Международная конференция молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов 2018 : Сб. тез. / АНО «Инновационный центр Кольцово». Новосибирск : ИПЦ НГУ, 2018. С. 20–23.

**РАЗРАБОТКА ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ МИКРОСФЕР  
ДЛЯ МУЛЬТИПЛЕКСНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ\***

**DEVELOPMENT OF FLUORESCENT MICROSPHERES  
FOR MULTIPLEX IMMUNOASSAY**

Е. В. Бондина<sup>1</sup>, П. В. Шалаев<sup>1</sup>, С. А. Долгушин<sup>1</sup>, Н. Н. Санькова<sup>2,3</sup>,  
В. С. Семейкина<sup>2,3</sup>, Е. В. Пархомчук<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> *Национальный исследовательский университет «МИЭТ»*

<sup>2</sup> *Институт катализа им. Г.К. Борескова СО РАН*

<sup>3</sup> *Новосибирский государственный университет*

E. V. Bondina<sup>1</sup>, P. V. Shalaev<sup>1</sup>, S. A. Dolgushin<sup>1</sup>, N. N. Sankova<sup>2,3</sup>,  
V. S. Semeykina<sup>2,3</sup>, E. V. Parkhomchuk<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> *National Research University of Electronic Technology, Russia*

<sup>2</sup> *Boraskov Institute of Catalysis SB RAS, Russia*

<sup>3</sup> *Novosibirsk State University, Russia*

E-mail: e\_bondina97@mail.ru

**Аннотация**

В работе исследуется возможность реализации мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа на основе использования синтезированных полистирольных микросфер, спектрально-кодированных флуоресцентными красителями Cy5 и Cy5.5.

**Abstract**

In this paper, we investigate the possibility of implementation of multiplex immunoassay using synthesized polystyrene microspheres spectrally encoded with fluorescent dyes Cy5 and Cy5.5.

Мультиплексный иммунофлуоресцентный анализ широко применяется в биологии, медицине, научных исследованиях. Метод предназначен для качественного и количественного определения патогенов в исследуемой жид-

---

© Е. В. Бондина, П. В. Шалаев, С. А. Долгушин, Н. Н. Санькова, В. С. Семейкина, Е. В. Пархомчук, 2019

\* Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект АААА-А17-117041710077-4).

кой пробе. Например, его используют для выявления инфекций и измерения уровня иммунных медиаторов в крови, проводят исследования клеток, грибов, биомаркеров различных онкологических заболеваний, исследуют влияние психических расстройств на иммунную систему человека.

Метод основан на использовании флуоресцентных магнитных микросфер. В ходе анализа на поверхности микросфер создаются иммунные комплексы «первичное антитело — детектируемый антиген — детектирующее антитело — флуоресцентная метка».

После забора образца из лунки планшета, микросферы иммобилизуются в специальной ячейке при помощи магнита. Детекция иммунных комплексов осуществляется путём возбуждения флуоресценции микросфер при помощи светодиодов и регистрации флуоресценции ПЗС-камерой.

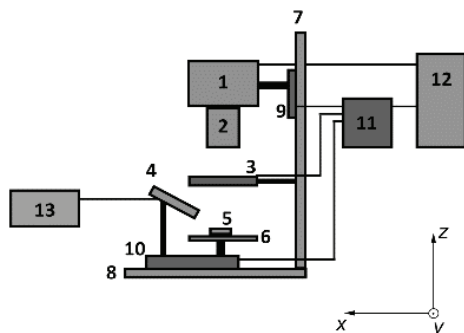
Мультиплексность достигается за счёт использования флуоресцентных микросфер разных типов, различающихся флуоресцентными красителями и концентрацией красителя. Получение изображений микросфер в оптической ячейке осуществляется с использованием оптических фильтров, соответствующих флуоресцентным красителям, что обеспечивает идентификацию микросферы по ее спектральному адресу. Кодирование микросфер несколькими флуорофорами в различных концентрациях позволяет создавать большое количество типов микросфер, обеспечивая тем самым высокую степень мультиплексности анализа.

Мультиплексный иммунофлуоресцентный анализ на основе микросфер является надёжным, точным и высокочувствительным методом. Однако, в настоящее время недостатком является закрытая технология, основанная на использовании дорогостоящих магнитных спектрально-кодированных микросфер.

В данной работе было проведено экспериментальное исследование флуоресценции синтезированных магнитных полистирольных микросфер, кодированных цианиновыми красителями Cy5 и Cy5.5 в разной концентрации, с целью определения возможности проведения иммунофлуоресцентного анализа с использованием синтезированных микросфер.

Исследовались и сравнивались между собой образцы магнитных полистирольных микросфер, отличающихся размером, а также методиками синтеза и нанесения красителей.

Для получения флуоресцентных изображений микросфер была разработана экспериментальная установка на основе высокочувствительной ПЗС-камеры (рис. 1).



1 — камера, 2 — объектив микроскопа, 3 — моторизованное колесо светофильтров, 4 — лазер, 5 — ячейка с образцом, 6 — предметный столик, 7, 8 — вертикальная и горизонтальная направляющие, 9 — линейный транслятор для перемещения камеры вдоль оси  $z$ , 10 — линейный транслятор для перемещения образца, 11 — контроллер линейных трансляторов, 12 — ПК, 13 — контроллер мощности лазера

Рис. 1. Схема экспериментальной установки для флуоресцентной микроскопии синтезированных микросфер

Образец суспензии с микросферами помещался в оптическую ячейку и освещался лазером. Лазер с длиной волны 635 нм использовался для возбуждения флуоресценции красителей.

Полосовые светофильтры 670/10 нм и 700/13 нм BrightLine (Semrock, США) использовались для регистрации флуоресцентного излучения  $\text{Cu5}$  и  $\text{Cu5.5}$  соответственно. ПЗС-камера Kingfisher 6MP (Raptor Photonics, Великобритания) и 20-кратный микрообъектив использовались для получения изображений флуоресцентных микросфер.

Анализ полученных изображений проводился с использованием программы ImageJ (НИН, США). Статистический анализ результатов проводили с использованием программ Origin (OriginLab Corporation, США) и MATLAB (MathWorks, США).

В ходе автоматического анализа изображений отдельные частицы идентифицировались на изображении по пороговому значению. Затем измерялась средняя яркость каждой обнаруженной частицы. Чтобы избежать ложного распознавания двух конгломерированных частиц как одной, частицы с округлостью менее 0,8 и размерами выше заданного порога игнорировались. Округлость рассчитывалась как  $4\pi \times [\text{Площадь}] / [\text{Периметр}]^2$ .



Были получены флуоресцентные изображения микросфер размером 2, 2.5, 4 и 6 мкм с разными концентрациями красителей (рис. 2).

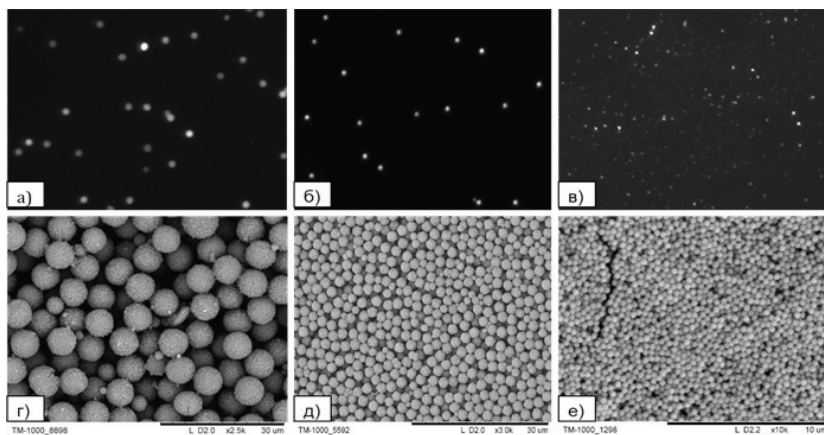


Рис. 2. Флуоресцентные изображения (а, б, в) и соответствующие РЭМ-изображения (г, д, е) синтезированных микросфер

В результате экспериментов было установлено, что среди исследованных образцов оптимальными характеристиками для использования в иммунофлуоресцентном анализе обладают полистирольные микросферы диаметром 6 мкм, синтезированные методом дисперсионной полимеризации и окрашенные флуоресцентными красителями методом диффузионной пропитки.

Была показана возможность идентификации микросфер с различными красителями на полученных изображениях. Показано также, что частицы в образце с одинаковой концентрацией красителя имеют одинаковую яркость на изображении. В то же время, микросферы с различными концентрациями красителя могут быть идентифицированы по разной яркости на изображении.

Измеренный коэффициент вариации интенсивности флуоресценции микросфер составил менее 10 %. Низкий коэффициент вариации интенсивности флуоресценции позволяет использовать большое количество типов спектрально-кодируемых микросфер в иммунофлуоресцентном анализе и, таким образом, даёт возможность выявлять наличие не менее 36 патогенов в одном образце за один анализ.

Полученные результаты могут быть использованы для разработки новых диагностических мультиплексных тест-систем.

## КОНСТРУИРОВАНИЕ И АНАЛИЗ ПРОДУЦЕНТА РАСТВОРИМОЙ ФОРМЫ КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА ЧУМНОГО МИКРОБА

### CONSTRUCTION AND ANALYSIS OF THE PRODUCER OF SOLUBLE FORM OF CAPSULE ANTIGEN *YERSINIA PESTIS*

А. А. Буданова, Н. И. Микшис, И. В. Тучков

*ФКУЗ Российской научно-исследовательский противочумный  
институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия*

A. A. Budanova, N. I. Mikshis, I. V. Tuchkov

*Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe"  
Rospotrebnadzor, Saratov, Russia*

E-mail: anglinca@mail.ru

#### Аннотация

В качестве основных антигенов, обладающих протективным действием в отношении бубонной и легочной чумы, большинством авторов рассматриваются капсульный антиген (F1) и V-антиген. Однако при проведении генно-инженерных манипуляций процесс синтеза F1 рекомбинантными штаммами-продуцентами *Escherichia coli*, нарушается, приводя к образованию в цитоплазме клетки нерастворимых конгломератов F1.

В работе были проведены исследования, направленные на конструирование продуцентов нативной (F1) и растворимой (F1mut) формы капсульного антигена *Yersinia pestis* на основе штамма-продуцента *E. coli* BL21 (DE3). С применением генно-инженерных методов изменены антигенные характеристики F1 чумного микроба — повышена его растворимость с сохранением иммунодоминантных эпитопов. Смоделирована пространственная структура целевых белковых молекул. Выполнено сравнение способности к синтезу F1 полученных рекомбинантных продуцентов на основе штамма *E. coli* BL21 (DE3).

#### Abstract

Most authors consider capsular antigen (F1) and V-antigen as the main antigens that have a protective effect against bubonic and pulmonary plague. However, during genetic engineering manipulations, the process of F1 synthesis by recombinant producer strains of *Escherichia coli* is disrupted, leading to the formation of insoluble F1 conglomerates

in the cell cytoplasm. Studies were conducted aimed at the construction of producers of the native (F1) and soluble (F1mut) forms of the capsule antigen *Yersinia pestis* based on the producer strain *E. coli* BL21 (DE3). Using genetic engineering methods, the antigenic characteristics of the plague microbe F1 have been changed — its solubility has been increased with the preservation of immunodominant epitopes. The spatial structure of the target protein molecules is simulated. Comparison of the ability to F1 synthesis of the obtained recombinant producers based on the *E. coli* strain BL21 (DE3) was performed.

«Черная смерть» известна человечеству с глубокой древности. Однако и в настоящее время чума представляет собой наиболее опасную бактериальную инфекцию, природные очаги которой зафиксированы на всех континентах, за исключением Австралии и Антарктиды. Кроме того, возбудитель чумы относится к потенциальным агентам биотеррористических атак [1]. Все это указывает на необходимость поиска не только эффективных средств лечения, но и профилактики данной инфекции. Конструирование вакцин против чумы сопряжено с определенными трудностями, связанными с наличием у чумного микроба множества факторов патогенности и механизмов, позволяющих микроорганизму уклоняться от иммунного ответа [2]. В современный период в создании вакцин широко используются генно-инженерные методы. Опыт зарубежных и отечественных исследователей свидетельствует об эффективности использования рекомбинантного капсульного антигена (F1) и V-антигена (LcrV) для формирования защиты в экспериментах по моделированию как бубонной, так и легочной формы чумы. Важно, что в составе F1 обнаружены CD4+ Т-клеточные эпитопы.

Как известно, капсула возбудителя чумы представляет собой гомоагрегат субъединиц капсульного антигена, соединенных в линейное волокно F1 посредством N-концевой  $\beta$ -цепи [3]. Однако при проведении генно-инженерных манипуляций слаженный процесс синтеза F1 штаммом-продуцентом *Escherichia coli* нарушается, приводя к образованию нерастворимых конгломератов F1 в цитоплазме клетки [4].

Целью данной работы было получение продуцента растворимого мономера F1. Изменение конформации белковой молекулы стало возможным благодаря произведенным перестройкам в нуклеотидной последовательности гена *cafI*, затрагивающим исключительно N- и C-концевую область биополимера [4].

Полноразмерный ген *cafI* (513 п.н.) амплифицировали из штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ. Температуру отжига праймеров определяли в программе Vector NTI. Для получения растворимой формы F1 в нуклеотидной последовательности гена *cafI* был произведен перенос N-концевого участка размером 7 а.о. на C-конец с последующим его удвоением, что привело

к восстановлению потенциальных Т-клеточных эпитопов. В качестве экспрессирующей системы был выбран вектор рЕТ32а (Novagen), несущий на N-конце последовательность, кодирующую 6 гистидиновых остатков (6xHis tag), облегчающую дальнейшую очистку целевого белка на никель-хелатном сорбенте. Сконструированными плазмидами с интегрированными на участке полилинкера генами мутантного (*caf1mut*) и нативного (*caf1*) трансформировали компетентные клетки *E. coli* TOP10. Отбор трансформантов проводили на среде с добавлением ампициллина в концентрации 50 мкг/мл. На следующем этапе ДНК рекомбинантных плазмид трансформировали экспрессирующий штамм *E. coli* BL21 (DE3). Селекцию клонов производили по маркеру резистентности к ампициллину. Продукцию целевых белков стимулировали, добавляя к находящимся в логарифмической фазе роста бактериям 0,1 мМ раствор изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ).

В нашей работе для определения пространственной структуры рекомбинантных белков использовали онлайн-ресурсы I-Tasser и Swiss-model. Примечательно, что внешний вид моделей нативного и модифицированного капсульного антигена, выполненных с помощью разных веб-ресурсов, был идентичен. При построении 3D модели продукта трансляции мутантного гена *caf1* онлайн-сервером I-Tasser программой было подобрано 10 наиболее близких гомологов, в качестве каркаса программой была выбрана определенная при помощи рентгено-структурного анализа и аннотированная последовательность белка F1. Интерес представляют данные по прогнозированию онлайн-сервером I-Tasser положения α-спиралей, β-слоев и петель, что несомненно важно при исследовании структуры белка и его взаимодействий с лигандами. Также к преимуществам данного сервера можно отнести и то, что при отсутствии экспериментального шаблона программой используется моделирование «с нуля» с применением высокоэффективных математических методов, основываясь на законах квантовой механики и молекулярной динамики. Проведенное гомологичное моделирование с применением онлайн-ресурсов I-Tasser и Swiss-model подтвердили, что изменения пространственной структуры антигена, не перекрывают Т-клеточные эпитопы.

Были наработаны в препаративных количествах препараты мутантного (F1mut) и нативного F1. Отмечено различие в молекулярных массах модифицированной и исходной форм F1 из-за наличия аминокислотного линкера, состоящего из 2-х аминокислотных остатков, а также некоторое увеличение концентрации F1mut при соблюдении одинаковых условий культивирования рекомбинантных штаммов-продуцентов. В отличие от нативной формы F1 продукт трансляции мутантного гена *caf1* преимущественно обнаруживается в супернатанте отмытых от культуральной среды бактериальных

клеток, что облегчает очистку иммуногенного продукта с применением коммерческой системы ProBond™ Purification System (Invitrogen, Германия) с сохранением конформации белковой молекулы и ее активности.

Таким образом, с использованием генно-инженерных подходов осуществлено направленное изменение антигенных характеристик капсульного антигена чумного микроба, приводящих к повышению его растворимости. Полученные очищенные препараты нативной и модифицированной формы F1 могут быть в дальнейшем использованы в экспериментах по созданию средств диагностики и профилактики чумы.

### Литература

1. Онищенко, Г. Г. Биотерроризм: национальная и глобальная угроза / Г. Г. Онищенко, Л. С. Сандахчиев, С. В. Нетесов, Р. А. Мартынюк // Вестник Российской академии наук. 2003. Т. 73. № 3. С. 195–204.
2. Бугоркова, С.А. исторические и современные представления о проблеме специфической профилактики чумы / С. А. Бугоркова, З. Л. Девдариани, Т. Н. Шуковская, В. В. Кутырев // Проблемы особо опасных инфекций. 2013. Вып.3. С. 63–69.
3. Zavialov, A. V. Structure and biogenesis of the capsular F1 antigen from *Yersinia pestis*: preserved folding energy drives fiber formation / A. V. Zavialov, J. Berglund, A. F. Pudney, L. J. Fooks, T. M. Ibrahim, S. MacIntyre, S. D. Knight // Cell. 2003. V. 113. P. 587–596.
4. Tao, P. Mutated and bacteriophage T4 nanoparticle arrayed F1-V immunogens from *Yersinia pestis* as next generation plague vaccines / P. Tao, M. Mahalingam, M. L. Kirtley, C.J. van Lier, J. Sha, L. A. Yeager, A. K. Chopra, V. B. Rao // PLoS Pathog. 2013. 9(7). e1003495.

## ЭФФЕКТ ИСТОЧНИКА УГЛЕРОДА НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОЦЕССА БИООКСИЛЕНИЯ СУЛЬФИДНОГО КОНЦЕНТРАТА \*

### EFFECT OF CARBON SOURCE ON THE EFFICIENCY OF SULFIDE CONCENTRATE BIOOXIDATION

А. Г. Булаев

*Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского,  
ФИЦ Биотехнологии РАН*

A. G. Bulaev

*Winogradsky Institute of Microbiology,  
Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences*

E-mail: bulaev.inmi@yandex.ru

#### **Аннотация**

Был исследован эффект внесения углерода в виде  $\text{CO}_2$  в пульпу биореактора на эффективность процесса биоокисления сульфидного золотосодержащего концентрата. Было показано, что использование  $\text{CO}_2$  позволило увеличить степень биоокисления сульфидных минералов по сравнению с контрольным реактором, куда  $\text{CO}_2$  не подавался (было окислено 81 и 37 % сульфидной серы соответственно).

#### **Abstract**

The effect of carbon supply in the form of  $\text{CO}_2$  into the bioreactor pulp on the efficiency of the biooxidation of a gold bearing sulfide concentrate was studied. It was shown that the  $\text{CO}_2$  application made it possible to increase the rate of sulfide minerals biooxidation in comparison with the control reactor, where  $\text{CO}_2$  was not supplied (81 and 37% of sulfide sulfur were oxidized, respectively).

Биоокисление успешно применяется для переработки упорных золотосодержащих концентратов по всему миру. Эта технология, основанная на процессе деструкции сульфидных золотовмещающих минералов аэробными экстремально ацидофильными микроорганизмами, использующими в качестве источников энергии двухвалентное железо и серу, позволяет

проводить переработку минерального сырья, не создавая высокой нагрузки на окружающую среду, и значительно повысить степень извлечения золота из упорных сульфидных концентратов. Несмотря на то, что основы этой биотехнологии были разработаны еще в 70-х годах 20 века, до сих пор проводятся исследования с целью изучения влияния различных факторов на эффективность процесса. Целью данной работы являлось определение влияния дополнительного источника углерода ( $\text{CO}_2$ ) на биоокисление золотосодержащего пирит-арсенипиритного флотоконцентрата.

Состав концентрата представлен в таблице. Основными сульфидными минералами концентрата являлись пирит (56 %) и арсенипирит (14 %). Процесс биоокисления концентрата проводили в периодическом режиме в двух лабораторных реакторах объемом 2.5 л при следующих параметрах: аэрация — 5 л/мин, скорости вращения турбинной мешалки — 500 об/мин, температура — 39–40 °С, плотность пульпы (Т : Ж) — 1 : 5. Продолжительность эксперимента составила 40 сут.

### Химический состав концентрата

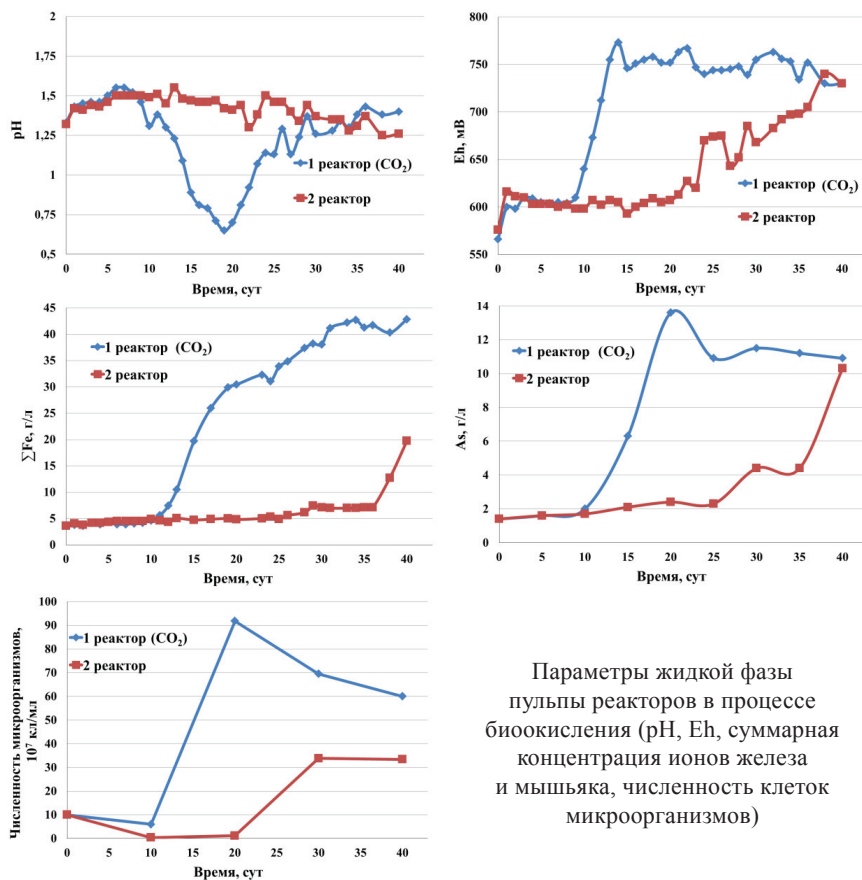
Компонент	Содержание, %
$\text{Fe}_\Sigma$	31,8
$\text{Fe}_s$	29,1
$\text{S}_\Sigma$	34,7
$\text{S}_s$	34,4
$\text{S}_{\text{сульфатная}}$	0,2
$\text{S}^0$	0,1
$\text{As}_\Sigma$	6,9
$\text{As}_s$	6,5
Au, г/т	45,5

В качестве инокулята использовали микробную культуру, сформировавшуюся в процессе биоокисления того же сульфидного концентрата при 40 °С в проточном режиме, в которой преобладали ацидофильные бактерии *Leptosiphillum ferriphilum*, *Sulfobacillus* spp., а также археи *Ferroplasma acidiphilum* и *Acidiplasma* sp. Инокулят вносили в реакторы в таком объеме, чтобы начальная численность клеток микроорганизмов в жидкой фазе составляла  $1 \times 10^8$  кл/мл. В пульпу первого реактора осуществляли подачу  $\text{CO}_2$  (примерно 0,01 л/мин). При проведении процессов биоокисления определяли параметры жидкой фазы пульпы биоокисления, которые позволяют оценить активность биоокисления (рН, Eh, концентрацию ионов  $\text{Fe}^{3+}$  и  $\text{Fe}^{2+}$ ,

а также мышьяка. При необходимости рН пульпы регулировали путем добавления серной кислоты или карбоната кальция. Численность клеток микроорганизмов определяли прямым подсчетом с помощью фазово-контрастного микроскопа Carl Zeiss Jena ( $\times 1600$ ). После окончания эксперимента твердые остатки биоокисления отделяли от жидкой фазы пульпы и подвергали их химическому анализу для определения степени окисления сульфидных минералов.

Параметры жидкой фазы пульпы представлены на рисунке. Как видно из представленных данных, подача углекислого газа значительно повлияла на все параметры жидкой фазы. Значение рН жидкой фазы пульпы в реакторе 1 быстро снижалось и на 20-е сутки достигло 0,65, тогда как в реакторе 2 рН снижался намного медленнее и не достигал настолько низких значений. В обоих реакторах потребовалось внесение  $\text{CaCO}_3$  для поддержания рН. В первом реакторе расход  $\text{CaCO}_3$  составил 314 кг/т концентрата, тогда как во втором реакторе — 71 кг/т. Eh в первом реакторе уже на 15 сутки превысил 750 мВ, что указывало на активное биоокисление сульфидных минералов и железа. При этом после 15 суток биоокисления в реакторе 1 концентрация  $\text{Fe}^{2+}$  была ниже 0,5 г/л. В реакторе 2 Eh достиг значения 740 мВ только на 38 сутки. Концентрация  $\text{Fe}^{2+}$  на протяжении всего эксперимента была достаточно высокой, и стала ниже 1 г/л только после 34 суток биоокисления. Суммарная концентрация ионов железа в первом реакторе также росла намного быстрее, при этом в конце эксперимента она была в два раза выше, чем в реакторе 2 (43 и 20 г/л соответственно). Несмотря на то, что концентрация мышьяка в жидкой фазе в реакторе 1 также росла намного быстрее, к концу эксперимента концентрации мышьяка в реакторе были почти одинаковы. Нужно отметить, что в первом реакторе концентрация мышьяка достигла максимума на 20 сутки, а затем снизилась. Это может объясняться тем, что в присутствии высоких концентраций ионов  $\text{Fe}^{3+}$  мышьяк может переосаждаться в виде скородита ( $\text{FeAsO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). Результаты анализа состава твердых остатков биоокисления соответствовали результатам анализа жидкой фазы. Было показано, что в результате биоокисления в реакторе 1 было окислено 81 и 37 % сульфидной серы. При этом в реакторе 1 было окислено 77 и 98 % пирита и арсенопирита, а в реакторе 2—27 и 92 % пирита и арсенопирита соответственно. Таким образом, степени окисления арсенопирита различались незначительно, тогда как степени окисления пирита различались почти в 3 раза. Это можно объяснить тем, что пирит значительно более устойчив к биоокислению, чем арсенопирит.





Параметры жидкой фазы  
пульпы реакторов в процессе  
биоокисления (рН, Eh, суммарная  
концентрация ионов железа  
и мышьяка, численность клеток  
микроорганизмов)

Более эффективному биоокислению соответствовала более высокая численность микроорганизмов в жидкой фазе пульпы. Нужно отметить, что в начале процесса происходило снижение численности клеток в жидкой фазе, что связано с прикреплением клеток к минеральным частицам концентрата, после чего численность клеток микроорганизмов начала возрастать. Максимальная численность микроорганизмов в реакторе 1 достигла  $9 \times 10^8$  кл/мл, тогда как в реакторе 2 она не превышала  $3,3 \times 10^8$  кл/мл. Таким образом, очевидно, что внесение дополнительного источника углерода, необходимого для конструктивного метаболизма хемолитотрофов, позволило увеличить активность биоокисления концентрата, так как повысило численность микроорганизмов в популяции.

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ ДИГОКСИНА ПО ОТНОШЕНИЮ К ОПУХОЛЕВЫМ И НОРМАЛЬНЫМ КЛЕТКАМ

### COMPARATIVE TOXICITY OF DIGOXIN TOWARDS TUMOR AND NORMAL CELLS

К. А. Быкова, И. А. Дубровина

*Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины»  
Министерства обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург*

K. A. Bykova, I. A. Dubrovina

*State Scientific Research Testing Institute of Military Medicine,  
Ministry of Defense of Russian Federation, Saint Petersburg*

#### **Аннотация**

Благодаря своей биологической активности дигоксин способен стать основой для новых противоопухолевых препаратов. В настоящей работе показано цитотоксическое действие дигоксина на клетки линий А549 и СНО. Вещество обладает выраженным цитотоксическим действием в отношении клеточной линии А549, при этом не подавляет пролиферацию клеток СНО.

#### **Abstract**

Due to its biological activity, digoxin is able to become the basis of the new antitumor drugs. The work describes the cytotoxic effect of digoxin on A549 and CHO cells lines. The substance has a pronounced cytotoxic effect on the A549 cell line, while it does not inhibit the proliferation of CHO cells.

Сердечные гликозиды — это разнообразное семейство соединений природного происхождения, широко известные своей способностью связываться с Na/K-АТФазой в клетках сердечно-сосудистой системы и ингибировать её активность. В течение многих лет представителей этого семейства (дигоксин, дигитоксин) используют в клинической практике для лечения сердечной недостаточности и мерцательной аритмии. Недавние исследования сердечных гликозидов *in vitro* выявили повышенную восприимчи-

вость раковых клеток к воздействию этих соединений. Показано, что они избирательно ингибируют рост опухолевых клеток и, соответственно, могут применяться в качестве противоопухолевых препаратов. Цель нашего исследования — сравнительное изучение цитотоксичности дигоксина на нормальных и опухолевых клетках млекопитающих *in vitro*.

Эксперименты проведены на следующих перевиваемых клеточных линиях: А-549 карциномы легких человека, клон линии CHO (CHO-K1). Для культивирования данных клеток использовали среду DMEM, содержащую 4 mM L-глутамин, 1000 мг/л глюкозы, 10 % фетальную бычью сыворотку FBS и антибиотик пенициллин/стрептомицин/амфотерицин В. Клетки культивировали при 37 °C и увлажненной атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub>. Для эксперимента клетки высевали по 2x10<sup>4</sup> клеток на лунку 8-ми луночного планшета E-Plate в 700 мкл среды, содержащей исследуемое вещество. В работе использовали дигоксин, производства Sigma-Aldrich (США). Вещество вводили в 10-х кратных, а затем в 2-х кратных разведениях.

Для оценки влияния исследуемого вещества на адгезию и пролиферативную активность А549 и CHO использовали систему RTCA iCELLigence. Анализ результатов и статическую обработку выполняли с помощью программного обеспечения RTCA Software 1.0.

При исследовании антипролиферативного эффекта сердечной гликозида — дигоксина в отношении клеток линии А549 показано, что эффект имеет четкую концентрационную зависимость (рис. 1). При воздействии на клетки дигоксином в концентрации 0,005 мкг/мл показатель нормализованного клеточного индекса (отражает количество прикрепленных живых

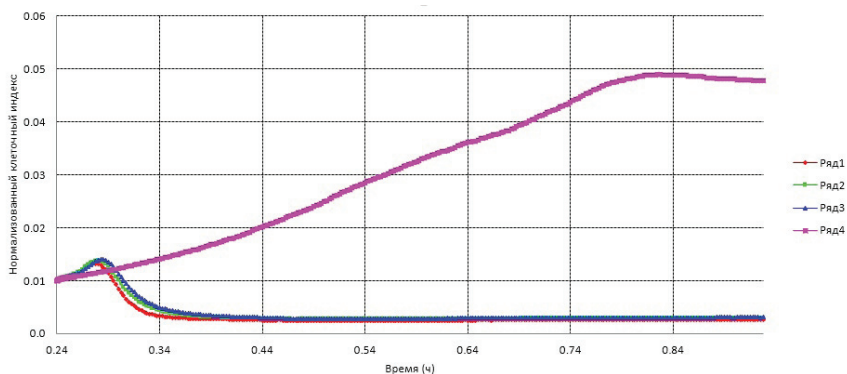


Рис. 1. Воздействие дигоксина в концентрациях 0,5-0,005 мкг/мл на культуру А549 методом клеточного анализа iCELLigence. Ряд 1 — концентрация 05 мкг/мл, ряд 2 — 0,05 мкг/мл, ряд 3 — 0,005 мкг/мл, ряд 4 — контроль

клеток) снижается относительно контрольного образца в 4,4 раза, при воздействии дигоксина в концентрации 0,05 мкг/мл в 4,5 раза, при 0,5 мкг/мл в 4,8 раза. Оценка цитостатического эффекта на клетках культуры СНО выявила слабый эффект, и только при воздействии дигоксина в концентрации 0,5 мкг/мл клеточный индекс снижался в 1,9 раз. Угнетение пролиферации СНО при других концентрациях обнаружено не было.

Воздействие дигоксина на клеточные популяции оценивали по изменению величины времени удвоения количества клеток (рис. 2). При отрицательном значении времени удвоения количество клеток уменьшается из-за цитотоксического действия вещества и, чем выше концентрация, тем меньше время удвоения. Из полученных данных следует, что дигоксин оказывал цитотоксическое действие на А549, тогда как клеточная линия СНО была нечувствительна к действию данного вещества, а только замедлилась в росте при концентрации 0,5 мкг/мл. Контроли обеих клеточных линий были практически одинаковы по времени удвоения.

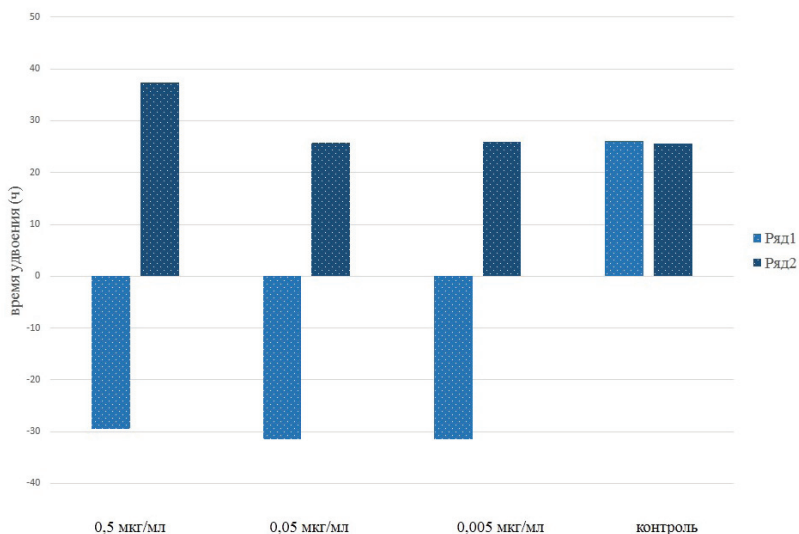


Рис. 2. Время удвоения клеточных линий. Ряд 1 — А549, ряд 2 — СНО

При исследовании противоопухолевого эффекта дигоксина в отношении культур А549 и СНО было показано, что вещество обладает выраженной цитотоксической активностью только по отношению к карциноме лег-

---

кого человека. Цитотоксический эффект имеет прямую концентрационную зависимость. Антипролиферативный эффект дигоксина на клетки СНО выявлен не был.

### **Литература**

1. Prassas I. et al. Digitoxin-induced cytotoxicity in cancer cells is mediated through distinct kinase and interferon signaling networks//Molecular cancer therapeutics. 2011. Т. 10. №.11. С. 2083–2093.
2. Sreenivasan Y., et al. Oleandrin-mediated expression of Fas Potentiates apoptosis in tumor cells//Journal of Clinical Immunology. 2013. Т. 33. №. 5.
3. Newman R. A. et al. Cardiac glycosides as novel cancer therapeutic agents // Molecular interventions. 2008. Т. 8. №. 1. С. 36.

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ НОВЫХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ШТАММОВ ЛАКТОБАЦИЛЛ\*

### IDENTIFICATION OF NEW BIOTECHNOLOGICAL STRAINS OF LACTOBACILLI

А. С. Волкова, Е. А. Анисимова, Д. Р. Яруллина

*Казанский (Приволжский) Федеральный университет,  
Институт фундаментальной медицины и биологии*

A. S. Volkova, E. A. Anisimova, D. R. Yarullina

*KFU, Russia*

E-mail: volkov-alisa@yandex.ru

#### Аннотация

Для 15 штаммов лактобацилл, выделенных из различных источников, выполнена родовая и видовая идентификация по ГОСТ 10444.11-89, с помощью MALDI Biotyper и по последовательности гена 16S рРНК. Результаты видовой идентификации лактобацилл с помощью MALDI Biotyper и по последовательности гена 16S рРНК совпали для 19 из 20 образцов, поэтому MALDI-TOF масс-спектрометрия может использоваться как быстрый и надежный метод видовой идентификации лактобацилл. Показаны ограничения анализа спектра утилизируемых субстратов в видовой идентификации лактобацилл: ферментационный профиль позволил дифференцировать *L. fermentum/L. plantarum*, но не позволил дифференцировать *L. brevis/L. buchneri/L. hilgardii*.

#### Abstract

For 15 strains of lactobacilli isolated various sources genus and species identification was performed according to GOST 10444.11-89, using MALDI Biotyper and according to the 16S rRNA gene sequence. The results of species identification of lactobacilli using MALDI Biotyper and the sequence of the 16S rRNA gene were the same for 19 of the 20 samples; therefore, MALDI-TOF mass spectrometry can be used as a fast and reliable method for the species identification of lactobacilli. The limitations of spectrum analysis of

---

© А. С. Волкова, Е. А. Анисимова, Д. Р. Яруллина, 2019

\* Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 18-34-00268 в рамках Программы повышения конкурентоспособности КФУ с использованием оборудования Междисциплинарного центра протеомных исследований.

utilized substrates in the species identification of lactobacilli are shown: the fermentation profile made it possible to differentiate *L. fermentum* / *L. plantarum*, but not allowed to differentiate *L. brevis* / *L. buchneri* / *L. hilgardii*.

Бактерии рода *Lactobacillus* являются важными членами резидентной микрофлоры желудочно-кишечного тракта человека и животных, многие лактобациллы имеют статус GRAS (Generally Regarded As Safe) и включены в список QPS (Qualified Presumption of Safety) Евросоюза. Поэтому лактобациллы зачастую присутствуют в продуктах питания, входят в состав пищевых добавок и используются в качестве стартерных культур при конструировании пробиотиков. Несмотря на признанную микробиологическую безопасность, некоторые виды лактобацилл могут вызывать такие патологические процессы, как бактериемия, холецистит, зубной кариес, эндокардит и другие. Таким образом, большое значение бактерий рода *Lactobacillus* в научном и биотехнологическом плане диктует необходимость их быстрой и однозначной видовой идентификации. Сложность идентификации лактобацилл обусловлена их многочисленным видовым составом, а также тем, что представители разных видов часто обладают сходными фенотипическими и физиологическими характеристиками. Поэтому целью данной работы является сравнительный анализ методов таксономической идентификации бактерий рода *Lactobacillus*.

Из растительного материала, кисломолочных продуктов и ЖКТ человека нами было выделено 15 штаммов лактобацилл. Определение принадлежности бактерий к роду *Lactobacillus* осуществляли согласно ГОСТ 10444.11-89 по положительному окрашиванию по Граму, отсутствию спорообразования и каталазной активности. В качестве референсных микроорганизмов использовали 5 штаммов лактобацилл: *L. fermentum* 90 ТС-4, *L. brevis* DSM 20054, *L. brevis subsp. gravesensis* LMG 7934, *L. buchneri* DSM 20057, *L. rhamnosus* I2L. Определение ферментации углеводов бактериями проводили с использованием планшетных тест-систем «АНАЭРОтест-23» и «СТРЕПТОтест-24» («MicroLaTest», Чехия). Масс-спектр рибосомных белков анализировали с помощью MALDI BioType (Bruker, Германия). Генотипическую идентификацию проводили на основе анализа последовательности гена 16S рРНК: гены 16S рРНК амплифицировали методом ПЦР с применением пары праймеров 27f и 1392г и секвенировали методом Сэнгера на секвенаторе ABI Prism 3730 (Applied Biosystems), полученные последовательности анализировали с помощью алгоритма NCBI BLASTn, используя базу данных GeneBank.

Результаты видовой идентификации лактобацилл с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии и по последовательности гена 16S рРНК совпа-

ли для 19 из 20 образцов, поэтому MALDI-TOF масс-спектрометрия может использоваться как быстрый и надежный метод видовой идентификации лактобацилл. Таким образом, исследуемые лактобациллы отнесены к видам *L. fermentum* (9 штаммов) и *L. plantarum* (6 штаммов), а для референсных штаммов *L. fermentum* 90 TC-4, *L. brevis* DSM 20054, *L. brevis ssp. gravesensis* LMG 7934, *L. buchneri* DSM 20057, *L. rhamnosus* I2L подтверждена видовая принадлежность. Однако отметим, что по последовательности гена 16S рРНК и по спектру утилизации сахаров штамм *Lactobacillus sp.* HF-B1 идентифицирован как *L. plantarum*, в то время как методом MALDI-TOF масс-спектрометрии как *L. fermentum*. Также нами показаны ограничения анализа спектра утилизируемых субстратов в видовой идентификации лактобацилл: ферментационный профиль не позволил дифференцировать *L. brevis/L. buchneri/L. hilgardii*. Поэтому данный метод не пригоден для однозначной видовой идентификации лактобацилл.

Полученные результаты подчеркивают, что при отборе биотехнологических штаммов лактобацилл необходимо комбинировать методы идентификации, а также применять индивидуальный подход для конкретных штаммов лактобацилл.



**СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ СТИМУЛИРУЮЩЕГО  
ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ЭМБРИОГЕНЕЗ БРОЙЛЕРОВ  
ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ И ЕЁ АММОНИЕВОЙ СОЛИ**

A COMPARATIVE ASPECT OF THE EFFECTIVENESS  
OF THE STIMULATING EFFECT ON THE EMBRYOGENESIS  
OF BROILERS OF SUCCINIC ACID AND ITS SALT

М. В. Голунова, Т. О. Азарнова, М. С. Найденский

*ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной  
медицины и биотехнологий-МВА им. К. И. Скрябина»*

M. V. Golunova, T. O. Azarnova, M. S. Naidenskiy

*FSBEI of HE “Moscow State Academy of Veterinary Medicine and  
Biotechnology — MBA named after K. I. Scriabin”, Russia*

**Аннотация**

Янтарная кислота и ее аммониевая соль стимулируют эмбриональное развитие бройлеров, повышая качественные и количественные результаты инкубации.

**Abstract**

Succinic acid and its ammonium salt stimulate the embryonic development of broilers, increasing the qualitative and quantitative results of incubation.

Как известно, эмбрионы птицы развиваются вне организма матери, в связи с чем, становится очевидной возрастающая роль воздействия внешних факторов на качество и интенсивность их становления и развития, переоценить которую не возможно. Зачастую, факторы, обусловленные условиями искусственной инкубации, оказывают пагубное влияние на организм развивающейся особи. Указанное определяет необходимость коррекции негативных последствий их воздействий.

Как известно, янтарная кислота (ЯК) поддерживает и стимулирует энергетический обмен, биосинтез гемма и ряд других жизненно важных процессов в условиях воздействия факторов стресса (Кондрашова М. Н.). Заявленный метаболит обладает выраженным антиоксидантным действием, что

также важно для ликвидации негативных последствий оксидативного стресса развивающегося на фоне общего стресса любой этиологии. Стресспротекторное свойство ЯК во многом обусловлено способностью предложенной кислоты поддерживать высокую степень восстановленности коэнзима Q, предупреждая накопление его полувосстановленной формы, которая является генератором супероксид-аниона.

В медицинской и ветеринарной литературе присутствуют разрозненные данные о том, что сукцинат аммония обладает рядом сходных жизненно важных свойств для взрослых животных и человека, наиболее освящены среди прочих: гепатопротекторные, антиоксидантные и актопротекторные (Косенко Е. А., Каминский Ю. Г., Кондрашова М. Н., 1997). Однако отсутствуют данные по использованию соли в условиях эмбриогенеза сельскохозяйственных птиц.

В этой связи определенный научный интерес представляет сравнение эффективности стимулирующего воздействия на эмбриогенез бройлеров янтарной кислоты и её аммониевой соли.

Результаты проведенных исследований свидетельствовали о том, что обработка инкубационных яиц оптимальными концентрациями растворов, как янтарной кислоты, так и её аммониевой соли перед закладкой в инкубатор положительно повлияли на эмбриональную жизнеспособность молодняка, что выразилось в увеличении вывода цыплят и выводимости яиц на 5,9 % и на 6,8 % в первом случае, на 5,4 % и на 4,3 % во втором, соответственно.

Указанное обусловлено снижением таких категорий отходов инкубации, как «неоплод», преимущество опыта над контролем по данной категории отходов фиксировали только в партии, где применяли ЯК, по остальным же превосходство наблюдали в обоих случаях: «кровяные кольца» на 0,31 % и на 0,62 %, «замершие» на 0,61 % и на 0,92 %, «задохлики» на 0,31 % и на 0,62 % и слабых на 3,70 % и на 4,01 %, соответственно.

Как видно из ранее представленного, янтарная кислота оказала более выраженное влияние на категорию отходов «неоплод», очевидно, за счёт «ложного неоплода», тогда, как сукцинат аммония имел более выраженное воздействие на «кровяные кольца» и «замершие». Последнее, очевидно, связано, с наличием более выраженного антигипоксического действия.

Полученный суточный молодняк имел преимущество не только по эмбриональной жизнеспособности, но и по ряду интерьерных показателей.

Так, было зафиксировано при использовании лучших концентраций заявленных БАВ, выявленных в сериях предшествующих экспериментов, преимущество по весовым значениям органов, в частности сердца, селезенки, мышечного и железистого желудков фабрициевой сумки, при снижении остаточного желтка. При этом максимальные различия по большинству из

перечисленных органов были зафиксированы в группе, где использовали сукцинат аммония. Также следует обратить внимание на разницу между опытом и контролем по массе суточного молодняка на 2,4 % и на 3,5 %, соответственно, что по данным Бессарабова Б. Ф. и соавторов (2015), свидетельствует о более высокой полноценности полученного молодняка. Этот же факт был подтверждён преимуществом особой опытных групп по шкале «Пасгар» на 0,5 и 0,7 балла, соответственно. Как видно, эффект был максимален также в группе, где использовали оптимальную концентрацию сукцината аммония.

Как известно, по данным Орлова М. В., Бессарабова Б. Ф. (2015) и соавторов, качество молодняка и интенсивность его развития обусловлены интенсивностью метаболизма.

Изучение основных показателей центральных обменных процессов указывают на повышение интенсивности белкового обмена, что выразилось в увеличении содержания в сыворотке крови общего белка и альбуминов на 3,28 % и на 11,49 % в первом случае и на 3,92 % и на 3,45 % во втором.

Наряду с этим, зафиксирована интенсификация углеводного обмена, что выразилось в увеличении глюкозы в крови, активности  $\alpha$ -амилазы и снижении ЛДГ на 18,03 %, на 2 % и в 3 раза, соответственно первом случае, в 1,4, в 1,56 раз и в 1,16 раза во втором. Более низкие значения ЛДГ указывают на возрастающую роль аэробного гликолиза, как наиболее энергетически выгодного процесса.

В свою очередь, по данным Тагирова М. Т., тенденция к снижению уровня триглицеридов в сыворотке крови, вероятно, связано с возросшей ролью глюконеогенеза, исходными субстратами для которого могут быть компоненты триглицеридов.

Представленное выше свидетельствует о фактически равнозначном действии изучаемых БАВ на организм эмбрионов бройлеров. Однако полученные данные требуют детализации и подтверждения на других видах сельскохозяйственной птицы.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЦР ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ГРИППА А В МОНИТОРИНГЕ ГРИППА СРЕДИ ДИКИХ ПТИЦ \*

### USE OF PCR TEST SYSTEMS FOR DIAGNOSTIC OF INFLUENZA A IN MONITORING INFLUENZA AMONG WILD BIRDS

К. К. Джекебеков<sup>1</sup>, К. К. Акылбаева<sup>1</sup>, Э. Т. Тайлакова<sup>1</sup>, С. О. Садикалиева<sup>1</sup>,  
Е. Д. Бурашев<sup>1</sup>, А. Т. Жунушов<sup>2</sup>, М. М. Касенов<sup>1</sup>, К. Т. Султанкулова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности Комитет Науки Министерства образования и науки Республики Казахстан (НИИПББ КН МОН РК)*

<sup>2</sup> *Институт биотехнологии Национальной Академии Наук Кыргызской Республики*

K. K. Jekebekov<sup>1</sup>, K. K. Akylbayeva<sup>1</sup>, E. T. Tailakova<sup>1</sup>, S. O. Sadikaliyeva<sup>1</sup>,  
E. D. Burashev<sup>1</sup>, A. T. Junushov<sup>2</sup>, M. M. Kassenov<sup>1</sup>, K. T. Sultankulova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Research Institute for Biological Safety Problems KN MES RK, Gvardeyskiy, Kazakhstan*

<sup>2</sup> *Institute of Biotechnology of the National Academy of Sciences of Kyrgyz Republic*

E-mail: zhekebekov\_87@mail.ru

#### Аннотация

Объектом исследований является вирус гриппа типа А. Целью исследования является испытание диагностической эффективности тест-системы для лабораторной диагностики гриппа А методом ПЦР. С использованием разработанной ПЦР-тест-системы идентифицирован вирус гриппа типа А в 17,9 % в биопробах от диких птиц, обитающих на территории РК.

Область применения — медицинская /ветеринарная вирусология.

#### Abstract

The object of research is PCR analysis of influenza A virus. The aim of the study is to test the diagnostic effectiveness of the test system for laboratory diagnosis of influenza

---

© К. К. Джекебеков, К. К. Акылбаева, Э. Т. Тайлакова, С. О. Садикалиева, Е. Д. Бурашев, А. Т. Жунушов, М. М. Касенов, К. Т. Султанкулова, 2019

\* Работа выполнена в рамках проектов грантового финансирования «Молекулярно-эпизоотологический мониторинг гриппа птиц в Казахстане», 2018–2020 гг., № АР05132659 и проекту 0145-17-ГК «Внедрение в производство «Тест-системы для лабораторной диагностики гриппа А/Н5 методом полимеразной цепной реакции».

A by PCR. As a result of research, a test system for diagnosing influenza A virus has been developed. Using the developed PCR-test system influenza A virus has been identified in 17,9% of biological samples from wild birds in the territory of the Republic of Kazakhstan.

Scope — medical / veterinary virology.

Одними из основных задач при борьбе с гриппом являются определение ареала его распространения путем мониторинга циркуляции вируса гриппа в популяциях птиц и человека и установление генетического разнообразия возбудителя болезни. На сегодняшний день ПЦР-анализ является одним из наиболее распространенных и динамично развивающихся технологии лабораторной диагностики. Ежегодно на рынке появляется все больше тест-систем, предназначенных для выявления, как возбудителей различных заболеваний, так и мутаций генов человека, животных и растений. Количество ПЦР-лабораторий неуклонно увеличивается, а ПЦР-анализ становится все более востребованным. Целью исследований является испытание диагностической эффективности тест-системы для лабораторной диагностики гриппа А методом ПЦР. В НИИПББ КН МОН РК разработана «Тест-система для лабораторной диагностики гриппа А методом полимеразной цепной реакции», которая будет использована для мониторинга циркуляции вируса гриппа на молекулярном уровне. Диагностическая тест-система является новым биопрепаратом в биотехнологии Казахстана, где впервые с использованием молекулярных инструментов внедряется в практику Республики Казахстан для ранней лабораторной диагностики гриппа А.

Порог чувствительности разработанной тест-системы составил  $1 \times 10^{-5}$  в разведении вируса гриппа с исходной активностью  $5,0 \text{ IgЭИД}_{50}/\text{мл}$ . При оценке специфичности тест-системы установлено, что тест-система позволяет выявлять в биоматериалах только РНК вирусов гриппа типа А. Срок хранения тест-системы составляет 12 месяцев.

С помощью разработанной диагностической тест-системы на основе ПЦР проведены работы по идентификации вируса гриппа А в биопробах, отобранных в ходе мониторинговых экспедиций от диких птиц семейства Fringillidae, Passeridae, Accipitridae, Coraciidae, Hirundinidae Vigors, Columbidae, Muscicapidae, Strigidae, Cuculidae, Emberizidae, Motacillidae, Turdidae, Sylviidae, Acrocephalidae, Phylloscopidae, Acrocephalidae, Sylviidae, Emberizidae, Phylloscopidae, Panuridae орнитологической станции «Шакпак» (Жамбылская область) и в системе озер Сорбулак (Алматинская область).

При исследовании биопроб, отобранных в ходе мониторинга гриппа у диких птиц, с использованием «Тест-системы для лабораторной диагностики гриппа А методом полимеразной цепной реакции» были обнаружены в 17,9 % образцах вирус гриппа А.

## СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ КОМПОЗИЦИОННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ РИБОНУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

### METHOD OF CONSTRUCTING COMPOSITE PREPARATIONS BASED ON RIBONUCLEIC ACIDS

В. В. Ермолаев, П. В. Апалёв, Ю. В. Телегина, Ю. С. Аликин, Л. Р. Лебедев

*ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Бердск, Россия*

V. V. Ermolaev, P. V. Apalev, U. V. Telegina, Yu. S. Alikin, L. R. Lebedev

*FBSI SRC VB "Vector", Rospotrebnadzor, Berdsk, Novosibirsk region, Russia*

#### **Аннотация**

Разработана модель полимерной матрицы, содержащая этиотропный противовирусный агент. За счёт положительного заряда молекулы полимерной матрицы в сочетании с отрицательно заряженными молекулами dsРНК (индукторы интерферонов) образуются конструкции биочастиц, которые обладают комбинированными противовирусными свойствами. Исследованы технологические аспекты синтеза матрицы и образования биочастиц.

#### **Abstract**

In present work a model of a polymer matrix containing etiotropic antiviral agent was developed. Bioparticles, formed due to the attraction between the positive charge of the polymer matrix molecule and the negative charge of dsRNA molecules (interferon inducers), have combined antiviral properties. Technological aspects of the matrix synthesis and bioparticles formation were investigated.

#### **Введение**

Экономический ущерб от ОРВИ, гриппа и герпесвирусных инфекций в РФ составляет более 450 млрд. рублей в год [1]. Это, в частности, свидетельствует о недостаточной эффективности противовирусных препаратов и актуальности создания новых, более эффективных средств для профилактики и лечения инфекций.

Среди современных противовирусных средств можно выделить препараты неспецифического и специфического (этиотропного) действия.

К препаратам первой категории относятся иммуномодуляторы различной природы, в частности, интерфероны и их индукторы. Специфические противовирусные средства включают: ингибиторы декапсидации вирусов (на примере амантадина), ингибиторы протеазы (апротинин) и нейраминидазы (озельтамивир).

Перспективным является создание полимерных систем комплексного противовирусного действия, сочетающих активность полимерных матриц с вирус-ингибирующими функциями биологически активных веществ различного строения и специфичности.

Исследования свойств отдельных компонентов комплексных препаратов могут дать важную предварительную информацию о дополнительных эффектах, являющихся следствием взаимодействия действующего начала и вспомогательных веществ исходных препаратов.

Цель настоящей работы — получение данных о физико-химических свойствах композиционных препаратов на основе двуспиральных РНК (дсРНК) и полимерной матрицы с этиотропными противовирусными средствами; отработка процедур создания композиционных препаратов и прогноз появления у них дополнительных биологических эффектов.

### **Материалы и методы**

В работе были использованы: индукторы интерферонов — двуспиральные РНК (дсРНК), полученные из дрожжей *S. cerevisiae* [2] и бактериофага ф6 [3].

В качестве этиотропных агентов использовали ингибитор протеаз апротинин из препарата контрикал (фирма AWD Pharma) с активностью 10000 АТрЕ/доза, содержащего в качестве наполнителя маннитол, или ингибитор декапсидации вирусов амантадин («Sigma», США).

В работе также использовали: декстран с молекулярной массой 40000 Да («AppliChem», США); спермидин («Sigma», США); РНКазу («Fermentas», Литва), сыворотку мыши; для гель-фильтрации — сефадексы G-25 и G-150, сефарозу CL-6B («Pharmacia», Швеция); реактивы (трис, периодат натрия, боргидрид натрия, додецилсульфат натрия, гидрокарбонат натрия) категории «х.ч.».

Для активации матрицы при получении конъюгатов растворы декстрана и периодата натрия смешивали и проводили инкубацию при температуре от +20 °С до +25 °С. Через выбранные промежутки времени аликвоты раствора подвергали гель-фильтрации на сефадексе G-25 в буфере 50 мМ NaHCO<sub>3</sub>, рН 8,80. Количество образующихся альдегидных групп определяли по методу Саболкса [4]. Далее к раствору активированного декстрана добавляли этиотропный агент и спермидин. Синтезированные конъюгаты отделяли

гель-фильтрацией на сефадексе G-25 в изотоническом растворе. Полученные препараты анализировали гель-фильтрацией на сефадексе G-150 и электрофорезом в 15%-ом ПААГ. Для получения молекулярных конструкций синтезированные конъюгаты смешивали с РНК и образовавшиеся комплексы отделяли гель-фильтрацией на сефарозе CL-6В.

Результаты обрабатывали с использованием компьютерной программы Gel-pro31. Содержание белка в растворах определяли по методу Лоури [5], содержание нуклеиновых кислот — по методу Спирина [6].

### **Результаты и обсуждение**

Для создания матрицы, несущей вирус-ингибирующие агенты, был выбран декстран. Он легко биodeградируем в организме и его препараты с молекулярной массой 40000–60000 Да (полиглюкин, реополиглюкин) разрешены к применению в медицинской практике в качестве кровезаменителей. Для придания положительного заряда в состав молекулы декстрана вводили молекулы спермидина.

В качестве одного из этиотропных агентов был выбран ингибитор протеаз — апротинин, для которого показано, что при его ингаляционном введении в дозах 300–600 КИЕ/сут. наблюдался терапевтический эффект при лечении ОРВИ [7]. Апротинин — одноцепочечный полипептид, получаемый из лёгких или поджелудочной железы крупного рогатого скота, с молекулярной массой 6512 Да. Благодаря наличию большого числа основных аминокислот полипептид имеет сильный положительный заряд. Апротинин хорошо растворим в воде и водных растворах с низкой ионной силой (<10 мг/мл), устойчив в диапазоне рН 1-12, образует комплексы с субстратами в диапазоне  $3 < \text{pH} < 10$  [8].

В сообщении [9] показано, что апротинин, включённый в микрокапсулы из крахмала и бычьего сывороточного альбумина, подавляет размножение вируса инфекционного ринотрахеита у крупного рогатого скота. Будучи ингибитором протеаз, тормозящим протеолитические процессы, необходимые для синтеза вирусных белков и слияния вирусов с клеточной мембраной, апротинин также является ингибитором фибринолиза при тяжёлых формах инфекций дыхательных органов [9,10].

Другим этиотропным агентом выступает ингибитор декапсидации вирусов амантадин. В сообщении [11] было показано, что амантадин препятствует проникновению в клетку ряда вирусов, преимущественно вирусов гриппа А. Амантадин представляет собой трициклический первичный амин на основе адамантана молекулярной массой 151,2 Да. Имеет основные свойства, в медицине применяют в нейтрализованной, преимущественно



гидрохлоридной форме массой 187,7 Да.

Для выполнения работы использовали созданную в ГНЦ ВБ «Вектор» модель молекулярной конструкции вирусоподобных частиц, содержащих в центре индуктор интерферона — дсРНК, покрытую оболочкой из молекул конъюгата (поликатиона, содержащего в своём составе этиотропные агенты, среди которых ингибитор протеаз апротинин и ингибитор декапсидации вирусов амантадин).

Выбор дсРНК в качестве ядра частиц обусловлен тем, что максимальный клинический эффект при лечении вирусных заболеваний может быть получен при сочетанном применении этиотропных средств и препаратов интерферона или индуктора интерферонов. Мы использовали индуктор интерфероногенеза — дсРНК из киллерного штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* или бактериофага ф6.

Подобраны соотношения вводимых компонентов в молекулярную конструкцию и режимы синтеза конъюгатов декстрана с этиотропным агентом. Для активации декстрана использовали реакцию окисления периодатом натрия, внося на одну молекулу полимера 50 молекул окислителя.

Активированный декстран отделяли гель-фильтрацией и к нему последовательно добавляли апротинин или амантадин и спермидин (для придания молекуле конъюгата положительного заряда). Полноту вхождения компонентов контролировали методами электрофореза и хроматографии.

В процессе работы были исследованы факторы, оказывающие влияние на процесс образования конъюгатов декстрана:

- количественное соотношение полисахарида и окислителя ( $\text{NaJO}_4$ ) — 1/50 (моль/моль);
- длительность инкубации полисахаридной матрицы с окислителем — 1–2 ч;
- количественное соотношение полисахарида и спермидина для образования ионной связи конъюгатов с РНК — 1/10 (моль/моль);
- количественное соотношение полисахаридного и белкового компонентов — 1/1 (моль/моль).
- количественное соотношение полисахаридного компонента и амантадина — 1/1 и 1/2 (моль/моль).

Из полученных конъюгатов создавали оболочку для молекул дсРНК, добавляя его до 100 молекул на одну молекулу дсРНК.

Полученные электрофореграммы показывают, что комплексы РНК с конъюгатами имеют заметно меньшую подвижность, чем исходная дсРНК (Рис. 1, дорожки 10, 5 и 11; Рис. 2). Это можно объяснить увеличением молекулярной массы композиции в результате образования наночастиц и тем, что положительно заряженный спермидин частично нейтрализует в комплексе отрицательный заряд РНК. Наличие в образовавшихся частицах нуклеино-

вых кислот и пептидов подтверждено окрашиванием их (в 1 % геле агарозы или 15 % ПААГ после проведения электрофореза) красителями: бромистым этидием и Кумасси G-250.

В сравнительных экспериментах установлено, что дсРНК в конструкциях более устойчива к действию деградирующих факторов сыворотки крови. Если исходная дсРНК (2 мкг) разрушается под действием 0,1 мкл сыворотки практически полностью после инкубации 20 мин, то в конструкциях с конъюгатами дсРНК сохраняется и после инкубации с 0,5 мкл сыворотки (рис. 1). Это позволяет предположить возможность более длительной циркуляции молекулярных конструкций с РНК в организме и соответственно — пролонгированный комплексный терапевтический эффект.

Таким образом, полученные данные подтверждают, что использование стандартных физико-химических методов анализа позволяет выявить характерные изменения в поведении биологически активных соединений в составе конструкций, стимулирующих противовирусные защитные механизмы. Это позволяет предположить появление дополнительных биологических эффектов, вызываемых комплексными препаратами и предусмотреть методы по определению их роли в противоинфекционном ответе.

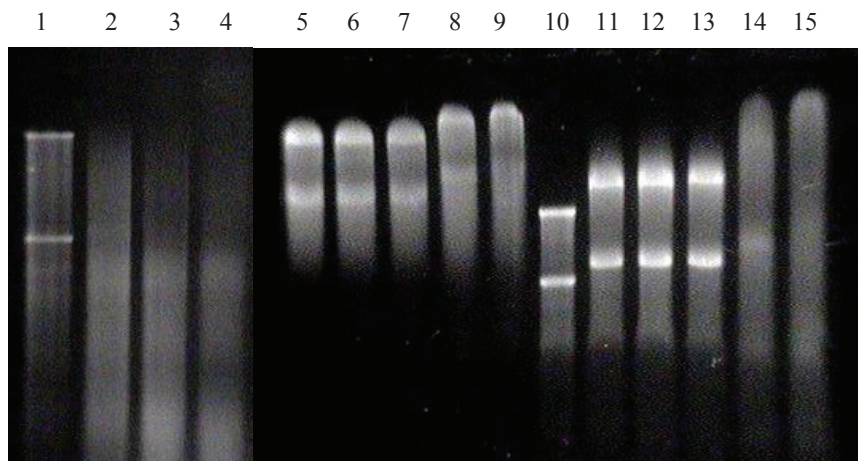


Рис. 1. Электрофореграмма экспериментальных образцов, обработанных сывороткой мыши в течение 20 мин при 37°C, в 1 % геле агарозы, дорожки:

1 и 10 — препарат исходной дсРНК; 2–4 — дсРНК после инкубации с сывороткой: 0,1; 0,2 и 0,5 мкл соответственно; 5 — препарат дсРНК с конъюгатом декстран-спермидин; 6–9 — после инкубации с сывороткой: 0,1; 0,2; 0,5 и 1 мкл соответственно; 11 — препарат дсРНК с конъюгатом декстран-апротинин-спермидин; 12–15 — после инкубации с сывороткой: 0,1; 0,2;

0,5 и 1 мкл соответственно

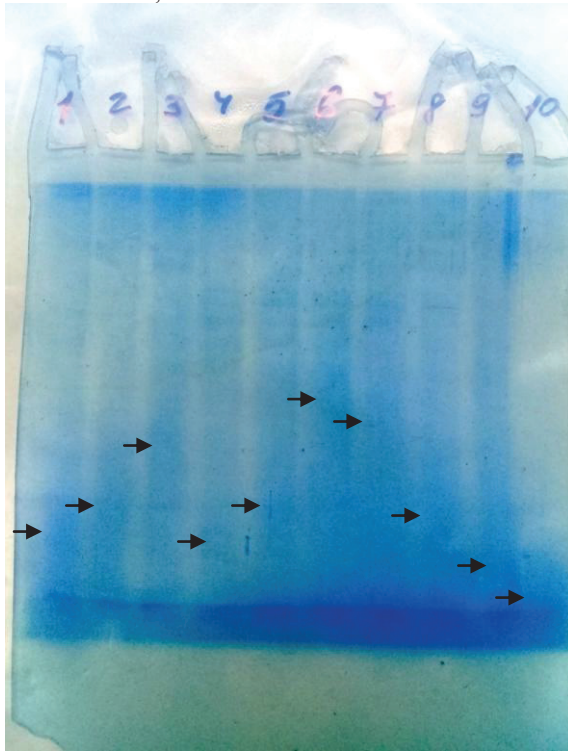


Рис. 2. Электрофореграмма экспериментальных образцов в 15% ПААГ, окрашивание Кумасси G-250, дорожки:

1–3 — композиции дсРНК бактериофага ф6 и конъюгата  $D_{40}$ -амантадин (1/2)-спермидин. Доли компонентов: 1/4, 1/6, 1/8; 4–8 — композиции дсРНК бактериофага ф6 и конъюгата  $D_{40}$ -амантадин (1/1)-спермидин. Доли компонентов: 1/4, 1/6, 1/8, 1/10, 1/12; 9 — композиция дсРНК бактериофага ф6 и конъюгата  $D_{40}$ -спермидин — 1/10; 10 — исходная дсРНК бактериофага ф6

### Выводы

Получены данные о физико-химических свойствах композиционных препаратов на основе дуспиральных РНК и разработанной полимерной матрицы с этиотропным противовирусным агентом; отработана процедура создания композиционных препаратов, и спрогнозировано наличие у них дополнительных биологических эффектов.

Установлено, что дсРНК в составе конструкций более устойчива к действию деградирующих факторов сыворотки крови. Это предполагает более длительную её циркуляцию в организме и соответственно — пролонгированный комплексный терапевтический эффект.

### Литература

1. Попова А. Ю. Об эпидемиологической ситуации по гриппу и ОРВИ и мероприятиях по обеспечению готовности субъектов Российской Федерации к предстоящему эпидсезону. <http://www.iaa-rf.ru/upload/iblock/eaf/eaf4ca4d113a2228a91ea87e7629ec63.pdf>
2. Лебедев Л. Р., Аликин Ю. С., Рослякова Е. Ю., Подгорный В. Ф., Дубинкина О. С., Азаев М. Ш. Выделение и очистка двуспиральной рибонуклеиновой кислоты из киллерного штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Биофарм. ж. 2014. Т. 6, № 6. С. 37–43.
3. Аликин Ю. С., Кашперова Т. А., Белявская В. А. и др. Перспективы применения пробиотиков и иммуномодуляторов для профилактики вирусных заболеваний птиц // Институт медицинской биотехнологии ФГУН ГНЦ «Вектор»: Сб. науч. тр. сотрудников. 2006. С. 192–236.
4. Торопцева А. М., Белгородская К. В., Бондаренко В. М. Лабораторный практикум по химии и технологии высокомолекулярных соединений // Л., 1972. С. 106.
5. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with Fo-lin phenol reagent // J. Biol. Chem., 193, 265–275 (1951).
6. <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-7-2-0018-15-opredelenie-nukleinovykh-kislot-pome-todu-spirina-v-immunobiologicheskikh-lekarstvennykh-preparatah/>
7. Аликин Ю. С., Телегина Ю. В., Лебедев Л. Р., Мотовилова Н. Г., Корнеев Д. В., Масычева В. И. Синтез и исследование свойств биочастиц, содержащих противовирусный индуктор интерферона дсРНК и аprotинин // Биофармацевтический ж. 2013. Т. 5, № 6. С. 3–9.
8. Aprotinin // <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/enzyme-reagents/aprotinin.html>
9. Шкиль Н. Н., Шкиль Н. А., Аликин Ю. С. Применение РНК-содержащих иммуностимуляторов для лечения микоплазмоза молодняка крупного рогатого скота. // Институт медицинской биотехнологии ФГУН ГНЦ «Вектор»: Сб. науч. тр. сотрудников. 2006. С. 237–249.
10. Аликин Ю. С., Подгорный В. Ф., Кашперова Т. А. Система лечебно-профилактических средств для поддержания ветеринарного благополучия // Проблемы инфекционной патологии в регионах Сибири, Дальнего Востока и Крайнего Севера: Тез. Докл. 3-й Рос. Науч. конф. с междунар. участием (Новосибирск, 27–29 сент. 2006 г.). Новосибирск: ЦЭРИС, 2006. С. 285–286.
11. C. E. Hoffman, E. M. Neumayer, R. F. Haff, R. A. Goldsby. Mode of Action of the Antiviral Activity of Amantadine in Tissue Culture // Journal of Bacteriology, 1965. Vol. 90, No. 3. P. 623–628.

## КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ ХВОЙНЫХ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*\*

CLONAL MICROPROPAGATION OF CONIFERS *IN VITRO* CULTURE

Т. В. Железниченко, М. С. Воронкова

ФБУН Центральный сибирский ботанический сад СО РАН

T. V. Zheleznichenko, M. S. Voronkova

Central Siberian Botanical Garden of the SB of RAS, Russia

E-mail: zhelez05@mail.ru

### Аннотация

Исследованы особенности регенерации лиственницы сибирской (*L. sibirica* Ledeb.) и ели сибирской (*P. obovata* Ledeb.) в культуре *in vitro* под действием тидиазурана. Выявлены основные факторы, влияющие на формирование адвентивных микропобегов.

### Abstract

The features of regeneration of of *Larix sibirica* Ledeb. and *Picea obovata* Ledeb. in tissue culture (*in vitro*) under the action of thidiazuron were studied. The main factors affecting the formation of adventive microshoots are revealed.

Лиственница сибирская (*Larix sibirica* Ledeb.) и ель сибирская (*Picea obovata* Ledeb.) являются основными лесообразующими хвойными породами Сибири, составляя основу лесосырьевой базы страны. В связи с масштабными пожарами в Сибири летом 2019 г. очевидна актуальность восстановления и сохранения этих растений в естественных экосистемах. В то же время известно, что семенное размножение хвойных имеет определенные сложности из-за низкой грунтовой всхожести семян (Теринов, 2015). Альтернативой традиционному способу размножения этих видов хвойных является применение современных биотехнологических подходов, используя методы культуры тканей растений.

© Т. В. Железниченко, М. С. Воронкова, 2019

\* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00434 мол\_а.

Цель исследования заключалась в изучении регенерации *L. sibirica* и *P. obovata* в культуре *in vitro* под действием тидиазурона (ТДЗ).

В качестве эксплантов использовали вегетативные почки, а также зрелые семена изучаемых видов хвойных. Образцы собирали в дендрарии ЦСБС СО РАН (Академгородок, г. Новосибирск) в 2018 году. Стерилизацию вегетативных почек проводили с использованием 0,1 %  $\text{HgCl}_2$ . Семена стерилизовали 15 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ . После стерилизации материал промывали стерильной водой трижды. Культивирование проводили на питательной среде  $\frac{1}{2}$  LV (Litvay, 1985), дополненной ТДЗ в концентрации 0,5 или 1  $\mu\text{M}$  при 23 °C и 16-часовом фотопериоде. Длительность пассажа составляла 28 суток. Затем растительный материал переносили на безгормональные питательные среды.

При культивировании почек лиственницы сибирской и ели сибирской на питательных средах с ТДЗ в течение первого пассажа наблюдалось разрастание тканей эксплантов. Морфогенный ответ был высоким и достигал 100 % у лиственницы и 80 % у ели. Однако дальнейшее культивирование на безгормональных питательных средах приводило к некрозу эксплантов.

Культивирование зрелых зиготических зародышей на средах с ТДЗ также привело к разрастанию тканей эксплантов исследуемых видов хвойных растений. При переносе растительного материала на безгормональные питательные среды через две недели инкубации на поверхности разросшихся тканей семядолей *L. sibirica* появлялись хвоинки, затем, через 4 недели культивирования формировались микропобеги (см. рисунок).



Конгломерат микропобегов *L. sibirica* после трех недель культивирования на безгормональной питательной среде  $\frac{1}{2}$  LV

При этом на средах с более низкой концентрацией (0,5  $\mu\text{M}$ ) ТДЗ органогенез наблюдали у 61 % эксплантов, а на средах с более высокой концентрацией (0,5  $\mu\text{M}$ ) ТДЗ этот показатель составлял уже 83 %. При культивировании *P. obovata* развитие микропобегов отмечали только после второго пассажа на безгормональных питательных средах (8 недель). При этом более низкая концентрация ТДЗ приводила к формированию более развитых микропобегов, а более высокая стимулировала развитие микропобегов с аномальной структурой.

Таким образом, существенную роль в клональном микроразмножении хвойных (*L. sibirica* и *P. obovata*) играл выбор экспланта. Успешная регенерация отмечена при введении в культуру зрелых зиготических зародышей. Реакция исследуемых видов растений на концентрацию ТДЗ в питательной среде являлась видоспецифичной. Органогенез лиственницы сибирской протекал более активно при высокой концентрации ТДЗ (1  $\mu\text{M}$ ), тогда как для ели сибирской предпочтительнее более низкие (0,5  $\mu\text{M}$ ) концентрации этого регулятора роста в питательной среде.

### Литература

1. Теринов Н. Н. Грунтовая всхожесть семян ели сибирской (*Picea obovata*) // Леса России и хозяйство в них. 2015. № 4. Т. 55. С. 40–44.
2. Litvay J. D., Verma D. C., Jonson M. A. Influence of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of wild carrot (*Daucus carota* L.) // Plant Cell Rep., 1985. Vol. 4. P. 325–328.

**МОДУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА HIF-2 $\alpha$   
В ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ CRISPR/CAS9**

MODULATION OF HIF-2 $\alpha$  EXPRESSION IN HUMAN PLURIPOTENT  
STEM CELLS BY CRISPR/CAS9 SYSTEM

М. К. Живень<sup>2,3,4</sup>, И. С. Захарова<sup>2,3,4</sup>, А. М. Смирнова<sup>1,2,4</sup>, К. Е. Орищенко<sup>2</sup>,  
А. И. Шевченко<sup>1,2,3,4</sup>, Е. А. Елисафенко<sup>2,3,4</sup>, С. М. Закиян<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup>Новосибирский национальный исследовательский государственный  
университет

<sup>2</sup>Федеральный исследовательский центр  
«Институт цитологии и генетики СО РАН»

<sup>3</sup>ФГБНУ «Институт химической биологии  
и фундаментальной медицины СО РАН»

<sup>4</sup>ФГБУ «Национальный Медицинский Исследовательский Центр им акад.  
Мешалкина» Министерства здравоохранения Российской Федерации»

M. K. Zhiven<sup>2,3,4</sup>, I. S. Zakharova<sup>2,3,4</sup>, A. M. Smirnova<sup>1,2,4</sup>, K. E. Orishchenko<sup>2</sup>,  
A. I. Shevchenko<sup>1,2,3,4</sup>, E. A. Elisaphenko<sup>2,3,4</sup>, S. M. Zakian<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup>Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup>The Federal research center

The Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia

<sup>3</sup>Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian  
Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

<sup>4</sup>Meshalkin National Medical Research Center,  
Ministry of Health of Russian Federation, Novosibirsk, Russia

**Аннотация**

В данной работе в качестве перспективного способа терапевтического ангиогенеза рассматривается активация и стабилизация HIF-2 $\alpha$  с помощью сайленсинга его ингибитора *INT6* в эмбриональных стволовых клетках человека (ЭСК) с использованием системы CRISPR/Cas9. Эндотелиальные производные ЭСК со сверхэкспрессией *HIF-2 $\alpha$*  обладают повышенным ангиогенным потенциалом в нормоксических



условиях. Полученные эндотелиальные производные генетически-модифицированных ЭСК найдут широкое применение в качестве модели для изучения механизмов HIF-сигнального пути, а также станут неограниченным источником эндотелиоцитов с регенеративным потенциалом для терапевтического применения в сердечно-сосудистой медицине.

### Abstract

In this study, the activation and stabilization of HIF-2 $\alpha$  is considered as a promising therapeutic method of angiogenesis by silencing *INT6* inhibitor under normal conditions in human embryonic stem cell (ESCs) by CRISPR/Cas9 system. Endothelial derivatives with overexpression of HIF-2 $\alpha$  have angiogenic potential under normal conditions. The produced endothelial derivatives of genetically modified ESCs will find wide application as a model for studying the mechanisms of the HIF signaling pathway, and will also become an unlimited source of endothelium cells with regenerative potential for therapeutic use in cardiovascular medicine.

При длительном воздействии пониженного уровня кислорода (5 % O<sub>2</sub>) клеточная адаптация осуществляется посредством активации транскрипционных факторов, которые обозначили как факторы, индуцируемые гипоксией (HIFs). HIF-2 $\alpha$  участвует в регуляции ангиогенеза за счет активации ряда ангиогенных факторов в физиологических и патологических процессах, связанных с развитием онкологических и сердечно-сосудистых заболеваний. Исследование молекулярных механизмов действия HIFs позволит разработать эффективные методы лечения подобных заболеваний.

В данной работе получены генетически-модифицированные линии ЭСК человека со стабильной экспрессией *HIF-2 $\alpha$*  в нормоксических условиях посредством нокаута его ингибитора *INT6* с помощью системы геномного редактирования CRISPR/Cas9. Делеция гена *INT6* включает промоторную область и участок первого экзона с захватом точки начала транскрипции. Генетические конструкции доставили в клетки с помощью нуклеофекции. Методом проточной цитометрии осуществлен сортинг GFP-позитивных клеток, содержащих плазмидные конструкции с целевыми встройками, проведены раунды субклонирования. В результате были получены генетически-модифицированные ЭСК человека с делецией размером в 220 п.н., включающей требуемых участок *INT6*.

По результатам цифровой ПЦР в каплях, уровень экспрессии *INT6* достоверно снижен в генетически-модифицированных субклонах. При этом уровень экспрессии *HIF-2 $\alpha$*  достоверно повышен по сравнению с контрольной линией ЭСК. Полученные субклоны обладают всеми морфологическими и функциональными свойствами плюрипотентных стволовых клеток. Кроме того, стабилизация HIF-2 $\alpha$  за счет нокаута *INT6* способствует

---

эффективности мезодермальной и эндотелиальной дифференцировки ЭСК человека: наблюдается повышение процентного содержания VEGFR2/CD31 позитивных эндотелиальных клеток, а также повышение экспрессии генов-мишеней HIF-2 $\alpha$ , что способствует усилению процессов ангиогенеза на матрикеле в тестах *in vitro*.

Полученные результаты данного исследования позволят определить взаимосвязь модуляции уровня HIFs и экспрессии ангиогенных факторов в эндотелиальных производных ЭСК, что необходимо для детального понимания аспектов функционирования HIF-сигнального пути и выбора эффективной стратегии терапевтического ангиогенеза.

## ПОДБОР ЗАКВАСОЧНЫХ КУЛЬТУР ДЛЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО КИСЛОМОЛОЧНОГО ПРОДУКТА

### SELECTION OF STARTER CULTURES FOR A FUNCTIONAL DAIRY PRODUCT

М. А. Захаренко, Е. В. Назимова

*ФГБОУ ВО Кемеровский государственный университет*

M. A. Zakharenko, E. V. Nazimova

*Kemerovo State University, Russia*

E-mail: mariya\_zakharenko@mail.ru

#### **Аннотация**

Используемые в производстве кисломолочных продуктов молочнокислые и пробиотические микроорганизмы определяют органолептические показатели готового продукта, а также его биологическую ценность. В связи с этим проведены исследования по подбору видового состава заквасок для производства функционального кисломолочного продукта. По результатам проведенных исследования подобрана закваска, содержащая в своем составе *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* в соотношении 3:1:1.

#### **Abstract**

The lactic and probiotic microorganisms used in the production of fermented milk products determine the organoleptic characteristics of the finished product, as well as its biological value. In this regard, studies were conducted on the selection of the species composition of starter cultures for the production of a functional fermented milk product. Based on the results of the study, a sourdough containing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* in a ratio of 3:1:1.

Производство кисломолочных продуктов основано на биотехнологических процессах. Используемая закваска определяет определенные органолептические, биологические свойства, характерные для каждого вида кисломолочных продуктов. Молочнокислые бактерии являются основным компонентом заквасок в производстве ферментированных молочных про-

дуктов. Их основной функцией является трансформация основных компонентов молока (белка, лактозы и др.), способствуя, таким образом получению определенным органолептических показателей в готовом продукте. Кроме того, образующиеся в результате их жизнедеятельности молочная кислота и антибактериальные вещества, оказывают губительное воздействие на патогенную микрофлору, которая может попадать в готовый продукт. Помимо молочнокислой микрофлоры в производстве некоторых кисломолочных продуктов могут использоваться бактерии — пробиотики. Такие микроорганизмы вводят в состав заквасок с целью повышения биологической ценности готового продукта.

Сочетание в составе заквасок различных видов микроорганизмов позволяет повысить их устойчивость к неблагоприятным факторам среды, а также повысить активность комбинированной закваски.

В связи с вышесказанным, проведены исследования по определению видового состава различных заквасок для производства функционального кисломолочного продукта. Выходными параметрами эксперимента являлись количество клеток микроорганизмов, нарастание кислотности и органолептические показатели получаемых сгустков.

В эксперименте использовали два образца закваски. Первый образец содержал следующие виды микроорганизмов: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*. Второй образец закваски содержал: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacterium casei* subsp. *casei*, *Bifidobacterium bifidum*. Указанные образцы заквасок исследовали при различных соотношениях микроорганизмов. Результаты эксперимента приведены в таблице.

### **Влияние соотношения и вида микроорганизмов в закваске на увеличение биомассы микроорганизмов и процесс ферментации**

Исследуемые параметры 1:1:1		Образец закваски 1			Образец закваски 2		
		2:1:1	3:1:1	1:1:1	2:1:1	3:1:1	
Количество клеток микро- организмов, КОЕ/г	общее	$3 \cdot 10^9$	$5 \cdot 10^9$	$9 \cdot 10^9$	$1 \cdot 10^8$	$7 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^9$
	бифидо- бактерии	$5 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^8$	$7 \cdot 10^7$	$7 \cdot 10^8$	$9 \cdot 10^8$
Титруемая кислотность, °Т		65±2	71±2	76±2	60±2	64±2	69±2

Анализируя данные таблицы, можно сказать, что в обоих образцах закваски при соотношении микроорганизмов 3:1:1, отмечалось активное на-

растание кислотности. Что касается прироста биомассы микроорганизмов, то в первом образце закваски количество клеток микроорганизмов было выше, чем во втором.

Органолептические показатели образующихся сгустков имеют существенное значение при производстве кисломолочных продуктов, поэтому была проведена оценка исследуемых образцов сгустков при использовании двух образцов закваски с разным соотношением микроорганизмов. Наиболее высокую органолептическую оценку получил образец сгустка с использованием первого образца закваски в соотношении 3:1:1. Он имел однородную консистенцию и ярко выраженный, чистый кисломолочный вкус и запах.

В результате проведенных исследований нами выбран первый образец закваски с соотношением микроорганизмов 3:1:1. Данная закваска будет использована для дальнейшей разработки технологии функционального кисломолочного продукта.

**МИКРОРЕАКТОРНЫЙ СИНТЕЗ СОЛИ РАЗВЕТВЛЕННОГО  
ОЛИГОГЕКСАМЕТИЛЕНГУАНИДИНА И РАЗРАБОТКА  
ОФТАЛЬМОЛОГИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА НА ЕЕ ОСНОВЕ**

MICRO-REACTOR SYNTHESIS OF BRANCHED  
OLIGOHexamethylene Guanidine Salt and Development  
of Ophthalmological Drug on Its Basis

И. С. Иванов, А. М. Норин, Д. О. Шаталов, С. А. Кедик

*ФГБОУВО «МИРЭА — Российский технологический университет»*

I. S. Ivanov, A. M. Noreen, D. O. Shatalov, S. A. Kedik

*MIREA — Russian technological university, Russia*

E-mail: ivan.ivanov1994@gmail.com

**Аннотация**

ОГМГ гидросукцинат является перспективной субстанцией в борьбе с патогенными микроорганизмами, вызывающими конъюнктивит. Для его синтеза используется ОГМГ-ГХ, синтезируемый, как правило, в объёме и не соответствующий на выходе критериям качества, предъявляемым к фармацевтическим субстанциям. Вследствие этого в настоящее время проводится экспериментальная работа по разработке методов, повышающих качество синтезируемого соединения. Одним из решений стало использование микрофлюидных технологий. Предполагается, что такая стратегия сделает продукт качественней и снизит экономические затраты при его производстве. Несмотря на то, что уже были получены образцы, удовлетворяющие поставленным критериям, ведется дальнейшая работа по снижению времени синтеза. Итогом работы стала разработка инновационного лекарственного препарата против конъюнктивитов бактериальной природы.

**Abstract**

OHMG succ is a promising substance in the fight against pathogenic microorganisms that cause conjunctivitis. OHMG-HC is used for its synthesis, which is synthesized, as a rule, in volume and does not meet the quality criteria for pharmaceutical substances at the output. As a result of this, experimental work is currently underway to develop methods that improve the quality of the synthesized compound. One solution was the use of microfluidic technologies. It is assumed that such a strategy will make the product better

and reduce the economic costs of its production. Despite the fact that samples have already been obtained that satisfy the set criteria, further work is ongoing to reduce the synthesis time. The result of the work was the development of an innovative drug against conjunctivitis of a bacterial nature.

По данным Всемирной Организации Здравоохранения в мире около 1,3 млрд человек живут с той или иной формой нарушения зрения, 80 % из которых считаются предотвратимыми. Наиболее широко распространены воспалительные заболевания глаз бактериальной природы. По данным Росстат [1], заболеваемость глаза и его придаточного аппарата в 2017 г. составила 31,6 зарегистрированных больных на 1000 человек населения, что говорит о довольно высоком значении, где второе место занимают конъюнктивиты бактериальной и вирусной этимологии.

Поиск новых антибактериальных средств всегда остается актуальным т.к. данная процедура позволяет исключить возможность появления резистентных штаммов микроорганизмов. Среди множества соединений перспективным является гидросукцинат олигогексаметиленгуанидина (ОГМГсукц). Низкая токсичность и широкий спектр действия делают целесообразным создание на его основе лекарственного препарата, активного в отношении таких возбудителей конъюнктивитов как *S. aureus*, *E. coli* и *P. aeruginosa* [2].

Известен основной способ получения ОГМГсукц из гидрохлорида олигогексаметиленгуанидина (ОГМГ-ГХ), синтезируемого, как правило, в объеме, но качество, полученного таким образом ОГМГ-ГХ, ограничивает его применение в фармацевтике. Другими недостатками общепринятой технологии получения ОГМГ-ГХ являются неравномерность распределения вводимой энергии по объему реактора и широкий разброс времени пребывания, что в конечном итоге приводит к повышению экономических затрат. Для решения данной проблемы синтез ОГМГ-ГХ проводили в микрореакторе с помощью микрофлюидных технологий, использование которых привносит ряд преимуществ перед конвенциональными методами синтеза (безопасность процесса, энергоэффективность вследствие высокого коэффициента поверхности микроканала к объему реакционной жидкости [3], модульность конструкции, что позволяет интегрировать несколько резервуаров, насосов и разветвленных микрофлюидных каналов, а также возможность ускоренного масштабирования и воспроизводимость технологического процесса, компактность и высокая селективность). Вместе с этим предполагается увеличить и степень чистоты получаемого соединения.

В результате проведенной экспериментальной работы были получены образцы, удовлетворяющие молекулярно-массовым характеристикам, с надлежащей степенью разветвления и приемлемым содержанием примесей,

что подтверждалось анализами ЯМР-спектроскопии и ВЭЖХ. В настоящее время производится подбор условий для сокращения времени микрофлюидного синтеза и температуры, при которой происходит поликонденсация.

Вторым этапом работы являлась разработка офтальмологического препарата на основе ОГМГсукц для лечения конъюнктивитов бактериальной этимологии. Исходя из проведённых испытаний, выявлен оптимальный состав готовой лекарственной формы глазные капли, успешно прошедший впоследствии испытания стабильности согласно требованиям Государственной Фармакопеи.

В настоящее время в рамках Государственного гранта № 14.N08.11.0190 от 22 ноября 2017 г. [2] проведены исследования субстанции ОГМГсукц и лекарственного препарата на его основе на предмет механизма действия в отношении микробных дегидрогеназ, действия на биопленку и клеточную стенку *E. coli*, а также влияние на морфологию микроорганизмов, вызывающих конъюнктивит. Также определены минимальная ингибирующая концентрация, минимальная бактерицидная концентрации, изучена специфическая фармакологическая активность на модели конъюнктивита у кроликов породы Шиншилла.

По результатам представленной работы можно заключить о том, что была разработана схема инновационного микрофлюидного синтеза получения ОГМГ-ГХ — исходного для получения ОГМГсукц соединения, являющегося, в свою очередь, субстанцией для создания лекарственного препарата, активного против патогенной микрофлоры, вызывающей конъюнктивит. На данный момент ведется детальное изучение субстанции ОГМГсукц и лекарственного препарата на его основе.

## Литература

1. Заболеваемость населения по основным классам болезней: Федеральная служба государственной статистики [Электронный ресурс]. URL: [http://www.gks.ru/wps/wcm/connect/rosstat\\_main/rosstat/ru/statistics/population/healthcare/#](http://www.gks.ru/wps/wcm/connect/rosstat_main/rosstat/ru/statistics/population/healthcare/#) (дата обращения 11.09.2019)
2. Государственный контракт от «22» ноября 2017 г. № 14.N08.11.0190.
3. Занавескин М. Л., Миронова А. А., Попов А. М. Микрофлюидика и ее перспективы в медицине // Молекулярная медицина № 5, 2012.



## ПОВЫШЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ КЛЕТОК БИФИДОБАКТЕРИЙ В БИОСУСПЕНЗИИ ПОСЛЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

### INCREASING OF THE CONCENTRATION OF BIFIDOBACTERIA CELLS IN BIOSUSPENSION AFTER GRAWING

В. В. Каминский, В. Ю. Давыдкин, И. Ю. Давыдкин,  
А. В. Мелихова, В. М. Лахтин

*ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии  
им. Г. Н. Габричевского*

V. V. Kaminskiy, V. Yu. Davydkin, I. Yu. Davydkin,  
A. V. Melikhova, V. M. Lakhtin

*G. N. Gabrichevsky research institute  
for epidemiology and microbiology, Russia*

E-mail: kaminskyvalery86@gmail.com

#### **Аннотация**

Известно, что в процессе культивирования бифидобактерий при достижении ими определенной концентрации в культуральной жидкости основным фактором, препятствующим делению клеток, является образование конгломератов микроорганизмов. Для разрушения межклеточного матрикса и увеличения вследствие этого выхода свободных колониеобразующих клеток нами предложен способ диспергирования культуральной жидкости бифидобактерий ферромагнитными элементами электромагнитного диспергатора. Показано, что эффективность предложенного способа зависит не только от режимных параметров диспергирования, но и от видовой принадлежности бифидобактерий и среды культивирования. В целом разработанный способ позволяет увеличить количество колониеобразующих клеток бифидобактерий в суспензии в 20 раз по сравнению с таковой после культивирования без диспергирования.

#### **Abstract**

It is known that the formation of conglomerations of microorganisms is the main factor which prevents the cell fission in the process of culturing bifidobacteria when they produce certain concentration in the culture fluid. In order to destroy intercellular matrix and to in-

crease consequently the outflow of free cell producing colonies, we developed the process for dispersing the fluid of bifidobacteria using ferromagnetic elements of electromagnetic milling device. It was demonstrated that the efficiency of the developed process depends not only on operating conditions of dispersion, but also on species of bifidobacteria and culture medium. In general the developed process allows to increase 20 times the quantity of the bifidobacteria cells producing colonies in treated suspension as compared with the untreated one after culturing.

Известно, что некоторые штаммы бифидобактерий в поздней экспоненциальной и стационарной фазах роста обладают способностью к почкованию и дихотомическому 2-4-6-8-латеральному ветвлению. Происходит мультисептация ветвящихся филаментов, блокирование отделения образовавшихся клеток, в результате чего формируются конгломераты, могущие включать десятки микробных тел. Мицелиальные конгломераты образуются при помощи межклеточных связей преимущественно за счет слияния клеточных стенок, посредством капсулярных структур, в том числе синтезируемого клеткой органического макромолекулярного матрикса. Образование клеточных ассоциаций в культуральной жидкости сопровождается истощением питательных веществ, накоплением метаболитических «ядов», увеличением активной кислотности и т. д. Нами для разрушения межклеточного матрикса и увеличения вследствие этого выхода свободных колониеобразующих клеток предложен способ, основанный на механическом разрушении конгломератов бифидобактерий при обработке культуральной жидкости в рабочей камере электромагнитного диспергатора (ЭМД).

Накопление клеток различных штаммов бифидобактерий из коллекции микроорганизмов МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского осуществляли в казеиново-дрожжевой (КД-5) и тиогликолевой (ТГ) средах. В исследованиях использовали культуры третьей генерации (3-х кратное последовательное пассирование на соответствующей питательной среде). Заданный объем культуральной жидкости (КЖ) загружали в рабочую камеру диспергатора и подвергали в течение требуемого времени воздействию ферромагнитных тел, движущихся под действием вращающегося электромагнитного поля, создаваемого индукторами аппарата. После обработки биосуспенсию извлекали из рабочей камеры и анализировали. Биологическую концентрацию бифидобактерий в биосуспensionях определяли методом предельных разведений в жидких питательных средах.

Оптимизацию процесса диспергирования бактериальных конгломератов в КЖ осуществляли с использованием штамма *B. adolescentis* МС-42 в тиогликолевой среде. Результаты определения содержания бифидобактерий в биосуспensionях, обработанных в течение 3 мин ферромагнитными телами

различных размеров, а также результаты краткосрочного хранения обработанных суспензий представлены в табл. 1.

Таблица 1

**Влияние диаметра ферромагнитных тел на концентрацию бифидобактерий и их сохраняемость в обработанных в ЭМД суспензиях**

Диаметр ферромагнитных тел, мм	Количество клеток в КЖ, КОЕ/мл	Количество клеток <i>B. adolescentis</i> МС-42 (КОЕ/мл) в хранившихся при 6 °С КЖ, сутки		
		4	6	8
0	$3 \times 10^7$	$1 \times 10^7$	$7 \times 10^6$	$2 \times 10^6$
0,15	$2 \times 10^8$	$1 \times 10^8$	$1 \times 10^8$	$9 \times 10^7$
0,25	$2 \times 10^8$	$1 \times 10^8$	$9 \times 10^7$	$6 \times 10^7$
0,50	$1 \times 10^8$	$7 \times 10^7$	$6 \times 10^7$	$1 \times 10^7$
0,75	$3 \times 10^7$	$1 \times 10^7$	$7 \times 10^6$	$2 \times 10^6$

Как видно из данных табл. 1, ферромагнитные тела диаметром 0,15 и 0,25 мм обладают практически одинаковой диспергирующей способностью, что выражается в идентичной и максимальной достигнутой в эксперименте концентрации клеток бифидобактерий, почти на порядок превышающей таковую в необработанной КЖ после культивирования ( $3 \times 10^7$  КОЕ/мл). В обработанных этими ферромагнитными телами суспензиях наблюдается также наибольшая сохраняемость клеток после выдержки КЖ в течение 8 суток при низкой положительной температуре. С использованием аналогичного методического приема были оптимизированы и такие технологические параметры процесса диспергирования, как масса ферромагнитных тел и объем биосуспензии, перерабатываемой в рабочей камере диспергатора.

Влияние длительности обработки в ЭМД на выход свободных клеток из конгломератов в различных питательных средах представлено в табл. 2, а для различных штаммов — в табл. 3.

Таблица 2

**Динамика изменения концентрации клеток штамма *B. adolescentis* МС-42 в казеиново-дрожжевой и тиогликолевой питательных средах**

Вид среды	Концентрация (КОЕ/мл) <i>B. adolescentis</i> МС-42 в КЖ в зависимости от продолжительности обработки в ЭМД, мин					
	0	1	2	3	4	5
КД-5	$1 \times 10^8$	$3 \times 10^8$	$4 \times 10^8$	$5 \times 10^8$	$5 \times 10^8$	$3 \times 10^8$
ТГ	$4 \times 10^8$	$7 \times 10^8$	$6 \times 10^8$	$2 \times 10^9$	$1 \times 10^9$	$1 \times 10^9$

Таблица 3

**Влияние штаммовой принадлежности бифидобактерий на выход свободных клеток в тиогликолевой питательной среде**

Штамм	Концентрация (КОЕ/мл) бифидобактерий в КЖ в зависимости от продолжительности обработки в ЭМД, мин					
	0	1	2	3	4	5
<i>B. longum</i> В379М	$2,4 \times 10^7$	$3,0 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	$1,0 \times 10^7$
<i>B. adolescentis</i> МС-42	$4,0 \times 10^8$	$7,0 \times 10^8$	$6,0 \times 10^8$	$2,0 \times 10^9$	$1,1 \times 10^9$	$1,0 \times 10^9$
<i>B. bifidum</i> 791	$1,3 \times 10^7$	$7,0 \times 10^7$	$2,1 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$	$2,6 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$

Как следует из данных табл. 2, максимальное увеличение концентрации клеток *B. adolescentis* МС-42 на обеих использованных средах в этой серии экспериментов составило 5 раз. Следующей серией экспериментов (табл. 3) показано, что вид культивируемого штамма бифидобактерий, по-видимому вследствие образования различных по своим свойствам клеточных конгломератов, существенно влияет на выход свободных клеток. Так, количество клеток *B. longum* практически не увеличивается, а содержание бифидобактерий *B. Bifidum* 791 возрастает после 3 мин обработки КЖ в 20 раз по сравнению с исходным ( $1,3 \times 10^7$  КОЕ/мл).

В целом результаты проведенных исследований показывают, что обработка в электромагнитном диспергаторе суспензий бифидобактерий после культивирования обеспечивает два преимущества. Первое — за счет лучшей выживаемости клеток бифидобактерий в процессе краткосрочного хранения при низкой положительной температуре повышается гибкость всей технологии приготовления сухих препаратов за счет исключения необходимости немедленного сублимационного высушивания выращенных микроорганизмов. Второе — вследствие существенного увеличения (до 20 раз) содержания в культуральной жидкости жизнеспособных клеток повышается экономическая эффективность производства бифидосодержащих пробиотических и пребиотических сухих препаратов, т.к. пропорционально увеличивается количество доз препарата, которое может быть получено из единицы массы (г, кг) высушенной биомассы используемого штамма бифидобактерий.

## МИКРОСОРБЦИОННЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ НЕИНВАЗИВНОЙ ДИАГНОСТИКИ САХАРНОГО ДИАБЕТА

### MICROSORPTION SYSTEMS TO INCREASE THE EFFECTIVENESS OF NON-INVASIVE DIAGNOSIS OF DIABETES MELLITUS

Д. Д. Карапетян, А. Э. Игитханян

*Самарский национальный исследовательский университет  
им. акад. С. П. Королева*

D. D. Karapetyan, A. E. Igitkhanyan

*Samara National Research University, Russia*

E-mail: dianik2@mail.ru

#### **Аннотация**

В ходе исследования изучена возможность повышения точности количественного определения ацетона в выдыхаемом воздухе с использованием микросорбционных систем. Экспериментально исследована возможность получения градуировочных газовых смесей ацетона в диапазоне концентраций 0,5–30 мг/м<sup>3</sup>.

#### **Abstract**

During the study, the possibility of increasing the accuracy of the quantitative determination of acetone in exhaled air using micro-sorption systems was studied. The possibility of obtaining calibration gas mixtures of acetone in a concentration range of 0,5–30 mg/m<sup>3</sup> was experimentally investigated.

В соответствии с официальной статистикой Всемирной Организации здравоохранения численность лиц, страдающих сахарным диабетом, увеличилась до 422 миллионов человек. Несмотря на совершенствование методов лабораторно-инструментальной диагностики сахарного диабета, актуальным и клинически значимым остается разработка методов ранней и в то же время доступной и неинвазивной диагностики. К таким методам можно отнести измерение концентрации ацетона в выдыхаемом воздухе, который коррелирует с уровнем глюкозы в крови.

Развитие и применение анализа выдыхаемого воздуха сдерживается отсутствием оптимизированного метода измерения биомаркеров. Лимитирующим фактором, определяющим точность и скорость количественного определения эндогенных биомаркеров в выдыхаемом воздухе, является эффективная градуировка газоаналитического оборудования, которая бы учитывала специфику анализа микроконцентраций в сложной матрице и исключала возможность внесения дополнительных артефактов из окружающей среды.

Цель данной работы — изучение возможности применения микросорбционных систем для повышения точности количественного определения ацетона в пробах выдыхаемого воздуха.

В рамках данного исследования градуировка газоаналитического оборудования проводилась методом абсолютной градуировки, с использованием жидких, парогазовых и газовых смесей, полученных статическим объемным и хромато-десорбционным способами.

Для реализации хромато-десорбционного метода получения градуировочных смесей были использованы микросорбционные системы, представляющие собой медицинские иглы (длина 40 мм, внутренний диаметр 0,6 мм), заполненные сорбентом с известным количеством ацетона.

В данной работе были исследованы экспериментальные образцы микросорбционных систем со следующими сорбентами: инертный носитель Chromaton N-AW-DMCS, модифицированный  $\text{CoCl}_2$ , инертный носитель Chromaton N-AW-DMCS, модифицированный  $\text{CaCl}_2$ , стекловолокно с нанесенным на него ПЭГ-20М, стекловолокно с нанесенным на него PMS-1000 и модифицированное УНТ.

Экспериментально изученные микросорбционные системы позволяют генерировать газовые смеси ацетона с постепенным снижением концентрации. В зависимости от применяемой конфигурации стабильная концентрация поддерживается на протяжении 3–13 дискретных вводов. Основным фактором, влияющим на концентрацию получаемой газовой смеси, является температура десорбции ацетона из системы. В случае низких температур ацетон десорбируется равномерно, образуя при этом более продолжительные площадки стабильной концентрации.

Оптимальными характеристиками обладают микросорбционные системы, заполненные инертным носителем Chromaton N-AW-DMCS с нанесенной в его поры солью  $\text{CoCl}_2$ , и стекловолокно с нанесенным на него PMS-1000 и модифицированное УНТ. Данные конфигурации показывают самые высокие параметры стабильности рабочих площадок, для которых среднеквадратичное отклонение концентраций полученных газовых смесей не превышает 2,1 %, а концентрация на выходе из системы находится в ди-

апазоне от 1,8 до 31,4 мг/м<sup>3</sup>. Микросорбционные системы применимы для получения градуировочных газовых смесей, не содержащих микропримеси мешающих компонентов, в широком диапазоне концентраций, нижняя граница которого ограничена лишь порогом чувствительности детектора.

В результате оценки точности градуировки с применением градуировочных смесей, полученных различными способами, установлено, что применение градуировочных газовых смесей, полученных с помощью микросорбционных систем, позволяет снизить общую погрешность анализа за счет повышения точности описания линейной зависимости. Также следует отметить, что микросорбционные системы обладают рядом преимуществ, главными из которых являются простота аппаратного оформления, универсальность, экономичность, надежность, экспрессность и возможность автоматизации анализа, соответствие принципам «зеленой химии».

## МОРАЛЬНОЕ ПРИНЯТИЕ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ И АБОРТА

### MORAL ACCEPTANCE OF ARTIFICIAL INSEMINATION AND ABORTION

А. В. Коршунов

*Профессиональное училище Этеля-Кюменлааксо (г. Котка, Финляндия)*

A. V. Korshunov

*EKAMI, Kotka, Finland*

E-mail: pon4ickoff@yandex.ru

#### **Аннотация**

Человечество обязано знать принципы медицины и как она работает. Важно согласовать моральные устои и научный прогресс. Шагом для этого будет принятие обществом искусственного оплодотворения и абортов.

#### **Abstract**

Mankind is obliged to know the principles of medicine and how it works. It is important to reconcile moral principles and scientific progress. A step for this will be the adoption of artificial insemination and abortion by the society.

Главное для людей, которые работают в научной, медицинской и других сферах предоставления услуг людям — это объяснить почему и как, а уже после выполнять поставленную задачу. Людям не всегда понятно как устроен организм человека, поэтому простые манипуляции и операции вызывают страх и недоумение. Ответы разъясняют как это работает, после приходит понимание дела, следственно страх который пугал, пропадет. Как писал Говард Филлипс Лавкрафт «Страх — самое древнее и сильное из человеческих чувств, а самый древний и самый сильный страх — страх неведомого.».

Найдя проблему, её необходимо решить. После поднятия уровня медицинской образованности у людей и введения уроков сексологии в школах, это повлечёт за собой уменьшение нежелательных зачатий у подростков, уменьшение заражения подростков инфекциями, передающимися половым



путём и улучшение знаний граждан о здоровье. Чем больше людей будут понимать принципы работы человеческого организма, тем меньше будут возникать конфликты между медициной и моральными устоями. Для принятия обществом новых методов нужно время, а для ускорения принятия нужно помочь разобраться. Представление каждого человека о том, кто такой «человек» разное, тем самым моральные устои навязывают и внедряют, но моральные ценности отличаются у каждого человека. Решить нравственные и моральные вопросы помогают законы страны. Для большинства законы и социальные нормы приемлемы, тем самым государство оберегает людей от конфликтов и регулирует возможные разногласия между людьми. Со временем законы должны меняться, в мире появляются новые возможности, технологии и вместе с ними моральные ценности. Церковь заставила отречься Галилея от гелиоцентрической теории в 1633 году, церковь так же выступает против аборт. К счастью, церковь не выступает против искусственного оплодотворения и разрешает завести детей тем, кто не мог этого сделать.

На данный момент 70 % опрошенных россиян выступают против запретов аборт, а за запреты выступили 21 % опрошенных — сообщает Всероссийский центр изучения общественного мнения. Ситуация достаточно благоприятная для развития и укоренения аборт в России. Аборт — это выбор каждого человека и наша главная цель предоставить этот выбор. Выбор — свобода, которая должна предоставляться каждому.

Люди, получающие достаточно знаний для осознания происходящего, не имеют таких сложных и моральных выборов. Дело человечества — это созидание. Главное освободиться от старых заветов и устаревшей информации, во имя человечества и нашего развития.

## СОЗДАНИЕ ЭФФЕКТИВНОЙ СИСТЕМЫ ЭКСПРЕССИИ НА ОСНОВЕ ПРОМОТОРА *B. SUBTILIS*\*

CREATION OF AN EFFECTIVE EXPRESSION SYSTEM  
UNDER THE CONTROL OF THE PROMOTER OF *B. SUBTILIS*

А. О. Корягина, Ф. Р. Османова, Д. Л. Иткина,  
А. А. Тойменцева, М. Р. Шарипова

*ФГАОУ ВПО Казанский (Приволжский) федеральный университет*

A. O. Koryagina, F. R. Osmanova, D. L. Itkina,  
A. A. Toymntseva, M. R. Sharipova

*Kazan (Volga region) federal university, Russia*

E-mail: tihonovaa093@gmail.com

### Аннотация

Грамположительная бактерия *Bacillus subtilis* является прекрасной платформой для производства секретируемых белков. Одной из основных стратегий экспрессии гетерологичных белков является создание систем экспрессии с сильными промоторами. В настоящей работе был использован конститутивный промотор *degQ* для получения сериновых протеиназ *Bacillus pumilus*.

### Abstract

The gram-positive bacterium *Bacillus subtilis* is an excellent platform for the production of secreted proteins. One of the main strategies for the expression of heterologous proteins is the creation of expression systems with strong promoters. In this work, we used the constitutive *degQ* promoter to obtain *Bacillus pumilus* serine proteinases.

Создание новой системы экспрессии, способной эффективно синтезировать соответствующие белки, обеспечивая их максимальный выход

---

© А. О. Корягина, Ф. Р. Османова, Д. Л. Иткина, А. А. Тойменцева, М. Р. Шарипова, 2019

\*Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров и поддержана грантом РФФИ № 19-08-00853\_А. Работа поддержана грантом Академии Наук Республики Татарстан № 10-49-Ч г 2019.

и функциональную полноценность, является важной задачей биотехнологии. Клетки грамположительных бактерий, в частности бацилл, широко используются в микробиологической промышленности в качестве продуцентов для получения различных белков, так как они имеют хорошо изученный геном, секретируют белки непосредственно в среду культивирования, имеют статус GRAS (generally recognized as safe), то есть бактерии являются непатогенными и могут быть использованы в пищевой промышленности. Для получения максимального выхода целевого белка штамм-продуцент должен обладать высокой скоростью роста при культивировании, высокой продуктивностью, то есть обеспечивать большой выход фермента за малый промежуток времени, способностью расти на рентабельных питательных средах. Количество целевого белка зависит от выбора экспрессионной системы и штамма-продуцента. Целью настоящей работы являлся анализ экспрессии сериновых протеиназ *Bacillus pumilus* (AY754946.2, Y15136.1, EU678894.2) под контролем конститутивного промотора *degQ* *B. subtilis*. Гены ферментов клонировали на мультикопийной плазмиде pGP382. Вектор pGP382 содержит модифицированный конститутивный промотор гена *degQ*. Этот ген кодирует DegQ полипептид (46 а.о.), который способствует фосфорилированию двухкомпонентной системы DegS-DegU. Фосфорилированная форма DegU белка (DegU-P) стимулирует в клетках экспрессию генов протеолитических ферментов. Замена единственного нуклеотида в регионе «-10» позволила получить конститутивную активность промотора *PdegQ36*. За 3'-концом промотора *PdegQ36* на векторе pGP382 расположен полилинкер из 11 сайтов рестрикции, за которым следует Strep-tag пептидная последовательность (Грp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys), позволяющая проводить эффективную очистку путем аффинной хроматографии. Полученные рекомбинантные конструкции трансформировали в штамм *B. subtilis* BG2036. Показано, что максимальная активность ферментов приходится на 14–20 час роста, с максимумом 1,2 усл.ед. С целью повышения продукции гетерологичных белков, рекомбинантные конструкции (вектор + ген) будут трансформированы в штаммы *B. subtilis* с минимальным геномом. Мы предполагаем, что разработанные рекомбинантные конструкции в сочетании с эффективными штаммами могут быть рекомендованы в качестве технологической основы для получения рекомбинантных белков.

## ПОЛУЧЕНИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА Е ВИРУСА ЖЕЛТОЙ ЛИХОРАДКИ

### THE PRODUCTION AND DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE OF RECOMBINANT E PROTEIN OF YELLOW FEVER VIRUS

Е. И. Кривошеина<sup>1,2</sup>, М. Ю. Карташов<sup>1,2</sup>, Т. П. Микрюкова<sup>1</sup>,  
С. А. Пьянков<sup>1</sup>, Е. В. Протопопова<sup>1</sup>, В. А. Терновой<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет

E. I. Krivosheina<sup>1,2</sup>, M. Yu. Kartashov<sup>1,2</sup>, T. P. Mikryukova<sup>1</sup>,  
S. A. Ryankov<sup>1</sup>, E. V. Protopopova<sup>1</sup>, V. A. Ternovoi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> SRC VB «Vector» Rospotrebnadzor

<sup>2</sup> Novosibirsk State University

#### Аннотация

Для серодиагностики флавивирусных инфекций высокой диагностической значимостью обладает ИФА, направленный на выявление вирусоспецифических IgM и IgG в сыворотке крови больных. В данной работе был получен бактериальный штамм — продуцент рекомбинантного белка Е, содержащего антигенные детерминанты ВЖЛ, и выделен рекомбинантный антиген. Также была подтверждена его специфичность иммунологическими методами.

#### Abstract

ELISA has a high diagnostic value, which is aimed at identifying virus-specific IgM and IgG to flaviviruses in the blood serum of patients. In this work, we obtained a bacterial strain producing a recombinant protein E containing antigenic determinants of YFV, and recombinant antigen was isolated. The specificity of the recombinant protein was confirmed by immunological methods.

#### Введение

Вирус желтой лихорадки (ВЖЛ) — оболочечный вирус размером 30–35 нм, являющийся представителем рода *Flavivirus* (семейство

*Flaviviridae*) и относящийся ко II группе патогенности. Геном ВЖЛ представлен одноцепочечной (+) РНК размером примерно 11 kb.

На территории России циркуляция ВЖЛ не отмечена. Однако в последние годы все больше и больше возрастает туристический поток населения в районы, эндемичные по желтой лихорадке, вследствие чего возрастает риск завоза этой инфекции на территорию РФ. Этот факт свидетельствует о необходимости разработки надежных и экономически доступных диагностических тест-систем для лабораторной индикации вируса и изучения его возможного распространения на территории России.

Для серодиагностики flavивирусных инфекций высокой диагностической значимостью обладает ИФА (иммуноферментный анализ), направленный на выявление вирусоспецифических IgM и IgG в сыворотке крови больных. Обнаружение антител класса IgG методом ИФА имеет значение при ретроспективной диагностике заболевания и оценке эффективности иммунизации против ВЖЛ.

Для создание специфического серологического диагностикума ВЖЛ необходимо использовать антигены, которые способны индуцировать образование антител (IgM и IgG) в организме инфицированного или вакцинированного человека. Согласно литературным данным, именно такими антигенами являются E и NS1 белки.

**Цель** данного исследования состояла в получении бактериального штамма — продуцента рекомбинантного белка E ВЖЛ, выделение белка и оценка его диагностической значимости.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи: по литературным данным провести анализ антигенной структуры E белка ВЖЛ и определить в его составе антиген-значимые участки, способные индуцировать образование антител; провести дизайн олигонуклеотидов, соответствующих фрагментам вирусного генома, кодирующих выбранные участки вирусных антигенов; создать генно-инженерную конструкцию на основе экспрессирующего вектора pET160, несущую фрагмент гена, кодирующего белок E в штамме *E.coli* TOP10; подтвердить правильность встройки фрагмента гена E путем секвенирования фрагмента, полученной плазмидной конструкций; используя разработанную векторную систему, получить бактериальный штамм — продуцента рекомбинантного белка E на основе штамма BL-21 (DE3), содержащего антигенные детерминанты ВЖЛ и выделить рекомбинантный антиген; иммунологическими методами подтвердить специфичность полученного антигена.

## Материалы и методы

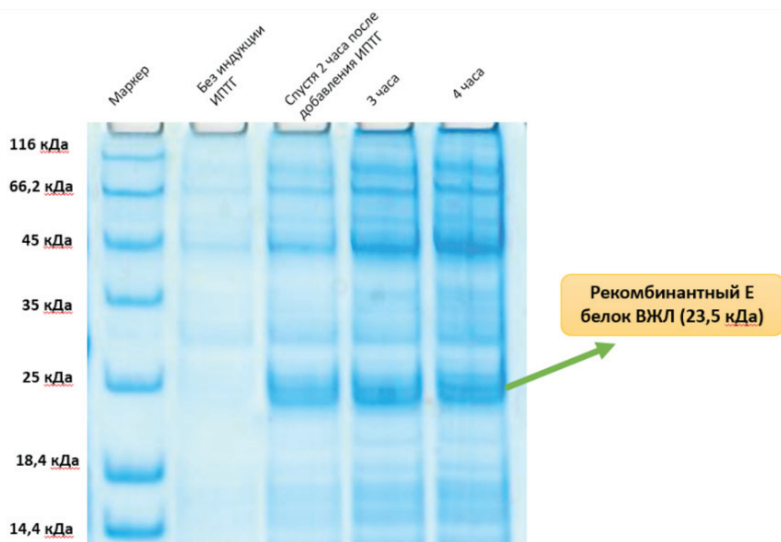
В данной работе был использован вакцинный 17D штамм ВЖЛ, который культивировали на клеточной культуре С6/36. Дизайн праймеров, необходимых для получения клонируемого фрагмента гена белка Е, осуществляли при помощи программы PerlPrimer v. 1.1.21 (Marshall, 2004), используя известные нуклеотидные последовательности геномов ВЖЛ, доступные в базе данных GenBank. Амплифицированные фрагменты клонировали в рЕТ160/GW/D-ТОРО (Thermo Fisher Scientific, США) и трансформировали клетки *E.coli* штамма TOP10 и засекали в чашки Петри со средой LB с добавлением ампициллина в качестве селективного маркера. Далее была выделена плазмидная ДНК и с помощью ПЦР были отобраны клоны, которые содержали целевую вставку (фрагмент гена Е белка ВЖЛ). Секвенирование продуктов амплификации проводили по обеим цепям методом Сэнгера. Анализ полученных нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программы UniproUGENE v. 1.30 и MEGA7. Плазмидной ДНК со вставкой трансформировали клетки *E.coli* штамма BL-21 (DE3) (Thermo Fisher Scientific, США). Полученные клоны-продуценты анализировали по уровню экспрессии после индукции в ПААГ-электрофорезе с SDS по Леммли. В качестве индуктора экспрессии использовали изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) в конечной концентрации 0,1 мМ. После индукции и инкубации (при 34 °С, 200 об/мин в течении 4 ч.) культуральные суспензии центрифугировали при 4 °С 14000 об/мин в течении 10 мин. Осадки ресуспендировали в 8М мочевины (рН 8,0) и хранили при –70 °С. Полученные лизаты сорбировали на планшетах для ИФА в двух сорбционных растворах — ацетатном (1М  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) и карбонатом ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  и  $\text{NaN}_3$ ). Далее проводили стандартный ИФА с последующим измерением оптической плотности получившихся иммунных комплексов.

## Результаты исследования

Был проведен анализ антигенной структуры белка Е ВЖЛ и определены в его составе антиген-значимые участки (III домен), способные индуцировать образования антител.

В результате генно-инженерных манипуляций была получена гибридная плазида рЕТ160-Е, содержащая открытую рамку считывания, кодирующую фрагмент белка Е длиной 221 а.о. (с шестью остатками гистидина, что обеспечивает последующее выделение белка на Ni-хелатном носителе и остатками полилинкера векторной плазмиды рЕТ160) под контролем промотора фага Т7.

Штамм *E.coli* BL-21 (DE3), трансформированный плазмидной ДНК рЕТ160-Е культивировали в 100 мл жидкой питательной среды LB с добавлением ампицилина, индуцировали индуктором Lac-оперона ИПТГ, обеспечивающим высокоэффективную транскрипцию промотора T7, в среднеарифметической стадии роста ( $D_{600}=0,6$ ) и культивировали. В серии экспериментов было показано, что максимальная продукция рекомбинантного белка происходит на 4 час инкубации при 34 °С (200 об/мин) после добавления индуктора. Отбор клонов-продуцентов проводили по наличию экспрессируемого белка в 15 % ПААГ-электрофорезе с SDS. Электрофоретическая подвижность рекомбинантного белка совпадала с теоретическими расчетами (23,5 кДа) (см. рисунок).



Электрофореграмма лизатов клеток *E.coli* BL-21 (DE3), содержащих плазмиду рЕТ160-Е в 15 % ПААГ-электрофорезе с SDS

Далее лизаты клеток *E.coli*, несущие плазмиду рЕТ160-Е, анализировали методом ИФА с использованием панели сывороток крови, содержащие антитела к ВЖЛ или к другим флавивирусам. Наилучший уровень специфичности антиген-антитело достигается при использовании ацетатного сорбционного раствора. При разведении рекомбинантного антигена 1:100 самая высокая чувствительность антигена к антителам ВЖЛ составила 0,347 о.е., а к антителам других флавивирусов 0,148 о.е. При разведении 1:10 самая высокая чувствительность антигена к антителам ВЖЛ

составила 0,429 о.е., а к антителам других флавивирусов 0,109 о.е. По-средством этого анализа отобраны штаммы-продуценты, экспрессирующие фрагмент белка Е ВЖЛ, наиболее эффективно взаимодействующие со специфическими антителами.

### **Заключение**

В данной работе был получен бактериальный штамм-продуцент рекомбинантного белка Е, содержащего антигенные детерминанты ВЖЛ и выделен рекомбинантный антиген. Проведено определение оптимальных условий наработки рекомбинантного белка Е ВЖЛ. Также подтверждена его специфичность иммунологическими методами. Опираясь на результаты данной работы, становится возможным создание лабораторного варианта диагностикума для обнаружения антител к ВЖЛ на основе рекомбинантного антигена.



**ПОЛУЧЕНИЕ ПОПУЛЯЦИЙ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ  
Т-ЛИМФОЦИТОВ И Т-КЛЕТОК ПАМЯТИ,  
СПЕЦИФИЧНЫХ К ЭПИТОПАМ  
ОПУХОЛЬ-АССОЦИИРОВАННОГО АНТИГЕНА HER2/NEU \***

OBTAINING POPULATIONS OF CYTOTOXIC T-LYMPHOCYTES AND  
MEMORY T-CELLS SPECIFIC TO HER2/NEU TUMOR-ASSOCIATED  
ANTIGEN EPITOPES

М. С. Кузнецова<sup>1,2</sup>, Ю. А. Лопатникова<sup>1</sup>, С. В. Сенников<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной  
и клинической иммунологии»*

<sup>2</sup> *ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский  
государственный университет»*

M. S. Kuznetsova<sup>1,2</sup>, J. A. Lopatnikova<sup>1</sup>, S. V. Sennikov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *RIFCI*

<sup>2</sup> *Novosibirsk State University, Russia*

**Аннотация**

Работа посвящена получению популяций цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичных к эпитопам опухоли-ассоциированного антигена HER2/neu, изучению их фенотипа, субпопуляционного состава и противоопухолевой активности.

**Abstract**

Obtaining populations of cytotoxic T-lymphocytes specific for the epitopes of the tumor-associated HER2 / neu antigen, assessment of their phenotype, memory and effector cell subset distribution and antitumor activity.

**Введение**

Исследования последних лет подтверждают эффективность использования потенциала иммунной системы в борьбе со злокачественными новообра-

---

© М. С. Кузнецова, Ю. А. Лопатникова, С. В. Сенников, 2019

\* Исследования выполнены при поддержке ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014.2020 годы» (Соглашение № 14.607.21.0043).

зованиями. Основными противоопухолевыми агентами, непосредственно реализующими специфический иммунный ответ, являются цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ) — антиген-специфичные CD8<sup>+</sup> Т-клетки, обладающие выраженным потенциалом к реализации целого ряда механизмов цитотоксичности. Показано, что наличие ЦТЛ, специфичных к антигенам опухоли, в достаточном количестве, с достаточной жизнеспособностью и с ненарушенными эффекторными функциями, прямо коррелирует с успешностью устранения опухолевых клеток в ходе адоптивной Т-клеточной иммунотерапии пациентов. Таким образом, разработка технологии получения жизнеспособных и функционально активных популяций ЦТЛ, специфичных к опухоль-ассоциированным антигенным детерминантам, может позволить решить проблему остаточной опухолевой нагрузки — сохранения и распространения опухолевых клеток в организме пациента после удаления основной части опухоли, приводящих к рецидивам и метастазированию. **Целью** работы стало получение популяций цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичных к эпитопам опухоль-ассоциированного антигена HER2/neu (HER2) и оценка их фенотипа и противоопухолевой активности.

### **Материалы и методы**

Объектом исследования являлись мононуклеарные клетки периферической крови (МНК ПК) HLA-A\*02-позитивных условно-здоровых доноров (18 человек) и пациентов с подтвержденным диагнозом HER2-позитивного рака молочной железы (4 человека). Исследование проводилось с добровольного информированного согласия всех доноров и пациентов, одобрено локальным этическим комитетом НИИФКИ (протокол № 111 от 6.11.2018).

Для получения HER2-специфичных ЦТЛ культуру МНК ПК, истощенную по моноцитарной фракции, культивировали со аутологичными дендритными клетками (ДК), трансфицированными ДНК-конструкцией, кодирующей эпитопы HER2. Для выявления популяции HER2-специфичных ЦТЛ в совместной культуре МНК и ДК клетки окрашивались HLA-мультимерами по технологии Strepamer. Фенотипирование получаемых HER2-специфичных ЦТЛ производилось методом многоцветной проточной цитометрии с использованием подобранной панели из 8 антител к маркерам Т-клеток человека. HER2-специфичные ЦТЛ выделяли методом магнитной сортировки с использованием технологии Strepamer. Противоопухолевая активность HER2-специфичных ЦТЛ оценивалась с помощью цитометрического анализа цитотоксичности против клеток опухолевой линии MCF-7, экспрессирующей антиген HER2.

## Результаты

Показано наличие цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичных к эпитомам E75 и E88 опухолевого антигена HER2/нец, в периферической крови здоровых индивидов и значительно более высокое их содержание в крови пациентов с HER2-позитивным раком молочной железы.

Разработанный протокол получения HER2-специфичных Т-лимфоцитов с помощью дендритных клеток, трансфицированных плазмидой, кодирующей эпитопы белка HER2, технологии стрептамеров и магнитной сепарации антиген-специфичных клеток, позволяет повысить содержание E75-специфичных Т-лимфоцитов в среднем в 8 раз, содержание E88-специфичных Т-лимфоцитов — в среднем в 22 раза, а также позволяет получать популяции HER2-специфичных Т-лимфоцитов, содержащие порядка 71,5 % CD8<sup>+</sup> клеток в культуре E88-специфичных Т-лимфоцитов и 90,2 % — в культуре E75-специфичных Т-лимфоцитов, что указывает на эффективность активации HER2-специфического иммунного ответа с помощью аутологических антиген-активированных дендритных клеток, а также на высокую чистоту выделения целевых популяций.

Исследование фенотипа получаемых HER2-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов показало, что данные популяции в значительной степени представлены лимфоцитами с фенотипом Т-клеток памяти, и, в частности, содержат большой процент Т-клеток памяти со свойствами стволовых клеток — T<sub>SCM</sub> (порядка 50 % всех HER2-специфичных CD8<sup>+</sup> Т-клеток). Анализ цитотоксичности CD8<sup>+</sup> HER2-специфических Т-клеток показал значимо более высокий уровень цитотоксического эффекта в отношении клеточной линии MCF-7 по сравнению с таковым для общей фракции активированных МНК ПК, а также по сравнению с общей фракцией активированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток периферической крови.

## Заключение

Разработанный протокол получения HER2-специфичных ЦТЛ, сочетающий использование дендритных клеток, трансфицированных плазмидой HER2, с выделением и наработкой антиген-специфичных Т-клеток, позволяет получать популяции E75- и E88-специфичных Т-лимфоцитов, в значительной степени представленные Т-клетками памяти и, прежде всего, Т-клетками памяти со свойствами стволовых клеток, а также способные проявлять выраженную специфическую цитотоксичность.

## РАЗРАБОТКА СТАБИЛЬНЫХ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ФОРМ АСТАКСАНТИНА И ЕГО ЭФИРОВ

### DEVELOPMENT OF STABLE WATER-SOLUBLE FORMS OF ASTAXANTINE AND ITS ETHERS

И. С. Куликова<sup>1</sup>, Н. Ю. Лотош<sup>1</sup>, А. А. Селищева<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Национальный исследовательский центр «Курчатовский Институт»*

<sup>2</sup>*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

I. S. Kulikova, N. Y. Lotosh, A. A. Selishcheva

<sup>1</sup>*National Research Center «Kurchatov Institute», Russia*

<sup>2</sup>*Lomonosov Moscow State University, Russia*

E-mail: kefirka08@mail.ru

#### Аннотация

Настоящая работа посвящена оптимизации условий получения водных растворов и наноэмульсий каротиноида астаксантина и его эфиров для дальнейшего использования в качестве медицинского препарата. Изучена стабильность водных растворов и наноэмульсий АСТ и его эфиров при хранении при дневном освещении и комнатной температуре в отсутствие и присутствии различных антиоксидантов (ионола, аскорбиновой кислоты и альбумина). Установлено, что наиболее эффективным антиоксидантом для эфиров астаксантина является альбумин в определенных процентных соотношениях между каротиноидом и белком, как в водных растворах, так и в наноэмульсиях. Методом динамического светорассеяния определены размеры частиц в наноэмульсиях, дзета-потенциал и индекс полидисперсности.

#### Abstract

The present work is devoted to optimizing the conditions for obtaining aqueous solutions and nanoemulsions of the astaxanthin esters for further use as a medicine. The stability of aqueous solutions and nanoemulsions of AST and its esters was studied during storage under daylight and room temperature in the absence and presence of various antioxidants (ionol, ascorbic acid and albumin). It was established that the most effective antioxidant for astaxanthin is albumin in certain percentages between the carotenoid and protein in aqueous solutions and nanoemulsions. The particle sizes in the nanoemulsions, zeta potential the polydispersity index were determined by using dynamic light scattering.

Каротиноид астаксантин (АСТ) принадлежит к классу ксантофиллов. АСТ обладает антиоксидантными свойствами, т.к. взаимодействует с разными активными формами кислорода (АФК), содержание которых значительно увеличивается при развитии различных возрастных заболеваний, в частности при нейродегенеративных расстройствах, таких как болезнь Альцгеймера и Паркинсона. АСТ защищает клетки от окислительного повреждения нейтрализацией синглетного кислорода и взаимодействием с радикалами для предотвращения цепных реакций.

АСТ синтезируется в клетках *Haematococcus Pluvialis* в свободной форме ( $R_{1,2}-H$ ), в виде моноэфиров ( $R_1$  — жирнокислотный остаток,  $R_2-H$ ) и в виде диэфиров ( $R_{1,2}$  — жирнокислотные остатки), а в составе экстрактов основную часть составляют моноэфиры. Поскольку АСТ плохо растворим в воде, и разрушается на свету, задача данной работы состояла в разработке стабильной водорастворимой формы АСТ и его эфиров, оценке их стабильности и физико-химических характеристик.

Исследовали стабильность двух типов препаратов, перечисленных ниже, при хранении при дневном освещении и комнатной температуре:

1. Моноэфиры АСТ, выделенные из биодобавки «БиоАстин», содержащей экстракт *Haematococcus Pluvialis* (производитель «Источник долголетия», Россия). Методом ВЭЖХ-МС был определен жирнокислотный состав моноэфиров.

2. Эфиры АСТ из *Haematococcus Pluvialis* (Sigma-Aldrich, США), содержащие 70 % моноэфиров, 20 % диэфиров и 10 % АСТ в свободной форме.

Подлинность препаратов была подтверждена методами спектрофотометрии и ВЭЖХ.

На первом этапе исследований изучена стабильность водных растворов моноэфиров (препарат № 1), содержащих 5 % этанола. В качестве стабилизации использовали альбумин, ионол ( $10^{-4}$  М) и аскорбиновую кислоту ( $10^{-4}$  М). Соотношение АСТ и белка варьировали от 1:1 до 1:10. Стабильность определялась по оптической плотности раствора в максимуме поглощения АСТ (при 470 нм). Показали, что при хранении в выбранных условиях водный раствор моноэфиров АСТ полностью распадается на 2-ой день. Введение в этот раствор альбумина или аскорбиновой кислоты, или ионола не приводило к достижению значимого результата, препарат разлагался на 2-ой или 3-ий день. Только при добавлении смеси альбумина и ионола оптическая плотность водного раствора на 10-ый день снизилась на 42 %.

Такие же результаты были получены для смеси эфиров АСТ (препарата № 2). В водном растворе, содержащем 5 % спирта, препарат разлагался на 2-день хранения. Введение альбумина, ионола и аскорбиновой кислоты

приводило к незначительному замедлению падения оптической плотности при хранении. И только добавление смеси альбумина с ионолом позволило стабилизировать водный раствор таким образом, что падение оптической плотности на 10-ый день хранения составило 30 %.

Таким образом, водные растворы чистых моноэфиров АСТ (препарат № 1) и смеси моно — и диэфиров (препарат № 2) быстро разрушаются при хранении на свету при комнатной температуре и могут быть стабилизированы смесью альбумина и ионола.

На следующем этапе было приготовлено несколько наноэмульсий на основе соевого фосфатидилхолина (ФХ), содержащие смесь эфиров АСТ (препарат № 2). Размер частиц, индекс полидисперсности (ИП) и дзета-потенциал были измерены на приборе Malvern Zetasizer Nano ZSP при температуре 37 °С. Установили, что наноэмульсии представляют собой гомогенную эмульсию (индекс полидисперсности меньше 0.3), состоящую из электронейтральных частиц размером 40–70 нм. Их хранение в течение месяца сопровождалось падением оптической плотности на 50 %. Эмульсия смеси эфиров АСТ, содержащая альбумин, но без ионола, оказалась наиболее устойчивой, т.к. падение оптической плотности на 35 день составило только 8 %. При хранении тех же самых образцов в темноте и при температуре +4 °С оптическая плотность эмульсии с альбумином снизилась на 3 %.

Согласно полученным результатам, наиболее стабильной оказалась водорастворимая форма эфиров АСТ в виде наноэмульсии, стабилизированная добавлением альбумина.

## Литература

1. Gentine P. et al. Manufacture of liposomes by isopropanol injection: characterization of the method //Journal of liposome research. 2012. Т. 22. №. 1. С. 18–30.

## СОЗДАНИЕ МОДЕЛИ ПРЕДСКАЗАНИЯ ВРЕМЕНИ СМЕРТИ ПО МЕТАБОЛОМНОМУ СОСТАВУ КРОВИ, ВОДЯНИСТОЙ ВЛАГИ И СТЕКЛОВИДНОГО ТЕЛА \*

A MODEL FOR PREDICTING THE POST-MORTEM INTERVAL BASED  
ON THE METABOLOMIC COMPOSITION OF SERUM, AQUEOUS AND  
VITREOUS HUMORS

А. Д. Мельников, Л. В. Яньшолё, Е. А. Зеленцова

*Международный томографический центр СО РАН  
Новосибирский государственный университет*

A. D. Melnikov, L. V. Yanshole, E. A. Zelentsova

*International Tomography Center SB RAS, Novosibirsk, Russia  
Novosibirsk State University*

E-mail: melnikov.arsenty@gmail.com

### **Аннотация**

Метаболомный анализ посмертных изменений биологических жидкостей и тканей дает возможность разработки новых методов оценки времени смерти индивида. В данной работе впервые создана многопараметрическая модель и оценена ее предсказательная способность для трех различных типов ткани: плазма крови, водянистая влага и стекловидной тело.

### **Abstract**

Metabolomic analysis of post-mortem changes in biological fluids and tissues makes it possible to develop new methods for estimating the time of death of an individual. In this work, a multiparameter model was created for the first time and its predictive ability for three different types of tissue was evaluated: serum, aqueous and vitreous humors.

### **Введение**

Очень часто перед криминалистами и судмедэкспертами встает вопрос об установлении времени наступления смерти человека. Как в нашей стра-

---

© А. Д. Мельников, Л. В. Яньшолё, Е. А. Зеленцова, 2019

\* Исследования выполнены при поддержке российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 18-34-00137, № 18-33-20097).

не, так и в мире этот процесс не видоизменялся уже многие годы, и в практике активно используются устаревшие по своим возможностям методы: измерение температуры тела, наблюдаемая окоченелость, жесткость мышц и многие другие методы. При этом золотым стандартом является измерение температуры тела. Однако, данный подход даже при учете множества параметров, таких как температура окружающей среды, веса тела и толщины одежды дает точный результат лишь для непродолжительного промежутка времени. Многие другие традиционные методы дают ответ лишь о количестве дней. Основной целью данной работы является разработка нового метода определения времени после смерти, основанного на анализе метаболомного состава биологических жидкостей и тканей.

Анализ биохимических изменений после смерти является активно развивающейся областью. Одним из наиболее интересных направлений является анализ изменений в метаболомном составе биологических жидкостей, например плазмы крови или водянистой влаги. Интерес к биологическим жидкостям обусловлен в первую очередь простотой их получения и пробоподготовки. Однако, другие ткани, например, стекловидное тело, могут позволять лучше предсказывать время смерти в связи с их большей инертностью. В данной работе для построения предсказательной модели были выбраны кровь, водянистая влага и стекловидное тело.

## **Методы**

Количественное метаболомное профилирование плазмы крови, водянистой влаги и стекловидного тела, полученных в разное время после смерти, было проведено с использованием высокочастотной ЯМР-спектроскопии (AVACE III HD 700 MHz, Bruker BioSpin). Для определения концентрации метаболитов считалась площадь пиков и сопоставлялась с площадью пика внутреннего стандарта DSS. Обработка данных, построение предсказательных моделей и оценивание их эффективности были проведены на языке программирования Python.

## **Результаты**

Было проведено метаболомное профилирование плазмы крови (31 образец), водянистой влаги (33 образца) и стекловидного тела (33 образца), полученных в разное время после смерти индивида. Посчитаны концентрации 42 метаболитов в каждом из образцов. Для каждой ткани отобрано оптимальное количество метаболитов для построения предсказательной модели: водянистая влага — 3 метаболита (креатин, холин, бетаин), стекловидное тело — 2 метаболита (креатин, бетаин), кровь — 1 метаболит (фосфохолин/



---

гипоксантин/глутамат). Модели, построенные по метаболомному составу водянистой влаги и стекловидного тела, дают примерно одинаковые результаты (средняя относительная ошибка = 0.45), в то время как использование метаболитов крови заметно понижает качество предсказания. Таким образом, водянистая влага и стекловидное тело являются куда более пригодными тканями для предсказания времени смерти, чем кровь. В дальнейшем планируется заметно улучшить качество моделей путем добавления внешних параметров, таких как температура окружающего воздуха и/или причины смерти.

**РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ  
ХОЛАНГИОКАРЦИНОМЫ,  
АССОЦИИРОВАННОЙ С ОПИСТОРХОЗОМ\***

**DEVELOPMENT AND VALIDATION OF EXPERIMENTAL  
CHOLANGIOCARCINOMA MODEL**

Г. А. Минькова<sup>1</sup>, А. Г. Шилов<sup>1</sup>, Д. В. Пономарев<sup>1</sup>, М. Н. Львова<sup>1</sup>,  
С. А. Романенко<sup>2</sup>, М. Ю. Пахарукова<sup>1</sup>, В. А. Мордвинов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН

<sup>2</sup>ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН

G. A. Minkova<sup>1</sup>, A. G. Shilov<sup>1</sup>, D. V. Ponomarev<sup>1</sup>, M. N. Lvova<sup>1</sup>,  
S. A. Romanenko<sup>2</sup>, M. Y. Pakharukova<sup>1</sup>, V. A. Mordvinov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>FRC ICG SB RAS, Russia

<sup>2</sup>IMCB SB RAS, Russia

**Аннотация**

Описторхоз — это гельминтоз, поражающий преимущественно гепатобилиарную систему и поджелудочную железу плотоядных животных. На территории стран СНГ и некоторых европейских стран возбудителем описторхоза является печеночный сосальщик *Opisthorchis felineus*.

У человека описторхоз отличается длительностью, протекает с частыми обострениями и может способствовать возникновению рака желчных протоков — холангиокарциномы (ССА, cholangiocarcinoma). ССА занимает второе место по встречаемости среди злокачественных заболеваний печени и является агрессивным видом рака: быстро прогрессирующим и трудно поддающимся лечению. К сожалению, холангиокарциногенез, ассоциированный с инвазией *O. felineus*, практически не изучен, что во многом связано с отсутствием соответствующих клеточных моделей. Цель данной работы — создание перевиваемой клеточной линии *O. felineus*-ассоциированной ССА и определение её морфологических, культуральных, иммуногистохимических и туморогенных характеристик.

---

© Г. А. Минькова, А. Г. Шилов, Д. В. Пономарев, М. Н. Львова, С. А. Романенко, М. Ю. Пахарукова, В. А. Мордвинов, 2019

\* Исследования выполнены при поддержке Бюджетного проекта ИЦиГ СО РАН (0324-2019-0041).

Клеточная линия HamCCA-1 была получена из образцов ССА, индуцированной у хомячков *Mesocricetus auratus* сочетанным воздействием инфекции *O. felineus* и субканцерогенной дозы диметилнитрозамина. Согласно результатам иммуноцитохимического анализа, клетки HamCCA-1 сохранили маркеры ССА, обнаруженные в первичной опухоли и используемые для описания ССА человека — кератин 7, аннексин А1, экзостосин 1 и виментин. Туморогенность HamCCA-1 была продемонстрирована с помощью аллотрансплантации клеток линии хомячкам. При гистологическом исследовании возникших опухолей установлено, что морфологически они мало отличаются от первичных ССА. Таким образом, полученная клеточная линия может быть использована для изучения гельминт-ассоциированного холангиокарциногенеза, поиска молекулярных маркеров ССА для ранней диагностики этого заболевания, а также тестирования новых лекарственных препаратов и методов лечения ССА.

### Abstract

Opisthorchiasis is a helminthiasis that affects mainly the hepatobiliary system and the pancreas of carnivores. In the territory of the CIS countries and some European countries, the causative agent of opisthorchiasis is the liver fluke *Opisthorchis felineus*. Chronic opisthorchiasis proceeds with frequent exacerbation and may promote development of bile duct cancer (CCA, cholangiocarcinoma). CCA is the second most common malignant liver disease. It is an aggressive type of cancer because of active progression and difficulties of treatment. Mechanisms of cholangiocarcinogenesis associated with *O. felineus* infection are not studied due to the lack of appropriate cell models. The aim of the work was to establish immortalized cell lines of *O. felineus*-associated CCA and to determine its morphologic, immunocytochemical and tumorigenic characteristics.

A cell line HamCCA-1 was derived from the CCA tissue of *O. felineus*-infected and dimethylnitrosamine-treated Syrian hamsters *Mesocricetus auratus*. Immunocytochemical analysis revealed positive staining of markers used to describe human CCA, such as keratin 7, annexin A1, exostosin 1 and vimentin. HamCCA-1 cells retained CCA markers found in the primary tumor. Tumorigenicity of HamCCA-1 cells was demonstrated by allograft transplantation in hamster. Histological examination of transplanted tumors showed glandular structure similar to the primary CCA in hamster liver. In conclusion, the models can be used for studying cholangiocarcinogenesis, as well as for searching CCA treatments and methods for early diagnosis of the disease.

Описторхоз, вызванный *O. felineus*, распространен на территории бывшего СССР и Восточной Европы. Очаги заболевания приурочены к равнинам, расположенным в руслах рек. Наиболее показательна в этом смысле Западно-Сибирская низменность — именно здесь, в Обь-Иртышском бассейне, расположен самый большой в мире очаг описторхоза, обусловленного *O. felineus*. По разным оценкам в мире от инвазии этого печеночного сосальщика страдают не менее 1,6 млн человек (1).

У человека описторхоз часто переходит в хроническую форму, протекает с периодическими обострениями и может способствовать возникновению рака желчных протоков — холангиокарциномы (ССА, cholangiocarcinoma). ССА — агрессивный, активно метастазирующий тип рака. Медиана выживаемости пациентов без лечения 3–4 месяца. Пятилетняя выживаемость пациентов после резекции опухоли составляет около 40 %. На ранних стадиях ССА бессимптоматична, поэтому диагностируется, как правило, уже на поздних этапах болезни, сопровождающихся серьезными функциональными нарушениями печени (2).

Следует отметить, что как механизмы холангиокарциногенеза в целом, так и механизмы малигнизации, ассоциированные с инвазией *O. felineus*, изучены слабо. Данные факты указывают на высокую актуальность работ, направленных на создание экспериментальной модели ССА для исследования холангиокарциногенеза, поиска новых биомаркеров ССА и тестирования новых противоопухолевых лекарственных препаратов. В связи с этим цель нашего исследования — создание перевиваемой клеточной линии *O. felineus*-ассоциированной ССА и определение её морфологических, культуральных, иммуногистохимических и опухолевых характеристик.

Установлено, что в клетках ССА человека повышена экспрессия эпителиального маркера желчных протоков цитokerатина 7 (3), аннексина А1 и экзостосина 1 (4, 5). Кроме того, виментин, участвующий в прогрессии и метастазировании опухолей, рассматривают как маркер низкой выживаемости пациентов при дедифференцированной ССА (6). С помощью иммуногистохимии и ПЦР в реальном времени нами показано увеличение экспрессии этих маркеров в тканях ССА хомячков *M. auratus*, возникшей при инвазии *O. felineus* на фоне диметилнитрозамина. Мы использовали образцы ССА хомячков для получения клеточной линии НамССА-1.

При культивировании клетки НамССА-1 сохраняли свою морфологию как минимум в течение 6 месяцев. Клеткам линии свойственен адгезивный рост и отсутствие контактного торможения. Результаты скретч-теста продемонстрировали, что линии НамССА-1 также свойственны одиночный тип и высокая скорость миграции клеток. С помощью иммуноцитохимического анализа установлено, что клетки линии НамССА-1 сохранили маркеры ССА, обнаруженные в первичной опухоли — кератин 7, аннексин А1, экзостосин 1 и виментин.

Туморогенность клеточной линии была продемонстрирована с помощью подкожной аллотрансплантации разных доз суспензии клеток НамССА-1 хомячкам *M. auratus*. Рост трансплантированных опухолей наблюдали в 100 % случаев. За 6 недель опухоли достигали значительных размеров и, соглас-

но гистологическому анализу, сохраняли морфологические характеристики первичных ССА.

Таким образом, нами впервые получена перевиваемая туморогенная клеточная линия *O. felineus*-ассоциированной ССА. Проведенная валидация клеточной линии НамССА-1 показывает, что линию можно использовать для изучения холангиокарциногенеза, а также для *поиска новых биомаркеров* ССА. Кроме того, данная клеточная линия может быть использована для *тестирования противоопухолевых препаратов*.

### Литература

1. Keiser J, Utzinger J. Food-borne trematodiasis. Clin Microbiol Rev. 2009; 22(3): 466–83. doi: 10.1128/CMR.00012-09.
2. Patel T. Cholangiocarcinoma controversies and challenges. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2011; 8(4): 189–200. doi: 10.1038/nrgastro.2011.20.
3. Moll R, Divo M, Langbein L. The human keratins: biology and pathology. Histochem Cell Biol. 2008; 129(6): 705–33. doi: 10.1007/s00418–008–0435–6.
4. Hongsrichan N, Rucksaken R, Chamgramol Y, Pinlaor P, Techasen A, Yongvanit P, Khuntikeo N, Pairojkul C, Pinlaor S. Annexin A1: A new immunohistological marker of cholangiocarcinoma. World J Gastroenterol. 2013; 19(16): 2456–65. doi: 10.3748/wjg.v19.i16.2456.
5. Khoontawad J, Hongsrichan N, Chamgramol Y, Pinlaor P, Wongkham C, Yongvanit P, Pairojkul C, Khuntikeo N, Roytrakul S, Boonmars T, Pinlaor S. Increase of exostosin I in plasma as a potential biomarker for opisthorchiasis-associated cholangiocarcinoma. Tumour Biol. 2014; 35(2): 1029–39. doi: 10.1007/s13277–013–1137–9.
6. Korita PV, Wakai T, Ajioka Y, Inoue M, Takamura M, Shirai Y, Hatakeyama K. Aberrant expression of vimentin correlates with dedifferentiation and poor prognosis in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma. Anticancer Res. 2010; 30(6): 2279–85.

**КАТАЛИТИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ ГИСТОНОВ  
В ПАТОГЕНЕЗЕ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА \*****CATALYTIC ACTIVE ANTIBODIES AGAINST HISTONES  
IN THE PATHOGENESIS OF MULTIPLE SCLEROSIS**

Е. В. Михеева, С. В. Баранова

*ФБУН Институт химической биологии  
и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

Mikheeva E. V., Baranova S. V.

*Institute of chemical biology and fundamental medicine SB RAS, Novosibirsk,  
Russia*

E-mail: korobova\_lena@mail.ru

**Аннотация**

Появление антител с различными каталитическими активностями (абзимов) — самый ранний признак развития аутоиммунных заболеваний. Рассеянный склероз (РС) — аутоиммунное, хроническое прогрессирующее заболевание центральной нервной системы, механизмы развития которого окончательно неясны. Показано, что иммуноглобулины G (IgG) из крови пациентов РС расщепляют человеческие гистоны. Представлены доказательства принадлежности каталитической активности выделенным антителам. Определены каталитические свойства антител (ингибиторный анализ, металл- и pH-зависимость). Показано, что способность гидролизовать гистоны различна у разных пациентов и зависит от течения основного заболевания, стадии процесса. Есть основание предполагать, что гистон-гидролизующие IgG играют важную роль в патогенезе рассеянного склероза.

**Abstract**

Autoantibodies with enzymatic activities are distinctive feature of autoimmune diseases. Multiple sclerosis (MS) is a chronic demyelinating pathology of the central nervous system presenting a serious medical and social problem. Its etiology and

---

© Е. В. Михеева, С. В. Баранова, 2019

\*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-15-00145 «Клеточные и молекулярные механизмы патогенеза при развитии аутоиммунных заболеваний» и проекта базового бюджетного финансирования ПФНИ ГАН 2013-2020 № ААА-А-А17-117020210023-1.

mechanism of development disease remains unclear. It was shown that IgGs from sera of MS patients effectively hydrolyze histones. Several rigid criteria shown that hydrolysis of histones are an intrinsic property of immunoglobulins from blood of MS patients. The catalytic properties of antibodies (inhibitory analysis, metal — and pH-dependence) were determined. The ability of hydrolysis of histones (H1, H2a, H2b, H3, and H4) significantly varied for IgGs of different patients and depends from progress of the disease. There is reason to suggest that histone hydrolysing IgG play an important role in the pathogenesis of multiple sclerosis.

Рассеянный склероз (РС) — аутоиммунное хроническое демиелинизирующее заболевание, в основе которого лежит комплекс нейродегенеративных процессов, приводящих к множественному очаговому поражению центральной нервной системы. Несмотря на активное изучение РС, этиология и патогенетические механизмы развития заболевания окончательно не ясны. Наличие каталитически активных антител в крови — один из ранних признаков аутоиммунных процессов. Гистоны участвуют в упаковке ДНК и регуляции ядерных процессов. При низкой концентрации гистонов могут возникать повреждения ДНК, а в большом количестве гистоны токсичны для клетки.

Показано, что в крови пациентов с рассеянным склерозом содержатся аутоантитела против гистонов. Проанализировано 59 препаратов антител (IgG) из крови больных РС из госпиталей г. Новосибирска, Томска и Красноярска (согласие пациентов на участие в исследовании получено). Длительность заболевания составляла от нескольких месяцев до 23 лет.

Определено, что 73 % IgG из крови пациентов с РС гидролизуют от одного до пяти человеческих гистонов, из них 84 % расщепляют гистон H1, 74 % — гистоны H2A, H2B, и H4, и 88 % только H3. 59 % препаратов IgG гидролизуют все пять гистонов, в то время как 5 % IgG только один, 28 % IgG — от двух до трех гистонов, 8 % антител — четыре разных гистона.

По ряду специфических признаков течения РС больные были разделены на три группы: первая — больные с ВПРС (вторично-прогрессирующий рассеянный склероз), вторая — с РРС (ремиттирующий рассеянный склероз) и с ремиттирующе-прогрессирующим течением болезни (РПРС), третья — с дебютом РС (длительность заболевания до 1 года). Заболевание дебютировало с чувствительных, глазодвигательных и пирамидных расстройств. Показано, что активность у больных в дебюте заболевания была в 1,5 раза выше по сравнению с активностью у больных с РРС и РПРС, и в 1,1 раз выше по сравнению с активностью у больных с ВПРС. У пациентов в дебюте заболевания (третья группа) 100 % препаратов IgG способны гидролизовать от одного до пяти гистонов, во второй группе — 67 %, а у

больных с ВПРС такой способностью обладали 90 % препаратов антител. Активность антител крови пациентов, находящихся в стадии ремиссии и в стадии обострения, существенно отличалась. Только 30 % препаратов IgG из крови пациентов в стадии ремиссии эффективно расщепляли от одного до пяти гистонов, в то время как, в стадии обострения 92 % препаратов антител гидролизуют гистоны.

В дебюте заболевания 100 % препаратов антител расщепляли гистоны. При длительности заболевания до пяти лет только 60 % препаратов антител эффективно гидролизуют от одного до пяти гистонов. В группе пациентов, с длительностью заболевания 6–10 лет, 82 % препаратов антител расщепляли гистоны. У пациентов с длительностью заболевания более 10 лет способность гидролизовать гистоны уменьшалась от 75 % до 17 %.

Проведено исследование доказательств принадлежности каталитической активности выделенным антителам (электрофоретическая гомогенность, анализ ферментативной активности антител после SDS-электрофореза и гель-фильтрация в кислом буфере). Показано, что каталитическая активность является собственным свойством выделенных антител и не связана с примесью ферментов. Определены каталитические свойства антител (ингибиторный анализ, металл- и pH-зависимость). Изучены кинетические параметры реакции гидролиза гистона H1. Зависимость скорости реакции от концентрации гистона H1 описывалась уравнением Михаэлиса — Ментен. Показано, что активные центры гистон-гидролизующих антител, выделенных из крови пациентов с рассеянным склерозом, содержат аминокислотные остатки тиоловых, сериновых, кислых и металлопротеаз. Для всех препаратов антител не было выявлено общего оптимума pH.

В данной работе впервые показано, что IgG больных рассеянным склерозом обладают гистон-гидролизующей активностью. Определение гистон-гидролизующих антител может быть использовано в качестве дополнительного критерия на этапе постановки диагноза и прогнозирования течения РС, а относительная простота методов выявления антител могут позволить разработать дополнительные методы диагностики данного заболевания.



**РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ И МЕТОДОВ ПОЛУЧЕНИЯ  
ПЕРВИЧНЫХ КУЛЬТУР РАЗНЫХ ТИПОВ КЛЕТОК  
ЭНДЕМИЧНЫХ БАЙКАЛЬСКИХ АМФИПОД *IN VITRO*\***

**DEVELOPMENT OF PROTOCOLS FOR OBTAINING PRIMARY  
CULTURES OF DIFFERENT CELL TYPES OF BAIKAL ENDEMIC  
AMPHIPODS *IN VITRO***

А. А. Назарова, А. Н. Гурков, А. Д. Мутин,  
К. П. Верещагина, М. А. Тимофеев

*НИИ биологии ФГБОУ ВО «Иркутский государственный университет»*

A. A. Nazarova, A. N. Gurkov, A. D. Mutin, K. P. Vereshchagina, M. A. Timofeev

*Irkutsk State University*

E-mail: annazarova1995@gmail.com

**Аннотация**

В данной работе впервые была отработана методика выделения клеток гепато-панкреаса и яичников эндемичных байкальских амфипод на примере массового литорального вида *Eulimnogammarus verrucosus* (Gerstf., 1858). Были протестированы эксплантационный метод выделения клеток и метод ферментативной дезагрегации по степени выживаемости клеток.

**Abstract**

This study provides the first description of methods for cell separation of ovaries and hepatopancreas from Baikal amphipods. The object of this study is the endemic Baikal species of amphipod *Eulimnogammarus verrucosus* (Gerstf., 1858). We tested the explant method of cell isolation and the method of enzymatic disaggregation according to the degree of cell survival.

Озеро Байкал — это крупнейший пресноводный водоём, населённый разнообразной фауной беспозвоночных с высоким уровнем эндемизма. Эндемичные байкальские амфиподы (Amphipoda, Crustacea) являются важным

---

© А. А. Назарова, А. Н. Гурков, А. Д. Мутин, К. П. Верещагина, М. А. Тимофеев, 2019

\* Работа поддержана грантом РФФИ № 19-54-04008.

компонентом экосистемы озера. Данная группа представлена более чем 350 видами и подвидами (99 % эндемики), которая составляет существенную часть биомассы макробентосных животных озера и играет важную роль в пищевых сетях Байкала (Тахтеев, 2015).

Первичные клеточные культуры являются важным инструментом для детального изучения молекулярных основ функционирования любого многоклеточного организма. Однако, несмотря на уникальные свойства байкальских эндемичных амфипод, их высокое разнообразие и важность для экосистемы Байкала, работ по получению их клеточных культур практически не проводилось. В то же время, клеточные культуры разных органов и тканей эндемичных байкальских амфипод имеют существенный потенциал как использования в фундаментальных исследованиях, так и прикладного применения. В частности, клеточные культуры могут стать удобной модельной системой для детального изучения процессов стресс-адаптации амфипод на клеточном уровне к различным негативным условиям среды, таким как воздействие токсикантов и изменения температуры, сопряженным с антропогенным загрязнением водоёмов и глобальным изменением климата.

Целью данного исследования являлась разработка методик выделения клеток гепатопанкреаса и яичников эндемичных байкальских амфипод и их содержания в первичной культуре.

Объектом исследования являлся эндемичный байкальский вид амфипод *Eulimnogammarus verrucosus* (Gerstfeldt, 1858). Для выделения клеток использовали два метода: эксплантационный метод и метод ферментативной дезагрегации. Для этого покровы животных стерилизовали промывкой в дистиллированной воде и 70%-м растворе этилового спирта. Ткани вырезали с использованием стерильных ножниц и пинцетов в ламинарном боксе, затем промывали в стерильном физрастворе. Полученные тканевые экспланты либо непосредственно содержали в среде Лейбовича (L-15), которая ранее была использована нами для культивирования гемоцитов (Shcharova, Nazarova et al., 2019), либо дополнительно обрабатывали для получения диссоциированных клеток. Для диссоциации клеток использовали трипсин в конечной концентрации 0,25 % на основе среды L-15 (George and Dhar, 2010) в течение 5, 10 и 15 минут. Далее проводили процедуру отмывки клеток от трипсина центрифугированием при 2000 g в течение 10 минут при 4 °C три раза (Fraser and Hall, 1999). Сразу после выделения проводили оценку выживаемости клеток с помощью окрашивания трипановым синим.

Миграция клеток из эксплантов гепатопанкреаса наблюдается в минимальном количестве, и характеризуется скоплениями клеток, связанных межклеточной адгезией. Сразу после обработки трипсином в течение 5 ми-

нут и диссоциации клеток гепатопанкреаса их выживаемость наблюдается на уровне от 80 до 90 %. Обработка трипсином в течение 15 минут даёт выживаемость на уровне от 67 до 91 % клеток сразу после обработки, при этом в большинстве своём первичная культура характеризуется одиночными клетками.

Из эксплантов яичников уже в течение 4 часов наблюдается активная миграция клеток, при этом выживаемость клеток сохраняется на уровне от 30 до 80 % через 4 часа. Непосредственно после обработки 0,25 % раствором трипсина в течение 5 минут выживает от 17 до 63 % клеток яичников, тогда как при 15 минутах обработки выживаемость оказывается в диапазоне от 12 до 20 % через. Низкая выживаемость клеток яичников после обработки трипсином по сравнению с клетками гепатопанкреаса объясняется менее плотной структурой ткани и меньшим количеством межклеточных связей.

В результате проведённого исследования было выявлено, что для выделения клеток яичников амфипод *E. verrucosus* наиболее подходящим по показателю выживаемости клеток является эксплантационный метод, тогда как для клеток гепатопанкреаса метод ферментативной дезагрегации с использованием 0,25 % раствора трипсина в течение 15 минут. Среда L-15 оказалась подходящей для получения первичных культур клеток обоих органов амфипод.

## Литература

Тахтеев В. В. Фауна и экология бокоплавов озера Байкал: учебное пособие. / В. В. Тахтеев, С. И. Дидоренко. Иркутск: Изд-во Института географии им. В. Б. Сошалева СО РАН, 2015. 115 с.

Fraser C. A. Studies on primary cell cultures derived from ovarian tissue of *Penaeus monodon* / C. A. Fraser, M. R. Hall // *Methods in Cell Science*. 1999. V. 21. P. 213–218.

George S. K. An improved method of cell culture system from eye stalk, hepatopancreas, muscle, ovary, and hemocytes of *Penaeus vannamei* / S. K. George, A. K. Dhar // *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal*. 2010. V. 46. P. 801–810.

Shchapova E. et al. Application of PEG-Covered Non-Biodegradable Polyelectrolyte Microcapsules in the Crustacean Circulatory System on the Example of the Amphipod *Eulimnogammarus verrucosus* E. Shchapova, A. Nazarova, A. Gurkov, E. Borvinskaya, Y. Rzhchitskiy, I. Dmitriev, I. Meglinski, M. Timofeyev // *Polymers*. 2019. V. 11. № 1246. P. 1–17. doi:10.3390/polym11081246.

**ВЛИЯНИЕ НАНОКОМПОЗИТОВ СЕЛЕНА В ПРИРОДНЫХ  
МАТРИЧНЫХ ОБОЛОЧКАХ НА ВОЗБУДИТЕЛЬ  
КОЛЬЦЕВОЙ ГНИЛИ И ПОЧВЕННЫЕ БАКТЕРИИ \***

INFLUENCE OF NANOCOMPOSITES OF SELENIUM IN NATURAL  
MATRIX MEMBRANES FOR THE POTATO OF RING ROT DISEASE  
AND SOIL BACTERIA

О. А. Ножкина<sup>1</sup>, А. И. Перфильева<sup>1</sup>, А. В. Дьякова<sup>2</sup>,  
И. А. Граскова<sup>1,3</sup>, Б. Г. Сухов<sup>4,3</sup>

<sup>1</sup>Сибирский институт физиологии и биохимии растений,  
г. Иркутск, Россия

<sup>2</sup>Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Россия

<sup>3</sup>Иркутский научный центр Сибирского отделения РАН, г. Иркутск, Россия

<sup>4</sup>Иркутский институт химии им. Фаворского Е. А., г. Иркутск, Россия

O. A. Nozhkina<sup>1</sup>, A. I. Perfileva<sup>1</sup>, A. V. Dyakova<sup>2</sup>,  
I. A. Graskova<sup>1,3</sup>, B. G. Sukhov<sup>4,3</sup>

<sup>1</sup>Siberian Institute of plant physiology and biochemistry SB, Irkutsk, Russia

<sup>2</sup>Irkutsk state university, Irkutsk, Russia

<sup>3</sup>Irkutsk scientific center of the Siberian branch of the RAS, Irkutsk, Russia

<sup>4</sup>A. E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry SB RAS, Irkutsk, Russia

E-mail: smallolga@mail.ru

**Аннотация**

В качестве потенциальных экологически безопасных средств оздоровления растений картофеля от бактериального заболевания, вызываемого *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, были изучены новые наноконпозиты селена, инкапсулированные в природные оболочки крахмала и каррагинана, а также, их воздействие на почвенные бактерии *Rhodococcus erythropolis*. Результаты проведенных экспериментов показали, что НК селена и крахмала обладает бактериостатическим

---

© О. А. Ножкина, А. И. Перфильева, А. В. Дьякова, И. А. Граскова, Б. Г. Сухов, 2019

\* Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации для молодых ученых № МК-1220.2019.11, а также грантом РФФИ и Правительства Иркутской области № 17-416-380001.

эффектом на *Cms*. Действие НК селена и каррагинана оказалось стимулирующим на *Cms*. Возможно рассматривать использование НК селен и крахмал как средство для оздоровления картофеля с экологически безопасным воздействием.

### Abstract

As a potential environmentally safe means of healing potato plants from bacterial disease caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*Cms*), new selenium nanocomposites (NC) encapsulated in natural starch and carrageenan sheaths have been studied, as well as their effects on soil bacteria *Rhodococcus erythropolis* (*R. erythropolis*). The results of the experiments showed that the NC of selenium and starch has a bacteriostatic effect. The action of NC selenium and carrageenan was stimulating. It is possible to consider the use of selenium and starch as a means of improving potatoes with environmentally friendly effects.

Картофель является универсальной сельскохозяйственной кормовой и производственной культурой во многих странах мира и, как и все многие сельскохозяйственные культуры, подвержен бактериальным заболеваниям [1]. Например, кольцевая гниль картофеля, вызываемое бактерией *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*Cms*), являющейся во многих странах карантинным и уничтожает до 40 % собранного урожая. Типичные симптомы у инфицированных растений некроз листьев, увядание, загнивание клубней картофеля как при хранении, так и при выращивании. Бактерии способны сохранять жизнеспособность в различных условиях при помощи образования биопленок, что во многом затрудняет борьбу с ними [2]. Поэтому целью нашей работы стали поиски новых безопасных средств защиты растений картофеля. Таким средствами выступили нанокomпозиты селена (НК).

В работе использовались бактерии *Cms* штамма Ас 1405, полученные из Всероссийской микробиологической коллекции г Пушкино; бактерии *Rhodococcus erythropolis*, выделенные из эндо- и ризосферы растений пос. Тыреть, Иркутская область; растения картофеля *in vitro* сорт Лукьяновский (восприимчивый к инфекциям сорт картофеля). Так же в работе использовались, синтезированные институтом химии им. Фаворского Е. А., НК селена и крахмала (12 % Se) НК селена и каррагинана (2 % Se). Для синтеза НК селена и крахмала (НК Se/Кр) был взят готовый препарата крахмала («Sigma Aldrich», USA) [4]. Для создания НК селена и каррагинана (НК Se/Кар) использовали каррагинан марки WR (78 (1800 кДа) («СР Celco», Дания). Все вещества хорошо растворимы в воде. Для экспериментов использовали растворы НК пересчитанные на селен с итоговой концентрацией 0,000625 % Se. Исследования для выявления влияния НК на жизнеспособность бактерий *Cms* проводили с помощью метода определения оптической плотности бактериальной суспензии. Бактерии *Cms* инкубировали с НК в те-

чении 72 часов. По результатам эксперимента было выявлено, что НК Se/Кр и НК Se/Кар обладают бактериостатическим эффектом, а также снижают способность бактерий образовывать биопленки.

Влияние НК на растения проверяли, отслеживая изменения биометрических показателей: прирост растений, количество листьев, влияние на массу вегетативной части растений и корней, а также активность фермента пероксидазы в тканях листьев. Для проведения эксперимента в среду роста растений вносили 100 мкл НК и инкубировали в течении 26 суток. Было показано, что рост и количество листьев растений, по сравнению с контролем, при добавлении обоих НК увеличивался (рис. 1, А, Б).

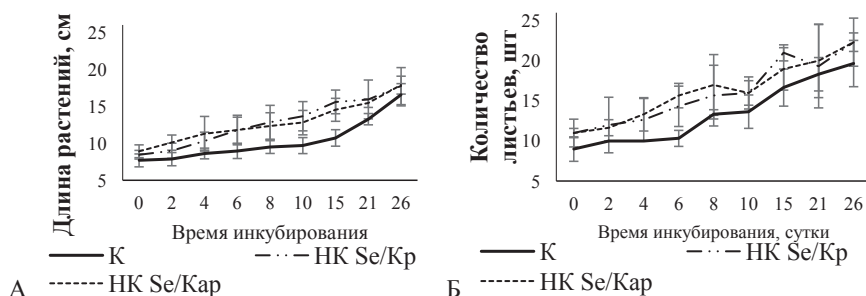


Рис. 1. Воздействие НК селена и каррагинана (НК Se/Кар) и НК селена и крахмала (НК Se/Кр) на прирост растений картофеля *in vitro* (А) и количество листьев (Б) (К — контрольные растения картофеля; НК Se/Кар — растения картофеля + НК Se/Кар; НК Se/Кр — растения картофеля + НК Se/Кр)

Так же были проведены эксперименты по накоплению селена в тканях растений картофеля после обработки НК при помощи стандартной методики рентгеновского спектрального энергодисперсионного микроанализа (РСЭДМА). Результаты исследования показали, что селен, после обработки картофеля НК, в тканях растений не накапливается, что не мало важно, так как в чистом виде он токсичен [6].

Следующим этапом работы стало изучение влияния НК на рост и развитие почвенных бактерий *R. erythropolis* с целью исключить негативное влияние на почвенные бактерии. Исследования показали, что при инкубировании бактерий родококка с НК в течении 72 часов, не проявилось негативного эффекта. При рассмотрении показателя биопленкообразования (рис. 2, Б), было выявлено, что НК не оказывали негативного влияния на исследуемый показатель.

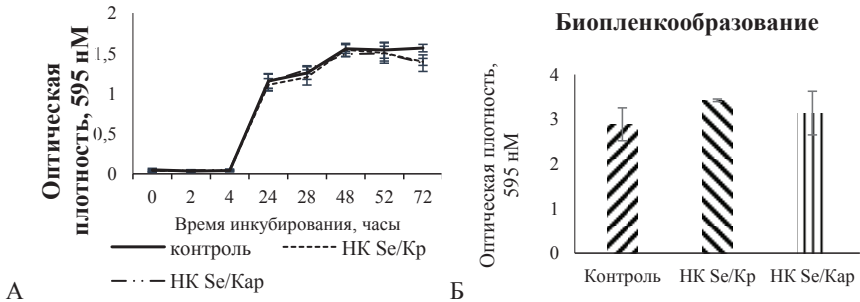


Рис. 2. Влияние НК Se/Кр и НК Se/Кр + НК Se/Кр на биопленкообразование (Б) и на жизнеспособность (А) *R. erythropolis* (Контроль – *R. erythropolis*, НК Se/Кр — *R. erythropolis* + НК Se/Кр, НК Se/Кр + НК Se/Кр — *R. erythropolis* + НК Se/Кр)

Таким образом, на основе полученных данных можно предположить использование НК Se/Кр в качестве стимулятора роста для растений, а НК Se/Кр как одно из потенциальных экологически безопасных средств для оздоровления растений картофеля.

## Литература

1. Иванюк В. Г., Банадысев С. А., Журомский Г. К. Защита картофеля от болезней, вредителей и болезней // Мн.: Белпринт, 2005, 696 с.
2. Шафикова Т. Н., Омеличкина Ю. В., Еникеев А. Г., Бояркина С. В., Гвильдис Д. Э., Семенова А. А., Живетьев М. А. Влияние фталатов растений на рост и биопленкообразование биотрофных и некротрофных фитопатогенных бактерий // сборник научных статей по материалам X Международного симпозиума «Фенольные соединения. Фундаментальные и прикладные аспекты», М., 2018. С. 392–395.
3. Донченко А. С., Шкиль Н. Н., Бурмистров В. А. Применение препаратов, содержащих наночастицы металлов в ветеринарии // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. Животноводство и ветеринария, 2019, 49.1. С. 59–67.
4. Перфильева А. И., Ножкина О. А., Граскова И. А., Сидоров А. В., Лесничая М. А., Александрова Г. П., Долма Г., Клименов И. В., Сухов Б. Г. Синтез нанокомпозитов селена и серебра и их влияние на фитопатогенную бактерию *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* // Известия Академии наук. Серия химическая. 2018. № 1. С. 157–163.
5. Papkina A. V., Perfileva A. I., Zhivet'yev M. A., Borovskii G. B., Graskova I. A., Klimentov I. V., Lesnichaya M. V., Sukhov B. G., Trofimov B. A. Complex Effects of Selenium-Arabinogalactan Nanocomposite on both Phytopathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* and Potato Plants // Nanotechnologies in Russia. 2015. V. 10. № 5–6. P. 484–491.
6. Карпова Е. А., Демиденко О. К., Ильина О. П. К вопросу о токсичности препаратов на основе наноселена // Вестник КрасГАУ, № 4, 2014. С. 207–210

## СОЗДАНИЕ ПАЦИЕНТ-СПЕЦИФИЧНЫХ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ОТ БОЛЬНЫХ СО СПИНАЛЬНОЙ МЫШЕЧНОЙ АТРОФИЕЙ III ТИПА

### GENERATION OF SPINAL MUSCULAR ATROPHY TYPE III PATIENT-DERIVED INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS

В. С. Овечкина<sup>1,2</sup>, К. Р. Валетдинова<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Федеральный исследовательский центр,  
Институт цитологии и генетики СО РАН

<sup>2</sup> Национальный медицинский

исследовательский центр им. акад. Е. Н. Мешалкина

<sup>3</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

V. S. Ovechkina<sup>1,2</sup>, K. R. Valetdinova<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics, SB RAS

<sup>2</sup> Meshalkin National Medical Research Centre

<sup>3</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS

#### Аннотация

Спинальная мышечная атрофия (СМА) — группа тяжёлых наследственных заболеваний, характеризующихся дегенерацией двигательных нейронов спинного мозга с последующей атрофией поперечнополосатой мышечной ткани. Несмотря на то, что генетические основы патогенеза СМА хорошо изучены, точные молекулярные механизмы развития заболевания до сих пор остаются невыясненными. Изучение патологических процессов, происходящих в дефектных нейронах, затруднительно по причине невозможности их получения безопасным и неинвазивным способом из организма пациента, а постморальные нейроны дают представление только о терминальной стадии заболевания. Для решения данных проблем были созданы клеточные модели СМА на основе ИПСК, которые позволяют моделировать заболевания на разных этапах нейральной дифференцировки.

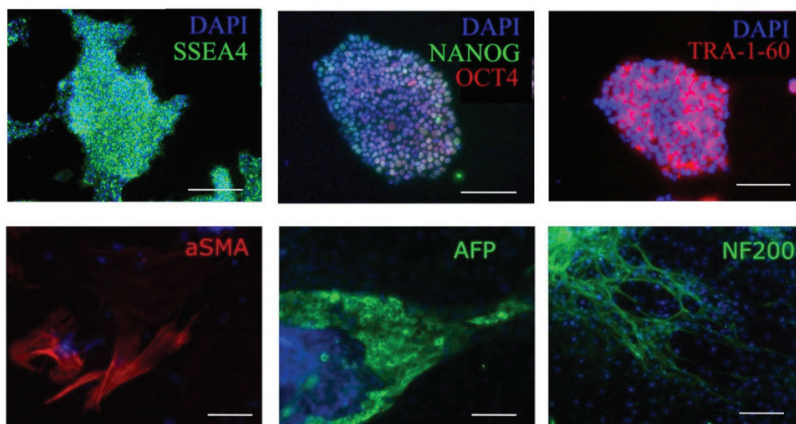
#### Abstract

Spinal muscular atrophy (SMA) is a group of hereditary disease, characterized by degeneration of motor neurons in the spinal cord that leads to atrophy of striated muscles. Despite the well-studied genetic basis of SMA, molecular mechanisms of SMA develop-



ment become unclear. Research of pathological processes occurring into defecting neurons is difficult because of inability to obtain these neurons from patient with SMA. On the other hand, postmortal neurons show only terminal stage of the disease. To solve these problems we generated SMA III type patient induced pluripotent stem cells and expect they allow simulating the disease on the different stage of the neural differentiation.

Spinal muscular atrophy (SMA) is an autosomal recessive neuromuscular disorder characterized by proximal muscle weakness due to degeneration of motor neurons in the spinal cord. SMA is a leading genetic cause of infant death (Sugarman et al., 2012). The disease caused by deletion of a *SMN1* (survival motor neuron 1) gene, that encodes full-length SMN protein indispensable for axonal growth and mRNA splicing. Substantial part of patients has one or more copies of a paralogue gene, *SMN2* (survival motor neuron 2), which results in reduced expression of full-length SMN protein, that makes a *SMN2* gene basic for disease modifying (Monani et al., 1999). The most perspective platform to investigate degeneration processes in specific motor neurons is patient-derived induced pluripotent stem cells (iPSCs). Here we describe the IPS cell model that represent the least severe type of SMA — SMA type III. In this study, we obtained blood mononuclear cells (lymphocytes and monocytes) from a patient with SMA type III and reprogrammed them with episomal vectors, encoding *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, *L-MYC*, *LIN28* and *Trp53*. All iPSCs lines represented morphology of embryonic stem cells with flat colonies on feeder that proliferated actively and had a high nucleus to cytoplasm ratio.



Characterization of SMA type III iPSCs. Scale bar is 200  $\mu$ m

All iPSCs stained positive for the pluripotency markers *SSEA-4*, *OCT4*, *NANOG* and *TRA-1-60*. *In vitro* differentiation in embryonic bodies and further immunostaining with followed markers revealed cell's ability to differentiate into three germ layers. We used smooth muscle actin (aSMA) as a mesodermal marker, alfa-fetoprotein (AFP) as an endodermal marker and neurofilament 200 (NF200) as an ectodermal marker. Episomal vectors were spontaneously lost at an approximately 25 passage, and there was no presence of mycoplasma during the cultivation.

In the next part of our work, we consider a differences in SMN expression between SMA types I, III and control iPSC lines. Patient-derived cells, except SMA type III, were obtained and described in previous experiments (Valetdinova K. R., 2016). Genome of a patient with SMA type III contains 3 copies of *SMN2* gene, while genome of a patient with SMA type I has only 2 copies of *SMN2* and represents the most severe type of the disease (Kolb, Kissel, 2015). All lines were involved into motor neuron differentiation (Du et al., 2015) with follow stages: motor neuron precursors, non-mature motor neurons and mature motor neurons.

At first, we performed a comparative characteristic of full-length- and non-full-length SMN transcription via real time polymerase chain reaction (RT-PCR). Analysis revealed decreased level of full-length SMN transcript in non-mature and mature motor neurons compared with the control line ( $p < 0,05$ ) and increased level compared with the SMA type I line in iPSCs and motor neuron precursors ( $p < 0,05$ ). Non-full-length SMN transcript level was evidently increased in SMA type III line compared with control cell line ( $p < 0,05$ ) that can be associated with amplification of *SMN2* gene copies. Western blot analysis revealed increased SMN protein level in SMA type III iPSCs compared with SMA type I and control iPSCs ( $p < 0,05$ ).

We generated a patient-derived SMA III iPSCs representing all characteristics of stem cells: producing pluripotency markers, ability to differentiate into three germ layers and no absence of episomal vectors on the 20<sup>th</sup> passages. This cell line coincides with literally data on the SMN transcription and expression level. SMA type III iPSCs can be used as a model cell line in further experiments.

## References

1. Du, Z. W., Chen, H., Liu, H., Lu, J., Qian, K., Huang, C. T. L., ... Zhang, S. C. (2015). Generation and expansion of highly pure motor neuron progenitors from human pluripotent stem cells. *Nature Communications*, 6, 1–9.
2. Kolb, S. J., & Kissel, J. T. (2015). Spinal Muscular Atrophy. *Neurologic Clinics*, 33(4), 831–846.

- 
3. Monani, U. R., Lorson, C. L., Parsons, D. W., Prior, T. W., Androphy, E. J., Burghes, A. H. M., & McPherson, J. D. (1999). A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene *SMN1* from the copy gene *SMN2*. *Human Molecular Genetics*, 8(7), 1177–1183.
  4. Sugarman, E. A., Nagan, N., Zhu, H., Akmaev, V. R., Zhou, Z., Rohlf, E. M., ... Allitto, B. A. (2012). Pan-ethnic carrier screening and prenatal diagnosis for spinal muscular atrophy: Clinical laboratory analysis of >72 400 specimens. *European Journal of Human Genetics*, 20(1), 27–32.
  5. Valetdinova, K. R. Spinal muscular atrophy model system based on induced pluripotent stem cells: Abstract dis. ... Ph.D. in Biology: 03.02.07. Novosibirsk, 2016.

## НАНОКОМПОЗИТ СЕЛЕНА И АРАБИНОГАЛАКТАНА КАК СРЕДСТВО ОЗДОРОВЛЕНИЯ КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ\*

NANOCOMPOSITE OF SELENIUM AND ARABINOGALACTAN AS A MEANS OF REHABILITATION OF CULTIVATED PLANTS

А. И. Перфильева<sup>1</sup>, О. А. Ножкина<sup>1</sup>, А. В. Дьякова<sup>2</sup>, А. Г. Павлова<sup>2</sup>,  
И. А. Граскова<sup>1</sup>, Б. Г. Сухов<sup>3</sup>, Б. А. Трофимов<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН

<sup>2</sup>Иркутский государственный университет

<sup>3</sup>Иркутский институт химии СО РАН

A. I. Perfilieva<sup>1</sup>, O. A. Nozhkina<sup>1</sup>, A. V. Dyakova<sup>2</sup>,  
A. G. Pavlova<sup>2</sup>, I. A. Graskova<sup>1</sup>, B. G. Sukhov<sup>3</sup>, B. A. Trofimov<sup>3</sup>,

<sup>1</sup>Siberian Institute of plant physiology and biochemistry SB RAS

<sup>2</sup>Irkutsk state University

<sup>3</sup>Irkutsk Institute of chemistry SB RAS

### Аннотация

Представлены результаты исследования биологической активности нанокон-  
позита селена и арабиногалактана (НК Se/Ag), полученного путем химического  
синтеза. Показано, что НК Se/Ag обладает выраженным бактерицидным или бак-  
териостатическим эффектом к фитопатогену картофеля *Clavibacter michiganensis*  
ssp. *sepedonicus*. При этом НК Se/Ag не оказывал негативного влияния на вегетацию  
растений картофеля *in vitro* двух сортов (Луговской и Лукьяновский), контрастных  
по устойчивости к патогенам. Выявлено, что селен не накапливается в картофеле  
после обработки композитом. НК Se/Ag не оказывал негативного влияния на пред-  
ставителя почвенной микрофлоры бактерию *Rhodococcus erythropolis*. Полученные  
результаты позволяют рассматривать НК Se/Ag в качестве потенциального эколо-  
гически безопасного агента для оздоровления сельскохозяйственных растений от  
патогенных бактерий.

---

© А. И. Перфильева, О. А. Ножкина, А. В. Дьякова, А. Г. Павлова, И. А. Граскова,  
Б. Г. Сухов, Б. А. Трофимов, 2019

\* Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации для молодых  
ученых № МК-1220.2019.11, а также грантом РФФИ и Правительства Иркутской  
области № 17-416-380001.

### Abstract

The results of the study of the biological activity of selenium and arabinogalactan nanocomposite (NC Se/Ag) obtained by chemical synthesis are presented. NC Se/Ag has been shown to have a pronounced bactericidal or bacteriostatic effect on potato phytopathogen *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. NC Se/Ag does not negatively impact the growing season of potato plants *in vitro* of two varieties of (Lugovskoy and Lukyanovsky), contrasting in resistance to pathogens. It was revealed that selenium does not accumulate in potatoes after treatment with composite. NC Se/Ag did not have a negative impact on the representatives of soil microflora of bacteria *Rhodococcus erythropolis*. The results obtained allow us to consider NC Se/Ag as a potential environmentally safe agent for the recovery of agricultural plants from pathogenic bacteria.

Нанотехнологии активно внедряются в различные аспекты хозяйственной деятельности человека, в частности в сельское хозяйство, однако в фитопатологии наноматериалы практически не применяются. Мониторинг инфекционного фона сельскохозяйственных угодий России свидетельствует о неблагоприятной ситуации, сложившейся в последние годы наблюдений. Благодаря изменению климата ареал обитания фитопатогенных микроорганизмов расширяется. При этом отсутствуют эффективные и к тому же экологически безопасные агенты для оздоровления культурных растений от возбудителей заболеваний. В качестве потенциальных агентов для этой цели нами исследовались нанокompозиты (НК) селена в природной полимерной матрице — арабиногалактане, выделенном из Лиственницы Сибирской (*Larix sibirica*). НК интересны своей структурной конструкцией, которая представляет собой биоактивные наночастицы Se, диспергированные в полимерную матрицу, безопасную для живых организмов и разлагаемую экзоферментами бактерий. Предполагается, что при обработке растений такими НК, фитопатогенные бактерии будут погибать, однако растение при этом не пострадает, а, возможно, будет наблюдаться даже положительный эффект на растения.

Цель работы — изучить влияние НК селена и арабиногалактана (6.4 % Se) по отношению к возбудителю кольцевой гнили картофеля — бактерии *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, растениям картофеля *in vitro*, а также к почвенному микроорганизму *Rhodococcus erythropolis*.

Синтез нанокompозита Se с арабиногалактаном (НК Se/Ag) проводили в Иркутском институте химии СО РАН окислением бис(2-фенилэтил)фосфинодиселенофосфината натрия пероксидом водорода в водном растворе арабиногалактана. Содержание Se в НК составило 6.4 %. Для экспериментов использовали водные растворы НК, в которых содержание Se составляло 0,000625 %.

На первом этапе работы было показано антибактериальное влияние НК на бактерию *Cms*. С применением витальных красителей, красителя Эванс

голубой, высева колониеобразующих единиц на твердую питательную среду и с использованием метода колодцев показано бактерицидное влияние НК в природных матрицах на бактерию, вызывающую кольцевую гниль картофеля. Кроме того, обработка бактерий композитами изменяла жирно-кислотный состав бактериальной клетки, ингибировала био пленкообразование, негативным образом влияла на поглощение бактериями кислорода. Показано прикрепление наночастиц селена к поверхности бактериальной клетки, что, по-видимому, приводит к нарушению ее мембранного потенциала, и, как следствие, гибели бактерии.

Для рассмотрения НК в качестве потенциальных агентов оздоровления растений от заболеваний важно изучить их воздействие не только на микроорганизмы, но и на растительный организм. Эксперименты проводились на растениях картофеля *in vitro* двух сортов, контрастных по устойчивости к патогенам: Луговской — устойчивый и Лукьяновский — восприимчивый. Растения размножали с помощью черенкования и выращивали на питательной среде Мурасиге — Скуга в течение 20 сут. Далее в жидкую среду культивирования растения вносили водный раствор НК. Растения инкубировали 18 сут., отслеживая каждые 2 сут. биометрические показатели (длину растений и количество листьев, длину междоузлий, массу корней и массу надземной части).

Результаты экспериментов по влиянию НК на вегетацию картофеля показали, что обработка НК Se/Ag не оказывала негативного влияния на биометрические показатели картофеля при наблюдении в течение 26 сут. Независимо от сорта картофеля НК Se/Ag стимулировал прирост растений в течение всего периода наблюдения. Эффект воздействия НК наиболее ярко был выражен у устойчивого сорта картофеля Луговской. Вероятно, НК способствовали повышению защитных механизмов растения. Анализ количества листьев у картофеля восприимчивого сорта Лукьяновский показал, что первые 10 сут. наблюдения обработка растений НК Se/Ag несколько снижала исследуемый показатель, однако дальнейшее наблюдение не выявило какого либо эффекта, количество листьев было на уровне контроля. У растений устойчивого сорта Луговской НК на протяжении всего периода наблюдения стимулировали образование листьев. При этом не наблюдался «эффект вытягивания» растений. В конце эксперимента нами была определена биомасса надземной части растений и их корней. Выявлено, что НК Se/Ag стимулировал образование корней у картофеля восприимчивого сорта Лукьяновский по сравнению с контролем. Такой эффект НК, по-видимому, может быть связан с воздействием наночастиц, а также наличием у арабиногалактана биологической активности, которая, возможно, приводит к стимуляции прироста биомассы растений.

Для выявления наличия стрессового состояния у растений при их обработке НК Se/Ag, было исследовано изменение активности одного из наиболее показательного стрессового фермента — пероксидазы. Было обнаружено, что активность фермента значительно у растений восприимчивого сорта Лукьяновский не изменялась после влияния НК. Активность пероксидазы повышалась в тканях растений устойчивого сорта Луговской. Полученный результат может быть объяснен именно различной устойчивостью сортов, устойчивый сорт быстро реагирует на стрессовый фактор, повышая активность фермента и запуская защитные механизмы в организме растения, при этом восприимчивый сорт реагирует на внешние воздействия гораздо медленнее, что приводит к большей поражаемости патогенами и иными стрессовыми факторами.

Далее проверили накопление Se в тканях картофеля после обработки НК. Для этого нами были проведены исследования тканей картофеля на содержание Se методом рентгеновского спектрального энергодисперсионного микроанализа спустя 2 сут. после обработки. Анализировалось наличие и количество в пробах следующих биогенных элементов: С, О, N, P, Mg, также анализировалось наличие и содержание Se. В контрольных растениях, в растениях обработанных НК Se/Ag не было выявлено Se. Вероятно, его содержание очень низкое, даже ниже предела определения метода.

Важным аспектом применения НК в реальной практике является их безопасность для окружающей среды. В связи с этим нами проведена серия опытов по изучению влияния изучаемых НК на жизнеспособность почвенных бактерий *Rhodococcus erythropolis*. Было изучено наличие бактериостатического эффекта в изучаемых НК по отношению к родококку. Согласно результатам, НК Se/Ag в точке наблюдения 28 ч по сравнению с контролем несколько снижал прирост бактерий, однако в остальных точках проявление бактериостатического эффекта не наблюдается. Таким образом, исследуемые НК не обладали бактериостатическим эффектом. Кроме того, с применением метода диффузии в агар нами не было обнаружено бактерицидного влияния исследуемые НК на родококк. Притом, не было выявлено воздействия НК на важнейшую способность для бактерий — образовывать биопленки. Показано, что НК не оказывал негативного эффекта на биопленкообразование родококка.

Таким образом, исследуемый НК обладает выраженным бактерицидным или бактериостатическим эффектом к фитопатогену *Cms*, стимулирует рост растений и не влияет на почвенную микрофлору. Полученные результаты позволяют рассматривать НК Se/Ag в качестве потенциального экологически безопасного агента для оздоровления сельскохозяйственных растений от патогенных бактерий.

## ИЗМЕНЕНИЕ ДИНАМИЧЕСКОЙ ВЯЗКОСТИ РАСТВОРОВ ПОЛИ-3-ГИДРОКСИБУТИРАТА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ РАСТВОРОВ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ ПОЛИМЕРА

О. Д. Петровская

*ФГАОУ ВО Сибирский федеральный университет*

O. D. Petrovskaya

*SibFU, Russia*

### **Аннотация**

Полигидроксиалканоаты (ПГА) — термопластические полиэфиры, синтезируемые различными бактериями в качестве внутриклеточного запасного материала в условиях лимитирования роста питательными элементами. В работе исследована реология растворов разных концентраций двух образцов поли-3-гидроксибутирата с низкими и высокими молекулярно-массовыми характеристиками.

### **Abstract**

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are thermoplastic polyesters synthesized by various bacteria as intracellular reserve material under conditions of growth restriction by nutrients. The rheology of solutions of different concentrations of two samples of poly-3-hydroxybutyrate with low and high molecular weight characteristics was studied.

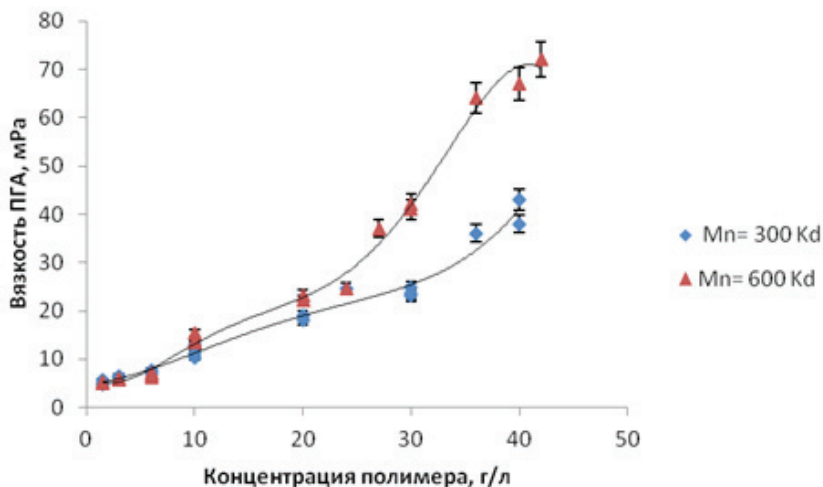
Полигидроксиалканоаты (ПГА) являются перспективными полиэфирами, вырабатываемыми бактериями при аэробной ферментации различных источников углерода [1]. Производство полигидроксиалканоатов в будущем сыграет огромную роль в развитии медицины (использование биополимера в качестве биорезорбируемого материала для создания транспортной системы доставки лекарств), сельского хозяйства в качестве депонированной формы удобрений, пестицидов, гербицидов в виде гранулированных, прессованных и пленочных форм [2]. Для получения специализированных полимерных изделий из растворов необходимы знания основных реологических свойств таких полимерных систем. Наиболее значимым параметром растворов служит динамическая вязкость, которая характеризует не только



реологию растворов и смешивание компонентов, но также определяет характеристики переноса массы и тепла в структуре системы полимер-растворитель [3].

Целью работы является изучение влияния различных концентраций ПГА двух образцов полимера с низкими и высокими молекулярно-массовыми характеристиками на динамическую вязкость растворов.

Для исследования взяты два образца ПГА с низкой молекулярной массой  $M_n = 300$  Kd, и высокой молекулярной массой  $M_n = 600$  Kd. Приготовлены растворы из данных образцов, в которых концентрация ПГА менялась от 1,5 г/л до 40 г/л. Вязкость полимера определяли с помощью вискозиметра VISCOSTARplus. Измерения проводились при температуре 20 °С (температура поддерживалась с помощью циркуляционного термостата). Растворителем являлся дихлорметан. Результаты исследования приведены на рисунке.



Изменение вязкости ПГА в различных концентрациях растворов при высоких и низких молекулярных массах полимера

При концентрации полимера до 20 г/л значения вязкости растворов с низкой молекулярной массой ( $M_n = 300$  Kd) и высокой молекулярной массой ( $M_n = 600$  Kd) отмечены различные показатели вязкости. При концентрации полимера до 10 г/л значения вязкости растворов с различной молекулярной массой не отличались. При концентрации полимера 20 г/л значение

вязкости низкомолекулярного раствора полимера составило 18 мПа, высокомолекулярного — 24 мПа соответственно. С увеличением концентрации растворов до 30 г/л, вязкость раствора с низкой молекулярной массой составила 24 мПа, а с высокой молекулярной массой — 40 мПа. При концентрации 40 г/л вязкость низкомолекулярного полимера составила 38 мПа, вязкость высокомолекулярного — 67 мПа.

Вследствие больших размеров макромолекул и значительного межмолекулярного взаимодействия процесс растворения полимеров и свойства их разбавленных растворов имеют характерные особенности, по которым растворы полимеров отличаются от растворов низкомолекулярных соединений, как истинных, так и коллоидных. Как уже указывалось выше, растворению полимеров всегда предшествует набухание, и растворы полимеров, особенно линейных, имеют высокую вязкость. При одинаковой концентрации вязкость раствора полимера всегда выше, чем вязкость коллоидного и истинного растворов низкомолекулярного соединения, что объясняется зависимостью вязкости раствора от молекулярной массы [4].

Таким образом, проведенные исследования показывают, что образцы полимера с низкими и высокими молекулярно-массовыми характеристиками влияют на динамическую вязкость растворов и данное влияние усиливается с увеличением концентрации ПГА в растворах. Исследования в данном направлении позволят определять молекулярно-массовые характеристики ПГА с помощью вискозиметра при получении специализированных полимерных изделий.

## Литература

1. Samori Chiara Extraction of polyhydroxyalkanoates from mixed microbial cultures: impact on polymer quality and recovery/ Chiara Samori, Federica Abbondanzi, Paola Galletti, Loris Giorgini, Laura Mazzocchetti, Cristian Torri, Emilio Tagliavini // *Bioresource Technology*. 2015. Vol. 189. P. 195–202.
2. Шершнева А. М. Конструирование микрочастиц на основе резорбируемых полимеров Биопластоган с применением метода распылительной сушки/ А. М. Шершнева, Е. И. Шишацкая // *Journal of Siberian Federal University. Biology* 2. 2014. P. 195–208.
3. Гончаров Д. Б. Реология растворов полигидроксиканоатов/ Д. Б. Гончаров, А. Г. Суковатый // *Journal of Siberian Federal University. Biology* 2.-2016.-P. 190–197.
4. Технология переработки полимеров. Физические и химические процессы : учебное пособие для вузов / М. Л. Кербер [и др.] ; под редакцией М. Л. Кербера. 2-е изд., испр. и доп. М. : Издательство Юрайт, 2018. 316 с.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРЕПАРАТА  
С АНТИОКСИДАНТНЫМИ СВОЙСТВАМИ  
НА МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ ОРГАНИЗМА**

STUDY OF THE EFFECT OF A PREPARATION WITH ANTIOXIDANT  
PROPERTIES ON THE METABOLIC PROCESSES OF THE ORGANISM

О. Г. Позднякова

*ФГБОУ ВО Кузбасская государственная сельскохозяйственная академия*

O. G. Pozdnyakova

*Kuzbass state agricultural academy, Russia*

**Аннотация**

Охарактеризована проблема гиповитаминозов среди населения и способ её решения. Представлена рецептура разработанного препарата. Приведены результаты исследований, подтверждающих эффективность использования препарата. Установлена возможность профилактического применения препарата в целях снижения риска формирования хронической патологии, в основе которой лежит накопление избыточной свободно радикальной активности.

**Abstract**

The problem of hypovitaminosis among the population and the method of its solution are characterized. Presented the formulation of the developed drug. The results of studies confirming the effectiveness of the drug. The possibility of prophylactic use of the drug in order to reduce the risk of the formation of chronic pathology, which is based on the accumulation of excess free radical activity, has been established.

На сегодняшний день остро стоит проблема гиповитаминозов как среди взрослого, так и детского населения, в связи с чем оптимизированные витаминные комплексы приобретают большое практическое значение с нутрицевтической и общеклинической точки зрения [1]. Использование комплекса витаминов А и Е, как основных жирорастворимых антиоксидантов, обусловлено их синергетическим эффектом, относительно друг друга. Их синергетический эффект затрагивает аспекты биологического действия в от-

ношении сосудистой стенки и эпителиальных тканей. Учитывая высокую подверженность организма оксидативному воздействию, как экзогенного, так и эндогенного происхождения, наличие антиоксидантов в повседневном рационе является доказанной необходимостью. Оксидативный стресс во многом определяет развитие и поддержание хронических заболеваний. Регулярный прием комплекса антиоксидантных витаминов способен это предотвратить. В этой связи, на базе научно-образовательного центра «Переработка сельскохозяйственного сырья и пищевые продукты» Кузбасской государственной сельскохозяйственной академии и научно-производственного объединения «Арт Лайф» (г. Томск) разработан препарат, который может быть использован в качестве профилактического средства в отношении оксидативного стресса. В состав разработанного препарата входят витамины С, Е и провитамин А, с одной капсулой препарата в организм поступает 100 % требуемого количества антиоксидантных витаминов. В табл. 1 представлена рецептура активного комплекса, разработанного препарата, в пересчете на 1 желатиновую капсулу, массой 0,66 г.

*Таблица 1***Рецептура активного комплекса разработанного препарата**

№	Наименование компонентов	Содержание, мг
1	Красное пальмовое масло	432
2	Аскорбиновая кислота	70
3	Токоферола ацетат 98 %	15,3
4	Аскорбил пальмитат	10
5	Бета-каротин 98 %	5,1

Нами была поставлена гипотеза, что включение разработанного препарата в рацион добровольцев занимающихся профессиональной деятельностью в условиях психофизической нагрузки позволит уменьшить выраженность оксидативность процессов.

Разработанные рецептура и технология апробированная на предприятиях компании «Арт Лайф», сертифицированных в рамках требований международных стандартов серии ISO 9001, 22000 и правил GMP, что обеспечивает стабильность качества производимой продукции и ее конкурентоспособность. Препарат прошёл клинические исследования, которые были проведены доктором медицинских наук, профессором Букреевой Е. Б. в городской больнице № 3, г. Томск.

В исследовании приняли участие 40 волонтеров, 20 в контрольной группе и 20 в опытной. Опытная группа принимала разработанный препарат в течение 30 дней. Повышенный уровень продукции перекисного окисления липидов, характеризующий высокую свободно-радикальную активность, имел место у 100 % волонтеров основной и контрольной групп, при этом резонным было предположить наличие полиэтиологической основы этого состояния. Следовательно, неспецифическая антиоксидантная протекция требовалась всем волонтерам.

Косвенно об интенсивности метаболических процессов свидетельствует динамика микроциркуляция при тесте нажатия на ногтевое ложе (табл. 2).

Таблица 2

**Динамика микроциркуляции у волонтеров на фоне приема препарата, по данным теста нажатия на ногтевое ложе**

Показатель	Опытная группа		Контрольная группа		Уровень значимости различий	
	До	После	До	После	До	После
Скорость кровотока, с	2,3±0,4	1,7±0,2*	2,2±0,3	1,9±0,2	0,21	0,048

Примечание. \* $p < 0,05$  по сравнению с исходным показателем в группе.

Из данных табл. 2 видно, что применение препарата улучшает микроциркуляцию крови. Исходя из этого, можно указать на возможность профилактического применения препарата в целях снижения риска формирования хронической патологии, в основе которой лежит накопление избыточной свободно радикальной активности, особенно в условиях, когда человек подвержен нагрузкам в процессе систематического труда.

### Литература

1. Позняковский В. М. Пищевые ингредиенты и биологически активные добавки / В. М. Позняковский, О. В. Чугунова, М. Ю. Тамова. М.: ИНФРА М, 2017. 143 с.

**КОНСТРУИРОВАНИЕ ГЕТЕРОЛОГИЧНОЙ СИСТЕМЫ  
ЭКСПРЕССИИ ГЕНА ПРОТЕИНАЗЫ  
НА ОСНОВЕ ДРОЖЖЕЙ *PICHELIA PASTORIS* \***

**DESIGN OF A HETEROLOGICAL EXPRESSION SYSTEM  
OF PROTEASE GENE BASED ON THE YEAST *PICHELIA PASTORIS***

Д. С. Пудова, Ю. А. Васильева, М. Р. Шарипова

*Казанский (Приволжский) федеральный университет*

D. S. Pudova, Y. A. Vasilyeva, M. R. Sharipova

*Kazan (Volga Region) Federal University, Russia*

E-mail: [dasha171711@gmail.com](mailto:dasha171711@gmail.com)

**Аннотация**

Протеолитические ферменты гидролизуют белки до коротких пептидов и аминокислот и широко используются в качестве кормовых добавок для сельскохозяйственных животных и птиц. Тем не менее, в настоящее время ведется постоянный поиск новых протеиназ и эффективных систем экспрессии для лучшего производства этих важных ферментов. В данном исследовании мы сообщаем о создании гетерологической системы экспрессии гена протеиназы в клетках метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris*. Последовательность гена *aprBp*, кодирующего субтилизиноподобную протеиназу *Bacillus pumilus* 3-19, оптимизирована и клонирована в дрожжевой вектор pPINK-LC под контролем индуцибельного промотора AOX1 и двух разных сигнальных пептидов — сигнальной последовательности гена лизоцима из *Gallus gallus* и киллер-белка из *Saccharomyces cerevisiae*. В результате были получены рекомбинантные штаммы *P. pastoris* с кодон-оптимизированным геном бактериальной протеиназы, которая стабильно экспрессировалась и секретировалась в культуральную среду дрожжей.

**Abstract**

Proteolytic enzymes hydrolyze proteins to short peptides and amino acids and are extensively used as feed additives for farm animals and birds. However, currently a constant search for new proteases and efficient expression systems for better production of these

---

© Д. С. Пудова, Ю. А. Васильева, М. Р. Шарипова, 2019

\* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-16-04062.

important enzymes. In this study, we report on the creation of a heterological system for the expression of protease gene in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. The sequence of the *aprBp* gene encoding the subtilisin-like proteinase of *Bacillus pumilus* 3-19 was optimized and cloned into the yeast vector pPINK-LC under the control of the inducible promoter AOX1 and two different signal peptides — the signal sequence of the lysozyme gene from *Gallus gallus* and killer-protein from *Saccharomyces cerevisiae*. As a result, recombinant *P. pastoris* strains were obtained with a codon-optimized bacterial proteinase gene, which was stably expressed and secreted into the yeast culture medium.

Протеиназы — это ферменты класса гидролаз, которые благодаря своим свойствам заинтересовали множество исследователей из различных областей науки. Повышенное внимание к данной группе ферментов обусловлено востребованностью и широким использованием протеиназ в медицине, лабораторных исследованиях и промышленности. В настоящее время актуальной задачей для биотехнологии является упрощение и снижение стоимости промышленного производства ферментов, в частности протеиназ. Одним из решений данной проблемы является создание устойчивой системы экспрессии ферментов на основе дрожжей *Pichia pastoris*. Именно эти эукариотические системы экспрессии все чаще используются для производства рекомбинантных белков, как прокариот, так и эукариот. Метилотрофные дрожжи *P. pastoris* являются безопасными для человека и животных, обладают низкой потребностью в питании и способны осуществлять большинство посттрансляционных модификаций, необходимых для биологически активного рекомбинантного белка. Обширный выбор промоторов, селективных маркеров и сигнальных пептидов позволяет исследователям оптимизировать эту систему для получения большого количества активного продукта, а легкость в культивировании заметно удешевляют процесс получения гетерологичных белков.

Субтилизиноподобная протеиназа *Bacillus pumilus* 3-19, кодируемая геном *aprBp*, является экзоферментом, обладает широкой субстратной специфичностью и проявляет максимальную активность при температуре 37 °С и pH 9 [Шарипова с соавт., 2002, Михайлова, 2007]. Благодаря своим свойствам сериновая протеиназа *B. pumilus* 3-19 является кандидатом для использования её в качестве кормовой добавки для сельскохозяйственных птиц и животных.

Для получения экспрессии субтилизиноподобной протеиназы в эукариотических клетках дрожжей провели лигирование оптимизированного гена *aprBp* с дрожжевым вектором. В работе использовали низкокопийный дрожжевой вектор pPINK-LC, в состав которого входит индуцибельный промотор AOX1, и сигнальные пептиды киллер-белка *Saccharomyces cerevisiae*

и лизоцима *Gallus gallus*. Клонирование конструкций pPINK-LC/aprBp осуществляли в клетках *E.coli* DH5 $\alpha$ . В результате ПЦР и рестрикционного анализа колоний трансформантов нами получено 2 конструкции дрожжевого вектора pPINK-LC, содержащего сигнальный пептид белка лизоцима и 3 конструкции вектора pPINK-LC, содержащего сигнальный пептид киллер-белка, под контроль которых клонировали ген субтилизиноподобной протеиназы *B. pumilus*.

С целью избежать расщепления целевого гетерологичного белка в процессе экспрессии в работе использовали штамм дрожжей PichiaPink № 4 с двумя делетированными генами протеиназ — *pep4* и *prb1*. Клетки дрожжей трансформировали полученными конструкциями, скрининг осуществляли на 5–7 день после трансформации. Эффективность трансформации для конструкций pPINK-LC/aprBp/sp.lysozyme составила 826 нг/мг, для конструкций pPINK-LC/aprBp/sp.killer — 831 нг/мг. ПЦР-анализ рекомбинантных колоний подтвердил наличие оптимизированного гена субтилизиноподобной протеиназы в геноме дрожжей *P. pastoris*. Внеклеточное накопление рекомбинантного белка подтверждали с помощью белкового электрофореза и измерения протеолитической активности по гидролизу специфического субстрата Z-Ala-Ala-Leu-pNa. Максимальная активность фермента под контролем сигнального пептида лизоцима составляла 3 Ед/мг, под контролем сигнального пептида киллер-белка — 6 Ед/мг. Таким образом, в результате трансформации получили рекомбинантные колонии дрожжей *P. pastoris*, в геном которых интегрирован ген субтилизиноподобной протеиназы *B. pumilus* 3-19 под контролем сигнальных пептидов киллер-белка и лизоцима.

## Литература

1. Михайлова, Е. О. Выделение и характеристика субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus intermedius*, секретируемой рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* aj 73 на разных фазах роста бацилл [Текст] / Е. О. Михайлова, А. М. Марданова, Н. П. Балабан, Г. Н. Руденская, М. Р. Шарипова // Биохимия. 2007. Т. 2. С. 228–235.
2. Шарипова, М. Р. Гидролитические ферменты и спорообразование у *Bacillus intermedius* [Текст] / М. Р. Шарипова, Н. П. Балабан, Л. А. Габдрахманова, М. А. Шилова, Ю. М. Кадырова, Г. Н. Руденская, И. Б. Лещинская // Микробиология. 2002. Т. 71. 494–499 с.



## СОЗДАНИЕ ТРАНСГЕННЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ТАНДЕМНЫХ ПОВТОРОВ\*

### CREATING TRANSGENIC CELL LINES TO STUDY THE INSTABILITY OF TANDEM REPEATS

Я. В. Пурвиньш, И. Р. Иматдинов, И. В. Грищенко

*ФБУН Государственный научный центр вирусологии  
и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора*

Y. V. Purvinsh, I. R. Imatdinov, I. V. Grishchenko

*SRC VB “Vector”, Russia*

E-mail: purvinsh\_yav@vector.nsc.ru

#### **Аннотация**

Синдром ломкой X-хромосомы является экспансионным заболеванием, которое развивается в результате экспансии (ЦГГ)<sub>n</sub> повторов в 5'-НТО гена *FMRI*. Это приводит к гиперметилованию промотора и прекращению экспрессии данного гена. В ходе работы были созданы клеточные модели, которые позволят оценить влияние активной транскрипции и репарации, связанной с транскрипцией на нестабильность повтора (ЦГГ)<sub>n</sub>.

#### **Abstract**

The Fragile X syndrome is repeat expansion disorders that develops as a result of the expansion (CGG)<sub>n</sub> repeats in the 5'-UTR of the *FMRI* gene. It leads to hypermethylation of the promoter and termination of the expression of this gene. In the course of the work, cell models were created that will allow us to evaluate the effect of active transcription and transcription-coupled repair on repeat instability (CGG)<sub>n</sub>.

Экспансия повторов является мутацией, в результате которой происходит многократное увеличение числа копий коротких повторенных последовательностей ДНК. Данная мутация приводит к развитию более 30 нейродегенеративных заболеваний человека, таких как болезнь Гентингтона, боковой амиотрофический склероз, синдром ломкой X-хромосомы и др. Механизм

экспансии повторов остается неизвестным, а заболевания, связанные с ней, неизлечимыми. Существует ряд гипотез, описывающих возможные модели развития этой мутации, но на данный момент не существует ни одной доказанной теории. Целью нашего исследования было создание клеточной модели, которая позволила бы оценить влияние активной транскрипции и репарации, связанной с транскрипцией на нестабильность повтора (ЦГГ)<sub>n</sub>. Экспансия данных триплетов в 5'-НТО гена *FMR1* приводит к нарушению экспрессии этого гена и развитию синдрома ломкой X-хромосомы — самой распространенной формы наследственной умственной отсталости у человека.

В результате работы были получены 5 трансгенных клеточных линий на основе клеток НЕК293А, которые могут быть использованы в качестве модели синдрома ломкой X-хромосомы. Для этого были синтезированы фрагменты ДНК, содержащие (ЦГГ)<sub>n</sub> повтор различной длины, методом ГЦ-богатой ПЦР. Затем осуществляли клонирование полученных фрагментов в плазмидные векторы под индуцируемый промотор TRE, который обеспечивает транскрипцию зеленого флуоресцентного белка GFP. Генетические конструкции также обеспечивали конститутивную экспрессию красного флуоресцентного белка dsRedExpress, необходимую для оценки эффективности трансфекции и отбора целевых клеток. Селекцию трансфицированных клеток проводили с помощью проточной цитофлуориметрии. Таким образом, были получены трансгенные клеточные линии с контролируемой транскрипцией через (ЦГГ)<sub>n</sub> повтор. Данные линии можно использовать в качестве модели для изучения влияния активной транскрипции на нестабильность повтора (ЦГГ)<sub>n</sub>, склонного к экспансии.

**ИЗМЕНЕНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ПУЛА СОВМЕСТИМЫХ ВЕЩЕСТВ ШТАММА *CHROMOHALOBACTER SP. N1* В ОТВЕТ НА ОСМОТИЧЕСКИЙ И ГИПЕРТЕРМИЧЕСКИЙ СТРЕССЫ\***

**CHANGE OF COMPATIBLE SOLUTES INTRACELLULAR POOL OF THE *CHROMOHALOBACTER SP. N1* IN RESPONSE TO OSMOTIC AND HYPERTHERMAL STRESSES**

А. А. Пьянкова<sup>1</sup>, А. А. Горбунов<sup>2</sup>, Л. Н. Ананьина<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия*

<sup>2</sup>*Институт технической химии — филиал ФГБУН ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия*

A. A. Pyankova<sup>1</sup>, A. A. Gorbunov<sup>2</sup>, L. N. Anan'ina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS, Perm, Russia*

<sup>2</sup>*Institute of Technical Chemistry UB RAS, Perm, Russia*

**Аннотация**

Исследовано изменение доли эктоина в пуле совместимых веществ клеток штамма *Chromohalobacter sp. N1* в зависимости от солености среды культивирования и температуры. Установлено, что увеличение осмолярности среды культивирования приводило к возрастанию доли эктоина, в то время как при повышении температуры имел место обратный эффект.

**Abstract**

The change in the ectoine fraction in the pool of compatible solutes of the *Chromohalobacter sp. N1* strain cells of the depending on the salinity of the culture medium and temperature was investigated. It was found that an increase in the temperature of cultivation led to an increase in the fraction of ectoine, while with an increase in temperature, the opposite effect took place.

---

© А. А. Пьянкова, А. А. Горбунов, Л. Н. Ананьина, 2019

\* Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ и Министерства образования и науки Пермского края в рамках проекта № 17-44-590178.

Бактерии рода *Chromohalobacter* выделены из высокоминерализованных биотопов различных эколого-географических зон мира. Для выживания в подобных условиях бактерии поддерживают осмотический баланс, как правило, за счет синтеза *de novo* «совместимых веществ», основным из которых является эктоин, имеющий широкий спектр использования. На настоящий момент нет сведений о патогенности бактерий этой таксономической группы, они не требуют сложных питательных сред и условий культивирования и потому являются перспективными для применения в биотехнологии в качестве продуцентов совместимых соединений. Целью настоящей работы являлось изучение пула совместимых соединений штамма *Chromohalobacter* sp. N1, выделенного из высокоминерализованного экотопа района промышленных разработок Верхнекамского месторождения солей и филогенетически близкородственного виду *Ch. japonicus* 43<sup>T</sup> (AB105159), в условиях высокой осмолярности среды культивирования и повышенных температур.

Культивирование штамма проводили в 100 мл минеральной среды Раймонда [1] с глюкозой (1 г/л) в качестве источника углерода и энергии в колбах объемом 250 мл на орбитальном шейкере УВМТ-12-250 при 100 об/мин при следующих условиях: в присутствии 50 г/л хлорида натрия до фазы стационарного роста при 28 °С, 37 °С и 40 °С; в присутствии 50, 100, 150 г/л хлорида натрия до фазы стационарного роста при 28 °С. Экстракцию органических соединений из клеток проводили согласно методике, описанной Schubert et al. [2]. Для изучения состава этанольных клеточных экстрактов бактерий был использован метод спектроскопии ЯМР <sup>1</sup>H, применяемый для анализа смесей органических соединений разных химических классов, на приборе Bruker Avance Neo 400 (400 МГц). Идентификацию сигналов в спектре проводили сравнением химических сдвигов и констант спин-спинового взаимодействия с таковыми аутентичных образцов и в спектрах органических веществ из базы данных Biological Magnetic Resonance Data Bank (<http://bmr.b.wisc.edu>), а также путем внесения веществ в пробу.

Установлено, что увеличение температуры культивирования с 28 °С до 40 °С приводило к снижению доли эктоина и возрастанию доли других органических соединений в клеточных экстрактах исследуемого штамма. Наиболее высокая доля дополнительных соединений (78.7%) была отмечена в этанольных клеточных экстрактах штамма *Chromohalobacter* sp. N1 при температуре культивирования 40 °С, что сопровождалось снижением доли эктоина до 21.3%. Увеличение концентрации хлорида натрия в среде культивирования с 50 г/л до 150 г/л приводило к снижению доли дополнительных соединений в этанольных клеточных экстрактах штамма *Chromohalobacter* sp. N1 с 36.0% до 20.7%.

---

Полученные данные могут служить основой для разработки условий культивирования штамма *Chromohalobacter* sp. N1 с целью биотехнологического производства эктоина.

### Литература

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. 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.

**НОВОЕ СОЕДИНЕНИЕ НА ОСНОВЕ ПИРИДОКСИНА  
И ТЕРБИНАФИНА ДЛЯ ТЕРАПИИ  
СМЕШАННЫХ БИОПЛЕНОК *S. AUREUS* И *C. ALBICANS* \***

A NEW COMPOUND BASED ON PYRIDOXIN AND TERBINAFIN  
FOR THE THERAPY OF MIXED *S.AUREUS* AND *C.ALBICANS* BIOFILMS

А. Э. Сабирова, Р. С. Павельев, М. Р. Гарипов, А. Р. Каюмов

*КФУ, Институт фундаментальной медицины и биологии*

A. E. Sabirova, R. S. Pavelyev, M. R. Garipov, A. R. Kayumov

*KFU, Institute of Fundamental Medicine and Biology*

**Аннотация**

В Центре фармацевтики Казанского федерального университета было синтезировано соединение KFU-127 на основе пиридоксина (витамина В6) и тербинафина. KFU-127 проявляет как антибактериальную, так и противогрибковую активность, в том числе против микроорганизмов, внедренных в биопленку, и представляет собой многообещающий антисептик для местного применения.

**Abstract**

A compound designed as KFU-127 based on pyridoxine (vitamin B6) and terbinafine has been synthesized in the Center of Pharmaceuticals of Kazan Federal University. KFU-127 demonstrates both antibacterial and antifungal activities including biofilm-embedded microorganisms and represents a promising antiseptic for topical application.

В настоящее время во всем мире существует глобальная проблема антибиотикорезистентности патогенов. Чрезвычайную устойчивость придают микробам биопленки — сообщества микробных клеток, погруженные в, так называемый, полисахаридный матрикс. Бактерии в составе биопленки особенно устойчивы к биоцидам, антибиотикам и иммунной системе человека. Биопленки представляют большую проблему в медицине. Они могут образовываться в очагах инфекций дыхательных и мочевыводящих путей, также могут образовываться как на неповрежденных участках тела человека, так и в ранах, покрывать поверхности катетеров, искусственных имплантантов, протезов и т. д. Но есть еще одна проблема. Если мы имеем дело с поли-

микробной биопленкой, состоящей из бактерий и кандиды, то на данный момент ни один из препаратов на рынке не даст положительного результата. Так как известные антисептики эффективны лишь против бактерий, но не действуют против кандиды например, также и наоборот, противогрибковое средство не действует против бактерий. Плюс ко всему к аптечным препаратам выработалась устойчивость у некоторых штаммов бактерий и грибов, что сильно затрудняет терапию инфекционных заболеваний. В связи с этим — поиск новых эффективных соединений является актуальной задачей современной фармацевтики.

Поэтому в НОЦ Фармацевтики КФУ на основе пиридоксина (витамина В<sub>6</sub>) и тербинафина было синтезировано соединение под условным названием KFU-127. Это соединение в своей структуре совмещает, во-первых, четвертичную аммониевую соль (фрагмент антисептиков), во-вторых, пиридоксин (витамин В<sub>6</sub>), триазольное кольцо (фрагмент тербинафина-противогрибкового средства). В конечном итоге получается продукт 2 в 1, совмещающий в себе и антисептик и противогрибковый препарат (по литературным данным подобных разработок еще нет). На рынке существуют аналоги по отдельным структурам KFU-127 (из антисептиков: мирамистин с достаточно высокой ценой, бензалкония хлорид и хлоргесдин; из противогрибковых препаратов: известные флуконазол и тербинафин) и по некоторым пока что изученным параметрам наше исследуемое вещество превосходит другие.

**Целью** работы было оценить антибактериальную активность, безопасность и установить молекулярную мишень соединения KFU-127. Соединение по антибактериальной активности сравним с референтными антисептиками. Помимо антибактериальной активности соединений против планктонных клеток, исследовалось еще и против клеток в составе биопленок. Чтобы снизить рост клеток стафилокока в составе монобиопленки на 3 порядка (с 10 в 8 до 5 степени) — чем и определяется терапевтический эффект, KFU-127 нужно использовать в концентрации 8МБК, а бензалкония хлорида примерно в 1,5 раза больше. Аналогично, чтобы снизить рост кишечной палочки на 3 порядка, KFU-127 нужно примерно в концентрации 12 МБК, а бензалкония хлорид не снижает на 3 порядка вообще. В случае мономикробной биопленки *C. albicans* терапевтический эффект KFU-127 достигается при концентрации 25 мг/мл, тербинафина нужно в 2 раза больше — 50 мг/мл, флуконазола — 100. В составе полимикробной биопленки KFU-127 также демонстрирует преимущество по сравнению с контрольными соединениями.

Далее мы исследовали влияние соединения на проницаемость клеточной мембраны, как у бактерий, так и у кандиды. У бактерий наблюдалось понижение мембранного потенциала, но значения оказались гораздо ниже

по сравнению с контрольным соединением, в случае же кандиды, наоборот, под действием KFU-127 и бензалкония хлорида мембранный потенциал оставался практически неизменным, в отличие от воздействия тербинафина. И так, мы предположили, что у KFU-127 помимо клеточной мембраны может быть еще одна, дополнительная, клеточная мишень. После идентификации белков, мы обнаружили повышенную индукцию и репрессию некоторых ферментов. Сопоставив данные ферменты с метаболической картой, можно предположить, что действие соединения в большей степени затрагивает пути гликолиза и цикла Кребса. Также и у *S.aureus* и у *E.coli* обнаружили повышенную индукцию двух ферментов (гистидинкиназы и глутаматдекарбоксилазы), и примечательно то, что именно пиридоксаль выступает в качестве кофактора у данных ферментов. И возможно, именно это и является дополнительной молекулярной мишенью исследуемого производного пиридоксина.

В дальнейшем мы провели предварительные исследования соединения на ДНК-повреждающую и мутагенную активность. В SOS-хромотесте использовали контрольные вещества для сравнения, в том числе и перекись водорода, в результате ни одно соединение не показало ДНК-повреждающего эффекта. В тесте Эймса превышения количества ревертантов не наблюдалось, соответственно, мутагенной активности тоже не было обнаружено.

Таким образом, KFU-127 является новым потенциальным эффективным антисептиком, совмещающим в себе антибактериальную и антимикотическую активность, и в дальнейшем может быть использован в терапии смешанных биопленок, состоящие из стафилококков и кандид.



**БИОЧИП ДЛЯ БЫСТРОГО ДИАГНОСТИЧЕСКОГО  
ТЕСТИРОВАНИЯ МОНОГЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ  
В ЭТНИЧЕСКИХ ПОПУЛЯЦИЯХ\***

DNA MICROARRAY FOR RAPID DIAGNOSTICS  
OF MONOGENIC DISEASES IN ETHNIC POPULATIONS

М. Т. Саввина, Н. Р. Максимова, А. Л. Сухомясова,  
П. И. Голикова, А. Л. Данилова

*Учебно-научная лаборатория «Геномная медицина» клиники медицинского  
института, ФГАОУ ВО Северо-Восточный федеральный университет*

M. T. Savvina, N. R. Maksimova,  
A. L. Sukhomyasova, P. I. Golikova, A. L. Danilova

*North-Eastern federal university, Medical School,  
laboratory of Genomic Medicine*

E-mail: mira@savv.in

**Аннотация**

Генетические особенности человека определяются его принадлежностью к этнической группе и географическому региону. Среди широкого спектра генетических заболеваний особое место занимают моногенные заболевания, которые, не смотря на низкую частоту отдельных видов, являются довольно распространенной формой наследственной патологии человека. Остро стоит необходимость проведения профилактических мер по снижению генетического груза в республике Саха (Якутия), которое возможно путем проведения массового молекулярно-генетического скрининга населения. Для данного типа болезней возможна прямая диагностика на уровне анализа структурных изменений последовательностей в молекуле ДНК. Существующие в настоящее время методы генетической диагностики ограничивают число проводимых исследований в виду ресурсозатратности и продолжительности проведения одного анализа. Одним из перспективных методов ДНК-диагностики, позволяющий проводить анализ сразу по нескольким точкам мутаций одномоментно является ана-

---

© М. Т. Саввина, Н. Р. Максимова, А. Л. Сухомясова, П. И. Голикова, А. Л. Данилова, 2019

\* Работа была выполнена при поддержке гранта «Федеральная целевая программа «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» № 14.575.21.0015.

лиз на ДНК-биочипах, который существенно снижает продолжительность и себестоимость проведения анализа. Нами разработан ДНК-биочип для выявления мутаций в генах *CUL7*, *NBAS*, *FAH*, *DIA1* и *GJB2*, которые являются причиной возникновения пяти наследственных болезней, распространенных в якутской этнической группе: 3-М синдрома, SOPH-синдрома, тирозинемии 1 типа, наследственной энзимопенической метгемоглобинемии I типа, наследственной несиндромальной глухоты 1А типа соответственно.

### Abstract

Genetic components of an individual are determined by an ethnic group and a geographic region he belongs to. Among a wide range of genetic diseases, a special place is taken by monogenic diseases, which, despite the low frequency of certain species, are a fairly common form of human hereditary pathology. High incidence and high prevalence of hereditary diseases in ethnic group of population (Yakuts) of republic of Sakha (Yakutia) has been reported by several research groups. The frequencies of occurrence of some of the diseases are much higher comparing to data in other regions of Russia and the worldwide. There is a pressing need for prevention of those diseases through the mass genetic screening of population. The methods of genetic diagnostics that are known today are not able to afford the mass screening due to the high cost and time consumption for a single test. One of promising technologies and methods of DNA diagnostics is DNA microarray. It enables researchers to quickly screen large numbers of biological analytes for a variety of purposes including disease diagnostics. A DNA chip comprises of an array of microscopic "spots" each carrying numerous single-stranded (ss) oligonucleotides of known sequence known as probes. In this study we developed a DNA microarray for detection of mutations in genes *CUL7*, *NBAS*, *FAH*, *DIA1*, *GJB2* genes which are known to be cause of five very frequently occurring hereditary diseases in republic of Sakha (Yakutia) : 3-M syndrome, SOPH-syndrome, Tyrosinemia type 1, Methaemoglobinaemia type 1, Nonsyndromic hearing loss and deafness (DFNB1) type 1A respectively.

Данные проведенных многолетних медико-генетических исследований в области наследственных болезней населения Республики Саха (Якутия) показали на накопление мажорных мутаций, характерных для якутской этнической группы, во много раз превышающие частоты в мировых популяциях. Эти исследования дополнены демографическими сведениями, свидетельствующими о достаточно высоком уровне изоляции, что обуславливает высокую гомогенность популяции [1]. Наследственные заболевания не излечимы и единственным способом снижения частоты данных заболеваний является их профилактика. Для осуществления их диагностики на практике в настоящее время используются методы ДНК-диагностики, основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени и ПЦР-ПДРФ. К сожалению, современные методы рутинной ДНК-диагностики не позво-

ляют широко их внедрить в программы скрининга населения из-за сложности, дороговизны и длительности выполнения анализов. Задача, на решение которой направлено заявленное изобретение, является создание способа одновременной диагностики наследственных заболеваний, наиболее часто встречаемых заболеваний среди якутской популяции.

Одним из перспективных методов ДНК-диагностики, позволяющим одновременно проводить анализ сразу по нескольким точкам мутаций является анализ на ДНК-биочипах, который также имеет высокую экспрессность и достоверность получаемых результатов [2, 3].

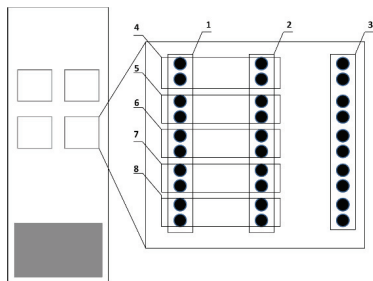
В настоящий момент нами изготовлен прототип тест-систем для основе ДНК-биочипа с иммобилизованными на его поверхности олигонуклеотидными мишенями, включающий детекцию точковых мутаций в генах *CUL7*, *NBAS*, *DIA1*, *FAH* и *GJB2*, вызывающих 3М синдром, SOPH синдром, наследственную энзимопеническую метгемоглобинемию 1 типа, тирозинемию 1 типа и наследственную несиндромальную глухоту 1А типа, соответственно. Из них две болезни были описаны нами впервые в мире: новый синдром наследственной аутосомно-рецессивной низкорослости в якутской популяции с распространенностью 9,95 на 100 тыс. якутов, среди детского населения –30,8 и SOPH-синдром — синдром низкорослости с атрофией зрительных нервов и пельгеровской аномалией лейкоцитов Разработанная тест-система позволит в кратчайшие сроки проводить ДНК-диагностику на носительство наследственных заболеваний с высокой частотой встречаемости в якутской популяции.

Принцип работы биочипа построен на реакции обратной гибридизации флуоресцентно меченных зондов. Методика была разработана по аналогии разработанной и запатентованной коллегами из ООО «Вега» группы компаний «Алкор Био» тест-системы для выявления мутаций в гене *CTFR* «муковцидоз-биочип» [4,5].

Биочип разделен на четыре эквивалентных поля (см. рисунок). Каждое поле содержит пять наборов мишеней: аллели дикого типа, мутантного типа, и контрольную полосу по каждому мутациям, соответствующие пяти наследственным заболеваниям: 3-М синдрома, SOPH-синдрома, тирозинемии 1 типа, наследственной энзимопенической метгемоглобинемии 1 типа, наследственной несиндромальной глухоты 1А типа. Мишени в каждом поле дублируются.

Способ диагностики включает следующие стадии:

- 1) проведение двухстадийной мультиплексной ПЦР с использованием специфичных для каждого участка генов праймеров и флуоресцентно меченых праймеров для второй стадии ПЦР продуктом которого являются флуоресцентно меченные одноцепочечные фрагменты ДНК;



Топологическая схема биочипа: 1 — Набор 5 мишеней в дубликатах дикого типа, 2 — набор 5 мишеней в дубликатах мутантного типа, 3 — Набор контрольных мишеней, 4 — Мишени для детекции мутации 4582insT в гене *CUL7*. (дикий и мутантный тип), 5 — Мишени для детекции мутации 5741G/A в гене *NBAS* (дикий и мутантный тип), 6 — Мишени для детекции мутации 1090G>C в гене *FAH* (дикий и мутантный тип), 7 — Мишени для детекции мутации P269L в гене *DIA1* (дикий и мутантный тип) 8 — Мишени для детекции мутации IVS1+1G>A в гене *GJB2* (дикий и мутантный тип)

- 2) проведение реакции гибридизации полученных продуктов ПЦР;
- 3) обработку результатов анализов с помощью сканера для регистрации флуоресцентных сигналов с гибридизованных на биочипе ампликонов;
- 4) интерпретация результатов.

Разработанный нами способ ДНК-диагностики в будущем может стать альтернативным методом выявления носительства этих редких в мире, но очень часто встречающихся у якутов наследственных болезней, и имеющий преимущество перед классическими методами в скорости и затратах ресурсов для проведения диагностики.

Планируется расширение диагностической панели с включением других часто встречающихся заболеваний. Используя данный подход возможно масштабировать проект на другие этнические популяции Российской Федерации, отягощенные наследственными заболеваниями.

По данному способу диагностики получен Патент РФ «Способ одновременной диагностики наследственных заболеваний» № 2627115 от 03.08.2017 г.

## Литература

1. Пузырев В. П., Максимова Н. Р. (2008). Наследственные болезни у якутов. Генетика. **44**, 1308–1314.

- 
2. Heller MJ (2002) DNA microarray technology: devices, systems, and applications. Annual review of biomedical engineering. 4, 129–53.
  3. Peeters JK1, Van der Spek PJ. Growing applications and advancements in microarray technology and analysis tools. (2005). Cell Biochemistry and Biophysics. 43, 149–66.
  4. Павлов А. Е., Апалько С. В., Воробьев Е. В. (2012) Молекулярно-генетическая диагностика муковисцидоза в формате микрочипа. Лаборатория. 4, 16–19.
  5. Воробьев Е. В. (2014) Способ идентификации вызывающих муковисцидоз мутаций в гене CFTR человека, набор праймеров, биочип, набор мишеней и тест-система, используемые в способе. Федеральная служба по интеллектуальной собственности. RU229717

**РАЗРАБОТКА ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА ТЕРМОСТАБИЛЬНОЙ  
ЭСТЕРАЗЫ БАКТЕРИИ *UREIBACILLUS THERMOSPHERICUS*  
ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В РЕАКЦИЯХ  
ЭНАНТИОСЕЛЕКТИВНОГО ГИДРОЛИЗА \***

DEVELOPMENT OF STRAIN PRODUCING THERMOSTABLE ESTERASE  
FROM *UREIBACILLUS THERMOSPHERICUS* FOR APPLICATION  
IN ENANTIOSELECTIVE HYDROLYSIS REACTIONS

Ю. В. Самойлова<sup>1</sup>, К. Н. Сорокина<sup>1,2</sup>, В. Н. Пармон<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН ФИЦ Институт катализа им. Г.К. Борескова СО РАН

<sup>2</sup>Новосибирский национальный исследовательский государственный  
университет

Y. V. Samoylova<sup>1</sup>, K. N. Sorokina<sup>1,2</sup>, V. N. Parmon<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Borokov Institute of Catalysis SB RAS, Russia

<sup>2</sup>Novosibirsk State University, Russia

E-mail: samoylova.jv@catalysis.ru

**Аннотация**

В работе была проведена коэкспрессия рекомбинантной термостабильной эстеразы estUT1 бактерии *Ureibacillus thermosphaericus* в присутствии триггерного фактора психрофильной бактерии *Devosia psychrophila*. Полученный в результате коэкспрессии фермент был протестирован в реакции гидролиза (*R,S*)-этилкетопрофена и показал высокую каталитическую эффективность в отношении (*S*)-кетопрофена.

**Abstract**

In this study the recombinant thermostable esterase estUT1 from *Ureibacillus thermosphaericus* was co-expressed with trigger factor of psychrophilic bacteria *Devosia psychrophila*. The esterase obtained was tested in the hydrolysis reaction of (*R,S*)-ketoprofen ethyl ester and showed high catalytic efficiency towards (*S*)-ketoprofen.

Термостабильные липолитические ферменты (липазы и эстеразы) нашли широкое применение в качестве биокатализаторов различных промыш-

ленных процессов, в том числе реакций тонкого органического синтеза для получения оптически чистых фармацевтических интермедиатов. Основным недостатком их применения является высокая стоимость получения ферментов, связанная, в том числе, с низкой продукцией ферментов из-за образования телец включения при их экспрессии.

В данной работе для повышения продукции термостабильной рекомбинантной эстеразы estUT1 бактерии *U. thermosphaericus* в клетках *E. coli* BL21(DE3) впервые была проведена ее коэкспрессия с триггерным фактором психрофильной бактерии *Devosia psychrophila*. Для конструирования плазмиды, экспрессирующей ген триггерного фактора *D. psychrophila*, была использована плаزمида pBB540. При оценке влияния триггерного фактора *D. psychrophila* на выход эстеразы esUT1 была проведена оптимизация условий их совместной экспрессии в отношении продолжительности и температуры индукции, а также концентрации индуктора (ИПТГ). Оптимальный уровень коэкспрессии estUT1 и триггерного фактора достигался при концентрации ИПТГ 0,5 мМ, времени индукции 20 ч и температуре 16 °С. В результате оптимальные условия коэкспрессии позволили увеличить активность эстеразы estUT1 в растворимой фракции клеточного лизата более, чем в 9 раз — с 25,4 до 230,2 ЕА/мг.

Стабильность фермента является важным показателем для его использования в промышленных процессах. Было установлено, что исследуемая эстераза estUT1 отличается высокой стабильностью в широком диапазоне значений pH (5,0–9,0) и температур (50–70 °С). Таким образом полученная в работе эстераза estUT1 была исследована в качестве биокатализатора реакции энантиоселективного гидролиза (*R,S*)-этилкетопрофена для получения (*S*)-кетопрофена — интермедиата, применяемого для производства лекарственных препаратов.

Были определены оптимальные условия ферментативного гидролиза (*R,S*)-этилкетопрофена. Наибольшая активность эстеразы estUT1 наблюдалась при pH 8,0 и температуре 50 °С, а оптимальное время реакции составило 24 ч. Также оценивали влияние различных органических растворителей, ПАВ и ионных жидкостей на активность эстеразы estUT1. Было установлено, что наибольшее положительное влияние на фермент оказывал 10 об.% раствор ионной жидкости [Bmim][HSO<sub>4</sub>]. Энантиомерный избыток (е<sub>р</sub>) (*S*)-кетопрофена составил 15,5%, а относительная активность эстеразы увеличилась более, чем в два раза. Исследование кинетических параметров эстеразы estUT1 в реакции гидролиза этилового эфира (*R,S*)-кетопрофена выявило высокое показание каталитической эффективности ( $k_{\text{cat}}/K_M = 234,4 \text{ с}^{-1}\text{мМ}^{-1}$ ) по сравнению с другими известными бактериальными эстеразами.

Таким образом, в работе было показано увеличение продукции эстеразы *U. thermosphaericus* в результате коэкспрессии с триггерным фактором бактерии *D. psychrophila*. Высокая активность и стабильность эстеразы, а также высокое значение каталитической эффективности при получении (*S*)-кетопрофена позволит эффективно применять ее в различных промышленных процессах, в том числе в составе биокатализаторов энантиоселективного гидролиза.



## ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КОБЫЛЬЕГО И ВЕРБЛЮЖЬЕГО МОЛОКА В СОЗДАНИИ ПРОДУКТОВ СПОРТИВНОГО ПИТАНИЯ

THE POSSIBILITY OF USING MARE AND CAMEL MILK  
IN THE CREATION OF SPORTS NUTRITION PRODUCTS

Х. С. Сарсембаев<sup>1,2</sup>, Ю. А. Синявский<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Алматинский технологический университет

<sup>2</sup>Казахская академия питания

Kh. S. Sarsembayev<sup>1</sup>, Y. A. Synyavskiy<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Almaty Technological University, Kazakh Academy of Nutrition

<sup>2</sup>Kazakh Academy of Nutrition

Email: husein.a14@gmail.com

### Аннотация

Вопрос создания новых специализированных спортивных продуктов питания является очень актуальным на сегодняшний день. Употребление спортивного питания восстанавливает организм после тяжелых тренировок и соревнований, и активирует анаболические процессы, и обеспечивает организм незаменимыми факторами питания.

### Abstract

The issue of creating new specialized sports food products is very relevant today. The use of sports nutrition restores the body after hard training and competition, and activates anabolic processes, and provides the body with indispensable nutritional factors.

На данный момент стоит актуальный вопрос разработки специализированных продуктов питания для людей, ведущих активный образ жизни. Специализированные пищевые продукты для питания спортсменов — это, отдельная группа пищевых продуктов с заданной пищевой и энергетической ценностью, при разработке таких продуктов обязательно учитывается вид спорта и фазы спортивной деятельности, а также индивидуальные особенности спортсмена. Также специализированные продукты могут быть

представлены в оптимальном ассортименте, который будет иметь сочетание пищевых веществ, удовлетворяющее требованиям, описанным выше [1–4]. Спортивное питание является добавкой к обычному суточному рациону, поэтому рациональное и полноценное питание должно лежать в основе питания спортсмена. Специализированные продукты должны покрывать затраты организма после тренировок или соревнований и быстро восстанавливаться, поэтому такие продукты содержат белки, углеводы, витаминно-минеральные комплексы, антиоксиданты, аминокислоты и т. д.

Настоящее исследование посвящено разработке новых видов спортивного питания на основе нетрадиционного сырья, отличающегося высокой пищевой биологической ценностью. Новизна представленной разработки заключается в создании абсолютно нового в рецептурном и технологическом аспекте сухого продукта для спортивного питания.

В работе использованы физико-химические методы оценки готового продукта, а также оценены показатели безопасности, включая токсикологическую и микробиологическую безопасность готовой продукции.

При разработке рецептуры и технологии нового вида спортивного питания нами в качестве основы было взято сухое кобылье и верблюжье молоко, отличающееся уникальностью своего химического состава, что подтверждено данными по химическому составу.

Ниже приведены данные аминокислотного состава нативного кобыльего и верблюжьего молока, а также их физико-химические показатели (табл. 1 и 2).

Из приведенных данных в таблицах 1 и 2 видно, что кобылье и верблюжье молоко обладает высокой биологической ценностью и может быть рекомендовано для производства специализированных продуктов для спортсменов. Также кобылье молоко является альбуминовым и поэтому не вызывает аллергии у людей с непереносимостью молока. Кобылье молоко также богато витаминами групп А, D, E, F, С, В, что благоприятно влияет на организм. Верблюжье молоко также, как и кобылье является альбуминовым и содержит витамины группы С, В, А, D, E, К.

Наряду с вышеуказанными показателями, следует отметить, что кобылье и верблюжье молоко отличается повышенным содержанием в нем полиненасыщенных жирных кислот, а кобылье молоко не содержит трансизомеров жирных кислот и холестерина.

Нами была разработана рецептура сухой смеси для спортивного питания на основе кобыльего и верблюжьего молока с добавлением биологически активных ингредиентов, которые позволяют быстро восстановить организм после тренировок и соревнований, а также повысить иммунитет, антиоксидантные, микробиоценозномализующие и детоксицирующие функции организма.

Таблица 1

**Аминокислотный состав кобыльего и верблюжьего молока**

<b>Незаменимые аминокислоты</b>		
<b>Аминокислоты</b>	<b>Количество, в %</b>	
	Кобылье	Верблюжье
Лизин	181	375
Лейцин	170	539
Фенилаланин	223	164
Треонин	106	165
Валин	100	330
Метионин	63	138
Изолейцин	114	290
Триптофан	30	55
Сумма незаменимых аминокислот	987	2056
<b>Заменимые аминокислоты</b>		
Аланин	138	126
Аргинин	133	180
Аспарагиновая кислота	179	225
Гистидин	54	33
Серин	114	248
Глутаминовая кислота	288	581
Пролин	125	290
Глицин	44	23
Цистин	41	20
Тирозин	112	100
Сумма заменимых аминокислот	1228	1826

Таблица 2

**Физико-химические показатели  
нативного кобыльего и верблюжьего молока**

<b>Показатель</b>	<b>Кобылье молоко</b>	<b>Верблюжье молоко</b>
Кислотность, °T	6–7	17,5
Плотность, кг/м <sup>3</sup>	1034	1339
Жир, %	1,7–2,0	5,0–6,3
Белок, %	1,7–2,2	2,8–3,8
Сухое обезжиренное вещество, %	8,7–9,1	7,75
углеводы	6,7	4,8
ккал	70 ккал	85 ккал

Для приготовления продукта используют сухое верблюжье и кобылье молоко, сухое обезжиренное коровье молоко, витамины, минеральные вещества, сироп шиповника, сироп черной смородины, пектин цитрусовый, инулин, гинестеин, сухие штаммы молочнокислых- и бифидобактерий, фукоидан.

Ниже приведен состав сухой смеси для спортивного питания в масс. %:

Молоко кобылье — 60,0–65,0

Закваска бактериальная — 3,0–3,5

Верблюжье молоко — 13,0–15,0

Зародыши пшеницы — 1,0–2,0

Сироп черной смородины — 4,0–4,5

Сироп шиповника — 4,0–4,5

Инулин — 1,5–2,0

Пектин цитрусовый — 2,0–2,5

Гинестеин — 0,022–0,025

Витамины — 0,085–0,090

2 % бета-каротин (Веторон Е) — 0,025–0,030

Минеральные вещества — 0,055–0,060

Фукоидан — 0,10–0,15

Калорийность сухого продукта спортивного питания составляет 610–630 ккал на 100г продукта

При суточном употреблении 100г сухого продукта, растворенного в 1л воды или молока, спортсмен будет потреблять более 600ккал энергии для выполнения физической нагрузки.

Таким образом, исходя из приведенных данных, можно говорить о том, что кобылье и верблюжье молоко, имея уникальный состав и высокую биологическую ценность, могут быть использованы в качестве основы в производстве продуктов спортивного питания. Спортивное питание, полученное на основе кобыльего и верблюжьего молока, может быстро восстановить организм и восполнить потребность в основных питательных веществах и энергии. Сухая смесь может быть использована для повышения адаптационных возможностей организма в основах факторах питания для лиц, пребывающих в экстремальных условиях внешней среды, включая высокогорье, жаркий климат, влияния неблагоприятных факторов экологического содержания на организм.

На дальнейших этапах исследования планируется дать экспериментальную и клиническую оценку эффективности разработанного продукта.

### Литература

1. Л. Г. Елисеева, Л. В. Беркетова, Е. В. Крюкова. Анализ современных тенденций в области производства продуктов питания для людей, ведущих активный образ жизни часть 1 // Пищевая промышленность 1/2017.
2. Азизбекян, Г. А. Теоретические предпосылки к разработке индивидуального питания спортсменов / Г. А. Азизбекян [и др.] // Вопросы питания. 2009. Т. 78. № 2. С. 73–76.
3. Петрова, Е. И. Исследование и разработка технологии биопродукта для спортивного питания: автореф. дис.... канд. техн. наук / Е. И. Петрова. Омск, 2014. 25 р.
4. Тутельян, В. А. Оптимизация питания спортсменов: реалии и перспективы / В. А. Тутельян, Д. Б. Никитюк, А. Л. Поздняков // Вопросы питания. 2010. Т. 79. № 3. С. 78–82.

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ  
БИОСОВМЕСТИМОСТИ БИОДЕГРАДИРУЕМОГО СОСУДИСТОГО  
ГРАФТА МАЛОГО ДИАМЕТРА,  
МОДИФИЦИРОВАННОГО RGD-ПЕПТИДАМИ**

**EXPERIMENTAL STUDY OF BIOCOMPATIBILITY  
OF SMALL DIAMETER BIODEGRADABLE VASCULAR GRAFT  
MODIFIED RGD-PEPTIDES**

Е. А. Сенокосова<sup>1</sup>, Е. О. Кривкина<sup>1</sup>, Л. В. Антонова<sup>1</sup>, В. Н. Сильников<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *НИИ КПССЗ*  
<sup>2</sup> *ИХБФМ СО РАН*

E. A. Senokosova<sup>1</sup>, E. O. Krivkina<sup>1</sup>, L. V. Antonova<sup>1</sup>, V. N. Silnikov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *NIИ KPSSZ, Russia*  
<sup>2</sup> *ICBFM SB RAS*

E-mail: sergeewa.ew@yandex.ru

**Аннотация**

Одним из актуальных направлений создания функционально активного биодegradуемого сосудистого имплантата малого диаметра является модифицирование его внутренней поверхности с целью инициации скорейшего образования эндотелиального монослоя, предотвращающего тромбообразование. Активно изучается возможность модифицирования поверхности тканеинженерных сосудистых протезов адгезивными пептидами, селективно связывающимися с эндотелиальными клетками. Аргинин-глицин-аспарагиновая кислота (RGD-пептид) является активным участком многих структурных элементов естественного внеклеточного матрикса, обладая высокой тропностью к интегриновым рецепторам эндотелиальных клеток и, как показывают результаты многих исследований, может обеспечить спонтанное формирование жизнеспособного эндотелиального монослоя на внутренней поверхности сосудистого имплантата. Каждая конфигурация RGD-пептида обладает определенной степенью родства и сигналинга с интегриновыми рецепторами. Биодоступность RGD-пептида для эндотелиальных клеток обеспечивает линкерная группа, благодаря которой функционально активный пептид иммобилизован к полимерной поверхности материала. Однако остаётся открытым вопрос, касающийся наиболее предпочтительной конфигурации RGD-пептида и протяженности линкера.

### **Abstract**

One of the important directions of creation of small diameter functionally active biodegradable vascular implant is the modification of its inner surface. The aim is to initiate the early formation of the endothelial monolayer (EM) and prevent the formation of blood clots. The modification of tissue-engineered products with adhesive peptides that selectively bind to endothelial cells (EC) is studied with increased attention. Arginine-glycine-aspartic acid (RGD-peptide) is an active site of many structural elements of the natural extracellular matrix, has a high tropicity to the integrin receptors of EC and can provide spontaneous formation of a viable EM on the inner surface of the vascular implant. Each configuration of RGD peptide has a certain degree of affinity and signaling with integrin receptors of EC. The bioavailability of RGD-peptide for EC is provided by the linker group. However, the question of the most preferred configuration of the RGD-peptide and linker length remains open.

Цель исследования — определить оптимальный способ модифицирования RGD-пептидами сосудистых протезов на основе полигидроксibuтирата/валерата и поликапролактона (ПГБВ/ПКЛ).

### **Материалы и методы**

Биополимерные сосудистые ПГБВ/ПКЛ-протезы с внутренним диаметром 1,5 мм и 4 мм были изготовлены методом электроспиннинга и модифицированы следующими аминами: 1,6-hexamethylenediamine (A1, короткий) или 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine (A2, длинный); и далее пептидами: RGDK (P1), AhRGD (P2), циклический пептид c[RGDFK] (P3). Время аминолиза составило 10, 30 и 60 минут. В итоге было получено 6 модифицированных образцов: A1P1, A1P2, A1P3, A2P1, A2P2, A2P3. Физико-механические испытания (n=48) были проведены на разрывной машине. Анализ гемосовместимости проведен согласно стандарту ISO 10993.4. Оценивали адгезию и жизнеспособность колониеформирующих эндотелиальных клеток (КФЭК), культивируемых на модифицированных и немодифицированном матриксе того же полимерного состава. Проведена сканирующая электронная микроскопия образцов. Сосудистые протезы имплантировали крысам линии Wistar (n=70) на 1 и 3 месяца с последующим гистологическим исследованием эксплантированных образцов и анализом выраженности и распространенности кальцификации. Полученные данные обрабатывали с помощью программы «GraphPad Prism».

### **Результаты**

В ходе физико-механических испытаний было определено оптимальное время аминолиза для каждого линкера, основанное на итоговой concentra-

ции аминогрупп на полимерной поверхности: 60 минут для А1 и 30 минут для А2. Степень гемолиза эритроцитов после контакта с модифицированными и немодифицированными протезами не превышала 2 %, что указало на высокую биосовместимость материала с элементами крови. Наибольшая степень деформации тромбоцитов отмечена на поверхности протезов с коротким линкером — А1Р2 и А1Р3. Высокая клеточная адгезия и жизнеспособность выявлены на поверхности матриц с длинным линкером и циклическим RGD-пептидом — А2Р3. Краткосрочная имплантация сосудистых имплантатов с длинным линкером А2Р1 и А2Р3 демонстрировала лучшую регенерацию сосудистых тканей в сравнении с другими образцами, а также в меньшую склонность к кальцификации.

### **Выводы**

Оптимальное время аминирования полимерного материала для короткого линкера 1,6-hexamethylenediamine составило 60 мин, для длинного 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine — 30 мин. Биodeградируемые сосудистые протезы, модифицированные RGDK и с[RGDFK] пептидами, иммобилизованными через длинный линкер 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine, демонстрировали лучшую регенерацию сосудистых тканей. Среди рассматриваемых пептидов конфигурация AmRGD оказалась менее эффективна в ключевых аспектах экспериментального исследования.



**ВЛИЯНИЕ КОРОТКИХ ПЕПТИДОВ НА КЛЕТОЧНУЮ  
ПРОЛИФЕРАЦИЮ В КУЛЬТУРЕ ТКАНИ ПЕЧЕНИ  
В ПРИСУТСТВИИ ЦИКЛОФОСФАНА**

**THE INFLUENCE OF SHORT PEPTIDES ON CELLULAR  
PROLIFERATION IN LIVER TISSUE CULTURE IN THE PRESENCE  
OF CYCLOPHOSPHANE**

А. Г. Симанов, Н. О. Меньшиков, Д. В. Товпеко

*ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова»  
Министерства обороны Российской Федерации*

A. G. Simanov, N. O. Menshikov, D. V. Tovpeko

*S. M. Kirov Military Medical Academy, Russia*

**Аннотация**

Для изучения непосредственного влияния биологически активных веществ на клетки печени использовали метод органотипической культуры. Эксперименты проводили на 200 эксплантатах печени половозрелых крыс линии Вистар. Ткани печени разделяли на фрагменты, помещали в чашки Петри с добавлением питательной среды и введением эффективных концентраций исследуемых пептидов и циклофосфана. При культивировании эксплантатов наблюдалось их распластывание на подложке и образование зоны роста из мигрирующих и пролиферирующих специализированных клеток. Выявление стимулирующего действия пептидов формируют базу для разработки лекарственных препаратов на их основе с целью снижения побочного действия цитостатических веществ при лечении онкологических заболеваний.

**Abstract**

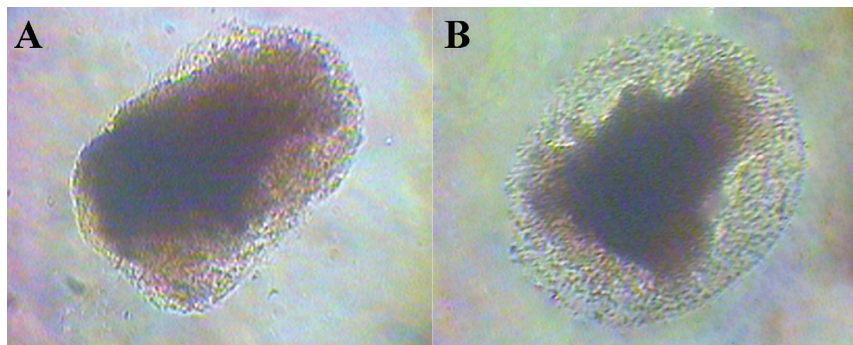
The organotypic culture method was used in order to study the direct effect of biologically active substances on liver cells. The experiments were performed on 200 liver explants of mature Wistar rats. The liver tissue was divided into fragments, placed in Petri dishes with the addition of a nutrient medium and the introduction of the studied peptides and cyclophosphamide effective concentrations. During the cultivation of the explants, their flattening on the substrate and the formation of a growth zone from migrating and proliferating specialized cells were observed. The identification of the peptides stimulating effect forms the basis for the development of drugs on their basis in order to reduce the side effects of cytostatic substances in the treatment of cancer.

Циклофосфамид, известный как циклофосфан представляет собой цитостатический противоопухолевый лекарственный препарат алкилирующего типа действия, производное азотистого иприта и одновременно производное оксазафосфорина [1]. В печени циклофосфан расщепляется под действием микросомальных ферментов системы цитохрома P450 на активные метаболиты, главным образом, фосфамид и акролеин. Механизм действия реакционноспособных метаболитов циклофосфамида основан на алкилировании ДНК, которое вызывает необратимые поперечные сшивки между ее нитями, приводящие к апоптозу клетки [2]. Преимущественно поражаются клетки, обладающие высоким митотическим индексом, либо клетки, биохимические процессы которых в наибольшей степени подвергаются дестабилизации. Химиотерапия циклофосфаном применяется при раке молочной железы, шейки матки, легких, яичников, лимфоме Ходжкина и неходжкинской лимфоме, множественной миеломе, грибковых микозах, остром миелоидном и хроническом миелогенном, а также остром лимфобластном лейкозах [1]. Циклофосфамид также используется при лечении тяжелых аутоиммунных заболеваний, включая нефротический синдром с минимальными изменениями, не поддающийся традиционной терапии [2]. В то же время циклофосфан обладает рядом побочных эффектов, связанных с токсическим поражением тканей паренхиматозных органов. Так, высокие дозы циклофосфамида, применяемые в качестве химиотерапии рака или миелобластной терапии в сочетании с общим облучением организма или бусульфаном при подготовке к трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, могут вызвать синдром синусоидальной обструкции (веноокклюзионная болезнь печени), который может привести к острой печеночной недостаточности. Таким образом, исследования, направленные на поиск биологически активных веществ, обладающих протекторным действием при цитотоксическом влиянии алкилирующих соединений на клетки печени в эксперименте, имеют научную актуальность и практическую значимость.

Для изучения непосредственного влияния биологически активных веществ на клетки печени использовали метод органотипической культуры [3]. Эксперименты проводили на 200 эксплантатах печени половозрелых крыс линии Вистар из биокolleкции «Коллекция лабораторных млекопитающих разной таксономической принадлежности» Института физиологии им. И. П. Павлова РАН. Отпрепарированные ткани печени разделяли на фрагменты величиной около 1 мм<sup>3</sup>, которые помещали в чашки Петри с полилизинным покрытием дна, с добавлением 3 мл питательной среды и введением эффективной концентрации исследуемых пептидов и циклофосфана. Эффективной для пептидов была концентрация 0,05 нг/мл, для циклофосфана — 1 мкг/мл. Питательная среда с pH 7,2 имела состав: 35 %

раствора Хенкса, 35 % среды Игла, 25 % фетальной бычьей сыворотки, глюкоза (0,6 %), инсулин (0,5 ед/мл), гентамицин (100 ед/мл). В контроле к эксплантатам пептид и циклофосфан не добавляли. Чашки Петри помещали в термостат при температуре  $37 \pm 0,1$  °С и через 3 сут просматривали под фазово-контрастным микроскопом. Для визуализации эксплантатов применяли микротеленасадку для микроскопа (серия 10, МТН-13 «Альфа-Телеком», Россия). Определяли индекс площади (ИП), который рассчитывался в условных единицах как соотношение площади всего эксплантата, вместе с зоной пролиферирующих клеток, к исходной площади эксплантата. Для каждого исследуемого вещества анализировали 20–25 экспериментальных и 20–25 контрольных эксплантатов. Для расчета ИП эксплантатов использовали программу PhotoM 1.2. Достоверность различий ИП эксплантатов контрольных и экспериментальных животных оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Значения ИП выражали в процентах, контрольное значение ИП принимали за 100 %.

При культивировании эксплантатов происходило их расплывание на подложке и образование зоны роста из мигрирующих и пролиферирующих специализированных клеток (см. рисунок).



Микрофотография эксплантатов печени в органотипической культуре ткани крыс на 3-й день культивирования. А — контроль, В — добавление в питательную среду 0,05 нг/мл пептида Lys-Glu-Asp

Выявлено, что добавление пептида Lys-Glu-Asp в эффективной концентрации статистически достоверно приводило к увеличению ИП на  $18 \pm 2$  % ( $n=23$ ,  $p<0,05$ ), по сравнению с ИП контрольных эксплантатов ( $n=22$ ). Остальные пептиды вызывали статистически не достоверное угнетение действия циклофосфана (см. таблицу).

**Изменение индекса площади при введении в культуральную среду препаратов (\*  $p < 0,05$  по сравнению с контролем)**

№, п/п	Пептид	Изменение индекса площади, %		
		При введении пептида	При введении циклофосфана	При сочетанном введении пептида и циклофосфана
1	Lys-Glu-Asp-Ala	+20±1*	-27±2*	-6±4
2	Lys-Glu-Asp	+32±2*	-25±2*	+18±2*
3	Glu-Asp-Leu	+24±2*	-23±1*	+14±5

Выявление стимулирующего действия пептидов формирует базу для разработки лекарственных препаратов на их основе с целью снижения побочного действия цитостатических веществ при лечении онкологических заболеваний.

### Литература

1. Bhat N., Kalthur S. G., Padmashali S., Monappa V. Toxic Effects of Different Doses of Cyclophosphamide on Liver and Kidney Tissue in Swiss Albino Mice: A Histopathological Study. *Ethiop J Health Sci.* 2018; 28 (6): 711–6.
2. El-Karim D. R. S. G., El-Amraw G. Cyclophosphamide hepatotoxicity: the role of 4-hydroxynonenal and cytochrome c oxidase and the possible protective effect of *Ganoderma lucidum* extract. *Slov Vet Res.* 2019; 56 (Suppl 22): 15–23.
3. Хавинсон В. Х., Линькова Н. С., Проняева В. Е., Чалисова Н. И., Концевая Е. А., Полякова В. О., Кветная Т. В., Кветной И. М., Яковлев Г. М. Методика создания монослоя клеток на базе органотипической культуры для тестирования физиологически активных веществ. *Бюл эксп биол и мед.* 2012; 153 (5): 759–63.

**ТРАНСГЕННАЯ КУЛЬТУРА КЛЕТОК, СТАБИЛЬНО  
ЭКСПРЕССИРУЮЩАЯ СТРУКТУРНЫЕ БЕЛКИ ВИРУСА ЛАССА****TRANSGENIC CELL CULTURE STABILITY EXPRESSING  
STRUCTURAL PROTEINS OF THE LASSA VIRUS**

С. С. Скрипкин, О. С. Таранов, И. Р. Иматдинов

*ФБУН Государственный научный центр вирусологии  
и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора*

S. S. Skripkin, O. S. Taranov, I. R. Imatdinov

*SRC VB «Vector», Russia*

E-mail: skripkin\_ss@vector.nsc.ru

**Аннотация**

Вирус Ласса (*Lassa marmarenavirus*) — РНК-содержащий вирус, принадлежащий к комплексу Старого Света семейства аренавирусов (*Arenaviridae*). Данный вирус относится к I группе патогенности. В настоящее время не существует лицензированных вакцинных препаратов. Специфическая терапия лихорадки Ласса не разработана и заключается в паллиативном лечении с применением препарата рибавирин.

Геном вируса Ласса представлен 2 молекулами РНК, кодирующими 4 структурных белка: предшественник поверхностных гликопротеинов GPC, мультифункциональный матриксный белок Z, нуклеопротеин NP и РНК-зависимую РНК полимеразу L. Показано, что экспрессии белка Z достаточно для формирования полиморфных вирусоподобных частиц.

**Abstract**

Lassa virus (*Lassa marmarenavirus*) — an RNA-containing virus that belongs to the Old World arenavirus family (*Arenaviridae*). This virus belongs to the first group of pathogenicity. There are currently no licensed vaccines. Specific therapy for Lassa fever has not been developed and consists of palliative treatment with the use of the drug ribavirin.

The Lassa virus genome is represented by 2 RNA molecules encoding 4 structural proteins: the surface glycoprotein precursor GPC, multifunctional matrix protein Z, nucleoprotein NP, and RNA-dependent RNA polymerase L. It has been shown that expression of Z protein is sufficient for the formation of polymorphic virus-like particles.

Распространенный в странах Западной Африки высокопатогенный вирус Ласса остается серьезной неразрешенной проблемой. Данный возбудитель вызывает острую геморрагическую лихорадку Ласса, характеризующуюся тяжелым течением, высоким процентом летальных исходов, поражением ЦНС и ССС, а также геморрагической гемостазиопатией. По различным подсчетам, ежегодно вирусом Ласса инфицируются от 300 тыс. до 500 тыс. человек, более 5 тыс. из которых заканчиваются летальными исходами.

На данный момент не существует лицензированных вакцинных препаратов против лихорадки Ласса, в том числе на основе аттенуированных штаммов вируса. Получение ослабленных штаммов сопряжено с высоким уровнем опасности данного микроорганизма, требующего высшего уровня безопасности при его культивировании и изучении (BSL-4). Длительное пассирование вируса Ласса на культурах клеток, вследствие высокой мутационной изменчивости генома, приводит к изменению антигенных свойств вируса. Кроме того, применение аттенуированных штаммов в качестве вирус-вакцин осложнено возможной реверсией вирулентных свойств, а также реассортацией сегментов генома с патогенными штаммами вируса Ласса или с другими представителями семейства аренавирусов.

Целью данной работы являлось получение трансгенной культуры клеток, стабильно экспрессирующей структурные белки вируса Ласса GPC и Z, синтез которых обеспечивает формирование нереплицирующихся вирусоподобных частиц (ВПЧ).

Использование перевиваемых культур клеток позволяет технологично масштабировать производство ВПЧ. Благодаря интеграции генов, кодирующих структурные белки GPC и Z вируса Ласса, в геном клеток-продуцентов, достигается высокая стабильность экспрессии, а также антигенная однородность вирусоподобных частиц.

В настоящее время получены клоны-продуценты на основе перевиваемой культуры клеток ВНК-21/13, стабильно экспрессирующие структурные белки Z и GPC вируса Ласса, формирование вирусоподобных частиц которыми подтверждено методом электронной микроскопии. Продолжаются исследования антигенных свойств лизатов клеток-продуцентов и кондиционированных сред, содержащих вирусоподобные частицы вируса Ласса.

В силу аутентичности пространственной организации структурных белков, вирусоподобные частицы могут быть использованы в качестве безопасных кандидатных вакцинных препаратов. Антигенная стабильность и однородность ВПЧ позволяет использовать их при разработке серодиагностикумов и получении вирусспецифических гипериммунных сывороток крови. Трансгенная линия клеток будет использована для изучения процессов самоорганизации вирусоподобных частиц из структурных компонентов, а также при изучении механизмов специфической упаковки генетического материала во вновь образующиеся вирионы.

**ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ ДЕЙСТВИЕ ЭКСТРАКТА МИЦЕЛИЯ  
*DUDDINGTONIA FLAGRANS* НА КСЕНОГРАФТЫ  
ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ КАРЦИНОМЫ ШЕЙКИ МАТКИ**

ANTITUMOR EFFECT OF MYCELIUM *DUDDINGTONIA FLAGRANS*  
EXTRACT ON XENOGRAPHS OF HUMAN CERVICAL CARCINOMA

О. И. Соловьёва<sup>1</sup>, Е. Л. Завьялов<sup>1</sup>, Т. В. Теплякова<sup>2</sup>,  
Л. Р. Лебедев<sup>2</sup>, И. А. Разумов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН

<sup>2</sup>ФБУН Государственный научный центр вирусологии  
и биотехнологии «Вектор»

O. I. Solovieva<sup>1</sup>, E. L. Zavjalov<sup>1</sup>, T. V. Teplyakova<sup>2</sup>,  
L. R. Lebedev<sup>2</sup>, I. A. Razumov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>SRC VB “Vector”

<sup>2</sup>FRC Institute of Cytology and Genetics, Russia

**Аннотация**

Для оценки противоопухолевого эффекта водный раствор экстракта мицелия гриба *Duddingtonia flagrans* (штамм F-882) вводили мышам с подкожными ксенографтами клеток С33а, карциномы шейки матки человека. В результате впервые было установлено, что введение F-882 значительно замедляет рост ксенографтов даже после окончания инъекций. Продолжительность жизни животных из группы лечения была увеличена на 6 недель, что на 73 % больше, чем у контрольной группы.

**Abstract**

To assess the antitumor effect, an aqueous solution of the mycelium extract of the fungus *Duddingtonia flagrans* (strain F-882) was injected to mice with subcutaneous xenografts of C33a cells, human cervical carcinomas. As a result, it was found for the first time that administration of F-882 significantly slows down the growth of xenografts even after the end of injections. The life expectancy of animals from the treatment group was increased by 6 weeks, which is 73 % more than the control.

Согласно мировой статистике, рак шейки матки занимает второе место по распространённости среди онкологических заболеваний репродуктивной системы.<sup>2</sup> Несмотря на широкий арсенал имеющихся в клинике средств борьбы с онкологическими заболеваниями, поиск новых средств противоопухолевой терапии по сих пор остается очень актуальным. Особое место в поиске новых подходов борьбы с онкологическими заболеваниями занимает разработка лекарственных средств, основанных на природных соединениях. В настоящем исследовании изучали противоопухолевые эффекты водного экстракта мицелия гриба *D. flammans* F-882, обладающего выраженным противовирусным действием<sup>5</sup>, на подкожные ксенографты карциномы шейки матки человека у мышей линии SCID. Работа была выполнена в ЦКП «SPF-виварий» ИЦиГ СО РАН, где животные содержались в стандартных условиях. Все манипуляции проводили в соответствии с международными правилами работы с животными (European Communities Council Directive 86/609 EEC).

Для получения ксенографтов использовали культуру клеток С33а карциномы шейки матки человека (ATCC HTB 31). Клетки размораживали и культивировали в течение 3–4 пассажей на среде Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 1:1 с 10 % фетальной бычьей сыворотки фирмы Invitrogen. Перед инъекцией животным опухолевые клетки снимали с подложки, центрифугировали, осадок ресуспендировали и повторно центрифугировали в среде без сыворотки, а затем растворяли в среде без сыворотки, доводя до концентрации  $8 \cdot 10^7$  клеток/мл. Для получения солидных опухолей животным подкожно вводили в область правой лопатки  $8 \cdot 10^6$  клеток в 100 мкл суспензии. При появлении характерных уплотнений измеряли линейные размеры узла (длину и ширину) с помощью штангенциркуля и высчитывали объём опухоли (V) по формуле<sup>1</sup>:  $V = (a \times b^2) \cdot 0.52$ , где: a — наибольший диаметр опухоли, b — наименьший диаметр опухоли.

Для оценки противоопухолевого эффекта рассчитывали показатель торможения роста опухоли (ТРО) по формуле<sup>3</sup>:  $\text{ТРО} (\%) = (V_k - V_o) / V_k \cdot 100$ , где:  $V_k$  — средний объём опухоли в контрольной группе;  $V_o$  — средний объём опухоли в опытной группе. Увеличение продолжительности жизни (УПЖ) вычисляли по формуле<sup>3</sup>:  $\text{УПЖ} (\%) = (\text{СПЖ}_o - \text{СПЖ}_k) / \text{СПЖ}_k \cdot 100$ , где: СПЖ<sub>к</sub> — средняя продолжительность жизни животных в контрольной группе (дни); СПЖ<sub>о</sub> — средняя продолжительность жизни животных в опытной группе (дни). Также использовали показатель индекса прироста опухоли (ИПО), рассчитанный для каждого животного по формуле<sup>3</sup>:  $\text{ИПО} = V_i / V_o$ , где:  $V_i$  — объём опухоли в определённый день исследования;  $V_o$  — объём опухоли в первый день инокуляции (до введения препарата).



Для исследования использовали водный экстракт мицелия F-882, полученный из биомассы гриба, выращенной в глубинных условиях (коллекция микроорганизмов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»<sup>9</sup>). Лиофильно высушенный экстракт заливали 10 мл воды для инъекций Bufus (Renewal, Россия) до полного растворения, получая концентрацию по полисахаридам 7.8 мг/мл, и по белкам 5.7 мг/мл. Введения F-882 осуществлялись 3 раза в неделю на протяжении 4 недель. Первые 2.5 недели экстракт вводили подкожно в область расположения ксенографта, затем, когда объём ксенографтов стал достаточно большим, введения продолжали интратуморально. Животным контрольных групп в том же объёме и по той же схеме вводили воду для инъекций.

На 27 сутки от начала инокуляции F-882 введения прекратили, поскольку был израсходован весь имеющийся в наличии экстракт F-882, за животными продолжали наблюдение. Отличия между средними объёмами опухолей в контрольной и опытной группах становились статистически достоверными начиная с 27 суток. Показатель ТРО на 27 сутки составлял 45.8 %. На 44 сутки из эксперимента были выведены животные контрольной группы. На этот момент в экспериментальной группе был зафиксирован максимальный терапевтический эффект со значением ТРО 58.7 %. Среднее значение ИПО контрольной группы на 44 сутки составляло 88.1, при этом для экспериментальной группы показатель был равен 38.5, то есть в 2 раза ниже. Наблюдение за опытной группой было продолжено до 86 суток от начала инокуляции F-882, когда средние объёмы опухолей сравнивались с объёмами в контрольной, и затем животные были подвергнуты эвтаназии. Продолжительность жизни животных из группы лечения была увеличена на 6 недель, а значение УПЖ составило 73 %.

Таким образом, впервые был обнаружен противоопухолевый эффект экстракта мицелия F-882 на подкожные ксенографты клеток С33а, карциномы шейки матки человека. Кроме того, было установлено, что последовательное введение F-882 подкожно и интратуморально значительно замедляет рост ксенографтов даже после окончания инъекций, так как показатель ТРО в этот период (27–44 сутки) последовательно увеличивался со значения в 45.8 % до 58.7 %, что позволяет предположить кумулятивное действие исследуемого экстракта. Продолжительность жизни экспериментальных животных была продлена на 6 недель (значение УПЖ 73 %).

## Литература

1. Tomayko M. M., Reynolds C. P. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer, Chemotherapy, Pharmacology*. 1989;24:148–154.

2. Байрамова Г. Р., Файзуллин Л. З., Королькова А. И., Полозников А. А., Киселев В. И. Скрининг рака шейки матки: что нового в мировой практике. Акушерство и гинекология. 2016;7:17–21.

3. Методические указания по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. / Хабриев Р. У // 2005.

4. Теплякова Т. В., Косогова Т. А., Бардашева А. В. Корреляция противовирусной и противоопухолевой активностей водных экстрактов из базидиальных грибов. Успехи медицинской микологии. 2014;12: 348–352.

5. Теплякова Т. В., Трошкова Г. П., Гашникова Н. М., Костина Н. Е., Балахнин С. М., Проценко М. А., Ананько Г. Г. Компоненты экстракта нематофагового гриба *Duddingtonia flagrans* F-882, обладающего противовирусной активностью в отношении ВИЧ-1. Успехи медицинской микологии. 2013;11: 377–379.

6. Штамм гриба *Duddingtonia flagrans*, проявляющий свойства против галловых нематод растений и паразитических нематод животных и стимулирующий рост и развитие растений. / Теплякова Т. В., Репин В. Е., Рябчикова Е. И. и др // Бюл. изобр. № 16 от 10.06.2005.

## ПОДБОР ОПТИМАЛЬНОГО ШТАММА ПРОДУЦЕНТА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ БЕЛКОВ\*

### SELECTION OF AN OPTIMAL PRODUCT STRAIN FOR OBTAINING HETEROLOGICAL PROTEINS

А. В. Солодкая, А. О. Корягина, А. А. Тойменцева, М. Р. Шарипова

*Казанский (Приволжский) федеральный университет*

A. V. Solodkaya, A. O. Koryagina, A. A. Toymentseva, M. R. Sharipova

*Kazan (Volga region) Federal University*

#### Аннотация

Бактерии рода *Bacillus* являются прекрасным источником ферментов, легко культивируются, их геном полностью изучен. Бациллы обладают развитой системой секреции, имеют статус GRAS (Generally Recognized as safe). Одним из секретируемых ферментов, представляющих интерес, является субтилизиноподобная протеиназа (AprBp) *Bacillus pumilus*. Такие ферменты часто находят применение в промышленности, например, в роли биокатализаторов синтеза пептидных связей, обладая широкой субстратной специфичностью, стабильностью при высоких значениях pH, активностью в широком интервале температур, устойчивостью к хелатирующим и окисляющим агентам, идеально подходят для использования в составе детергентов.

#### Abstract

*Bacillus* bacteria are an excellent source of enzymes, easily cultivated, their genome has been studied. *Bacillus* have a developed secretion system and have the status of GRAS (Generally Recognized as safe). One of the secreted enzymes is the subtilisin-like proteinase (AprBp) of *Bacillus pumilus*. Such enzymes are often used in industry, for example, as biocatalysts for the synthesis of peptide bonds, possessing broad substrate specificity, stability at high pH values, activity over a wide temperature range, and resistance to chelating and oxidizing agents; they are ideal for use in detergents.

---

© А. В. Солодкая, А. О. Корягина, А. А. Тойменцева, М. Р. Шарипова, 2019

\*Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров и поддержана грантом РФФИ № 19-08-00853\_A.

В настоящей работе была использована LIKE экспрессионная система (от нем. “Lia-Kontrollierte Expression”) для получения препаративного количества ArgVp, сконструированная на основе сильного индуцируемого стрессом промотора *lial* *B. subtilis* [Toumentseva et al., 2012]. LIKE система основана на двух типах векторов: интегративном (pLIKE-int), позволяющим получить стабильную экспрессию в геноме, и репликативном (pLIKE-rep), позволяющим получать экспрессию на плазмиде. LIKE система была оптимизирована с помощью рекомбинантных сигнальных пептидов *Bacillus megaterium* (SP<sub>pac</sub>, SP<sub>Asp</sub>, SP<sub>Yngk</sub>). Ген субтилизиноподобной протеиназы *B. pumilus* (ArgVp) был клонирован в оптимизированную LIKE систему экспрессии. Корректное встраивание гена подтверждено секвенированием [Tikhonova et al., 2017].

Для получения повышенной продукции целевого белка важным этапом является подбор оптимального штамма-продуцента с высокой продуктивностью и генетической стабильностью. Для получения высокого выхода ArgVp в работе будут протестированы штаммы: *B. subtilis* BG2036 (делетированы гены двух внеклеточных протеиназ *aprE* и *nprE*), *B. subtilis* 27-31 (делетированы гены спорообразования, антимикробных метаболитов, образования биопленок и внеклеточных протеиназ) и *B. subtilis* 27-39 (дополнительно удалены гены регуляции компетентности). Штаммы *B. subtilis* 27-31 и *B. subtilis* 27-39 получены с помощью CRISPR-Cas, системы редактирования генома (проф. J. Altenbuchner). Для повышения эффективности трансформации в геномы штаммов *B. subtilis* 27-31 и *B. subtilis* 27-39 была интегрирована кассета *comK/comS* под контролем промотора *PmtlA*. Сверхэкспрессия как *comK*, так и *comS* повышала эффективность трансформации *B. subtilis* плазмидной ДНК в 6–7 раз по сравнению со штаммом дикого типа *B. subtilis* 168 (Rahmer et al., 2015).

Таким образом, сочетание эффективной экспрессионной системы под контролем сильного индуцируемого промотора и оптимального штамма продуцента позволит получать повышенный выход рекомбинантных белков в клетках *B. subtilis*.

**РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К КЛИНИЧЕСКОМУ ПРИМЕНЕНИЮ  
ВАСКУЛЯРНЫХ КЛЕТОК В РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ \*****DEVELOPMENT OF CLINICAL APPLICATION METHODS  
OF VASCULAR CELLS IN REGENERATIVE MEDICINE**

А. С. Ступникова<sup>1,2</sup>, И. С. Захарова<sup>1,3,4</sup>, А. И. Шевченко<sup>1,2,3,4</sup>, С. М. Закиян<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup> *Институт цитологии и генетики СО РАН*

<sup>2</sup> *Новосибирский государственный университет*

<sup>3</sup> *НМИЦ им. акад. Е. Н. Мешалкина Минздрава России*

<sup>4</sup> *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН*

A. S. Stupnikova<sup>1,2</sup>, I. S. Zakharova<sup>1,3,4</sup>, A. I. Shevchenko<sup>1,2,3,4</sup>, S. M. Zakian<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup> *Institute of Cytology and Genetics  
of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences*

<sup>2</sup> *Novosibirsk State University*

<sup>3</sup> *NMTs of the academician E. N. Meshalkin  
the National medical research center*

<sup>4</sup> *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine,  
The Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences*

E-mail: alena.st97@gmail.com

**Аннотация**

Эндотелиальные и гладкомышечные клетки являются перспективными ресурсами для регенеративной медицины и заместительной клеточной терапии. Однако применение делящихся клеток для лечения заболеваний человека несет за собой риск их малигнизации в организме пациента. В данном исследовании разработаны методики получения и подготовки митотически инактивированных пациент-специфических васкулярных клеток из материала кардиальных эксплантов человека. Полученные клетки сохраняют свои морфофункциональные свойства *in vitro*: специфические клеточные маркеры, способность синтезировать компоненты межклеточного матрикса; эндотелиальные клетки также сохраняют способность формировать капилляроподобные структуры в матрикеле. Клеточные популяции митотически инактивированных эндотелиальных и гладкомышечных клеток демонстрируют вы-

© А. С. Ступникова, И. С. Захарова, А. И. Шевченко, С. М. Закиян, 2019

\* Работа поддержана Программой фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные исследования для биомедицинских технологий» (I.2.42).

сокий ангиогенный потенциал *in vivo* на модели иммунодефицитных мышей SCID. На поверхности из поликапролактона и хитозана клетки сохраняют специфические поверхностные антигены и способность к наработке межклеточного матрикса. Полученные результаты демонстрируют высокий регенеративный потенциал митотически инактивированных васкулярных клеток и в дальнейшем могут быть применены для создания пациент-специфических клеточных продуктов.

### **Abstract**

Endothelial and smooth muscle cells are promising resources for regenerative medicine and cell replacement therapy. However, the applying of dividing cells for the treatment of human diseases carries the risk of their malignancy in the patient's body. In this study are developed methods of obtaining and preparing of mitotically inactivated patient-specific vascular cells from the material of human cardiac explants. The obtained cells retain their morphofunctional properties *in vitro*: specific cell markers, the ability to synthesize the components of the extracellular matrix; endothelial cells also retain the ability to form capillary-like structures in matrigel. Cell populations of mitotically inactivated endothelial and smooth muscle cells demonstrate enhanced angiogenic potential *in vivo* in the SCID immunodeficient mouse models. Cells retain specific surface antigens and the ability to synthesize the components of the extracellular matrix on the surface of polycaprolactone/chitosan scaffold. The results demonstrate a high regenerative potential of mitotically inactivated vascular cells and could be used for create patient-specific cellular products.

В настоящее время наблюдается рост числа заболеваний с патологией кровеносных сосудов. Различные типы васкулярных эндотелиальных и гладкомышечных клеток используются в качестве модельных систем для изучения ряда заболеваний и считаются перспективным источником для регенеративной медицины. Создание пациент-специфических клеточных продуктов является актуальным и активно развивающимся направлением биомедицинских исследований.

Одним из препятствий для применения любого типа делящихся клеток в лечении заболеваний человека является риск того, что после введения в организм пациента они могут образовать опухоли. Поэтому важной задачей является исследование возможности использования в регенерации и тканевой инженерии васкулярных клеток человека, в которых инактивирована способность к митозу.

Цель данной работы — исследование регенеративного потенциала митотически инактивированных эндотелиальных и гладкомышечных клеток, выделенных из отходного послеоперационного материала кардиальных эксплантов человека. В результате выполнения проекта разработана методика митотической инактивации васкулярных клеток без потери их функциональности *in vitro*. Показано, что, несмотря на инактивацию пролиферации,

эндотелиальные и гладкомышечные клетки сохраняют жизнеспособность на уровне более 92 %. Обработка митомицином С не приводит к утрате функциональных маркеров клеток: в эндотелиальных клетках сохраняется CD31, vWF, способность нарабатывать межклеточный матрикс коллаген 4, фибронектин. Гладкомышечные клетки позитивны по альфа-актину гладких мышц, тяжелой цепи гладкомышечного миозина, нарабатывают эластин. Кроме того, клетки сохраняют свои функциональные свойства в составе тканеинженерной конструкции *in vitro*.

Таким образом, митотически инактивированные васкулярные клетки человека могут применяться для разработки методов терапевтического ангиогенеза в лечении ишемических поражений, а так же для получения клеточно-заселенных тканеинженерных конструкций, пригодных для сосудистой хирургии.

## **ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ПРОТЕАЗ ИЗ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ СЕВЕРНОГО ОЛЕНЯ**

### **ISOLATION AND PURIFICATION OF PROTEASES FROM THE REINDEER PANCREAS**

А. А. Стучаева, Н. В. Глазова

*Санкт-Петербургский государственный  
химико-фармацевтический университет*

A. A. Stuchaeva, N. V. Glazova

*St. Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University*

E-mail: [anna.stuchaeva@pharminnotech.com](mailto:anna.stuchaeva@pharminnotech.com)

#### **Аннотация**

Данная работа посвящена разработке метода выделения и очистки гидролитических ферментов из поджелудочной железы северного оленя. В работе описаны оптимальные условия экстракции протеаз из поджелудочной железы северного оленя, подобран оптимальный сорбент для сорбции протеаз из полученного экстракта.

#### **Abstract**

This work is dedicated to the development of a method for the isolation and purification of hydrolytic enzymes from the reindeer pancreas. The optimal conditions for the extraction of proteases from the pancreas of the reindeer are described, the optimal sorbent for sorption of proteases from the obtained extract is selected.

Целью работы являлась разработка инновационного метода выделения и очистки протеолитических ферментов из поджелудочной железы северного оленя.

На данный момент, органы северного оленя являются отходом мясной промышленности и, в отличие от органов КРС и свиней, не используются в производстве. В связи с этим актуальной задачей является разработка методов получения различных фармацевтических субстанций из органов северного оленя. Данное исследование проводилось в рамках научно-исследовательской работы по договору с ГАУ ЯНАО «Окружной технопарк «Ямал».



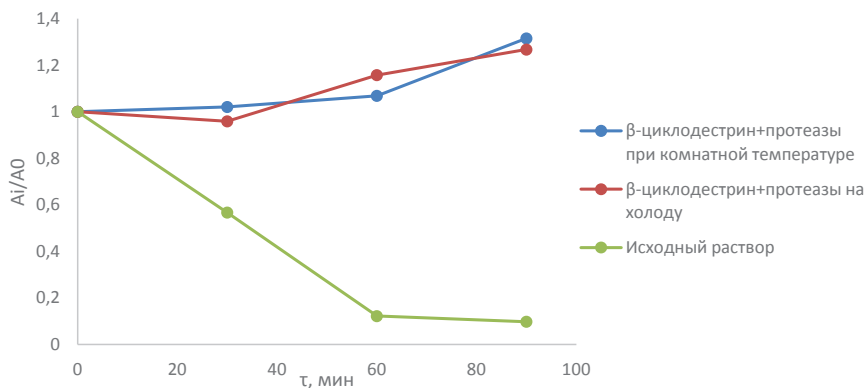
На первом этапе работы были подобраны оптимальные условия экстракции протеаз из поджелудочной железы северного оленя. За основу были взяты условия, при которых проводится экстракция протеаз из поджелудочной железы КРС на ООО «Самсон-мед». Состав экстракционной смеси представлен в таблице 1.

Таблица 1

## Состав экстракционной смеси

Наименование компонента	Масса, г	Объем, мл	Плотность, г/мл
Поджелудочная железа замороженная	73	–	–
Серная кислота 0,25н	402,96	219	1,84
Перлит	0,72	–	–
Аммоний серноокислый	5,621	–	–

Полученный экстракт был очищен методом центрифугирования. На следующем этапе было запланировано концентрирование экстракта методом ультрафильтрации и выделение протеаз из экстракта сорбционно-хроматографическими методами. Так как данные методы являются достаточно длительными по времени, проверялась кинетика инактивации протеаз при комнатной температуре. Как видно из графика (см. рисунок) при нахождении в растворе, активность протеазы при комнатной температуре быстро снижается. Для стабилизации фермента в растворе изучали влияние наноструктур (циклодекстринов). Наиболее значимое воздействие на модельный раствор протеолитических ферментов оказали  $\beta$ -циклодекстрины. Для дальнейшей работы было выбрано соотношение  $\beta$ -циклодекстринов к ферменту, как 1:4 (см. рисунок).



Влияние  $\beta$ -циклодекстринов на стабильность раствора протеаз при различных условиях

Как видно из рисунка, при соотношении  $\beta$ -циклодекстринов к ферменту 1:4 при комнатной температуре и на холоду, при температуре +5 °С протеолитическая активность возрастает на 30 %.

Для очистки и концентрирования экстракта поджелудочной железы северного оленя методом ультрафильтрации использовали ультрафильтрационную установку VIVAFLOW 200 с мембраной 30 000. Результаты ультрафильтрации приведены в таблице 2.

Таблица 2

### Результаты процесса ультрафильтрации

	Удельная активность протеазы в экстракте, Ед/мг	Объем, мл	Конц. общего белка после ультра-ии, мг/мл	Удельная активность протеазы после ультра-ии, Ед/мг
Фильтрат	0,2	170	2,34	0,02
Концентрат		110	16,5	0,31

Как видно из таблицы 2, удалось увеличить удельную активность протеазы в экстракте в полтора раза.

На следующем этапе работы был проведен выбор оптимального сорбента для сорбции протеолитических ферментов из экстракта поджелудочной железы северного оленя. Были изучены различные виды сорбентов. Наилучшим сорбентом оказался Purolite-C150, так как при сорбционно-хроматографическом выделении комплекса протеаз на этом сорбенте был получен максимальный выход на стадии десорбции.

### Выводы

В результате работы были подобраны: оптимальные условия экстракции протеолитических ферментов из поджелудочной железы северного оленя, условия для сохранения стабильности протеолитической активности полученного экстракта, условия для концентрирования экстракта, сорбент для выделения протеаз из полученного экстракта.

### Литература

- Lowry, O. H. Protein measurement with Folinphenol reagent / N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. No1. P. 265–275.
2. Kunitz, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor./ J. Gen. Physiol./ 1974. P. 291–300.
3. Purolite®. [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://www.purolite.com/> (дата обращения: 27.02.2018).

## БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПРОЦЕСС ОЧИСТКИ ОБРАЗЦОВ ШТАММОВ ВИРУСА ГРИППА, НАРАБОТАННЫХ НА РАЗВИВАЮЩИХСЯ КУРИНЫХ ЭМБРИОНАХ\*

BIOTECHNOLOGICAL PROCESS OF INFLUENZA VIRUS PURIFICATION  
PROPAGATED IN EMBRYONATED CHICKEN EGGS

П. Ю. Торжкова, Г. С. Онхонова, С. В. Святченко,  
В. Ю. Марченко, А. Б. Рыжиков

*ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия*

P. Yu. Torzhkova, G. S. Onkhonova, S. V. Svyatchenko,  
V. Yu. Marchenko, A. B. Ryzhikov

*FBRI SRC VB «Vector», Rospotrebnadzor, Russia*

### Аннотация

Целью данного исследования являлся подбор оптимальных условий очистки образцов вируса гриппа при помощи комбинации методов фильтрации и хроматографии. В результате работы были очищены и сконцентрированы различные штаммы вируса гриппа типа А, наработанные на развивающихся куриных эмбрионах. Полученные очищенные образцы могут быть использованы в разных сферах биотехнологического производства и биокинетики, в том числе для оценки специфичности связывания вирусного белка гемагглютинина с клеточными рецепторами.

### Abstract

The aim of this study was to select the optimal conditions for purification of influenza virus samples using a combination of filtration and chromatography methods. Various influenza A virus strains propagated in embryonated chicken eggs were purified and concentrated. The obtained purified samples can be used in various fields of biotechnology and biokinetics, including assessing the receptor binding specificity of hemagglutinin and cell receptors.

---

© П. Ю. Торжкова, Г. С. Онхонова, С. В. Святченко, В. Ю. Марченко, А. Б. Рыжиков, 2019

\* Работа выполнена в рамках государственного задания № 13/19 «Разработка генетических и фенотипических маркеров для количественной оценки пандемического потенциала зоонозных вирусов гриппа».

Высокая степень очистки образцов необходима в разных сферах биотехнологического производства и биокинетики. Так, например, метод поверхностного плазмонного резонанса, основанный на явлении полного внутреннего отражения, дает наиболее точные результаты с максимально очищенными образцами. Также процесс очистки и концентрирования вирусного компонента влияет на эффективность и реактогенность вакцинных препаратов. Применяющиеся в настоящее время технологические схемы включают комбинации нескольких методов, которые позволяют добиваться максимальной очистки вируса от яичного белка и различных компонентов клеток. Основным критерием пригодности и эффективности той или иной схемы очистки и концентрирования является степень чистоты и концентрирования вирусного антигена. Эффективность метода оценивают по выходу вируса, выраженному по проценту удаления балластных белков и нуклеиновых кислот. После осуществления процедур по очистке и концентрированию препарата вирусный компонент должен не только сохранять, но и повышать свои антигенные свойства, т.е. биологическую, иммуногенную, гемагглютинирующую, нейраминидазную активность, а также быть максимально свободным от балластных белков системы культивирования.

Для концентрирования вирусных суспензий и её частичной очистки используются ультрафильтрационные методы. Ультрафильтрация относится к баромембранным методам и заключается в пропускании вирусной суспензии через установку, задерживающую вирусы и пропускающую молекулы примесей, путем разделения веществ с помощью полупроницаемых мембран, в ходе которых перенос вещества через мембрану происходит благодаря градиенту давления. При ультрафильтрации вирусных суспензий количество целевого агента в концентрируемом растворе не изменяется, и благодаря уменьшению объема раствора его концентрация возрастает; в то же время концентрация компонентов растворителя (соли, детергенты, олигосахариды и т. д.) остается постоянной за счет свободного прохождения этих компонентов через мембранные поры. Успех ультрафильтрации зависит от суммарной проницаемости фильтров на единицу площади и применению принципа тангенциального потока. Одним из методов стерилизации вирусосодержащих материалов является микрофильтрация на основе использования мембранных фильтров с диаметром пор 0,20 мкм. Микрофильтрация осуществляется при низком давлении и служит для отделения коллоидных и взвешенных частицы размером 0,01–10 мкм.

Метод гель-хроматографии заключается в пропускании суспензии через колонку, заполненную пористым материалом. Вирусы проходят через колонку без задержки, а примеси задерживаются. Для заполнения колонки применяется макропористое стекло с диаметром пор порядка 100 нм,

с удельной поверхностью 10–25 м<sup>2</sup>/г. Далее колонку промывают буфером. Это обстоятельство вытекает из принципа гель-хроматографии. Зона вирусов и зона примесей движутся с несколько различными скоростями. Отношение этих скоростей равно отношению свободного объема колонки между зернами к свободному объему, включая поры. Это отношение обычно порядка ½ и для того, чтобы зоны разделились, нужно предоставить им свободное пространство. Адсорбционная хроматография заключается в пропуске через колонку вирусной суспензии, после чего колонка промывается чистым буфером, чтобы избавиться от загрязнений. Элюция вирусов с колонки осуществляется в малый объем специально выбранным элюирующим раствором.

Таким образом, применение наиболее оптимального методического и технического решения для концентрирования и очистки вируса (антигена) от контаминантов систем культивирования и других технологических процессов позволяет исключить механические повреждающие воздействия на вирус, повысить эффективность очистки и выход продукта, уменьшить этапоемкость и продолжительность процесса.

В результате комбинации нескольких методов были очищены и сконцентрированы различные штаммы вируса гриппа типа А, наработанные на развивающихся куриных эмбрионах. В ходе электрофореза в полиакриламидном геле по Лэммли была проверена чистота вирусных препаратов.

Было подтверждено, что чистота полученных образцов соответствует требованиям, необходимым для исследования штаммов методом поверхностного плазмонного резонанса.

## ИЗУЧЕНИЕ ОПТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ J-АГРЕГАТОВ АСТАКСАНТИНА И ЕГО ЭФИРОВ\*

### THE OPTICAL PROPERTIES OF ASTAXANTHIN J-AGGREGATES AND ITS ESTERS

В. А. Туранова<sup>1</sup>, Е. А. Куликов<sup>2</sup>, Е. В. Вязов<sup>3</sup>, Р. Г. Гончарик<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Российский химико-технологический университет  
им. Д. И. Менделеева, Россия, Москва*

<sup>2</sup>*НИЦ «Курчатовский институт», Россия, Москва*

<sup>3</sup>*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси,  
Беларусь, Минск*

V. A. Turanova<sup>1</sup>, E. A. Kulikov<sup>2</sup>, Y. V. Viazau<sup>3</sup>, R. G. Goncharik<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Russia, Moscow*

<sup>2</sup>*NRC Kurchatov Institute, Russia, Moscow*

<sup>3</sup>*Institute of Biophysics and Cell Engineering,  
National Academy of Sciences of Belarus, Belarus, Minsk*

E-mail: lera.turanova.00@mail.ru

#### Аннотация

Астаксантин — представитель класса природных каротиноидов. В водном растворе он способен к образованию двух типов агрегатов: Н и J, что характерно для всех каротиноидов, содержащих ОН-группы (ксантофиллы). Известно, что в растворах агрегатов наблюдается смещение спектра поглощения — в красную область в случае J-агрегатов, и в синюю область в случае Н-агрегатов. Считается, что только свободный астаксантин способен формировать агрегаты, поскольку его ОН-группы могут взаимодействовать с такими же группами другой молекулы астаксантина. В нашей работе мы показали, что моно- и диэфиры астаксантина также способны к образованию J-агрегатов, что можно наблюдать по изменению их оптических свойств.

#### Abstract

Astaxanthin is a representative of the group of natural carotenoids. It is able to form two types of aggregates in aqueous solutions: H and J, which is typical of all carotenoids

---

© В. А. Туранова, Е. А. Куликов, Е. В. Вязов, Р. Г. Гончарик, 2019

\* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-54-04003.

containing OH-groups (xanthophylls). It is known that aggregate solutions are characterized by a shift in the absorption spectrum — to the red region in the case of J-aggregates, and to the blue region in the case of H-aggregates. It is usually assumed that only astaxanthin can form aggregates, since its OH-groups can interact with the same groups of another astaxanthin molecule. In our work, we showed that astaxanthin mono- and diesters are also capable of forming J-aggregates, which can be observed by a change in their optical properties.

Астаксантин является природным каротиноидом с амфифильной структурой (рис. 1), благодаря чему обладает одновременно гидрофильными и гидрофобными свойствами. За счет этого астаксантин способен растворяться как в полярных, так и в аполярных растворителях. За счёт наличия в своей структуре свободных гидроксильных групп с обеих сторон астаксантин способен к образованию H- или J-агрегатов, каждый из которых имеет собственный спектр поглощения. В растворах с высоким содержанием воды астаксантин образует H-агрегаты. Такой тип агрегации вызывает гипсохромное смещение спектра поглощения (390 нм) относительно молекулярных мономеров (470 нм). В растворах с меньшим содержанием воды астаксантин образует J-агрегаты. В данном случае молекулы астаксантина ориентированы «голова-к-хвосту», спектр поглощения смещается в красную область (батохромный сдвиг) на 550 нм и более [1].

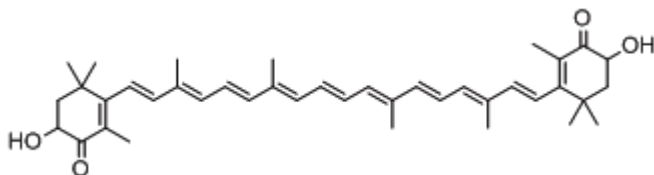


Рис. 1. Структурная формула астаксантина

В клетке *Haematococcus pluvialis* астаксантин содержится преимущественно в виде моноэфиров (70 %) и диэфиров (25 %) [2]. Методом рамановской спектроскопии было показано [3], что эфиры астаксантина в масляных каплях находятся в виде H-агрегатов, хотя *in vitro* их обычно получают с большим содержанием воды. Можно предположить, что J-агрегаты также могут присутствовать в клетке *Haematococcus pluvialis*. Однако нет никаких данных об образовании J-агрегатов для эфиров астаксантина.

Цель работы: получение J-агрегатов свободного астаксантина, его моно- и диэфиров, а также изучение их оптических свойств.

При подготовке экспериментов использовались следующие соединения:

1. Свободный астаксантин (Sigma Aldrich).
2. Диэферы астаксантина (выделены и очищены из «Astaxanthin esters from *Haematococcus pluvialis*») (Sigma Aldrich).
3. Моноэферы астаксантина (выделены и очищены из «Astaxanthin esters from *Haematococcus pluvialis*») (Sigma Aldrich).

Агрегаты получали смешиванием астаксантина в органическом растворителе (ТГФ+МеОН) с водой в соотношении 1:3. Спектрофотометрическим методом определяли максимумы поглощения полученных растворов при различной продолжительности инкубации (рис. 2).

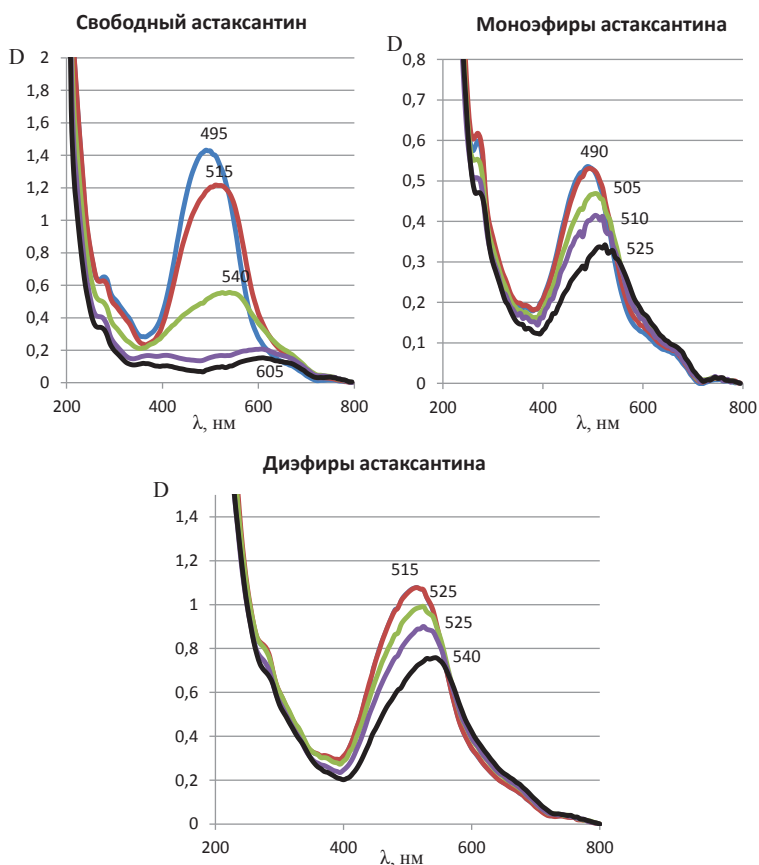


Рис. 2. Изменение спектров поглощения растворов астаксантина при инкубации (— 2 мин, — 8 мин, — 60 мин, — 180 мин, — 1 сутки) при температуре 5 °С



Как видно из представленного рисунка, со временем для максимумов поглощения астаксантина и его эфиров наблюдается батохромный сдвиг (в красную область), что свидетельствует об увеличении сопряжения полиеновой цепи за счёт образования агрегатов. Процесс агрегации для свободной формы протекает значительно быстрее, чем для эфиров.

Таким образом, было показано, что не только свободная форма астаксантина способна к образованию агрегатов, но также и его эфиры. В дальнейшем мы планируем изучить рамановские спектры полученных J-агрегатов и сравнить со спектрами астаксантина и его эфиров в живой клетке. Это позволит сделать выводы о наличии J-агрегатов в *Haematococcus pluvialis* на различных этапах стрессирования.

### Литература

1. Olsina J. et. al. Absorption Spectra of Astaxanthin Aggregates // arXiv preprint arXiv:1208.4958. 2012.
2. Miao F. et al. Characterization of astaxanthin esters in *Haematococcus pluvialis* by liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry // Analytical biochemistry. 2006. Vol. 352. №. 2. P. 176–181.
3. Kaczor A., Baranska M. Structural changes of carotenoid astaxanthin in a single algal cell monitored in situ by Raman spectroscopy // Analytical chemistry. 2011. Vol. 83. №. 20. P. 7763–7770.

## РАЗРАБОТКА БЫСТРОГО ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ТЕСТА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ОРТОПОКСВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ\*

### DEVELOPMENT OF A RAPID DIAGNOSTIC TEST FOR THE DETECTION OF ORTHOROPOXVIRUS INFECTIONS

Н. Д. Ушкаленко, А. В. Ерш, П. В. Филатов, А. Г. Полтавченко

<sup>1</sup> *ФБУН Государственный научный центр  
вирусологии и биотехнологии «Вектор»*

N. D. Ushkalenko, A. V. Ersh, P. V. Filatov, A. G. Poltavchenko

*SRC VB "Vector", Russia*

#### **Аннотация**

Обсуждаются проблемы разработки иммунохимического теста для первичного скрининга и серомониторинга ортопоксвирусных инфекций в клинических образцах.

#### **Abstract**

The problems of creation an immunochemical test for primary screening and monitoring of orthopoxvirus infections in clinical samples has been studied.

Отмена вакцинации против оспы привела исчезновению популяционного иммунитета к поксвирусам. Однако угроза заражения патогенными ортопоксвирусами сохраняется и определяет необходимость разработки чувствительных и оперативных методов индикации патогенов.

Нашей задачей является разработка чувствительного, быстрого и простого в применении иммунохимического теста для выявления ортопоксвирусов в формате «у постели больного». В работе использовали препараты культурального вируса осповакцины (ВОВ) с разной степенью очистки, поликлональные антитела из гипериммунной сыворотки кролика и оснастку ранее разработанного автономного набора для дот-иммуноанализа на плоских белковых матрицах.

---

© Н. Д. Ушкаленко, А. В. Ерш, П. В. Филатов, А. Г. Полтавченко, 2019

\* Работа сделана в рамках выполнения ГЗ-9/19 «Разработка передовых методов экспресс-диагностики ортопоксвирусных инфекций (формат «у постели больного») п.2.4.1 отраслевой программы Роспотребнадзора.

Установлено, что поликлональные антитела кролика могут использоваться в одностадийном дот-анализе, как в качестве иммобилизованного на подложке реагента захвата, так и в качестве связанного с частицами коллоидного золота реагента детекции. Показано, что эффективность выявления ВОВ имеет обратную зависимость от степени очистки препаратов от вневирионных белков и субвирусных структур. Чувствительность экспрессного определения вирусов в менее очищенном препарате оказалась примерно в 30 раз выше, чем в чистом вирусном материале. Прирост чувствительности, предположительно, происходит за счет связывания с антителами захвата вневирионных структур, формирующих на себе крупные агрегаты сенсибилизированных частиц золота. Тест не выявляет перекрестных реакций с гетерогенными вирусами (кори, краснухи и ветряной оспы), вызывающими эритрематозные заболевания.

Одностадийный вариант дот-иммуноанализа позволяет сократить время анализа до 40 мин и увеличить чувствительность выявления ортопоксвирусов в слабо очищенных вирусных препаратах до диапазона  $10^5$ – $10^4$  БОЕ/мл. Полная укомплектованность, простота выполнения анализа и возможность визуального учета результатов позволяют применять тест во внелабораторных условиях.

**ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ  
НАНОРАЗМЕРНОГО КАРБОНАТА КАЛЬЦИЯ  
ДЛЯ БИОМЕДИЦИНСКИХ ПРИМЕНЕНИЙ \***

**PREPARATION AND INVESTIGATION OF PROPERTIES OF NANOSCALE  
CALCIUM CARBONATE FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS**

В. К. Фоменко, Е. В. Дмитриенко

*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,  
Новосибирск, Россия  
Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*

V. K. Fomenko, E. V. Dmitrienko

*Institute of chemical biology and fundamental medicine,  
Siberian Branch of Russian Academy of Science, Novosibirsk, Russia  
<sup>2</sup>Novosibirsk state university, Novosibirsk, Russia*

E-mail: elena.dmitrienko@niboch.nsc.ru

**Аннотация**

Работа направлена на получение и исследование свойств наноразмерного карбоната кальция ( $\text{CaCO}_3$ ), а также возможности его использования для биомедицинских применений, в том числе в качестве носителя лекарственных средств. Предложена методика получения  $\text{CaCO}_3$  контролируемого размера, изучены факторы, влияющие на морфологию и размер частиц. Проведен ряд экспериментов с использованием модельного противоопухолевого антибиотика — доксорубина, направленных на изучение механизма взаимодействия носитель-лекарство, а также эффективности и скорости высвобождения препарата из комплекса с носителем.

**Abstract**

The work is aimed at obtaining and studying the properties of nanoscale calcium carbonate ( $\text{CaCO}_3$ ), as well as the possibility of its use for biomedical applications, including as a carrier of drugs. A method for producing  $\text{CaCO}_3$  of controlled size is proposed, and the factors affecting the morphology and particle size are studied. A number of experiments

---

© В. К. Фоменко, Е. В. Дмитриенко, 2019

\* Работа выполнена в рамках государственного задания 0309-2016-0004, а также синтез адресующих олигонуклеотидов осуществлен при поддержке проекта РНФ 18-14-00357.

using a model antitumor antibiotic — doxorubicin, aimed at studying the mechanism of carrier-drug interaction, as well as the effectiveness and rate of release of the drug from the complex with the carrier.

Адресная терапия является активно развивающейся областью исследований на протяжении уже нескольких десятков лет. Интерес к этому научному направлению обусловлен наличием широкого списка применяемых в клинической практике антибактериальных препаратов, в том числе противоопухолевых, нуждающихся в разработке направленной системы транспорта с целью увеличения эффективности действия лекарственного средства, а также снижения его токсикологического эффекта. Проблема неселективного и неизбирательного действия применяемых в клинике антибиотиков до сих пор не имеет полноценного решения, что подчеркивается растущим количеством публикаций по запросу «smart delivery system» [1]. Несмотря на повышенный интерес исследователей к данной проблеме, на сегодняшний день не предложено универсальной системы адресного транспорта лекарств, одобренной для клинических применений. При конструировании системы адресного транспорта необходимо уделять повышенное внимание к качеству и характеристикам используемых материалов, универсальности и эффективности использования конструкции, а также безопасности и оправданности ее применения.

Предполагается, что создание систем адресного транспорта противоопухолевых антибиотиков будет способствовать снижению высокого процента летальных исходов среди больных, что увеличивает актуальность поиска универсальных эффективных «smart» систем транспорта противоопухолевых агентов.

Таким образом, целью представленной работы является разработка способов получения стабильных, монодисперсных, наноразмерных материалов, и исследование возможности их дальнейшего применения в качестве основ систем доставки терапевтических агентов.

При разработке систем адресного транспорта и контролируемого высвобождения лекарственных препаратов, широкое распространение получила стратегия создания носителя, выступающего в качестве «лекарственного депо». Материал для подобных систем должен отвечать нескольким критериям для дальнейшего применения *in vivo*: биосовместимость, биоразлагаемость, субмикронный размер, а также стабильность при физиологических условиях. Среди разрабатываемых носителей лекарственных средств распространено используют растворимые полимеры, микро- и наночастицы, производные липопротеинов, липосомы и мицеллы. Носители могут быть медленно разлагающимися, реагирующими на внешние сигналы (например,

pH или температура) и аффинно взаимодействующие с мишенями (например, путем их конъюгирования со специфическими антителами, специфическими олигонуклеотидами, в том числе модифицированными).

В ряду применяемых материалов, можно выделить неорганические наночастицы (НЧ), такие как, смешанный оксид железа, диоксид кремния, золото и карбонат кальция. Целесообразность их применения объясняется их доступностью, низкой стоимостью, способностью к функционализации поверхности НЧ, а также возможностью контролируемого получения различных по морфологии и размерам частиц в пределах одного соединения. Дополнительно к перечисленному, НЧ карбоната кальция ( $\text{CaCO}_3$ ), как и ряд других НЧ — фосфата кальция, трифосфата кальция и гидроксиапатита, нестабильны при закисленных pH, что может обеспечивать избирательность высвобождения препарата в закисленные ткани, например, опухолевые. Коллоидное золото интересно тем, что, по литературным данным, НЧ эффективно преодолевают плазмолемму клетки и обладают способностью преобразовывать оптическое излучение в тепло, благодаря эффекту поверхностного плазмонного резонанса, что позволяет использовать фототермическую и фотодинамическую терапии [2]. Диоксид кремния обладает пористой структурой, что увеличивает удельную поверхность, и позволяет сорбировать большее количество лекарства. НЧ смешанного оксида железа обладают магнитными свойствами и могут использоваться в сочетании с магнитно-резонансной томографией (МРТ) для локализации препарата в окружении опухоли, а также для последующей термической абляции.

Для выбора оптимального носителя лекарственного средства, в рамках данной работы были получены НЧ золота, различные по морфологии НЧ диоксида кремния и НЧ карбоната кальция. Полученные материалы были охарактеризованы методами динамического рассеивания света и просвечивающей электронной микроскопии. Дополнительно, была исследована возможность модификации поверхности всех полученных структур с использованием бифункциональных реагентов, а также тиолсодержащих полимеров.

Среди синтезированного ряда частиц на данном этапе для дальнейших исследований выбраны НЧ карбоната кальция, благодаря pH чувствительности и медленной биodeградации. В рамках данной работы предложена новая методика получения НЧ  $\text{CaCO}_3$  доступного для применения *in vivo*. Изучены факторы, влияющие на размер, морфологию и стабильность материала: стехиометрическое соотношение реагентов, химические добавки и природа растворителя. Экспериментально установлена зависимость стабильности НЧ от кислотности среды: при pH выше 5,5 НЧ являются стабильными, при pH ниже 4,0 материал полностью гидролизуеться, в заданном интервале наблюдается зависимость степени разложения  $\text{CaCO}_3$  от показа-

теля кислотности среды. Предполагается, что этот эффект в дальнейшем обеспечит пассивное нацеливание конструкции в микроокружение опухоли, которое обладает пониженным рН.

Для изучения механизма взаимодействия НЧ карбоната кальция с лекарственным препаратом, в качестве модельного терапевтического агента был выбран доксорубин (DOX) — противоопухолевый антибиотик, в настоящее время применяемый в клинической практике для лечения широкого спектра онкологических заболеваний. Было рассмотрено два подхода к получению конструкции носитель-лекарство ( $\text{CaCO}_3$ -DOX), подразумевающих разные механизмы взаимодействия лекарства с НЧ: сорбция на поверхность НЧ и инкапсуляция внутрь.

Детально исследованы количественные параметры взаимодействия НЧ с лекарственным препаратом. Установлены оптимальные условия сорбции и инкапсуляции препарата. Показано, что в идентичных условиях эффективность загрузки НЧ  $\text{CaCO}_3$  выше в сравнении с НЧ смешанного оксида железа, диоксида кремния и полимерных капроновых капсул. Проведен ряд экспериментов, направленных на изучение эффективности и скорости высвобождения антибиотика при вариации температуры и рН среды. Полученные результаты указывают на перспективность применения карбоната кальция в качестве носителя терапевтических средств и дают основания для продолжения исследовательской работы *in vivo*.

### Литература

1. Ahmad K. et al. Nanoparticle-based drugs: A potential armamentarium of effective anti-cancer therapies //Current drug metabolism. 2018. Т. 19. №. 10. С. 839–846.
2. Yeh Y. C., Creran B., Rotello V. M. Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology //Nanoscale. 2012. Т. 4. №. 6. С. 1871–1880.

**ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МИКРОВЕЗИКУЛ,  
ПРОДУЦИРУЕМЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ  
КЛЕТКАМИ, НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ СПЛЕНОЦИТОВ  
И ПОЧЕЧНЫХ ЭПИТЕЛИОЦИТОВ *IN VITRO* \***

ASSESSMENT OF THE INFLUENCE OF TRANSPLANTATION  
OF MICROVESICLES PRODUCED BY MESENCHYMAL STEM  
CELLS ON THE PROLIFERATION OF SPLENOCYTES AND RENAL  
EPITHELIOCYTES *IN VITRO*

Т. С. Хабалова

*ФГБНУ Научно-исследовательский институт фундаментальной  
и клинической иммунологии (НИИФКИ)*

T. S. Khabalova

*Federal State Budget Scientific Institution "RESEARCH INSTITUTE OF  
FUNDAMENTAL AND CLINICAL IMMUNOLOGY", Russia*

E-mail: khabalovat@gmail.com

**Аннотация**

Микровезикулы, полученные из мезенхимальных стволовых клеток представляются перспективными в изучении их возможных регенераторных свойств при повреждениях паренхиматозных органов, таких как почка. Для того, чтобы исследовать про-регенераторное действие МВ, мы исследовали пролиферацию почечных эпителиоцитов и спленоцитов. В ходе эксперимента продуцируемые МСК микровезикулярные частицы усиливали пролиферацию ПЭ, причем эффект наблюдался дозозависимым. Аналогичное действие МВ оказывали и на клетки иммунной системы: отмечалось дозозависимое усиление пролиферации спленоцитов и увеличение их устойчивости к влиянию апоптогенных факторов. Т.е. продуцируемые МСК микровезикулярные частицы оказывают иммуностимулирующее действие. Этот результат противоречит литературным данным, что при острой почечной недостаточности (ОПН), независимо от генеза, наблюдается активация иммунной системы, приводящая к усилению повреждения и про-регенераторное действие МСК обусловлено их иммуносупрессорным действием. Указанные результаты требуют дальнейших исследований о влиянии МВ на функции иммунной системы *in vivo*.



**Abstract**

Microvesicles (ectosomes, MV) are extracellular vesicles ranging in size from 30 to 1000 nm, which can transport molecules such as microRNAs, mRNAs and other molecules, providing intercellular communication. Microvesicles received from mesenchymal stem cells appear promising in the study of their possible regenerative properties in case of damage to all parenchymal organs (such as the kidney). In order to investigate the pro-regenerative effect of MV, we examined the proliferation of renal epithelial cells and splenocytes. During the experiment MV's enhanced the proliferation of PE, and the effect was observed dose-dependent. CF had a similar effect on the cells of the immune system: a dose-dependent increase in proliferation of splenocytes and an increase in their resistance to the influence of apoptogenic factors were noted. MSC-produced microvesicular particles have an immunostimulating effect. This result contradicts the literature that, in acute renal failure, regardless of genesis, an activation of the immune system is observed, leading to increased damage and the regenerative effect of MSCs due to their immunosuppressive effect. These results require further studies on the effect of CF on the function of the immune system *in vivo*.

Влияние микровезикулярных частиц на пролиферацию спленоцитов и клеток почки исследовали в тесте на инкорпорацию НЗ-тимидина. Спленоциты получали путем гомогенизирования селезенки сингенных мышей и высаживали в 96-луночный планшет 300.000 клеток на лунку в полной среде. Почечные эпителиоциты снимали с TCF с использованием 0,25 % раствора версен-трипсина. Спленоциты и ПЭ культивировали в течение 3-х дней в полной среде с добавлением или без добавления микровезикулярных частиц. Дозу микровезикулярных пересчитывали по белку по методу Брэдфорда, и добавляли в титровках 10 мкг/мл, 30 мкг/мл и 90 мкг/мл (основываясь на литературных данных и количестве MV, полученных с одной TCF с МСК). НЗ-тимидин (1мкКи на лунку) добавляли за 16 часов до окончания культивирования. Результат смотрели на β-сцинтиляционном счетчике.

Для определения влияния микровезикулярных частиц на устойчивость лимфоцитов к апоптозу, спленоциты мышей CBF садили в 6 луночный планшет по 5 млн на лунку в полной среде и в полной среде с микровезикулярными частицами в количестве 90 мкг/мл. Экспозиция 2 дня. Затем, для индукции апоптоза, добавляли доксирубицин в дозе 0.1 мкМоль/л на 24 часа. Далее клетки снимали, фиксировали 0,5 % параформалином, окрашивали пропидиум иодидом. Процентное содержание клеток в состоянии апоптоза смотрели на проточном цитофлуориметре FACSCalibur.

**Влияние МВ на пролиферацию спленоцитов и почечных эпителиоцитов**

Уровень пролиферации спленоцитов в тесте с Н<sup>3</sup>-тимидином составил 118 имп/мин, КонА-стимулированная пролиферация составила 1208 им/

мин. Культивирование в присутствии МВ в дозе 10 мкг/мл повышало пролиферативную способность спленоцитов почти в 3 раза (342 имп/мин — спонтанная, 3889 имп/мин — Кона-стимулированная). Стимулирующий эффект на пролиферацию повышался, хоть и не пропорционально с увеличением дозы МВ: 475 имп/мин — спонтанная и 4667 имп/мин — Кона-стимулированная при добавлении МВ в дозе 30 мкг/мл; 492 имп/мин — спонтанная и 5012 имп/мин — Кона-стимулированная при добавлении МВ в дозе 90 мкг/мл.

Аналогичный эффект наблюдался в отношении ПЭ. Добавление МВ в культуральную среду на 3 суток в дозе 10 мкг/мл повышало пролиферацию ПЭ в 4 раза (254 имп/мин против 65 имп/мин в контроле). Увеличение дозы МВ также повышало пролиферацию ПЭ: 337 имп/мин при дозе МВ 30 мкг/мл и 392 имп/мин при дозе МВ 90 мкг/мл.

Таким образом, продуцируемые МСК микровезикулярные частицы дозозависимо стимулируют пролиферацию как спленоцитов, так и клеток почечной ткани.

### **Влияние МВ на апоптоз спленоцитов**

Влияние МВ на апоптогенное действие доксирубицина на спленоциты определяли в тесте с окраской пропидум иодидом. При этом использовали спленоциты как от интактных мышей, так и от мышей с глицерол-индуцированной острой почечной недостаточностью (ОПН). Интересно, что сама по себе индукция ОПН вызывает уменьшение апоптозных спленоцитов почти в 2 раза (16,3 % против 29,17 % у интактных мышей). Добавление МВ вызывает снижение уровня апоптоза как у интактных мышей (21,73 %) так и мышей с ОПН (13,28 %). Соответственно, обратно-пропорционально, увеличивался процент клеток, находящихся в S/M фазе клеточного цикла.

Таким образом, добавление МВ к культуральной среде на 3 суток увеличивает устойчивость спленоцитов к действию апоптогенных факторов как у интактных мышей, так и у мышей в глицерол-индуцированной ОПН.

### **Заключение**

Данные результаты говорят нам о том, что про-регенераторное действие мезенхимальных стволовых клеток во многом, если не полностью, обусловлено воздействием микровезикул. Это открывает большие перспективы по разработке бесклеточного лечения пациентов с почечной недостаточностью. Было показано, что про-регенераторное действие, в отличие от литературных данных, также имеет и иммуностимулирующий эффект. Требуется дальнейшее изучение микровезикул в модели *in vivo*.

**НОКАУТ ГЕНОВ ГЛИКОЗИЛТРАНСФЕРАЗ  
В СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК  
*ARABIDOPSIS THALIANA* С ПОМОЩЬЮ RGEN \***

**KNOCK-OUT OF THE GLYCOSYLTRANSFERASE GENES  
IN *ARABIDOPSIS THALIANA* SUSPENSION CELLS BY RGEN STRATEGY**

С. А. Хозеева, Н. В. Пермякова

*ФИЦ Институт Цитологии и Генетики СО РАН*

S. A. Khozeeva, N. V. Permyakova

*FRC Institute of Cytology and Genetics, Russia*

E-mail: khozeevasophie@gmail.com

**Аннотация**

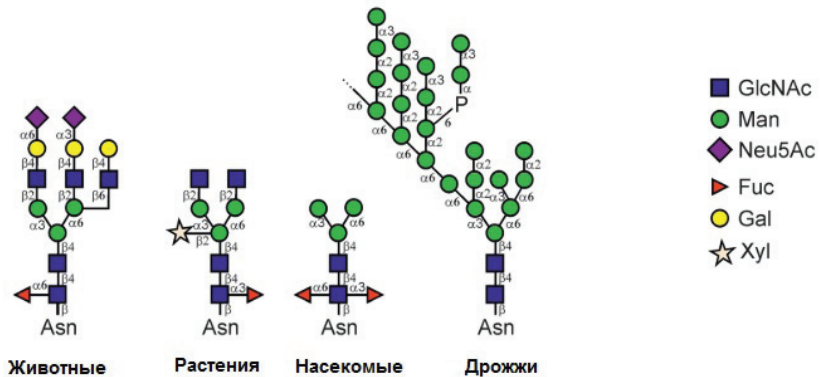
Растения или растительные клетки могут быть использованы для производства фармакологических гликопротеинов, таких как антитела или вакцины. Однако, эти белки несут N-гликаны с типичными для растений остатками ( $\beta$ -1,2-ксилоза и  $\alpha$ -1,3-фукоза), которые могут значительно влиять на иммуногенность, аллергенность или активность белка. В биохимическом пути N-гликозилирования за добавление растительно-специфических гликанов ответственны  $\beta$ -1,2-ксилозилтрансфераза (XYLT) и  $\alpha$ -1,3-фукозилтрансфераза (FUCT). Наша цель состоит в том, чтобы нокаутировать один ген *XYLT* и два гена *FUT11* и *FUT12* в суспензионных клетках *Arabidopsis thaliana* с использованием технологии RGEN (RNA-guided Cas9 endonuclease): РНК-направляемой эндонуклеазы Cas9.

**Abstract**

Plants or plant cells can be used to produce pharmacological glycoproteins such as antibodies or vaccines. However these proteins carry N-glycans with plant-typical residues ( $\beta$ -1,2-xylose and  $\alpha$ -1,3-fucose), which can greatly impact the immunogenicity, allergenicity, or activity of the protein. Two enzymes are responsible for the addition of plant-specific glycans:  $\beta$ -1,2--xylosyltransferase (XYLT) and  $\alpha$ -1,3-fucosyltransferase (FUCT). Our aim consisted of knocking-out one XylT gene and two FucT genes in *Arabidopsis thaliana* suspension cells using RGEN — RNA-guided Cas9 endonuclease.

Keywords: plant-specific glycans, humanized N-glycosylation, molecular farming, gene editing, glycoproteins, glyco-engineering, suspension cells

Использование суспензионной культуры растительных клеток в качестве платформы для производства рекомбинантных белков приобретает все большую популярность в биотехнологии. Растительные клетки в состоянии осуществлять большинство посттрансляционных модификаций белков свойственных белкам животных и при этом не содержат животных патогенов. В частности, растительные клетки, в отличие от дрожжей и бактерий, способны проводить N-гликозилирование белков, характерное для клеток млекопитающих. Растительные N-гликаны содержат сходную с млекопитающими гликановую структуру, но они также содержат специфичные для растений  $\alpha$ -1,3-фукозу и  $\beta$ -1,2-ксилозу (см. рисунок), которые отсутствуют у млекопитающих, бактерий и дрожжей. Именно это является основой для модифицирования пути N-гликозилирования белков у растений, что может позволить в дальнейшем производить высоко гомогенные олигосахариды, характерные для клеток человека, и повысить качество продуцируемых рекомбинантных белков.



#### Различные типы N-гликозилирования.

Показаны типичные структуры N-гликанов у млекопитающих, растений, насекомых и дрожжей (*S. cerevisiae*). Символы для моносахаридов на иллюстрации изображены в соответствии с номенклатурой Консорциума по функциональной гликомике (Strasser 2016)

Вероятная иммуногенность этих гликановых остатков приводит к необходимости создания линии растительных клеток, в которой инактивированы гены, отвечающие за присоединение этих специфичных для растений сахаров — гены  $\alpha$ -1,3-фукозилтрансферазы (*FucT*) и  $\beta$ -1,2-ксилозилтрансферазы (*XylT*). В данной работе для нокаута этих генов используется метод RGEN — РНК-направляемой эндонуклеазы Cas9.

В настоящей работе используется уникальная быстрорастущая суспензионная культура клеток *A. thaliana*. В геноме *A. thaliana*, ген  $\alpha$ -1,3-фукозилтрансферазы дублирован и присутствует в двух копиях *FucT11* и *FucT12*, что увеличивает количество целевых генов для редактирования.

В ходе работы был произведен подбор sgRNA для каждого гена *FucT11*, *FucT12* и *XylT* и необходимых праймеров и эндонуклеаз рестрикции для анализа сайт-специфической мутации.

Доставка компонентов для редактирования в растительные клетки осуществлялась в виде рибонуклеопротеиновых комплексов (РНП) методом биобаллистики. С помощью GeneArt™ Precision gRNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) были *in vitro* синтезированы sgRNA, нацеленные на гены *FucT11*, *FucT12* и *XylT*. Проведены 2 серии биобаллистики РНП-комплексами по суспензионной культуре клеток *A. thaliana*. Из полученных после биобаллистики клеток была выделена геномная ДНК и проведен анализ на наличие сайт-специфических мутаций 32 каллусов.

После проведения анализа были выявлены образцы с вероятной сайт-специфической мутацией (по гену *FucT11* — 12 шт., по *FucT12* — 5 шт. и по *XylT* — 12 шт.), которые далее были просеквенированы. При анализе секвенограмм онлайн-ресурсом TIDE было показано успешное редактирование в 0.9–3.4 % клеток. Низкий процент успешно отредактированных клеток не позволяет отобрать их из суспензионной культуры. Таким образом, возникает необходимость повышения эффективности редактирования и введения селективного отбора.

## ЭФФЕКТИВНЫЙ МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ ПИОЦИАНИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДОБАВОК ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ

### AN EFFECTIVE METHOD FOR PRODUCING PYOCYANIN USING ADDITIVES OF THE NUTRIENT MEDIA

И. Ю. Хохлова, М. В. Чубик

*Национальный исследовательский Томский политехнический университет*

I. U. Khokhlova, M. V. Chubic

*TPU, Russia*

#### **Аннотация**

Пиоцианин — феназиновый пигмент, производимый бактерией *Pseudomonas aeruginosa*. В работе собраны данные для построения кривой роста продуцента и изучено влияние добавок в питательную среду для повышения выхода биогенного пиоцианина.

#### **Abstract**

Pyocyanin is a phenazine pigment produced by the bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. The work collected data to build a producer growth curve and studied the effect of additives in the nutrient medium to increase the yield of biogenic pyocyanin.

Биологически-активные соединения, продуцируемые микроорганизмами, являются неисчерпаемым источником для исследования. В первую очередь интересны антибиотики. Кроме давно известных и широко используемых антибиотиков, есть ряд малоизученных природных соединений, потенциально применимых на практике.

Синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*) является условно-патогенным микроорганизмом, который производит феназиновые производные.

Характерное сине-зеленое окрашивание питательной среды дает пиоцианин. Он относится к группе феназиновых производных и обладает окислительно-восстановительной активностью, так же меняет цвет в зависимости от pH среды и степени окисления. Благодаря универсальному механизму действия обладает подавляющей активностью к бактериям, грибам, простейшим и злокачественным опухолям [1].

Кривая роста микроорганизма дает полное представление об изменении роста культуры во времени, а по её типу в известной мере можно судить о процессах, лежащих в основе регуляции, изменения популяции. Размножение бактерий в жидкой питательной среде наблюдали по возрастающей оптической плотности разведений микроорганизмов.

В настоящее время известно, что характерное приращение оптической плотности в инокулированной питательной среде свидетельствует о размножении в ней микроорганизмов [2]. Высокий уровень корреляции оптической плотности с количеством микробных тел позволяет опосредованно «кривую роста оптической плотности» называть «кривой микробного роста», представленной в виде графиков приращения оптической плотности на каждом шаге измерения.

Для получения кривой роста сначала был построен градуировочный график трехсуточной культуры (зависимость колониеобразующих единиц (КОЕ) от оптической плотности культуральной жидкости), затем проведены динамические измерения оптической плотности инокулята через равные промежутки времени при длине волны фотометрирования 580 нм. Контроль оптической плотности велся на спектрофотометре СФ-102.

Таким образом, была построена кривая роста клеток *P. aeruginosa*. Кроме того, на протяжении всего роста культуры, продукцию пиоцианина определяли путем измерения оптической плотности супернатантов при длине волны 690 нм.

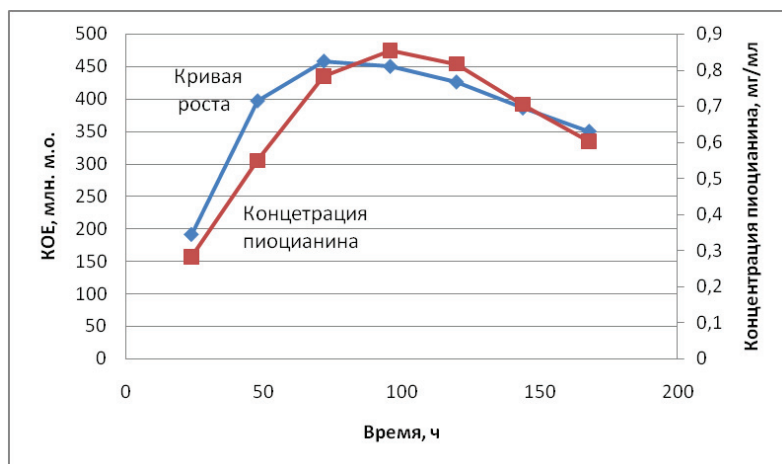


Рис. 1. График корреляции роста культуры и выделения пиоцианина в зависимости от времени (среда № 13)

Чистоту полученного вещества определили с помощью ВЭЖХ (высокоэффективной жидкостной хроматографии) на компактном жидкостном хроматографе Agilent 1200 Compact LC, а также методом тонкослойной хроматографии элюент:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}:\text{C}_6\text{H}_6$  — 80:15:5). Температуру плавления продукта определяли на приборе MP50 MeltingPointSystem.  $T_{\text{пл}}=133^\circ\text{C}$  (лит.  $133^\circ\text{C}$  [4]).

Структуру полученного соединения подтвердили с помощью УФ и ИК — спектроскопии. В исследовании использовались спектрофотометр СФ-102 и ИК-Фурье спектрометр BrukerTensor 27.

### Качественный состав сред

№	Состав сред	Концентрация пиоцианина, мг/мл
1	<b>ГРМ — бульон</b>	<b>0,042</b>
2	ГРМ + Glu	0,022
3	ГРМ + Met	0,041
4	ГРМ + Ala + Leu + Gly	Нет характерной окраски
5	ГРМ + Val	0,058
6	Глюкоза + $\text{NH}_4\text{Cl}$ + $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , $\text{CaCO}_3$	0,003
7	Среда № 6 + Glu	Нет характерной окраски
8	Среда № 6 + Met	0,001
9	Среда № 6 + Ala + Leu + Gly	0,003
10	Среда № 6 + Val	Нет характерной окраски
11	Глицерин + $\text{K}_2\text{HPO}_4$ + $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + $\text{FeSO}_4$ + Leu + Gly	Нет характерной окраски
12	Глицерин + $\text{K}_2\text{HPO}_4$ + $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + $\text{FeSO}_4$ + Ala	0,012
13	<b>Глицерин + <math>\text{K}_2\text{HPO}_4</math> + <math>\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}</math> + <math>\text{FeSO}_4</math> + Ala + Leu</b>	<b>0,126</b>
14	ГРМ + Глицерин + $\text{K}_2\text{HPO}_4$ + $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + $\text{FeSO}_4$ + Leu + Gly	Нет характерной окраски
15	ГРМ + Глицерин + $\text{K}_2\text{HPO}_4$ + $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + $\text{FeSO}_4$ + Ala	0,077
16	ГРМ + Глицерин + $\text{K}_2\text{HPO}_4$ + $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + $\text{FeSO}_4$ + Ala + Leu	0,092
17	Глицерин + $\text{K}_2\text{HPO}_4$ + $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + $\text{FeSO}_4$ + Ala + Leu + Gly	Нет характерной окраски
18	<b>ГРМ + Ala + Leu</b>	<b>0,081</b>
19	ГРМ + глицерин + $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , $\text{FeSO}_4$	0,051



Предполагая, что аминокислоты участвуют в шикиматном биосинтезе пиоцианина [3], а неорганические соли могут быть медиаторами переноса электронов, мы видим, что сочетание аминокислот и органических солей дает заметный эффект повышения выхода пиоцианина.

Таким образом, в ходе работы была сконструирована питательная среда, дающая заметный прирост выхода пиоцианина, необходимый для дальнейшего исследования.

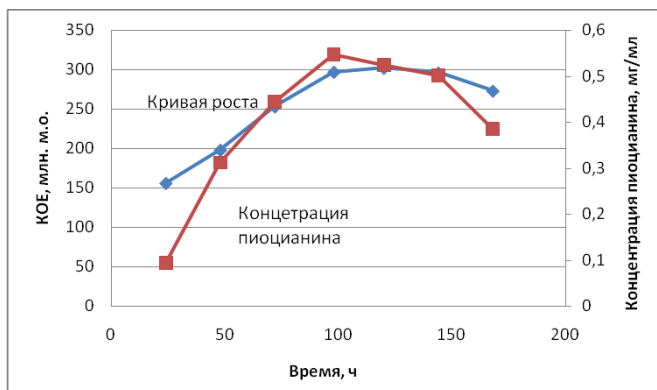


Рис. 2. График корреляции роста культуры и выделения пиоцианина в зависимости от времени (среда № 18)

## Литература

1. Егоров Н. С., Основы учения об антибиотиках: учебник. М.: Наука, 2004. 528 с.
2. Скала. Л.З., Использование кинетических моделей роста микроорганизмов для оценки антибактериальной активности и клинической эффективности препаратов // Сборник тезисов Российского национального конгресса «Человек и лекарство», 1996. 206–222 с.
3. Mentel M., Ekta G., Mavrodi D., Of Two Make One: The Biosynthesis of Phenazines // ChemBioChem. 2009, 10, 2295–2304.
4. Досон Р., Справочник биохимика. М.: Мир, 1991. 544 с.

**АНТИГЕЛЬМИНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЛИСАХАРИДОВ ГРИБА  
*CANTHARELLUS CIBARIUS* В УСЛОВИЯХ *IN VITRO***

**ANTHELMINTHIC ACTIVITY OF *CANTHARELLUS CIBARIUS*  
POLYSACCHARIDES *IN VITRO***

М. А. Цыганов<sup>1,2</sup>, М. А. Проценко<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ Федеральный исследовательский центр  
Институт цитологии и генетики Сибирского отделения  
Российской академии наук, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО Новосибирский национальный исследовательский  
государственный университет, Новосибирск, Россия

<sup>3</sup>ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии  
«Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирск, Россия

М. А. Tsyganov<sup>1,2</sup>, М. А. Protsenko<sup>3</sup>

<sup>1</sup>FRC Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup>Novosibirsk national state research university, Novosibirsk, Russia

<sup>3</sup>SRC VB "Vector", Novosibirsk, Russia

E-mail: mtzygan@mail.ru

**Аннотация**

Гриб Лисичка обыкновенная (*Cantharellus cibarius*) является потенциальным источником антигельминтных препаратов и обладает противоописторхозными свойствами. В данном исследовании показано, что действующими веществами экстракта этого гриба могут быть полисахариды, поскольку их среднеэффективная концентрация, обуславливающая снижение подвижности паразитов *in vitro*, в 170–360 раз ниже, чем у исходного метанольного экстракта гриба *C. cibarius*.

**Abstract**

Golden chanterelle (*Cantharellus cibarius*) is a potential source of anthelmintic drugs and has anti-opisthorchiasis properties. In this study it is shown that the active substances of this mushroom extract may be polysaccharides, since their average effective concentration, which causes a decrease in the mobility of parasites *in vitro*, is 170–360 times lower than that of the initial methanol extract of the *C. cibarius*.

*Opisthorchis felineus* (Rivolta, 1884) (двуустка кошачья, описторх) — широко распространённый на территории России гельминты. Личинки описторха (метацеркарии) попадают в организм хозяина при поедании рыбы семейства Карповые (Cyprinidae), после чего мигрируют в протоки печени и поджелудочной железы, где достигают половозрелости. Гельминты *O. felineus* вызывают описторхоз: паразитарное заболевание, характеризующееся развитием хронического воспаления, широким спектром осложнений (холестаза, холелитиаза, абсцесс печени или поджелудочной железы, холангиокарцинома и др.), а также наличием системных эффектов заболевания.

Основным препаратом для лечения описторхоза является празиквантел. Однако, данное лекарство имеет ряд побочных эффектов, а также сниженную эффективность в отношении ювенильных особей *O. felineus*. Некоторые исследователи отмечают возможную устойчивость гельминтов к празиквантелу. В связи с этим являются актуальными поиск и разработка новых соединений с потенциальными противоописторхозными эффектами.

Возможным источником таких веществ является гриб Лисичка обыкновенная (*Cantharellus cibarius* Fr., 1821), обладающий некоторыми антигельминтными (антинематодными) свойствами и часто используемый в народной медицине [1]. В предыдущих исследованиях было показано, что метанольный экстракт *C. cibarius* при введении инфицированным *O. felineus* мышам в первые сутки после инфицирования вызывает снижение гельминтной нагрузки на 23 %, но не оказывает значимого влияния на более позднем сроке введения. Это свидетельствует о превентивном эффекте экстракта при описторхозе. В условиях *in vitro* экстракт дозозависимо снижал подвижность и жизнеспособность ювенильных гельминтов: среднеэффективная доза ( $IC_{50}$ ), вызывающая снижение подвижности у 50 % гельминтов, была 1,58 мг/мл [2]. Установлено, что эта доза были менее выраженной, чем у празиквантела, у которого  $IC_{50} = 0,23$  мкг/мл [3].

Было выдвинуто предположение, что более низкая противоописторхозная эффективность экстракта *C. cibarius* может быть связана с низким содержанием действующего вещества в нём, в качестве которого рассматривались полисахариды — основной компонент метанольного экстракта *C. cibarius*, обладающие некоторыми иммуномодулирующими и антипролиферативными свойствами [4, 5]. Целью исследования было выделение фракции полисахаридов из *C. cibarius* и анализ её антигельминтной эффективности в отношении ювенильных особей *O. felineus* в условиях *in vitro*.

Для получения полисахаридных фракций *C. cibarius* плодовые тела гриба измельчали, после чего экстрагировали двумя способами. В первом способе производили экстракцию дистиллированной водой на водяной бане при 36–38 °С, во втором — при 95 °С. В обоих случаях производили двукратное

осаждение полисахаридов из экстрагированной фракции 95 % этиловым спиртом при 5–6 °С. Осадок полисахаридов отделяли центрифугированием, после чего высушивали при 25 °С (первый способ) или при 60 °С (второй способ).

Метацеркарии *O. felineus* были выделены из зараженных паразитом язей (*Leuciscus idus* Linnaeus, 1758). Эксцистирование ювенильных червей из метацеркарий обеспечивали выдерживанием с 0,06 % раствором трипсина 15 мин при 37 °С. Ювенильных гельминтов промывали средой инкубации (RPMI 1640 с L-глутамином + 100 мкг/мл стрептомицина + 100 мкг/мл пенициллина + 25 мкг/мл амфотерицина В + 1 % глюкоза) и помещали в ячейки стандартного культурального планшета. Высушенную фракцию полисахаридов разводили в воде и добавляли в ячейки, конечные концентрации в ячейках 0,1, 1, 10 и 100 мкг/мл. Планшет помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор (37 °С, 5 % CO<sub>2</sub>) на 24 часа. Оценку подвижности гельминтов проводили визуально по 4-балльной шкале [6] с нормировкой по контрольной группе (без препаратов). На основании снижения подвижности оценивали IC<sub>50</sub> для обеих фракций полисахаридов *C. cibarius*.

Было показано, что IC<sub>50</sub> полисахаридной фракции, выделенной при 40 °С, составляет 8,90 мкг/мл, а при 90 °С — 4,32 мкг/мл: в 170 и 360 раз (соответственно) меньше, чем у метанольного экстракта *C. cibarius*. Это свидетельствует о том, что действующими антигельминтными веществами *C. cibarius* являются полисахариды. Показана лучшая эффективность фракции, выделенной из грибов при более высокой температуре (90 °С). IC<sub>50</sub> 90 °С-фракции *C. cibarius* всего в 18,4 раза выше, чем IC<sub>50</sub> празиквантела, что свидетельствует о достаточно высоком уровне ее антигельминтной активности. Полагаем, что полисахариды, выделенные из грибов *C. cibarius*, могут быть использованы для создания профилактического антигельминтного средства для лечения описторхоза на начальных стадиях. Однако, это предположение нуждается в дальнейшем исследовании, в частности при экспериментальных условиях *in vivo* у *O. felineus*-инфицированных животных.

## Литература

1. Muszynska B., Kala K., Firlej A., Sulkowska-Zlaja K. *Cantharellus cibarius* culinary-medicinal mushroom content and biological activity // Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Res. 2016;73(3):589–598.
2. Цыганов М. А., Вишневецкая Г. Б., Кукина Т. П., Сорокина И. В., Львова М. Н., Проценко М. А., Костина Н. Е., Августинович Д. Ф. Исследование эффектов грибов *Cantharellus cibarius* на трематоду *O. felineus* и на хозяина паразита инбредных мышей C57BL/6 // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018; 22(7):850–858.

3. Mordvinov V. A., Shilov A. G., Pakharukova M. Y. Anthelmintic activity of cytochrome P450 inhibitors miconazole and clotrimazole: *in-vitro* effect on the liver fluke *Opisthorchis felineus* // Int J Antimicrob Agents. 2017; 50(1):97–100.
4. Nyman A. A.T., Aachmann F. T., Rise F., Balance S., Samuelsen A. B. C. Structural characterization of a branched (1 → 6)- $\alpha$ -mannan and  $\beta$ -glucans isolated from the fruiting bodies of *Cantharellus cibarius* // Carbohydrate Polymers. 2016; 146:197–207.
5. Valverde M. E., Hernández-Pérez T., Paredes-López O. Edible mushrooms: improving human health and promoting quality life // Int J Microbiol. 2015; 2015:376–387.
6. Keiser J., Adelfio R., Vargas M., Odermatt P., Tesana S. Activity of tribendimidine and praziquantel combination therapy against the liver fluke *Opisthorchis viverrini* *in vitro* and *in vivo* // J Helminthol. 2013; 87(2):252–256.

**ВЛИЯНИЕ СОЛЕЙ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ  
ДЕСТРУКЦИИ МОДЕЛЬНОГО КСЕНОБИОТИКА METHYL  
ORANGE ШТАММОМ ГРИБА *TRAMETES HIRSUTA* TH-11**

THE INFLUENCE OF HEAVY METALS SALTS ON THE EFFICIENCY  
OF MODEL XENOBIOTICS METHYL ORANGE DESTRUCTION BY  
*TRAMETES HIRSUTA* TH-11 FUNGUS

А. В. Чайка

*ГОУ ВПО «Донецкий национальный университет»*

A. V. Chaika

*SEI HPE "Donetsk national university"*

E-mail: alexander.v.chaika@gmail.com

**Аннотация**

Изучено влияние ряда солей тяжелых металлов на эффективность окислительной деструкции модельного ксенобиотика methyl orange штаммом ксилотрофного гриба *Trametes hirsuta* Th-11 при глубинном культивировании. Определены оптимальные и критические концентрации ионов некоторых тяжелых металлов для биодеградации methyl orange исследуемым штаммом.

**Abstract**

The effect of some heavy metals salts on the model xenobiotic methyl orange oxidative degradation efficiency by the xylotrophic fungus *Trametes hirsuta* Th-11 strain under deep cultivation was studied. The optimal and critical heavy metals ion concentrations for methyl orange biodegradation by the studied strain were determined.

Одной из острейших проблем современности является антропогенное воздействие на окружающую среду. Среди антропогенных факторов наибольшую опасность представляет химическое загрязнение. В связи с этим актуально изучение ксилотрофных грибов, способных расти на различных питательных субстратах, в частности, отходах производств. При этом ксилотрофные грибы синтезируют экстрацеллюлярные ферменты, обладающие широкой субстратной специфичностью [5], что позволяет им разлагать не

только органические вещества природного происхождения, но и различные ксенобиотики. На активность синтеза указанных ферментов, а, следовательно, и на скорость катализируемых реакций влияет ряд физических и химических факторов. Особое значение имеют ионы металлов, которые по причине острой токсичности и постепенной аккумуляции в природной среде образуют группу наиболее опасных загрязнителей среды и представляют серьезную угрозу для биоты, но, в то же время, составляют необходимую часть ферментативных систем живых организмов [1].

В связи с ингибирующим действием тяжелых металлов на ферментативную активность остро стоит вопрос определения оптимальных, возможных и критических концентраций ионов металлов для процессов биодеградации веществ ксилотрофными базидиомицетами, вовлеченными в технологии биодеструкции ксенобиотиков.

Целью данной работы было проведение лабораторных исследований влияния ряда солей тяжелых металлов на эффективность окислительной деструкции модельного ксенобиотика methyl orange штаммом ксилотрофного гриба *Trametes hirsuta* (Wulfen) Lloyd Th-11 при глубинном культивировании.

В исследованиях использовали коллекционный штамм ксилотрофного базидиомицета *T. hirsuta* Th-11. Штамм культивировали на жидкой питательной среде, содержащей лигносульфонат, твин-80, пептон, глюкозу и минеральные элементы [4]. Культивирование проводили в колбах емкостью 250 мл с 50 мл среды на лабораторной качалке в течение 6 суток. В конце срока культивирования определяли эффективность окислительной деструкции (ЭД) ксенобиотиков по разрушению модельного соединения — красителя methyl orange  $C_{14}H_{14}N_3NaO_3S$  (CAS 547-58-0) культуральным фильтратом штамма [4]. Полученные экспериментальные данные обрабатывали с использованием MS Excel и пакета программ для проведения статистической обработки результатов биологических экспериментов.

Одним из наиболее распространенных тяжелых металлов-загрязнителей природы Донбасса является свинец [3]. Его вносили в питательную среду в виде водного раствора  $Pb(NO_3)_2$  в следующих концентрациях: 0,5; 1,0; 2,5 и 5,0 мМ. На средах со свинцом наблюдалось увеличение эффективности окислительной деструкции модельного соединения штаммом *T. hirsuta* Th-11 на 14–19%. При этом на средах с различными концентрациями свинца уровень ЭД достоверно не отличался. Вероятно, повышение ЭД под действием свинца в эксперименте связано с тем, что исследуемые концентрации ионов металла не имеют значительного ингибирующего эффекта на экстрацеллюлярные ферменты штамма, но вызывают стимуляцию образования мицелием активных форм кислорода, также участвующих в деструкции веществ ксилотрофными грибами.

Следующий тяжелый металл, в значительных количествах содержащийся в техногенно измененных почвах Донбасса, — марганец [2]. Его вносили в среду в виде  $MnSO_4$  в концентрациях 0,5; 1,0; 2,5 и 5,0 мМ. С увеличением содержания марганца в питательной среде, в пределах изученных концентраций, наблюдалось закономерное снижение показателя ЭД штамма *T. hirsuta* Th-11 от 20 до 37 %. Это свидетельствует о нарушении метаболических процессов культуры.

Некоторые тяжелые металлы, такие как медь, участвуют в биологических процессах и относятся к биогенным незаменимым металлам. Для исследования влияния ионов меди на эффективность окислительной деструкции ксенобиотика methyl orange штаммом *T. hirsuta* Th-11 вносили сульфат меди ( $CuSO_4 \cdot 7H_2O$ ) в концентрациях 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 и 10,0 мМ. Наибольшее отрицательное воздействие на уровень ЭД штамма *T. hirsuta* Th-11 отмечено при концентрациях сульфата меди в среде от 2,5 до 10,0 мМ. Показатель ЭД снижался при этом в 9–16 раз в зависимости от концентрации элемента. Результаты указывают на то, что питательная среда содержит необходимое для этого штамма количество ионов меди, а избыточные количества элемента имеют значительное токсическое действие на культуру *T. hirsuta* Th-11.

Согласно перечню Американского агентства защиты окружающей среды одним из наиболее опасных загрязнителей окружающей среды является кадмий. В среду вносили сульфат кадмия ( $3CdSO_4 \cdot 8H_2O$ ) в концентрациях 0,003 мкМ (соответствует ПДК солей кадмия в питьевой воде); 0,034 мкМ (соответствует превышению ПДК в питьевой воде в 10 раз); 17 мкМ (соответствует ПДК в почве) и 51 мкМ (соответствует превышению ПДК в почве в 3 раза). Минимальная концентрация сульфата кадмия (0,003 мкМ) не оказывала влияния на уровень деструкции ксенобиотика methyl orange исследуемым штаммом. Однако увеличение концентрации кадмия в 10 раз уже приводило к достоверному снижению ЭД. Дальнейшее увеличение концентрации сульфата кадмия в среде приводило к снижению исследуемого показателя в 3 раза.

Негативное воздействие ионов марганца, меди и кадмия на эффективность окислительной деструкции methyl orange исследуемым штаммом может быть связана как с ингибированием синтеза экстрацеллюлярных ферментов, участвующих в деструкции модельного ксенобиотика, так и с токсическим действием ионов металлов на эти ферменты на молекулярном уровне. В пределах изученных концентраций медь оказалась гораздо более токсичной по сравнению с остальными элементами, что, вероятно, связано с различным уровнем их подвижности.

Таким образом, не было выявлено общей закономерности влияния ряда солей тяжелых металлов на эффективность деструкции methyl orange глу-



бинной культурой *T. hirsuta* Th-11. Исследуемые металлы по-разному воздействовали на уровень ЭД в зависимости от концентрации. Внесение в среду 0,5 мМ солей свинца приводило к активации метаболических процессов штамма *T. hirsuta* Th-11 и способствовало увеличению деструкции methyl orange. Концентрации других исследуемых микроэлементов в исходной (контрольной) среде являются оптимальными, и внесение дополнительных количеств снижало интенсивность деструкции модельного ксенобиотика штаммом.

Результаты работы являются основанием для дальнейшей оптимизации условий культивирования перспективных грибов-деструкторов с целью разработки способа биодеструкции ксенобиотиков, переработки отходов сельского хозяйства и деревообрабатывающей промышленности.

### Литература

1. Баширова М. Н. Развитие нитчатых цианобактерий в условиях загрязнения тяжелыми металлами / М. Н. Баширова, А. Р. Гальперина // Концепт. 2017. Т. 39. С. 2086–2090.
2. Земля тревоги нашей. По материалам Докладов о состоянии окружающей природной среды в Донецкой области в 2007–2008 годах / Под редакцией С. Третьякова, Г. Аверина. Донецк, 2009. 124 с.
3. Иваницкая Н. Ф. Комплексная оценка содержания свинца в объектах окружающей среды Донецкого региона / Н. Ф. Иваницкая, М. Г. Степанова, З. Л. Усикова, Д. С. Зыков, А. Н. Шарапова // Медико-социальные проблемы семьи, ДонНМУ им. М. Горького. 2013. Т. 18, вып. 2. С. 152.
4. Чайка А. В. Эффективность деструкции красителя methyl orange штаммами ксилотрофных грибов при глубинном культивировании / А. В. Чайка, Д. В. Шершень // Проблемы экологии и охраны природы техногенного региона. 2017. № 1–2. С. 101–107.
5. Kumar R. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives / R. Kumar, S. Singh, O. V. Singh // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 35. P. 377–391.

**ПОДГОТОВКА ПОВЕРХНОСТИ НАНОПРОВОЛОЧНЫХ  
КРЕМНИЕВЫХ ПОЛЕВЫХ ТРАНЗИСТОРОВ КАК ЭТАП  
СОЗДАНИЯ БИОСЕНСОРА**

THE SURFACE PREPARATION OF SILICON NANOWIRE FIELD-EFFECT  
TRANSISTORS AS A STAGE OF A BIOSENSOR CREATION

А. А. Черемискина

*ФБУН Государственный научный центр  
вирусологии и биотехнологии «Вектор»*

A. A. Cheremiskina

*SRC VB "Vector", Russia*

**Аннотация**

Данная работа является анализом литературных данных в области нанопроволочных кремниевых полевых нанотранзисторов. Особое внимание уделено стадиям подготовки поверхности: очистка и модификация. Приведены достоинства и недостатки методов жидкостной химической очистки, различные методы модификации поверхности биосенсоров.

**Abstract**

This work is a literatures analysis in the areas of silicon nanowire field-effect transistors. Particular attention is paid to the stages of surface preparation: cleaning and modification. The advantages and disadvantages of the liquid chemical cleaning methods and various methods for modification of surface are provided

Для индикации биологического материала применяют такие методы как: методы иммунодиагностики, световая и электронная микроскопия, вирусологическое исследование, молекулярно-генетические методы (ДНК — зондирование, полимеразной цепной реакции — ПЦР)<sup>[1]</sup>. К сожалению, данные исследования занимают много времени в связи с невозможностью осуществлять анализ десятков и сотен различных биомаркеров одновременно.

Последние достижения в науке и электронике позволяют перейти на новый уровень лабораторных исследований, поскольку с их помощью созда-

ются такие технологии, как биологические микрочипы (биочипы) [2]. Разработка современных биологических датчиков значительно влияет на области геномики, протеомики, биомедицинской диагностики, открытия лекарств и т. д. В настоящее время в качестве высокочувствительных биохимических сенсоров используются нанопроволочные кремниевые полевые транзисторы.

Их популярность заключается в оксидной пленке на поверхности кремния, которая, во-первых, уменьшает количество потребляемой мощности, во-вторых, увеличивает чувствительность биочипа, в зависимости от толщины  $\text{SiO}_2$ . В основе работы данного типа биочипа лежит реакция взаимодействия рабочей поверхности сенсора с аналитом на электроде, в результате которой изменяется количество свободных носителей заряда в нанопроволоке, и, следовательно, ее проводимость [3, 4].

Перед применением для индикации целевых биомолекул поверхность биочипа проходит несколько этапов подготовки. Первый из них это очистка рабочей поверхности. Она необходима вследствие того, что оксидная пленка активно адсорбирует на себе частицы из атмосферы, что приводит к загрязнению поверхности и неточности измерений.

Существует большое количество методов, которые можно разделить на физические или химические, сухие или жидкостные. Физические методы (отжиг, обезжиривание), в большей степени, применяются для удаления частиц с поверхностного и приповерхностного слоя. Для удаления загрязнений, находящихся в химической связи с поверхностью нанотранзистора, применяются химические методы. К ним относятся обезжиривание в мыльных и перекисных аммиачных растворах и кислотное травление (жидкостная обработка), газовое и плазмохимическое травление (сухие методы чистки). Суть данной обработки заключается в том, что с помощью химической реакции частицы переводят в другие соединения, которые легко удаляются с поверхности полупроводника.

Использование жидкостной чистки вызывает некоторые проблемы. Например, по мере увеличения диаметра кремниевых пластин количество очищающего раствора и деионизированной воды, необходимое для очистки пластины, также увеличивается. Кроме того, часто возникают сложности включения устройства в систему изготовления устройства интегральной схемы из-за разрушения элементов кремниевого нанопроволочного полевого транзистора.

Так как загрязнения имеют различную природу (физические, химические загрязнения и др.), то для полной очистки подложки необходимо подобрать такой технологический процесс, который включает в себя ряд стадий, каждая из которых удаляет один или несколько видов загрязнений. При выборе технологии очистки поверхности следует руководствоваться общими закономерностями:

- механические загрязнения удаляют промывкой в водных ваннах с использованием ультразвука или гидродинамической обработки;
- органические загрязнения — обработкой в кипящих растворителях;
- химические загрязнения — путем химического травления в щелочных или кислотных травителях;
- соляные и ионные загрязнения — ионным обменом или промывкой в особо чистой высокоомной деионизованной воде и т. д. [5].

Второй этап подготовки поверхности биочипа к работе — модификация поверхности нанопроволоки, используемая для создания слоя рецепторов (зондов), которые способны селективно связываться с мишенью непосредственно или с помощью кросс-линкера. В основном для иммобилизации рецепторов применяю дополнительный слой, расположенный между твердой поверхностью чипа и рецепторами, посредством образования связи (ковалентной или нековалентной) с поверхностью обоих слоев. Для этого применяются такие методы как: силанизация, прикрепления линкеров, гидросилирование и использование липидных мембран. В зависимости от определяемого вещества (ДНК, вирусов, химического анализа) в качестве функционального компонента аффинного слоя могут выступать антитела, олигонуклеотиды, лиганды и др. [6].

Анализ литературных данных показал, что существует большое количество методов подготовки поверхности кремниевых нанотранзисторов к работе. Это относится как к стадии очистки и активации поверхности, так и к методам модификации. Каждый из них имеет свои требования и особенности проведения. Но не один из них не являются идеальными. Поэтому работа по улучшению способов очистки-активации и модификации биочипов остается актуальной и по сей день.

## Литература

1. Шуб Г. М., Корженевич В. И., Лунева И. О. Краткий курс медицинской микробиологии / Г. М. Шуб, В. И. Корженевич, И. О. Лунева и др. Саратов, 2001 г. 342 с.
2. Кузнецов Е. В. Биосенсоры на кремниевых нанопроволочных полевых транзисторах / Е. В. Кузнецов, Е. Н. Рыбачек // Инновационная экономика. 2010. № 3. 85–89.
3. MoLai M // *Nanomed. J.* 2016.V. 3. P. 69.
4. Bergveld P // *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 1970. V. BME-17. P. 70.
5. Курносов А. И., Юдин В. В. Технология производства полупроводниковых приборов и интегральных микросхем / А. И. Курносов, В. В. Юдин М.: Высшая школа, 1986. 364.
6. Louis C. P.M. de Smet, Daniela Ullien *Organic Surface Modification of Silicon Nanowire-Based Sensor Devices.* 2011.

**ЗНАЧИМОСТЬ БРИОФИТОВ В ВОПРОСАХ БИОТЕХНОЛОГИИ**

## BIOTECHNOLOGICAL IMPORTANCE OF BRYOPHYTES

М. С. Шабета

*ГНПО «Научно-практический центр Национальной академии наук  
Беларуси по биоресурсам»*

M. S. Shabeta

*SSPA “SPC NAS of Belarus for Bioresources”, Belarus*

E-mail: Zentsova2009@gmail.com

**Аннотация**

Бриофиты — удивительная и малоизученная группа высших растений, обладающих большим потенциалом для использования в геномной инженерии, в качестве индикаторов условий окружающей среды, для очистки воды от различных гидрофильных и гидрофобных загрязнителей и солевых растворов, в легкой промышленности и сельском хозяйстве. В связи с большим потенциалом для хозяйственной деятельности человека изучение бриофитов является актуальным.

**Abstract**

Bryophytes are an amazing and little-studied group of higher plants. These unique plants possess many interesting and useful properties for humans. Bryophytes have great potential for possible use in genetic engineering, as indicators of environmental conditions, contaminated water purification from various hydrophilic and hydrophobic solvents and salt solutions, in light industry and agriculture. Due to the great potential for human activities, the study of bryophytes is relevant.

Мохообразные долгое время были очень сложным объектом для изучения, что обуславливалось их малым размером, сходством близкородственных таксонов и разнообразием форм. Бриология как отдельная наука сформировалась только в XVIII веке. Существенный прорыв в бриологии произошел с появлением микроскопа. С тех пор исследователи продолжают открывать новые факты о мохообразных и находить им применение. Однако до сих пор остается много вопросов об этой группе растений. В связи с не-

достатком квалифицированных бриологов бриофиты до сих пор во многом остаются загадкой. Мохообразные — это высшие споровые растения (около 25 тысяч видов, распространенных по всему миру) представляют собой многолетние (реже однолетние) растения высотой 1–50 см с частичным обособлением ассимиляционной, водопроводящей и механической тканей и групповыми формами роста (дерновинки, куртинки, подушки). Цикл развития отличается преобладанием гаплоидного гаметофита с развитием на нем диплоидного спорофита. Отдел бриофитов включает 3 класса. Антоцеротовые (*Anthocerotae*) — самая древняя группа мохообразных (более 300 видов из 6 родов и 2 семейств), преобладающих в основном в тропиках. Печеночники (*Hepaticae*) подразделяются на 2 класса. *Marchantiopsida* — преимущественно почвенные талломные растения, редко эпилиты или гидрофиты, распространены по всему миру (более 420 видов из 35 родов и 16 семейств), особенно многочисленны в тропиках. *Jungermanniopsida* — эпифитные, напочвенные или эпилитные талломные или листостебельные растения, распространены в субтропиках и тропиках (более 9000 видов из 240 родов и 45 семейств). Мхи (*Musci*) — листостебельные растения со спиральным расположением листьев, подразделены на 3 класса: *Sphagnopsida*, *Andreaeopsida*, *Bryopsida*, включающие около 15–25 тысяч видов из 660 родов. Бриофиты это очень древние организмы, коэволюционно связанные со своими местами произрастания. Они являются неотъемлемой частью экосистем и играют важную роль в их развитии и восстановлении, формируют специфический микроклимат. В Беларуси, богатой хвойными лесами и сфагновыми болотами, актуальна разработка направлений использования бриофитов. Бриофлора Беларуси насчитывает 433 вида [2, 10–11], в том числе 2 вида антоцеротовых из 2 родов, 93 вида печеночников из 45 родов, 29 семейств и 338 видов мхов (*Sphagnopsida* — 36, *Bryopsida* — 302) из 133 родов, 48 семейств. Цитирование таксонов приводится согласно современной номенклатуре мхов [1], печеночников и антоцеротовых [7].

**Свойства бриофитов.** Важно отметить способность бриофитов умеренно подкислять почву за счёт выделения ионов водорода (рН примерно 3). Бриофиты не содержат питательных веществ, в связи с чем не пригодны в качестве кормовой базы в цепях питания, а также это препятствует развитию гнилостных процессов [3–4]. Бриофиты очень выносливы. Периоды засухи или мороза они проводят в состоянии анабиоза благодаря особому химическому составу протопласта их клеток. Также эти растения способны извлекать из атмосферы и накапливать в себе ионы различных элементов, в том числе ионы тяжёлых металлов. Это свойство бриофитов успешно используется для мониторинга загрязнения атмосферы [10]. Анатомио-морфологические особенности бриофитов позволяют им активно накапливать тяжелые металлы не только из субстрата, но

и из атмосферного воздуха. Многолетнее нарастание фитомассы, ее медленное отмирание и минерализация способствуют депонированию тяжелых металлов в клетках надземных органов в достаточно высоких концентрациях. Мохообразные обладают свойством угнетать рост микроорганизмов [3–4, 6, 10], таких как золотистый стафилококк, кишечная палочка, сальмонелла, кандиды, сарцина желтая, стрептококк гноеродный и др. Например, сальмонеллу могут угнетать 16 видов бриофитов. Сфагнум также характеризуется антибактериальными, дезинфицирующими и противогрибковыми свойствами (в состав сфагнума входят: бактерицидное фенолоподобное вещество — сфагнол; антибиотики — сфагновые кислоты; кумарины, тритерпеновые соединения и т. д.) [3–4]. Сфагновые мхи обладают высокой абсорбирующей способностью по отношению к жидкостям, газам и соляным растворам (некоторые виды сфагнума впитывают влаги в 20 раз больше собственного сухого веса) [3–4].

Использование бриофитов. В настоящее время активно развивается направление использования мохообразных в генной инженерии, что увеличивает интерес к этой группе растений. Все чаще в медицине используются белки, ферменты и антитела, полученные с использованием генно-инженерных технологий. Эти рекомбинантные белки, называемые также комплексными биофармацевтическими препаратами, применяют как для диагностики, так и для лечения различных заболеваний. Биотехнологической фирме «Greenovation» из Фрайбурга удалось получить в биореакторе на основе мха *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp. моноклональные антитела, оказавшиеся при тестировании в сорок раз активнее аналогичных антител, полученных в культуре животных клеток [5].

Бриофиты широко используются в качестве индикаторов экологических условий, в том числе и для индикации загрязнения атмосферы тяжелыми металлами. Знания о видовом составе и проективном покрытии бриофитов позволяют проводить биоиндикационные исследования экосистем относительно существующего в местообитании комплекса экологических факторов, а также проводить оценку загрязнения окружающей среды, в том числе тяжелыми металлами. Существует большой объем данных, подтверждающих высокую металлоаккумуляционную способность бриофитов, произрастающих в самых разных природных условиях. Результаты проведенных к настоящему моменту исследований подтвердили возможность использования некоторых видов бриофитов (*Bryum caespitum* Hedw., *B. capillare* Hedw. и др.). Живые растения сфагнума и торф применяются для очистки окружающей среды, поскольку сфагнум является отличным абсорбентом различных гидрофильных и гидрофобных растворителей, соляных растворов, загрязнений воздуха [6, 8–9]. Данный способ очистки нетоксичен, а отработанный материал легко уничтожается посредством сжигания или закладки в компост. Растения сфагнума

могут также быть использованы в качестве средства, отделяющего гидрофильный раствор от гидрофобного. Обладая свойствами гидропонного субстрата сфагнум используется в качестве субстратного компонента в цветоводстве и флористике при проращивании семян, черенковании, клонировании, транспортировке растений и плодов. Сфагнум также используется в строительстве при укладке срубов. С использованием сфагнума могут изготавливаться дезинфицирующие средства, одноразовые абсорбирующие жидкость изделия, упаковочные материалы, стельки и элементы обуви и другое [3–4, 9].

Резюмируя выше изложенное следует подчеркнуть, что бриофиты, широко распространенные на территории Беларуси, с учетом необходимости их возобновления обладают большим потенциалом для возможного использования их в генной инженерии, биоиндикации, очистке загрязненных вод, для легкой промышленности и в сельском хозяйстве. Мохообразные еще не полностью раскрыли нам свои секреты. Впереди нас ждут удивительные открытия.

### Литература

1. Потемкин, А. Д. Печеночники и антоцеротовые России / А. Д. Потемкин, Е. В. Софронова // Т. 1. СПб.-Якутск: Бостон-спектр, 2009. 368 с.
2. Рыковский, Г. Ф. Современная таксономическая структура бриофлоры Беларуси / Г. Ф. Рыковский, М. С. Шабета // Ботаника (исследования): Сборник научных трудов. Ин-т эксперимент. бот. НАН Беларуси. Минск : Право и экономика, 2015. Вып. 44.
3. Рыковский, Г. Ф. Происхождение и эволюция мохообразных / Г. Ф. Рыковский. Минск: Беларус. навука, 2011. 433 с.
4. Рыковский, Г. Ф. Флора Беларуси. Мохообразные : в 2 т. / Г. Ф. Рыковский, О. М. Масловский / под ред. В. И. Парфенова. Минск : Беларуская навука, 2004–2009. Т. 2 : Hepaticopsida Sphagnopsida 2009. 213 с.
5. Büttner-Mainik, A., J. Parsons, H. Jérôme, A. Hartmann, S. Lamer, A. Schaaf, A. Schlosser, P. F. Zipfel, R. Reski, E. L. Decker. Production of biologically active recombinant human Factor H in *Physcomitrella*. *Plant Biotechnology Journal*, 2010.
6. Decker, E.L., R. Reski. Moss bioreactors producing improved biopharmaceuticals. *Current Opinion in Biotechnology*. 2007: 18, 393–398.
7. Ignatov, M. S. Check-list of mosses of East Europe and North Asia / M. S. Ignatov, O. M. Afonina, E. A. Ignatova et al. // *Arctoa*. 2006. Т. 15. P. 1–130.
8. Mathavan, G. N. Water, Air and Soil Pollution / G. N. Mathavan, T. Viraraghavan. 1989. Vol. 45. P. 17–26.
9. Shabeta, M. S. Biotechnological importance of sphagnum mosses. *The EuroBiotech Journal*, 2017. 1: ISSUE 2:1–2.
10. Shabeta, M.S., G. F. Rykovsky, V. I. Parfenov. *Bryophytes of coniferous forests of Belarus*. Saarbrücken: Laplabert Academic Publishing, 2016: 185.
11. Shabeta, M.S., G. F. Rykovsky. *Bryophyte diversity in the Belarus coniferous forests*. *Arctoa*. 2015. 24: 541–546.



## ЭФФЕКТИВНАЯ ТРАНСДУКЦИЯ НЕЙРОНОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЛЕНТИВИРУСНЫМИ ВЕКТОРАМИ ПРИ ПОМОЩИ ОЧИСТКИ ИОНООБМЕННОЙ ХРОМАТОГРАФИЕЙ\*

EFFICIENT TRANSDUCTION OF THE BRAIN NEURONS BY  
LENTIVIRAL VECTORS PURIFIED BY ANION EXCHANGE  
CHROMATOGRAPHY

Е. В. Шабурова, Д. А. Ланшаков

ФГБОУ ВПО «Новосибирский национальный исследовательский  
государственный университет», Россия  
ФГБНУ ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Россия

E. V. Shaburova, D. A. Lanshakov

*Novosibirsk National Research State University, Russia  
Institute of Cytology and Genetic SB RAS, Russia*

E-mail: sliza.nsk@gmail.com

### Аннотация

Для повышения эффективности трансдукции нейронов *in vivo*, вирусные препараты для доставки генов в ЦНС должны обладать высоким титром и высокой степенью очистки. В этой работе проведено сравнение наиболее распространенных способов очистки лентивирусных векторов, такие как преципитация вирусных частиц полиэтиленгликолем (PEG) и ионообменная хроматография на твердофазном носителе с привитыми сульфо- или четвертичными аммониевыми группами. Полученные результаты позволяют предположить, что комбинация преципитации PEG и анионообменной хроматографии (с четвертичными аммониевыми группами) является оптимальным методом для получения высококонцентрированных лентивирусных частиц, подходящих для трансдукции нейронов.

### Abstract

To increase the efficiency of neuron transduction *in vivo*, viral preparations for gene delivery to the central nervous system are required to be highly concentrated and have a high degree of purification. We compared the most common purification methods for

---

© Е. В. Шабурова, Д. А. Ланшаков, 2019

\* Исследования выполнены при поддержке бюджетным проектом № 0259-2019-0003.

lentiviral vectors, such as precipitation of viral particles with polyethylene glycol (PEG) and ion-exchange chromatography with sulfonic or quaternary ammonium groups. The obtained results suggest that the combination of PEG precipitation and anion exchange chromatography (with quaternary ammonium groups) is the optimal method for producing highly concentrated lentiviral particles suitable for neuron transduction.

### **Актуальность**

Повышение эффективности трансдукции нейронов *in vivo* является одним из шагов по апробации генетической терапии болезней нервной системы. В связи с высокой чувствительностью нейронов к токсичным и иммуногенным компонентам, а также ограничениями, вводимыми процедурой стереотаксической доставки вектора, вирусные препараты для доставки генов в ЦНС должны быть тщательно очищены и обладать высоким титром. В этой работе проведено сравнение наиболее распространенных способов очистки лентивирусных векторов [1], таких как преципитация вирусных частиц полиэтиленгликолем (PEG) и ионообменная хроматография на твердофазном носителе с различными привитыми сульфо- или четвертичными аммониевыми группами.

### **Материалы и методы**

Лентивирусы были получены, очищены и сконцентрированы по методикам, предложенными Kutner et al. [1] Всего было проанализировано 4 группы, в основе которых лежит очистка вирусных частиц преципитацией PEG 6000: с последующим концентрированием при помощи ультрафильтрации, без процедуры концентрирования, с анионообменной хроматографией на четвертично-аммониевых концентрирующих патронах ДИАПАК ТА, с катионообменной хроматографией на концентрирующих сульфопатронах ДИАПАК Сульфо (в двух последних группах также проводилась концентрирование ультрафильтрацией) соответственно. Титр определяли с помощью обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени [2]. Также были проведены инъекции полученных вирусных векторов *in vivo* в мозг двухдневных крысят.

### **Результаты**

Согласно результатам RT-PCR, наивысший титр (порядка  $10^9$  вирусных частиц в мкл) был получен при очистке вирусных векторов с помощью преципитации PEG с последующей анионообменной хроматографией на колонках с четвертичными аммониевыми группами. Пробы, где очистка проводилась только при помощи PEG, имели наименьший титр. После инъекции лентивирусов, преципитированными при помощи PEG (с последу-

ющей концентрацией и без неё) в головной мозг неонатального крысенка, были обнаружены аномальные агрегаты трансдуцированных нейронов, преимущественно в области коры. Возможно, при введении этих препаратов, оставшиеся молекулы полиэтиленгликоля вызывают слияние трансдуцированных клеток [3]. Подобных артефактов не наблюдалось в группах с дополнительным этапом очистки на ионообменных колонках.

### **Заключение**

Полученные результаты позволяют предположить, что комбинация преципитации PEG и анионообменной хроматографии (с четвертичными аммониевыми группами) является оптимальным методом для получения высококонцентрированных лентивирусных частиц, подходящих для трансдукции нейронов.

### **Литература**

1. Kutner R. H., Zhang X.-Y., Reiser J. Production, concentration and titration of pseudotyped HIV-1-based lentiviral vectors // Nat. Protoc. Nature Publishing Group, 2009. Vol. 4, № 4. P. 495–505.
2. Scherr M. et al., Efficient gene transfer into the CNS by lentiviral vectors purified by anion exchange chromatography // Gene Ther. Nature Publishing Group, 2002. Vol. 9, № 24. P. 1708–1714.
3. Messineo E., Pollins A., Thayer W. Optimization and evaluation of an *in vitro* model of PEG-mediated fusion of nerve cell bodies.// J Clin. Neurosci., 2019. Vol. 5, № 63. P. 189–195.

**НАНОКОНСТРУКЦИИ ЛИПОЕВОЙ КИСЛОТЫ:  
ПОЛУЧЕНИЕ, ХАРАКТЕРИСТИКИ И ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ  
НА АГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ\***

**NANOCONSTRUCTIONS OF LIPOIC ACID:  
PRODUCTION, CHARACTERISTICS AND STUDY OF INFLUENCE  
ON PLATELET AGGREGATION**

В. А. Щелконогов<sup>1,2,3</sup>, А. В. Шипелова<sup>1</sup>, А. М. Синебрюхова<sup>1</sup>,  
Е. С. Дарнотук<sup>1</sup>, Н. С. Шастина<sup>1</sup>, О. А. Баранова<sup>2,3</sup>, А. В. Чеканов<sup>2,3</sup>,  
К. Д. Казаринов<sup>3</sup>, А. А. Селищева<sup>2</sup>, Э. Ю. Соловьева<sup>2</sup>, А. И. Федин<sup>2</sup>

<sup>1</sup> МИРЭА — Российский технологический университет (ИТХТ), РФ, Москва

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский  
университет им. Н. И. Пирогова Минздрава России

<sup>3</sup> Фрязинский филиал ФГБУН «Институт радиотехники и электроники им.  
В. А. Котельникова» РАН

V. A. Shchelkonogov<sup>1,2,3</sup>, A. V. Shipelova<sup>1</sup>, A. M. Sinebryukhova<sup>1</sup>,  
E. S. Darnotuk<sup>1</sup>, N. S. Shastina<sup>1</sup>, O. A. Baranova<sup>2</sup>, A. V. Chekanov<sup>2</sup>,  
K. D. Kazarinov<sup>3</sup>, A. A. Selishcheva<sup>2</sup>, E. Y. Solovieva<sup>2</sup>, A. I. Fedin<sup>2</sup>

<sup>1</sup> MIREA-Russian technological University (ITHT), 119571, Russia, Moscow

<sup>2</sup> Pirogov Russian National Research Medical University,

<sup>3</sup> Kotelnikov Institute of Radioengineering  
and Electronics, RAS (Fryasino branch)

e-mail: vasiliy9999@yandex.ru

**Аннотация**

Были получены наноконструкции с ЛК (липосомы и наноэмульсии) с размером частиц от 50 до 250 нм, характеризующиеся 85±10 % ЭВ ЛК в НЧ, её медленным высвобождением из наноформ, а также обладающие высокой стабильностью

---

© В. А. Щелконогов, А. В. Шипелова, А. М. Синебрюхова, Е. С. Дарнотук, Н. С. Шастина, О. А. Баранова, А. В. Чеканов, К. Д. Казаринов, А. А. Селищева, Э. Ю. Соловьева, А. И. Федин, 2019

\* Исследования выполнены при поддержке гранта Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ. Регистрационный номер НШ-7946.2016.11.

(8–12 месяцев) при длительном хранении при комнатной температуре. Кроме того, было установлено, что получение эмульсий (Слк=5–7 мг/мл) позволяет на 40 % повысить концентрацию ЛК по сравнению с липосомами (Слк=5 мг/мл), что является существенным преимуществом. Полученные нанодисперсии были гомогенными (ИП>0.3). Было показано, что липосомы и наноэмульсии с ЛК ингибируют агрегацию тромбоцитов (Тц), обусловленную арахидоновой кислотой. Причем наноэмульсии с ЛК эффективней (в 1.5 раз) подавляли агрегацию по сравнению с ЛК-липосомами.

**Ключевые слова:** липоевая кислота, липосомы, наноэмульсии, наночастицы, тромбоциты, арахидоновая кислота.

### Abstract

Nanoconstructions with lipoic acid (LA, liposomes and nanoemulsions) with size of particles from 50 to 250 nm were obtained and characterized by  $85\pm 10\%$  encapsulation efficiency of LA in NP, its slow release from nanoforms, and possessing stability during long-term storage (8–12 months) at room temperature. In addition, it has been found that the obtaining of emulsions (Cla=5–7 mg/ml) can significantly increase 40% the concentration of LA compared with liposomes (Cla=5–7 mg/ml), which is a significant advantage. The obtained nanodispersions were homogeneous (PI>0.3). It has been shown, that liposomes and nanoemulsions with LA inhibit platelet aggregation caused by arachidonic acid. Moreover, nanoemulsions with LA more efficiently (by 1.5 times) suppressed aggregation compared with LA liposomes.

**Key words:** lipoic acid, liposomes, nanoemulsions, nanoparticles, platelets, arachidonic acid.

Сосудистые заболевания головного мозга относятся к числу наиболее распространенных форм патологии ЦНС. Ежегодно более 15 млн. человек во всем мире переносят инсульт, причем для 7 млн. данная патология является смертельной, а для остальных — глубоко и длительно инвалидизирующей [1]. К основным патогенетическим механизмам ишемического инсульта относят: возникновение и прогрессирование окислительного стресса, нарушения сосудисто-тромбоцитарного и коагуляционного гемостазов, повреждения ГЭБ и др. [2]. Терапия данной патологии включает применение препаратов, проявляющих антиоксидантное действие, препятствующих агрегации тромбоцитов. Одним из наиболее универсальных и перспективных антиоксидантов в комплексной терапии ишемии головного мозга является липоевая кислота (ЛК).

Поэтому **целью данной работы** является получение различных наноконструкций с ЛК, определение их характеристик и оценка эффективности их действия на агрегацию тромбоцитов.

На первом этапе работы получали наноконструкции с ЛК: липосомы и наноэмульсии (НЭ). Липосомы с ЛК получали из фосфатидилхолина (ФХ) методом «пассивной» загрузки, диспергируя липидную плёнку фосфатным буферным раствором (ПБС, рН 7.4) с последующей экструзией. Прямые

наноэмульсии («масло-в-воде») с ЛК получали методом ультразвукового диспергирования после инъекции ПБС и стабилизатора, с последующим удалением органического растворителя и избытка воды с целью повышения концентрации ЛК в наночастицах (НЧ). Индекс полидисперсности (ИП), размер и  $\zeta$ -потенциал ЛК-наночастиц определяли методом динамического и электрофоретического светорассеяния.

В результате проведенных исследований были получены фосфатидилхолиновые липосомы с ЛК (соотношение ЛК:ФХ=1:8), а также наноэмульсии с ЛК на основе ФХ (ЛК:ФХ=2:1, ЛК-ФХ), из 0.4 % Плуороника Ф68 (ЛК-Ф68) и из ФХ, Ф68 и ЛК (ЛК-ФХ-Ф68) в ПБС (рН 7.4), характеризующиеся стабильностью при комнатной температуре в течение 8–12 месяцев. Размеры полученных наноконструкций с ЛК колебались в диапазоне 100–200 нм, а среднее значение ИП–0.23, что подтверждало гомогенность нанодисперсий (НД). Полученные ЛК-наночастицы были электронейтральными (значения поверхностного заряда не превышали –5,5 мВ). При сравнении характеристик, полученных наноконструкций ЛК (ФХ-липосом и НЭ) установили, что в наноэмульсиях удалось повысить растворимость ЛК, в 1,5 раза, используя концентрации ЛК 5–7 мг/мл, в то время как для получения липосом с ЛК использовали концентрации 1 и 5 мг/мл. При дальнейшем увеличении концентрации ЛК (7–10 мг/мл) в липосомах происходило выпадение ЛК в осадок, и образовывались нестабильные дисперсии с размером частиц более микрона. При этом, удалось добиться достаточно высокой эффективности включения (ЭВ) ЛК в нанодисперсиях (на основе ФХ), равной 85–95 %, в то время как ЭВ ЛК в липосомах составляла 75–80 %. Более того, необходимо отметить, что в полученных НЭ (в состав которых входил ФХ) содержание ЛК в 2 раза превышало содержание ФХ (ЛК:ФХ–2:1), в то время как в липосомах содержание ФХ, значительно превышало содержание ЛК (ЛК:ФХ–1:8).

Наноэмульсии с липоевой кислотой содержащие в своем составе, стабилизатор Плуороник Ф68 (ЛК-Ф68 и ЛК-ФХ-Ф68) были гетерогенными (ИП>0.3) и состояли из двух фракций НЧ: 50–90 нм (15–20 %) и 130–250 нм (85–90 %). Полученные результаты связаны с образованием мицелл Плуороника Ф68 при озвучивании размер которых был менее (не превышал) 100 нм. Кроме того, как и ФХ липосомы с ЛК, так и наноэмульсии с ЛК на основе Ф68 были более стабильными (более 11 месяцев) по сравнению с фосфатидилхолиновыми НЭ (8 месяцев).

С помощью крио-ПЭМ была изучена морфология ФХ-липосом и ФХ-наноэмульсий. Было обнаружено, что ФХ-липосомы в основном представляют собой гомогенную систему, состоящую из однослойных везикул. В образце ФХ-НЭ, в свою очередь представляют систему мультислойных наноструктур, практически не отличающихся по размерам.

Далее изучали кинетику высвобождения ЛК из фосфатидилхолиновых липосом и наноэмульсий при помощи диффузионной ячейки Франца, загружая в донорную камеру липосомы или наноэмульсии, а в акцепторный отсек — ПБС. В результате исследований было обнаружено, что из ФХ-липосом за 22 часа высвободилось  $45 \pm 3$  % ЛК, а из ФХ-наноэмульсий  $55 \pm 5$  %, однако на начальном этапе процесса происходило медленное выделение ЛК из НЭ и быстрое — из липосом. Быстрый выход ЛК из липосом может быть связан с тем, что это в основном однослойные частицы, в то время как НЭ состоят из нескольких бислоев. Поэтому выход ЛК из НЧ затруднен и происходит с меньшей скоростью, что является важным преимуществом для создания лекарственной формы ЛК.

На завершающем этапе работы оценивали влияние полученных наноконструкций ЛК на агрегацию тромбоцитов (Тц), в плазме крови, взятой у здоровых доноров, методом оптической агрегатометрии. В качестве индуктора агрегации Тц использовали арахидоновую кислоту (АК). В ходе проведенных исследований, было установлено, что ЛК-липосомы (Слк=1–2 мМ) подавляют агрегацию тромбоцитов на 30–45 %. В свою очередь (Более того), ФХ наноэмульсии с ЛК и ЛК-наноэмульсии на основе Ф68 (Слк=1.3–3.8 мМ) эффективней (значительно) ингибировали агрегацию Тц, вызванную АК, на 35–70 % и 50–80 % соответственно. Данные результаты можно объяснить с тем, что концентрация ЛК в наноэмульсиях в 1.5 раза превышала концентрацию ЛК в липосомах. Кроме того, было обнаружено, что ФХ-липосомы, ФХ-наноэмульсии (Сфх=0.1–4 мМ) и мицеллярный раствор Плюроники Ф68 (0.01–1.2 %), незначительно (на 10–15 %) уменьшали агрегацию Тц, обусловленную АК.

Таким образом были получены наноконструкции с ЛК (липосомы и наноэмульсии) с размером от 50 до 250 нм, характеризующиеся  $85 \pm 10$  % ЭВ ЛК в НЧ, её медленным высвобождением из наночастиц, а также обладающие высокой стабильностью (8–12 месяцев) при длительном хранении при комнатной температуре. Проведенные исследования в данной работе показывают, что полученные наноконструкции с ЛК (липосомы и НЭ) ингибируют агрегацию Тц, причем антиагрегационный эффект наиболее выражен в случае использования ЛК-НЭ, что позволяет в дальнейшем, после проведения дополнительных исследований, использовать полученные наночастицы с ЛК в качестве нового возможного лекарственного средства при комплексной терапии ишемии головного мозга.

## Литература

1. Benjamin E. J., Virani S. S., Callaway C. W., Chamberlain A. M., Chang A. R., Cheng S., Chiuve S. E., Cushman M., Delling F. N., Deo R., et al. Heart disease and stroke statistics-2018 update: a report from the American Heart Association // *Circulation*. 2018, vol. 137, no.12, 67–492.
2. Гусев Е. И., Скорцова В. И. Ишемия головного мозга. М.: Медицина, 2001, 328 с.

**ДИЗАЙН ГЕНА ПРОХИМОЗИНА ЛОСЯ (*ALCES ALCES*)  
ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЕГО РЕКОМБИНАНТНОГО АНАЛОГА  
В ПРОКАРИОТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ ЭКСПРЕССИИ \***

DESIGN OF THE ELK PROCHIMOSIN GENE (*ALCES ALCES*) FOR  
OBTAINING ITS RECOMBINANT ANALOGUE IN THE PROCARIOTIC  
EXPRESSION SYSTEM

Д. Н. Щербаков<sup>1,2</sup>, А. А. Бондарь<sup>3</sup>, А. П. Рудометов<sup>1</sup>, С. В. Беленькая<sup>1</sup>,  
В. В. Ельчанинов<sup>4</sup>, А. А. Ильичев<sup>1</sup>, А. Д. Коваль<sup>4</sup>

<sup>1</sup> *ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии  
«Вектор» Роспотребнадзора*

<sup>2</sup> *Алтайский государственный университет*

<sup>3</sup> *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН*

<sup>4</sup> *Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий,  
Сибирский НИИ сыродоления*

D. N. Shcherbakov<sup>1,2</sup>, A. A. Bondar<sup>3</sup>, A. P. Rudometov<sup>1</sup>, S. V. Belenkaya<sup>1</sup>,  
V. V. Elchaninov<sup>4</sup>, A. A. Ilyichev<sup>1</sup>, A. D. Koval<sup>4</sup>

<sup>1</sup> *SRC VB "Vector", Koltsovo, Russia*

<sup>2</sup> *Altai State University, Barnaul, Russia*

<sup>3</sup> *ICBFM SB RAS, Novosibirsk, Russia*

<sup>4</sup> *FSBSI «FASCA» Barnaul, Russia*

**Аннотация**

Развитие методов молекулярной биологии (прежде всего секвенирования и геной инженерии) стимулировало поиски ферментов, превосходящих по биохимическим и технологическим свойствам ферменты, традиционно используемые в промышленности. В данной работе представлены результаты исследований по определению нуклеотидной последовательности, кодирующей прохимозин лося (*Alces alces*), и дизайну гена для эффективного получения его рекомбинантного аналога в прокариотической системе экспрессии.

---

© Д. Н. Щербаков, А. А. Бондарь, А. П. Рудометов, С. В. Беленькая, В. В. Ельчанинов, А. А. Ильичев, А. Д. Коваль, 2019

\* Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Алтайского края в рамках научного проекта № 19-44-220010.



### Abstract

The development of molecular biology methods (primarily sequencing and genetic engineering) stimulated the search for enzymes that are superior in biochemical and technological properties to enzymes traditionally used in industry. This paper presents the results of studies to determine the nucleotide sequence of the coding prochymosin moose (*Alces alces*) and gene design to efficiently obtain its recombinant analogue in the prokaryotic expression system.

Согласно прогнозам темпы роста мирового рынка биотехнологий до 2020 года должны составлять от 10 до 12 % в год и к 2020 году объем данного рынка должен достичь примерно 600 млрд. долларов [1, 2]. Одной из основных составляющих современного рынка биотехнологий является сегмент ферментов и ферментных препаратов. Для получения промышленных ферментных препаратов используют два основных подхода. Традиционный — выделение натуральных энзимов из природного сырья и инновационный — получение рекомбинантных аналогов природных ферментов.

Одним из первых промышленных препаратов, полученных с использованием генно-инженерных технологий стал рекомбинантный химозин (рХн) коровы [3], который долгое время считался эталоном молокосвертывающего фермента в сыроделии. В 2006 году был получен рХн верблюда, который, как оказалось, проявляет более высокую аффинность к к-казеину коровы и демонстрирует лучшее соотношение молокосвертывающей и протеолитической активности, по сравнению с коровьим рХн [4]. В 2018 году получен и исследован рХн альпака [5], превосходящий рХн коровы по специфичности к к-казеину коровы. Это позволяет предполагать существование и стимулирует поиск других видов химозина, превосходящих по биохимическим и технологическим свойствам рХн коровы.

Целью данной работы было дизайн гена, кодирующего прохимозин лося, для получения его рекомбинантного аналога в прокариотической системе экспрессии.

Так как нуклеотидная последовательность, кодирующая прохимозин лося, отсутствует в базе данных GenBank, для ее получения было проведено секвенирование по методу Сенгера геномной ДНК лося в районе соответствующего гену химозина (СУМ). Геномную ДНК выделяли из крови лося при помощи TRIzol реагента. Результаты сравнительного анализа СУМ млекопитающих из GenBank позволили выявить наиболее консервативные области гена СУМ и выбрать несколько пар праймеров для амплификации фрагментов гена на геномной ДНК лося. ДНК таких фрагментов гена была наработана, очищена от компонентов ПЦР и подвергнута прямому секвенированию по методу Сэнгера на автоматических генных анализато-

рах ABI3130XL. Полученные секвенограммы гена СУМ лося выравнивали с известными структурами СУМ из GenBank, для подтверждения принадлежности к гену химозина, и рассчитывали праймеры для следующего шага секвенирования. В результате сборки полученных секвенограмм впервые установлена структура гена химозина лося размером 11623 н.п. С помощью сравнительного анализа и выравнивания с последовательностями известных генов СУМ и мРНК, локализованы границы экзонов/интронов исследуемого гена СУМ лося и выведена структура соответствующей мРНК, кодирующей препрохимозин лося.

Система *Escherichia coli* является наиболее изученной системой экспрессии гетерологичных генов (в этой системе ранее уже были получены функционально активные химозин ряда млекопитающих) и позволяет в короткие сроки получать образцы рекомбинантных белков в количествах, достаточных для проведения биохимического анализа. Поэтому для лабораторной наработки химозина лося использовали *E. coli* штамм BL21. Был проведен дизайн гена кодирующего прохимозин лося для эффективной экспрессии в этой системе. Были удалены интроны, а кодонный состав полученной последовательности был оптимизирован с учетом кодонов *E. coli*. После этого нуклеотидная последовательность прохимозина лося, размером 1110 п.н., была синтезирована и клонирована в составе плазмидного вектора pET21a. Так же на основе полученной рекомбинантной плазмиды были получены варианты плазмид кодирующие прохимозина с довесками на N-конце: тага T7 (экспрессионный таг), GST (глутатион-s-трансфераза), SUMO (малый убиквитин-подобный модификатор). Целью получения этих конструкций была оценка влияние различных N-концевых фрагментов на выход целевого белка и его растворимость. С помощью секвенирования нуклеотидных последовательностей полученных рекомбинантных плазмид в районе встройки гена химозина, была подтверждена целостность полученных генетических конструкций.

Полученными плазмидами были трансформированы компетентные клетки *E. coli* штамма BL21. После трансформации были получены колонии *E. coli* BL21, содержащие рекомбинантные плазмиды, кодирующие генно-инженерные варианты химозина. Индивидуальные колонии *E. coli*, содержащие рекомбинантные плазмиды, культивировали в шейкер-инкубатор в среде LB при 37 °C и 180 об/мин, до оптической плотности  $D_{600} = 0,8$ . Затем индуцировали синтез белка добавлением IPTG до конечной концентрации 1 мМ. Колбы вновь помещали в шейкер-инкубатор и продолжали культивирование 4 часа при 37°C и 160 об/мин. Экспрессию клонированных генов, оценивали с помощью электрофоретического разделения лизата соответствующих клеток штаммов-продуцентов в 12 % ПААГ. Анализ электро-

фореграммы показал наличие мажорных полос, по подвижности соответствующих теоретически рассчитанным молекулярным массам прохимозина лося с T7, GST и SUMO (41, 66 и 52 кДа соответственно). Таким образом, получены образцы генно-инженерных вариантов прохимозина лося.

В дальнейшем будут изучены биохимические и технологические свойства полученных образцов и оценен их потенциал для внедрения в молочную промышленность.

### Литература

1. Рудометов А. П., Горст В. А., Щербаков Д. Н. Перспективы и направления импорт замещения в биотехнологической отрасли // Управление современной организацией: опыт, проблемы и перспективы. 2016. № 1. С. 219221.
2. Trono D. Recombinant Enzymes in the Food and Pharmaceutical Industries // Advances in Enzyme Technology. Elsevier, 2019. P. 349387.
3. Uchiyama H., Uozumi T., Beppu T., Arima K. Purification of prorennin mRNA and its translation *in vitro* // Agricultural and Biological Chemistry. 1980. V. 44. № 6. P. 1373–1381.
4. Kappeler S. R., van den Brink M., Rahbek-Nielsen H., Farah Z., Puhan Z., Hansen E. B., Johansen E. Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk // Biochem. Biophys. Res. Comm. 2006. V. 2. №. 342. P. 647654.
5. Бельнская С. В., Рудометов А. П., Щербаков Д. Н., Балабова Д. В., Кригер А. В., Белов А. Н., Коваль А. Д., Ельчанинов В. В. Некоторые биохимические свойства рекомбинантного химозина альпака (*Vicugna pacos* L.) // Прикладная биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. № 6. С. 585–593.

**ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИЙ РОДА *KOCURIA* —  
АКТИВНЫХ ДЕСТРУКТОРОВ ФТАЛАТОВ\***

**CHARACTERISTICS OF BACTERIA OF THE GENUS *KOCURIA* —  
ACTIVE DESTRUCTORS OF PHTHALATES**

Д. С. Юдин<sup>1</sup>, О. В. Ястребова<sup>2</sup>, Е. Г. Плотникова<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования «Пермский государственный национальный  
исследовательский университет»

<sup>2</sup> «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения  
Российской академии наук» — филиал ПФИЦ УрО РАН

D. S. Yudin<sup>1</sup>, O. V. Yastrebova<sup>2</sup>, E. G. Plotnikova<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Perm State University, Perm, Russia

<sup>2</sup> Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms,  
Ural Branch, Russian Academy of Sciences

**Аннотация**

Из рабочей коллекции микроорганизмов лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии «Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» отобрано 5 грамположительных штаммов, выделенных ранее на территории Пермского края (г. Оса, г. Соликамск). На основании определения нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК отобранные штаммы были идентифицированы как представители рода *Kocuria* семейства *Micrococcaceae*. Штаммы WD25, ML17 и M87-1 показали наибольшее филогенетическое сходство со штаммом *Kocuria rhizophila* DSM 11926<sup>T</sup>, а штаммы K72 и M46-10 — с типовым штаммом *Kocuria rosea* DSM 20447<sup>T</sup>. Показано, что штаммы *Kocuria* sp. WD25 и *Kocuria* sp. ML17 обладают широкой субстратной специфичностью и способны к деструкции ряда моно- и полиароматических углеводов (фенантрена, нафталина, бифенила), а также сложных эфиров фталевой кислоты (фталатов). В клетках штамма *Kocuria* sp. WD25 обнаружена плазмида большого размера (~80 т.п.н.).

---

© Д. С. Юдин, О. В. Ястребова, Е. Г. Плотникова, 2019

\* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Министерства образования и науки Пермского края в рамках научного проекта № 19-44-590011p\_a.

### Abstract

Five gram-positive strains, isolated earlier in the Perm region (Osa, Solikamsk), were selected from the working collection of microorganisms of the Laboratory of Molecular Microbiology and Biotechnology (Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences). Based on the determination of the 16S rRNA gene nucleotide sequences, the selected strains were identified as representatives of the genus *Kocuria* of the *Micrococcaceae* family. Strains WD25, ML17, and M87-1 showed the phylogenetic similarity with the strain *Kocuria rhizophila* DSM 11926<sup>T</sup>, strains K72 and M46-10 — with the strain *Kocuria rosea* DSM 20447<sup>T</sup>. It was shown that strains *Kocuria* sp. WD25 and *Kocuria* sp. ML17 have a broad substrate specificity and are capable to degrade a number of mono- and polyaromatic hydrocarbons (phenanthrene, naphthalene, biphenyl), *ortho*- phthalic acid, as well as phthalic acid esters. A large plasmid (~ 80 kb) was found in the cells of strain *Kocuria* sp. WD25.

Одной из актуальных проблем современной экологии является загрязнение окружающей среды устойчивыми органическими соединениями, образующимися в процессе промышленной деятельности человека. На территории Пермского края расположен ряд экологически опасных производств, в том числе нефтеперерабатывающей, химической, химико-металлургической и соледобывающей промышленности. С отходами коксохимических производств, химических предприятий, а также с разливами нефти в водные и наземные экосистемы поступают полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), галогенуглероды, фталаты и другие органические поллютанты. Одним из наиболее перспективных способов очистки окружающей среды от органических экополлютантов являются биотехнологии, основанные на способности природных бактерий разлагать многие ароматические соединения. В настоящее время обнаружены и описаны бактерии различных филогенетических групп, способных утилизировать стойкие органические загрязнители, в том числе ПАУ, фталаты и их производные (2, 3). В ряде исследований показано, что гены бактериальной деструкции ПАУ и фталатов могут быть расположены, как в хромосоме, так и на высокомолекулярных плазидах (1).

Цель работы — характеристика штаммов-деструкторов ПАУ и фталатов, выделенных из почв с высокой антропогенной нагрузкой (Пермский край).

Для проведения исследований из рабочей коллекции микроорганизмов лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии «Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» отобрано 5 грамположительных штаммов, выделенных ранее на территории Пермского края (г. Оса, г. Соликамск). Штамм WD25 выделен из образца почвы, загрязненной дихлордифенилтрихлорэтаном (ДДТ) (г. Оса), методом накопительного культивирования

на ДДТ в качестве субстрата. Штаммы ML17, M87-1 и M46-10 выделены из образцов ризосферной почвы, отобранных вблизи солеотвала (г. Соликамск), а штамм K72 — из образца породы каменной соли Верхнекамского месторождения калийных солей (ВКМКС), отобранного с глубины 239,7–239,8 м. Штаммы были выделены методом накопительного культивирования на полноценной среде с добавлением 50 г/л NaCl.

На основании секвенирования и последующего биоинформационного анализа гена 16S рПНК отобранные штаммы были идентифицированы как представители рода *Kocuria* (семейство *Micrococcaceae*). Штаммы WD25, ML17 и M87-1 показали наибольшее филогенетическое сходство с типовым штаммом *Kocuria rhizophila* DSM 11926<sup>T</sup>, а штаммы K72 и M46-10 оказались наиболее близкородственны виду *Kocuria rosea* (см. таблицу).

**Штаммы бактерий рода *Kocuria*,  
выделенные из образцов загрязненных почв  
(г. Оса, Соликамск, Пермь, Пермский край)**

Образец	Штаммы	Типовой штамм ближайшего родственного вида	Сходство генов 16S рПНК, %
Почва ООПТ «Осинская лесная дача» (г. Оса)	WD25	<i>Kocuria rhizophila</i> DSM 11926 <sup>T</sup>	99,89
Ризосфера мятлика лугового ( <i>Poa pratensis</i> L.), 1600 м от солеотвала, СКПРУ-1 (ПАО «Уралкалий», г. Соликамск)	ML17	<i>Kocuria rhizophila</i> DSM 11926 <sup>T</sup>	100
	M87-1		98,937
	M46-10	<i>Kocuria rosea</i> DSM 20447 <sup>T</sup>	99,664
Порода каменной соли ВКМКС с глубины 239,7-239,8 м (ПАО «Уралкалий», г. Соликамск)	K72	<i>Kocuria rosea</i> DSM 20447 <sup>T</sup>	99,77

Сравнительная генетическая характеристика с использованием метода ВОХ-ПЦР штаммов *Kocuria* sp. WD25 и ML17, имеющих наибольшее филогенетическое сходство со штаммом *Kocuria rhizophila* DSM 11926<sup>T</sup>, показала, что данные штаммы отличается от по ВОХ-ДНК и принадлежат к разным геномогруппам (см. рисунок).

Исследуемые штаммы проверены на способность к утилизации ряда ароматических углеводов и фталатов. Установлено, что штамм *Kocuria* sp. M87-1 способен к росту на бензоате и орто-ФК. Штаммы *Kocuria* sp. WD25 и ML17 обладают широкой субстратной специфичностью и способ-

ны к деструкции ряда моно- и полиароматических углеводов: фенантрена, нафталина, бифенила, а также *орто*-фталевой кислоты (*орто*-ФК) и сложных эфиров фталевой кислоты — дибутилфталата (ДФБ), диметилфталата (ДМФ) и диэтилфталата (ДЭФ). Сложные эфиры *орто*-ФК представляют собой устойчивые, токсичные соединения, являются распространенными загрязнителями окружающей среды и способны к биоаккумуляции.

В клетках штамма *Kocuria* sp. WD25 обнаружена плазида молекулярной массой ~80 т.п.н.

Таким образом, в результате проведенных исследований выявлены и штаммы *Kocuria* sp. WD25 и *Kocuria* sp. ML17, способные к эффективной утилизации фталатов (*орто*-ФК, ДБФ, ДМФ, ДЭФ) — повсеместно распространенных токсичных экополютантов. Охарактеризованные штаммы рода *Kocuria* обладают высоким потенциалом для использования при разработке новых биотехнологий, касающихся восстановления и мониторинга загрязненных почв.



Электрофореграмма продуктов амплификации BOX-ПЦР штаммов рода *Kocuria*: М — маркер O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder («Fermentas», Литва); 1 — WD25; 2 — ML17

## Литература

1. Jerke K., Nakatsu C. H., Beasley F. et al. Comparative analysis of eight *Arthrobacter* plasmid // *Plasmids*. 2008. V. 59. P. 73–85.
2. Liang D. W. Zhang T., Fang H. Phthalates biodegradation in the environment // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008. V. 80. P. 183–198.
3. Mueller J. G., Devereux R., Santavy D. L., Lantz S. E., Willis S. G., Pritchard P. H. Phylogenetic and physiological comparisons of PAH-degrading bacteria from geographically diverse soils // *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1997. V. 71. № 4. P. 329–343.

**ИЗУЧЕНИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ  
РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА TNF-BD ВИРУСА НАТУРАЛЬНОЙ  
ОСПЫ В МОДЕЛИ СЕПТИЧЕСКОГО ШОКА \***

STUDY OF THERAPEUTIC ACTIVITY OF THE RECOMBINANT  
TNF-BINDING PROTEIN FROM SMALLPOX VIRUS  
IN SEPTIC SHOCK MODEL

С. Н. Якубицкий<sup>1</sup>, И. П. Гилева<sup>1</sup>, И. В. Колосова<sup>1</sup>, С. Н. Щелкунов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФБУН «Государственный научный центр вирусологии  
и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора

<sup>2</sup> ФИЦ Институт цитологии и генетики  
Сибирского отделения Российской академии наук

S. N. Yakubitskiy<sup>1</sup>, I. P. Gileva<sup>1</sup>, I. V. Kolosova<sup>1</sup>, S. N. Shchelkunov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR,  
Rospotrebnadzor

<sup>2</sup> Institute of Cytology and Genetics, SB RAS

E-mail: yakubizkiy@vector.nsc.ru

**Аннотация**

В работе представлены данные о терапевтической активности искусственного белка TNF-BD/VARV, представляющего собой ФНО-связывающий домен белка CrmB вируса натуральной оспы.

**Abstract**

The data of therapeutic activity of artificial protein corresponding to TNF-binding domain of VARV-CrmB protein are presented.

Тяжелой патологией, обусловленной высоким уровнем фактора некроза опухолей (ФНО) и часто завершающейся летальным исходом, является септический шок. Ранее нами в экспериментах на мышинной модели липополисахарид (ЛПС)-индуцированного септического шока было обнару-

---

© С. Н. Якубицкий, И. П. Гилева, И. В. Колосова, С. Н. Щелкунов, 2019

\* Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-04-00022-а).



жено, что белок CtmB вируса натуральной оспы (VARV-CtmB) обладает существенным терапевтическим эффектом. Введение этого рекомбинантного белка приводило к достоверному увеличению выживаемости мышей [1] и отчетливому снижению гистопатологических изменений внутренних органов по сравнению с животными, не получавшими данный белок. Введение вирусного белка предупреждало появление инфарктов в сердце, снижало степень нарушений кровообращения в сосудах брюжейки, приводило к нормализации микроциркуляции и кровоснабжения головного мозга и внутренних органов, предупреждало развитие острой почечной недостаточности [2].

Известно [3], что полноразмерный белок VARV-CtmB содержит два домена N-концевой ФНО-связывающий и С-концевой хемокин-связывающий. Методами генетической инженерии получены рекомбинантные плазмиды, содержащие ген делеционного варианта белка VARV-CtmB, состоящего только из ФНО-связывающего домена. В клетках *E. coli* XL10-Gold Kan<sup>R</sup> показана экспрессия целевого гена. Методом хроматографии на Ni-NTA агарозе рекомбинантный белок TNF-BD/VARV выделен в количестве, достаточном для проведения экспериментов на животных.

На следующем этапе на взрослых мышах линии BALB/c исследовано наличие токсичности полученного рекомбинантного белка при внутрибрюшинном введении, а также подобрана доза ЛД<sub>80</sub> для ЛПС *E. coli* 055:B5. Далее на мышинной модели при внутрибрюшинном введении впервые показана дозозависимая терапевтическая активность укороченного искусственного белка TNF-BD/VARV в модели ЛПС-индуцированного септического шока.

Также изучены иммуногенные свойства рекомбинантного белка TNF-BD/VARV при четырехкратной внутрибрюшинной иммунизации им мышей линии BALB/c.

Полученные результаты указывают на перспективность использования рекомбинантного белка TNF-BD/VARV в качестве терапевтического препарата при лечении септического шока.

## Литература

1. Gileva I. P., Nepomnyashchikh T. S., Antonets D. V., Lebedev L. R., Kochneva G. V., Grazhdantseva A. V., Shchelkunov S. N. Properties of the recombinant TNF-binding proteins from variola, monkeypox, and cowpox viruses are different // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006. V. 1764(11). P. 1710–1718.
2. Непомнящих Т. С., Виноградов И. В. Сравнительное изучение свойств иммуномодуляторных белков ортопоксвирусов // *Российский иммунологический журнал*. 2007. Т. 1, № 10. С. 11–18.

---

3. Alejo A., Ruiz-Arguello M. B., Ho Y., Smith V. P., Saraeva M., Alcamí A. A chemokine-binding domain in the tumor necrosis factor receptor from variola (smallpox) virus // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. P. 5995–6000.

4. Трегубчак Т. В., Шеховцов С. В., Непомнящих Т. С., Пельтек С. Е., Колчанов Н. А., Щелкунов С. Н. TNF-связывающий домен белка СтmВ вируса натуральной оспы, синтезированный в клетках *Escherichia coli*, эффективно взаимодействует с TNF человека // *Доклады Академии наук*. 2015. Т. 462, № 4. С. 1–5.

**БИОГИДРОМЕТАЛЛУРГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ПЕРЕРАБОТКИ  
БЕДНЫХ СУЛЬФИДНЫХ РУД  
ОБЪЕКТОВ МУРМАНСКОЙ ОБЛАСТИ**

BIOHYDROMETALLURGICAL METHODS OF PROCESSING LOW-  
GRADE SULFIDE ORE OF OBJECTS OF THE MURMAN REGION

Е. С. Янишевская, А. А. Горячев

*Институт проблем промышленной экологии Севера ФИЦ КНЦ РАН*

E. S. Yanishevskaya, A. A. Goryachev

*Federal Research Centre "Kola Science Centre of RAS"  
Institute of Industrial Ecology Problems in the North, Apatity, Russia*

E-mail: drygina\_es@mail.ru

**Аннотация**

Целью данной работы было проведение лабораторных испытаний по биовыщелачиванию цветных металлов (меди и никеля) из отходов обогащения (техногенное образование «Отвалы Аллареченского месторождения») и забалансовой руды (месторождение Нюд II) с использованием аборигенных микроорганизмов.

**Abstract**

The aim of this work was to conduct laboratory tests on the bioleaching of non-ferrous metals (copper and nickel) from enrichment waste (technogenic formation) and low-grade ores (Nud II deposit) using native microorganisms.

В Мурманской области сосредоточено значительное количество крупных месторождений важнейших видов минерального сырья. Регион исследований характеризуется уникальным сочетанием природных и антропогенных факторов — суровые климатические условия и интенсивное развитие промышленности. Сокращение запасов богатых и доступных для классических методов обогащения руд ставит вопрос о перспективе использования некондиционного сырья природного и техногенного генезиса.

Опыт гидрометаллургической практики показывает, что для доизвлечения полезных компонентов из бедных забалансовых руд перспективно при-

менять кучное выщелачивание [1–3]. Одним из направлений научно-технического прогресса в области переработки минерального сырья является применение комбинированных технологий переработки, позволяющих значительно повысить его комплексное использование, снизить стоимость переработки и обеспечить эффективную защиту окружающей среды. Примером таких технологий может быть сочетание процессов обогащения и металлургии с бактериальным выщелачиванием, которое относится к процессам биотехнологии. Наиболее целесообразно использование аборигенных штаммов бактерий, адаптированных к определенным условиям окружающей среды. В настоящее время на основании выщелачивания с использованием микроорганизмов в мире уже работают промышленные установки по извлечению меди, урана, по переработке золотосодержащих руд и концентратов [4,5], имеется опыт кучного выщелачивания на месторождении полиметаллических руд в северной части Финляндии [6].

Мурманская область располагает рядом объектов, для вовлечения, в производство которых необходим поиск рациональных методов переработки. В качестве объектов исследований были выбраны: отвалы Аллареченского месторождения, расположенного в Печенгском районе Мурманской области; забалансовые руды медно-никелевого месторождения Нюд II, расположенного в Мончегорском районе.

С рудой Аллареченского техногенного образования (ТО) был поставлен эксперимент с подачей оборотных растворов (бактериального и 2 % серной кислоты). Крупность руды составляет  $-5+2$  мм, масса загрузки перколятора 800 г, высота рудного слоя 16 см, диаметр колонки 5 см. Запущено 2 колонки: 1 — биовыщелачивание с оборотом раствора, 2 — выщелачивание с оборотом 2 % серной кислоты. На первые сутки проводили увлажнение колонок. Подачу растворов осуществляли 2 раза в неделю в каждую колонку.

Крупность руды Нюд II составляет  $-5+1$  мм, масса загрузки 200 г, высота рудного слоя 12, диаметр колонки 3 см. Запущено две колонки: 1 — биовыщелачивание с оборотом раствора, 2 — выщелачивание с оборотом 2 % серной кислоты. В первые сутки эксперимента проводили увлажнение руды. Далее два раза в неделю подавали выщелачивающие растворы.

В ходе эксперимента постоянно отслеживались параметры выщелачивающих и выщелоченных растворов (рН, Eh, концентрации ионов двух- и трехвалентного железа). Растворы на выходе из колонок анализировали методом спектрометрии на спектрофотометре СФ-2000.

Результаты экспериментальной работы на образце руды, прошедшей магнитную сепарацию (высокие содержания цветных металлов) по кучному выщелачиванию, демонстрируют, что содержание металлов в фильтратах после выщелачивания раствором с микроорганизмами заметно превышает

содержание металлов в фильтратах при выщелачивании слабокислым серным раствором (рис. 1). Среднее содержание никеля в фильтратах колонки, обрабатываемой бактериальной суспензией, составило 679,1 мг/л, при максимальном значении 1,55 г/л на 40 сутки эксперимента. Среднее значение меди составило 83,9 мг/л, при максимальном содержании 211 мг/л на 49 сутки эксперимента. Выщелачивание 2 % раствором серной кислоты показало следующие результаты: Ni в среднем 349,1 мг/л, максимальное значение — 1,67 г/л на 7 сутки; среднее содержание Cu — 17,3 мг/л, при максимальном содержании 111,2 мг/л на 7 сутки.

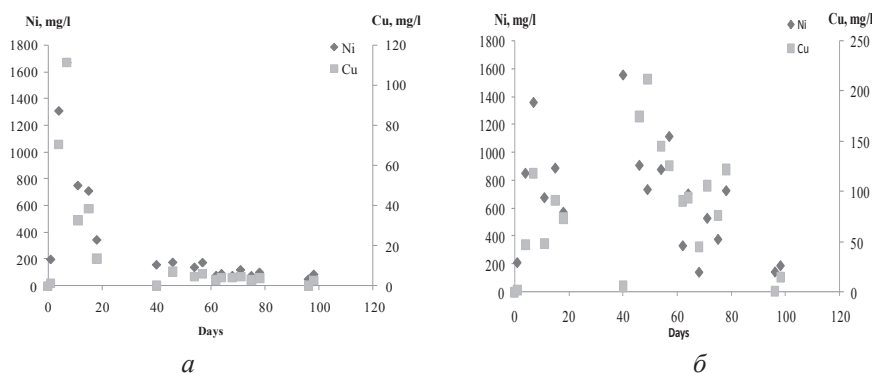


Рис. 1. Содержание металлов в оборотных растворах при выщелачивании руды ТО «Отвалы Аллареченского месторождения», прошедшей магнитную сепарацию (а — 2%-м раствором H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; б — бактериальным раствором)

Результаты экспериментальной работы на образце бедной руды по кучному выщелачиванию демонстрируют, что содержание металлов в фильтратах после выщелачивания раствором с микроорганизмами заметно превышает содержание металлов в фильтратах при выщелачивании слабокислым серным раствором, как и в случае с рудой, прошедшей магнитную сепарацию (рис. 2). Среднее содержание никеля в фильтратах колонки, обрабатываемой бактериальной суспензией, составило 566,8 мг/л, при максимальном значении 904,8 мг/л на 57 сутки эксперимента. Среднее значение меди составило 81,8 мг/л, при максимальном содержании 233 мг/л на 57 сутки эксперимента. Выщелачивание 2 % раствором серной кислоты показало следующие результаты: Ni в среднем 364,5 мг/л, максимальное значение — 1,04 г/л на 7 сутки; среднее содержание Cu — 18 мг/л, при максимальном содержании 75,9 мг/л на 57 сутки.

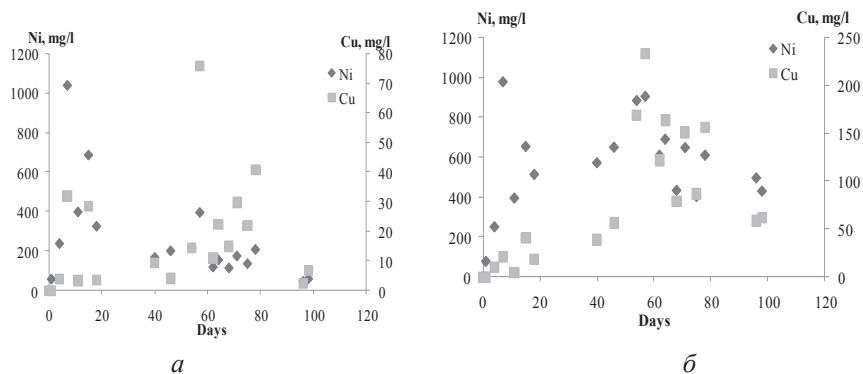


Рис. 2. Содержание металлов в оборотных растворах при выщелачивании руды месторождения Нью II (а — 2%-м раствором  $H_2SO_4$ ; б — бактериальным раствором)

В ходе опытов по выщелачиванию отходов от разработки месторождения открытым способом и образца забалансовых руд использование аборигенных железоокисляющих микроорганизмов показало преимущество перед использованием раствора серной кислоты. Так, среднее содержание меди в продуктивных растворах после биовыщелачивания превышает серноокислотное в 4,5 раза, никеля — в 2 раза.

## Литература

1. Watling H. R. The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides—a review // *Hydrometallurgy*. 2006. Т. 84. №. 1–2. С. 81–108.
2. Brierley J. A., Brierley, C. L. Present and future commercial applications of biohydrometallurgy // *Hydrometallurgy*. 2001. Т. 59. №. 2–3. С. 233–239.
3. Johnson D. B. Biomining biotechnologies for extracting and recovering metals from ores and waste materials // *Current Opinion in Biotechnology*. 2014. Vol. 30. P. 24–31.
4. Khalezov B. D. Heap leaching of copper and copper-zinc ores: (domestic experience): monograph. Ekaterinburg: RIO UB RAS, 2013. 346 p.
5. Watling H. R. The bioleaching of nickel-copper sulfides // *Hydrometallurgy*. 2008. V. 91, Iss. 1–4. P. 70–88.
6. Henna O. et al. The application of principal component analysis for bioheapleaching process case study: talvivaara mine // *minerals engineering*. 2016. V. 95. P. 48–58.

## НОВЫЕ СХЕМЫ ПОЛУЧЕНИЯ БИОПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ БРУЦЕЛЛЕЗА ЖИВОТНЫХ

### NEW SCHEMES FOR PRODUCING BIOLOGICALS FOR THE DIAGNOSTICS OF ANIMAL BRUCELLOSIS

Т. А. Янченко, Н. Н. Новикова

*ФГБНУ «Омский аграрный научный центр»*

T. A. Yanchenko, N. N. Novikova

*FSBSI «Omsk Agrarian Scientific Center»*

#### **Аннотация**

Возбудители бруцеллеза обладают различной степенью диссоциации и агглютинабельностью, порой полной утратой S-агглютинабельности. Индикация таких культур бруцелл затруднена. В этой связи актуальным является получение эффективной R-бруцеллезной диагностической агглютинирующей сыворотки. Известно, что для индикации и дифференциации возбудителей бруцеллеза в бактериологической диагностике необходима R-бруцеллезная агглютинирующая сыворотка. От уровня ее чувствительности зависит надежность индикации и видовой дифференциации бруцелл. Причем для практики важны простота и безопасность ее получения.

#### **Abstract**

Pathogens of brucellosis have varying degrees of dissociation and agglutinability, sometimes a complete loss of S-agglutinability. Indication of such brucella cultures is difficult. In this regard, it is relevant to obtain an effective R-brucellosis diagnostic agglutinating serum. It is known that for the indication and differentiation of pathogens of brucellosis in bacteriological diagnosis, R-brucellosis agglutinating serum is necessary. The reliability of the indication and species differentiation of brucella depends on the level of its sensitivity. Moreover, the simplicity and safety of its preparation are important for practice.

Бруцеллез — инфекционная болезнь животных, представляющая большую опасность и для людей.

Возбудители бруцеллеза обладают различной степенью диссоциации в SR,RS, а также специфические R формы возбудителя присущие отдель-

ным видам бруцелл: *B. canis*, *B. ovis*. В этой связи актуальным является получение эффективной R-бруцеллезной диагностической агглютинирующей сыворотки, которая используется при серологической, а также бактериологической диагностике для индикации и дифференциации выделенных культур. От уровня ее чувствительности зависит надежность индикации и видовой дифференциации бруцелл. Получение биопрепаратов должно быть технологичным и безвредными. Известны работы по получению R-бруцеллезной сыворотки на кроликах, включающей 4-х кратную внутривенную иммунизацию кроликов живой культурой *B.abortus*16/4, обескровливание животных через 5–7 дней после последнего введения [1]. Этот процесс является трудоемким и небезопасным.

Цель исследования — определение оптимальной схемы вводимого антигена и его дозы при гипериммунизации кроликов для получения R-бруцеллезной сыворотки и проверка ее активности через 12 месяцев хранения.

Материалы и методы: живая и инактивированная культура *B. abortus* 16/4 в смеси с адьювантом MONTANIDE™ IS A. Здоровые кролики, предварительно исследованные на бруцеллез серологическими методами, с отрицательными результатами.

Сформировали шесть групп (по 3 кролика в каждой) и гипериммунизировали:

1-я группа — животным ввели трехкратно с интервалом 7 дней подкожно (п/кожно) инактивированную культуру *B.abortus* 16/4 в общей дозе 46,5 млрд КОЕ/мл;

2-я группа — животным ввели четырехкратно с интервалом 7 дней внутривенно живую культуру *B.abortus* 16/4 в общей дозе 90,5 млрд КОЕ/мл.

3-я группа — животным ввели однократно подкожно инактивированную культуру *B.abortus* 16/4 в дозе 100 млн КОЕ/мл в смеси с адьювантом MONTANIDE ISA 61 VG в объеме 1 мл.

4-я группа — животным ввели однократно подкожно инактивированную культуру *B.abortus* 16/4 в дозе 50 млн КОЕ/мл в смеси с адьювантом MONTANIDE ISA 61 VG;

5-я группа — животным ввели однократно подкожно инактивированную культуру *B.abortus* 16/4 в дозе 100 млн КОЕ/мл в смеси с адьювантом MONTANIDE ISA 61 VG;

6-я группа — животным ввели однократно подкожно инактивированную культуру *B.abortus* 16/4 в дозе 200 млн КОЕ/мл в смеси с адьювантом MONTANIDE ISA 61 VG.

Кровь от животных в целях получения сыворотки брали на 14, 21, 28, 35 дни после введения антигенов.



В результате проведенных исследований, оптимальная схема вводимого антигена получена на животных третьей группы в которой использовалась однократная подкожная гипериммунизация суспензией инактивированной культуры бруцелл *B.abortus* 16/4 в дозе 100 млн КОЕ/мл в смеси с масляным адьювантом MONTANIDE ISA 61 VG, который позволяет стимулировать получение высоких титров антител. Кроме эпидемической безопасности преимущество выбранной схемы заключается в получении высоких титров R-бруцеллезной сыворотки при получении ее в отдаленные сроки после гипериммунизации — на 35 сутки.

Результат РА с сыворотками крови, полученными от кроликов на 21 день после их сенсibilизации. В четвертой группе РА была положительной в разведении: пробирочной — 1:320, в пластинчатой — 1:20 соответственно; в пятой группе была положительной в разведении: пробирочной РА — 1:1280, в пластинчатой — 1:60 соответственно; в шестой группе была положительной в разведении: пробирочной РА — 1:1280, в пластинчатой РА — 1:60 соответственно, при отрицательном результате РБП, пластинчатой агглютинации с живыми культурами бруцелл в S-форме в разведении 1:10 и отрицательном результате РА с единым бруцеллезным антигеном для РА, РСК и РДСК в разведении 1:10 во всех группах.

В исследовании дозы водимого антигена лучшей оказалась пятая группа получен наибольший титр антител в пластинчатой реакции агглютинации 1:60 на 21 день после сенсibilизации.

Вывод. Предлагаемый способ получения R — бруцеллезной сыворотки на кроликах позволяет снизить трудоемкость производственного процесса за счет однократного подкожного введения антигена кроликам, максимально повысить противэпидемическую безопасность этого процесса за счет использования инактивированной культуры бруцелл штамма *B.abortus* 16/4 (100 млн КОЕ/мл). Использование адьюванта MONTANIDE ISA 61 VG в смеси с инактивированной культурой бруцелл штамма *B.abortus* 16/4 позволит стимулировать получение высоких титров антител и повысить количество получаемой сыворотки минимум в два раза за счет взятия крови от каждого животного-производителя минимум трех-четырекратно. Полученную сыворотку использовали для изучения эффективности R бруцеллезного цветного антигена и иммунобиологических свойств противобруцеллезных вакцин [2,3].

## Литература

1. Дегтяренко Л. В., Косилов И. А., Ниязов У. Э., Шумилов К. В. Получение R-бруцеллезной сыворотки на кроликах / Профилактика и диагностика болезней животных, сб. научных трудов, Новосибирск, 1983. С. 103–107.

---

2. Новикова Н. Н. Изучение эффективности использования R бруцеллезного цветного антигена в опыте на морских свинках /Янченко Т. А., Имерякова С. А., Кожаметова А. А.//Сб. тр конференции «Состояние и перспективы научного обеспечения АПК Сибири» Омск, 17–18 июля 2018 г. С. 307–310.

3. Кисиль А. С. Результаты испытания иммунобиологических свойств противобруцеллезных вакцин из штаммов *V. abortus RB-51* и *V. abortus 82*/ Кузьмин В. А., Скляр О. Д., Дегтяренко Л. В., Власенко В. С., Новикова Н. Н // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. № 4. 2017. С. 26–29.



## РАЗДЕЛ 2

**БИОФИЗИКА**

---

**ПРИНЦИП ВЗАИМНОЙ СОПРЯЖЁННОСТИ  
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ  
В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ**

THE PRINCIPLE OF MUTUAL CONJUGACY OF PHYSICAL  
AND CHEMICAL PROCESSES IN BIOLOGICAL SYSTEMS

П. И. Бабич, В. Н. Зарубин\*

*ООО «Сибирский инновационный центр»*

P. I. Babich, V. N. Zarubin

*LLC "Siberian innovation center", Russia*

E-mail: sicenter@bk.ru

**Аннотация**

В работе рассматриваются физические аспекты биологических процессов. Сформулирован принцип взаимной сопряжённости физических и химических процессов в биологических системах. Разработан метод лечения соматических заболеваний путём устранения десинхронозов и аппарат для его реализации.

**Abstract**

The paper considers the physical aspects of biological processes. The principle of mutual conjugacy of physical and chemical processes in biological systems is formulated. A method for the treatment of somatic diseases by eliminating desynchronosis and an apparatus for its implementation have been developed.

Согласно принципу ритмичности биологических процессов все биопроцессы, протекающие в организме, имеют свои биоритмы [1]. С позиции биоритмологического подхода биопроцесс представляет собой непрерывную последовательность циклов взаимосвязанных химико-физических реакций: синтеза и расщепления веществ, сопровождающихся фазами потребления и выделения энергии соответственно [2]. Этот механизм физико-химического взаимодействия, лежащий в основе функционирования живых организмов (метаболизма), представляет собой принцип взаимной сопряжённости физических и химических процессов, протекающих в биологических системах. Под биоритмом понимается чередование циклов синтез — расщепление веществ в биопроцессе, происходящее с определённой частотой.

Из принципа взаимной сопряжённости следует, что изменение одного из процессов будет сопровождаться изменением другого, и, как следствие этого, изменением их биоритмов. В здоровом организме биопроцессы и их биоритмы находятся в норме, а при заболевании возникают две взаимозависимые патологии: патофизиология, связанная с нарушением химико-физических реакций и хронопатология, связанная с отклонением их биоритмов от нормы — десинхроноз. Таким образом, все соматические заболевания в организме сопровождаются десинхронозами, а сами заболевания представляют собой комбинацию двух взаимозависимых патологических процессов — хронопатофизиологию. Это открывает новые возможности в области медицинской биофизики: лечение заболеваний путём устранения десинхронозов. Действительно, лечить хронопатофизиологию можно двумя способами: путём устранения патофизиологии методами фармакотерапии и/или путём устранения хронопатологии аппаратными методами хронофизioterапии. В первом случае в результате медикаментозной терапии происходит восстановление нарушенных химических процессов, которое, согласно принципу взаимной сопряжённости, сопровождается восстановлением физических (энергетических) процессов и устранением патофизиологии. Вследствие этого происходит нормализация биоритмов, устранение десинхроноза (хронопатологии) и выздоровление организма, что и наблюдается в медицинской практике.

Однако несмотря на то, что методы фармакотерапии вызывают значительные побочные воздействия и не обеспечивают достаточную эффективность и безопасность лечения, физиотерапевтические методы лечения путём устранения десинхронозов в медицинской практике не используются. Проблема здесь заключается в отсутствии в арсенале хрономедицины научно обоснованных методов лечения десинхронии путём воздействия на биофизические процессы в организме.

Для решения этой проблемы на основе явления усвоения внешних ритмов живыми организмами, открытого академиком А. А. Ухтомским [3], разработан метод ресинхронизации (восстановления) биоритмов в больном организме. Явление усвоения ритма характеризует способность тканей, органов и организма в целом перестраивать свои биоритмы под воздействием внешних ритмов и сохранять эти изменения после окончания воздействия. В качестве источника внешних ритмов для лечения используется ЭМП частотой биоритмов здоровой ткани (органа), в которой возник патологический процесс. Принцип лечения в этом случае заключается в следующем [4]. При воздействии на больную ткань ЭМП частотой биоритмов здоровой ткани, энергетические процессы в больной ткани, в результате усвоения ритма, перестраиваются на частоту биоритмов здоровой ткани, происходит устранение десинхроноза (хронопатологии) и нормализация физических процессов. Вследствие этого, согласно принципу взаимной сопряжённости, происходит восстановление химических процессов, устранение патофизиологии и выздоровление организма.

Использование частотной составляющей ЭМП из диапазона биоритмов здоровой ткани, в которой возникла патология, является необходимым и достаточным условием для возникновения явления усвоения ритма только в больной ткани и не оказывает побочного действия на организм. Таким образом, в результате прямого воздействия на биоритмы больной ткани метод гарантирует получение только положительного терапевтического эффекта и относится к биомедицине нового поколения: частотно-таргетной физиотерапии.

Для реализации метода разработан аппарат с функцией хронотерапии — хронокорректор биоритмов организма [5]. Лечение на аппарате осуществляется путём частотной коррекции отклонений, возникших в биоритмах больного организма. Клинические испытания показали высокую эффективность и безопасность лечения. Так, положительная динамика при лечении заболеваний желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) превышает 95 %. При этом употребление лекарственных препаратов снижается более чем на 50 %. Частотные диапазоны биоритмов отделов ЖКТ определялись методами биопотенциометрии у здоровых людей аппаратом «Гастроскан-ГЭМ».

## Литература

1. Бабич П. И., Зарубин В. Н. Биоритмы и принцип ритмичности биологических процессов // V Международная конференция молодых учёных: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов 2018. Раздел «Биотехнология»: Сб. тез. / Новосибир. гос. ун-т. Новосибирск: РИЦ НГУ, 2018. С. 10–12.

2. Зарубин В. Н. Ритмичность принцип функционирования живых организмов. // XX Международный научно-исследовательский конкурс «Лучшая научно-исследовательская работа 2019»: Сб. статей. Под общ. ред. Г. Ю. Гуляева Пенза: МЦНС «Наука и Просвещение», 2019. с. 25–28.

3. Ухтомский А. А. Усвоение ритма в свете учения о парабииозе // Избранные труды. Под редакцией Е. М. Крепса. Серия «Классики науки». Ленинград: Издательство «Наука», 1978. 360 с.

4. Зарубин В. Н. Способ терапевтического воздействия низкочастотным импульсным ЭМП // Патент РФ на изобретение № 2616330.

5. Зарубин В. Н., Семин М. М. Магнитоимпульсный низкочастотный терапевтический аппарат // Патент РФ на полезную модель № 120878.

**ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ СОКРАЩЕНИЯ  
СОСУДИСТЫХ ГЛАДКИХ МЫШЦ В МОДЕЛИ  
МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА \***

**STUDY THE MECHANISMS OF REGULATION OF VASCULAR SMOOTH  
MUSCLE CELLS CONTRACTION IN THE MODEL  
OF METABOLIC SYNDROME**

Ю. Г. Бирулина, А. В. Светлякова, Е. П. Ефремкина, С. В. Гусакова

*ФГБОУ ВО Сибирский государственный  
медицинский университет Минздрава России*

Yu. G. Birulina, A. V. Svetlyakova, E. P. Efremkina, S. V. Gusakova

*SSMU, Russia*

E-mail: birulina20@yandex.ru

**Аннотация**

Выполнено моделирование метаболического синдрома на крысах. Механографическим методом исследованы сократительные реакции интактных и деэндотелизированных гладкомышечных сегментов аорты крыс с метаболическим синдромом на действие ацетилхолина, нитропруссид натрия, фенилэфрина. Показано снижение релаксирующего эффекта ацетилхолина и нитропруссид натрия у крыс опытной группы, а также подавление констрикторного действия адrenomиметика фенилэфрина.

**Abstract**

The model of the metabolic syndrome in rats was performed. The contractile reactions of intact and deendothelized smooth muscle segments of rat aorta with metabolic syndrome on the action of acetylcholine, sodium nitroprusside, phenylephrine was studied by a mechanographic method. A decrease in the relaxing effect of acetylcholine and sodium nitroprusside in rats of the experimental group was shown, as well as a suppression of the constrictive effect of phenylephrine.

В общей структуре заболеваемости населения развитых стран одно из ведущих мест отводится патологическим состояниям и нозологическим

---

© Ю. Г. Бирулина, А. В. Светлякова, Е. П. Ефремкина, С. В. Гусакова, 2019

\* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Томской области в рамках научного проекта № 19-415-703015.

единицам, объединенным рамками метаболического синдрома (МС). МС представляет собой сложный комплекс взаимосвязанных метаболических, гормональных и гемодинамических нарушений, увеличивающих риск развития ожирения, сахарного диабета 2 типа, сердечно-сосудистых заболеваний. Дисбаланс выработки адипокинов, инсулинорезистентность, дисрегуляция метаболизма липидов, окислительный стресс и системное воспаление при МС способствуют развитию эндотелиальной дисфункции и повреждению гладкомышечных клеток (ГМК) кровеносных сосудов. Изменение их сократительной функции, баланса эффектов вазоконстрикторных и вазодилатационных эндотелиальных факторов сопровождается нарушением регуляции сосудистого тонуса, что в конечном итоге является компонентом в развитии артериальной гипертензии.

Целью исследования явилось изучение особенностей сократительной активности гладких мышц аорты крыс с МС.

В качестве **объекта исследования** использовали крыс-самцов линии Wistar, которых случайным образом распределили на контрольную и опытную группу (по 10 животных в каждой группе). Крыс контрольной группы содержали на стандартной диете с калорийностью 250 ккал/100 г пищи. Крысы опытной группы в течение 12 недель находились на комбинированной высокожировой диете с повышенным содержанием углеводов (high fat and high fructose (HFHF) diet): 22 % жиров (лярд) и 17 % фруктозы добавлены к стандартному корму вместе с 20 % фруктозы в питьевой воде. Потребление пищи и жидкостей давали *ad libitum* и контролировали еженедельно. Для контролирования развития МС у животных два раза в месяц измеряли АД и фиксировали вес. В конце исследования выполняли глюкозотолерантный тест и биохимическое исследование крови. Изучение сократительной активности изолированных гладкомышечных сегментов (интактных и дезэндотелизированных) аорты крыс контрольной и опытной групп выполняли механографическим методом. Механическое напряжение гладкомышечных клеток сосудов в условиях, близких к изометрическим, регистрировали с помощью четырехканальной системы Myobath II (Германия). В качестве предсокращающих факторов использовали калия хлорид (KCl, 30 мМ) и фенилэфрин (1 мкМ). Амплитуду сократительных ответов сосудистых сегментов рассчитывают в процентах от амплитуды контрольного (100 %) гиперкалиевого или ФЭ-индуцированного ответа. Анализ результатов исследований выполняют при помощи программы IBM SPSS Statistics 21 методами статистического описания и проверки статистических гипотез.

В ответ на добавление холиномиметика ацетилхолина, натрия нитропруссид (донор NO) в концентрациях от 10 нМ до 1 мМ происходило снижение сократительных реакций интактных изолированных сегментов



аорты крыс контрольной и опытной группы, вызванных калия хлоридом и фенилэфрином. Однако у крыс с метаболическим синдромом наблюдалось подавление релаксирующего действия на ГМК ацетилхолина и натрия нитропруссиды по сравнению с группой контроля ( $p < 0,05$ ). На фоне действия ингибитора эндотелиальной NO-синтазы (L-NAME, 100 мкМ) релаксирующий эффект холиномиметика на сосудистые сегменты снижался у крыс контрольной и опытной группы, причем в большей степени у крыс из экспериментальной группы. Дозозависимый констрикторный эффект альфа1-адреномиметика фенилэфрина (10 нМ до 100 мкМ) деэндотелизированных сосудистых сегментов крыс опытной группы синдромом ослаблялся по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ ). Полученные результаты свидетельствуют о нарушении сократительной функции ГМК сосудов крыс с метаболическим синдромом.

**НОРАДРЕНАЛИН АКТИВИРУЕТ НЕЙРОН-ГЛИАЛЬНЫЕ  
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ И УВЕЛИЧИВАЕТ ЭФФЕКТИВНОСТЬ  
ВОЗБУЖДАЮЩЕЙ СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЕРЕДАЧИ \***

NORADRENALINE ACTIVATES NEURON-GLIAL INTERACTIONS  
AND INCREASES THE EFFICIENCY OF EXCITATORY SYNAPTIC  
TRANSMISSION

А. О. Богданов<sup>1</sup>, А. В. Сербина<sup>1</sup>, Д. В. Прокудина<sup>1</sup>, Ю. В. Панкратов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Балтийский Федеральный Университет им. И. Канта,  
Институт живых систем, Калининград, Российская Федерация*

<sup>2</sup>*Уорикский Университет, Школа биологических наук,  
Соединенное Королевство, Ковентри*

A. O. Bogdanov<sup>1</sup>, A. V. Serbina<sup>1</sup>, D. V. Prokudina<sup>1</sup>, Y. V. Pankratov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Immanuel Kant Baltic Federal University, School of Life Sciences,  
Kaliningrad, Russian Federation*

<sup>2</sup>*The University of Warwick, School of Life Sciences, United Kingdom, Coventry*

**Аннотация**

Традиционно считается, что норадреналин действует на  $\beta$ -адренорецепторы, расположенные на мембране нейронов, обеспечивая индукцию долговременной пластичности синапсов и формирование эмоционально окрашенной памяти. Однако учитывая тот факт, что на мембране астроцитов, которые способны к двусторонней коммуникации с нейронами, имеется большое количество  $\alpha$ - и  $\beta$ -адренорецепторов, возникает вопрос о роли глиальных клеток и нейрон-глиальных взаимодействий в регуляции пластичности синапсов головного мозга [1]. В данной работе было исследовано влияние норадреналина на возбуждающую синаптическую передачу и нейрон-глиальные взаимодействия в соматосенсорной коре головного мозга крыс.

**Abstract**

It is traditionally thought that norepinephrine acts on  $\beta$ -adrenergic receptors which are located on the membrane of neurons, providing the induction of long-term synaptic plasticity and the formation of emotionally enhanced memory. However, given the fact

---

© А. О. Богданов, А. В. Сербина, Д. В. Прокудина, Ю. В. Панкратов, 2019

\* Исследование выполнено при поддержке проекта повышения конкурентоспособности ведущих российских университетов среди ведущих мировых научно-образовательных центров 5 топ 100.

that there are a large number of  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenoreceptors on the membrane of astrocytes, which are capable of bidirectional communication with neurons, the question arises of the role of glial cells and neuron-glial interactions in regulating plasticity of synapses in the brain [1]. In this work, we investigated the effect of norepinephrine on excitatory synaptic transmission and neuron-glial interactions in the somatosensory cortex of the rat brain.

Для того чтобы изучить влияние активации астроглии норадреналином на эффективность синаптической передачи, мы в течение 2 минут апплицировали на переживающий срез головного мозга норадреналин (2 мкМоль) и одновременно оценивали синаптическую передачу путем регистрации миниатюрных возбуждающих постсинаптических токов (мВПСТ) при помощи технологии пэтч-кламп. Кроме того, мы оценивали кальциевую сигнализацию в астроцитах с применением флуоресцентного красителя Rhod-2. Аппликация на срез мозга норадреналина, вызывала активацию кальциевой сигнализации в астроцитах соматосенсорной коры за счет действия на  $\alpha 1$ -адренорецепторы, связанные с Gq-белком. Кроме того, мы наблюдали транзистентное увеличение амплитуды мВПСТ, опосредованных АМПА-рецепторами нейронов соматосенсорной коры (рис. 1). В течение 10 минут после прекращения аппликации норадреналина, амплитуда АМПА мВПСТ возвращалась к изначальным показателям. По результатам анализа синаптической передачи при аппликации норадреналина, квантовый размер АМПА мВПСТ составил  $127.14 \pm 11.99\%$  от среднего квантового размера

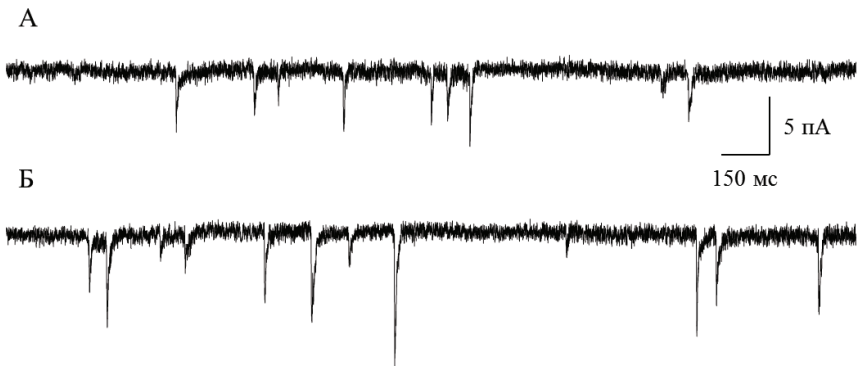


Рис. 1. Влияние норадреналина (2 мкМ) на возбуждающую синаптическую передачу, опосредованную АМПА-рецепторами нейронов 2/3 слоя соматосенсорной коры головного мозга. А — АМПА мВПСТ до стимуляции астроглии, Б — миниатюрные постсинаптические АМПА-токи после аппликации на срез норадреналина

АМПА-токов до стимуляции,  $n=8$ ,  $p=0.001$ . При этом норадреналин практически не повлиял на частоту возникновения АМПА-токов. Частота мВПСТ при аппликации на срез норадреналина составила  $102.15 \pm 6.46\%$  от частоты АМПА-токов до аппликации норадреналина,  $n=8$ ,  $p=0,34$ . Такое слабое влияние норадреналина на частоту АМПА мВПСТ свидетельствует о преимущественно постсинаптическом механизме изменения эффективности возбуждающей синаптической передачи.

Согласно современным представлениям, активация астроглиальной кальциевой сигнализации за счет  $\alpha 1$ -адренорецепторов может вызывать высвобождение АТФ, глутамата и D-серина из астроцитов [2]. В свою очередь АТФ, который выделяют астроциты, может действовать на внесинаптические P2X — пуринорецепторы нейронов. В результате активации P2X-рецепторов в цитозоль нейрона поступают ионы  $Ca^{2+}$ , под действием которых происходит активация сигнального пути фосфоинозитид-3-киназы или СаМКП и фосфорилирование АМПА-рецепторов [3,4]. Фосфорилирование АМПА-рецептора способствует увеличению времени открытого состояния канала этого рецептора при взаимодействии с агонистом. Соответственно, мы наблюдали увеличение амплитуды постсинаптических АМПА-токов при аппликации норадреналина.

Помимо увеличения амплитуды АМПА-токов мы обнаружили, что аппликация на срез норадреналина вызывает возникновение медленных входящих токов глиальной природы, о чем свидетельствует появление дополнительного пика в функции плотности вероятности распределения данных при анализе коэффициента Tdecay, характеризующего кинетику мВПСТ (рис. 2). Входящие токи глиальной природы, зарегистрированные нами, характеризуются очень медленной кинетикой: 45–1500 миллисекунд и амплитудой 10–500 пикоАмпер.

Известно, что такие медленные токи являются отражением нейрон-глиальных взаимодействий и возникают в результате активации внесинаптических НМДА-рецепторов нейронов (содержат NR2B субъединицы) под действием глутамата и D-серина, которые высвобождаются из астроцитов. В экспериментах с использованием ифенпродила (блокатор NR2B НМДА-рецепторов), частота и амплитуда медленных токов резко снижались [5]. Наблюдаемые нами медленные токи глиальной природы (Рис.3.) не ингибировались пикротоксином (блокатор ГАМКа-рецепторов) в концентрации 100 мкМ, частично уменьшались под действием блокатора АМПА-рецепторов (DNQX, 50 мкМ), и значительно уменьшались или вовсе исчезали под действием блокатора НМДА-рецепторов (D-AP5, 30 мкМ).

Полученные результаты указывают на то, что норадреналин оказывает свое действие не только на нейроны, но и на глиальные клетки. В частности



Рис. 2. Норадреналин индуцирует появление медленных входящих токов глиальной природы. Анализ функции плотности вероятности распределения данных (Tdec) выявил наличие дополнительного пика, который соответствует токам с гораздо более медленной, чем АМПА мВПСТ кинетикой.

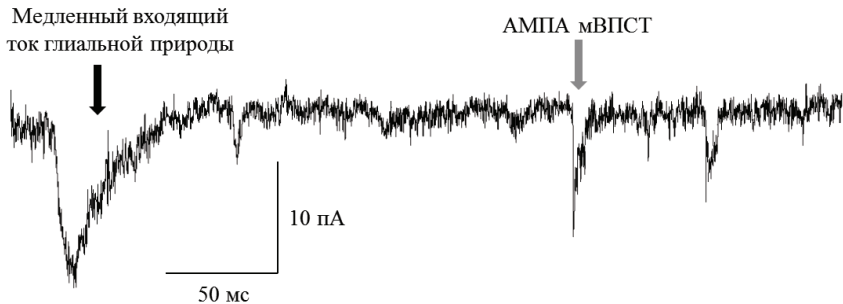


Рис. 3. Норадреналин активирует нейрон-глиальные взаимодействия, вызывая возникновение НМДА-рецептор-зависимых медленных входящих токов у нейронов за счет высвобождения астроцитами глутамата и D-серина

норадреналин активизирует нейрон-глиальные взаимодействия, о которых мы можем судить по возникновению медленных входящих токов глиальной природы в нейронах. Более того, благодаря активации астроглиальных  $\alpha 1$ -адренорецепторов, норадреналин способен осуществлять регуляцию возбуждающей синаптической передачи, увеличивая ее эффективность в тех ситуациях, когда организму необходимо быстро реагировать на меняющиеся условия окружающей среды (например, стресс) или для формирования эмоционально усиленной памяти.

## БЕСКАЛИБРОВОЧНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧИСЛА РЕЦЕПТОРОВ НА ПОВЕРХНОСТИ КЛЕТОК

### CALIBRATION-FREE QUANTATIVE IMMUNOASSAY BY FLOW CYTOMETRY

И. В. Вахрушева, В. С. Козырева

*Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр им. акад. Е. Н. Мешалкина»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации*

I. V. Vakhrusheva, V. S. Kozyreva

*Meshalkin Siberian National Biomedical Research Center, Novosibirsk, Russia*

#### **Аннотация**

В ходе работы был разработан бескалибровочный метод для определения количества рецепторов на поверхности клеток. Метод основан на анализе эволюции средней интенсивности флуоресценции клеток во времени, измеренной на проточном цитометре во время связывания лиганд-рецептор (антиген-антитело) в условиях их сопоставимых концентраций. Данный метод может быть использован для определения числа любых рецепторов на поверхности любых клеток, обеспечивая: (а) отказ от использования калибровочных частиц, что ведет к возможности создания единого стандарта для всех лабораторий; (б) разделение специфического и неспецифического связывания; (г) отказ от использования процедуры гейтирования, которая является общей проблемой для проточной цитометрии, особенно в случае использования тусклых красителей.

#### **Abstract**

We propose a calibration-free method to determine the number of receptors per cell, as well as the direct and the reverse reaction rate constants for a single receptor. The method is based on the analysis of the temporal evolution of the cells mean fluorescent intensity measured by a flow cytometer during the ligand-receptor (antigen-antibody) binding under the conditions of their comparable concentrations. The new approach expands the limits of flow cytometry providing certain advantages: a) calibration beads are not used; b) specific and unspecific binding can be separated on their different time scale of the process; 3) the method does not use a gating procedure, which is a general problem in flow cytometry, especially in the case of dim staining.

**Introduction:** Nowadays, the use of fluorescence calibration beads is traditional for quantitative flow cytometry. All conventional methods to determine the number of expressed receptors on the cell surface are based on the interaction of fluorescently labeled antibodies and their cellular antigens in saturating conditions. The presence of the calibration beads is required for the conversion to the absolute number of receptors. Although the calibration bead-based technologies seem to be a trivial procedure, there are many important technical issues and limitations of their usage. Furthermore, these technologies have not been successfully standardized. The different types of calibration microbeads give distinct results for the same cell population, sometimes the differences reach 49 %.

**Method:** In the present work, we proposed a calibration-free approach to obtain the number of receptors per cell, as well as the direct and the reverse reaction rate constants. The method is based on the analysis of the temporal evolution of the mean fluorescent intensity of all cells measured by flow cytometry during ligand-receptor binding under the conditions when the concentrations of antibodies and receptors are comparable.

**Results:** We theoretically demonstrated that this method allows one to determine the number of receptors, the direct and reverse reaction rate constants without the use of the calibration. We further developed the kinetic approach taking into account the time delay between the dilution and the measurement, and the time duration of the measurement. The method was assayed in the kinetic study of IgG antibody binding to CD14 receptors on cells. For this antigen-antibody pair the direct and reverse reaction rate constants were obtained. The mean number of receptors on cells in suspension, as well as in particular subpopulations (CD14<sup>bright</sup> monocytes, CD14<sup>low</sup> monocytes, granulocytes), were calculated for several donors.

**Conclusion:** The calibration-free approach will allow one to determine a wide range of parameters that are inaccessible to standard immunoassay (the number of receptors per cell, the direct and the reverse reaction rate constants) and open the way to standardize measurements carried out in different laboratories.

**ДИНАМИКА ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ  
НА РАЗЛИЧНЫХ ЭТАПАХ ЛЕЧЕНИЯ  
МАСТОЦИТОМЫ У СОБАКИ**

DYNAMICS OF ENZYMATIC ACTIVITY  
AT DIFFERENT STAGES OF TREATMENT  
OF MASTOCYTOMA IN A DOG

О. А. Воронина<sup>1</sup>, М. С. Царькова<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ ФНЦ ВИЖ им. Л. К. Эрнста

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО МГАВМиБ — МВА им. К. И. Скрябина

O. A. Voronina<sup>1</sup>, M. S. Tsarkova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>L. K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, Russia

<sup>2</sup>Moscow SAVMB, Russia

E-mail: VoroninaOk-senia@inbox.ru

**Аннотация**

Динамика ферментативной активности при опухолевых процессах в организме часто нестабильна и плохо прогнозируема ввиду многих причин. Биохимический мониторинг позволяет контролировать активность ферментов на различных этапах терапии и своевременно вносить коррективы в процесс лечения. На протяжении курса лечения велись наблюдения за состоянием собаки с установленным диагнозом «мастоцитомы».

**Abstract**

The dynamics of enzymatic activity in tumor processes in the body is often unstable and poorly predicted, due to many reasons. Biochemical monitoring allows you to control the activity of enzymes at various stages of therapy and make timely adjustments to the treatment process. Throughout the course of treatment, observations were made on the condition of the dog with an established diagnosis of mastocytoma.

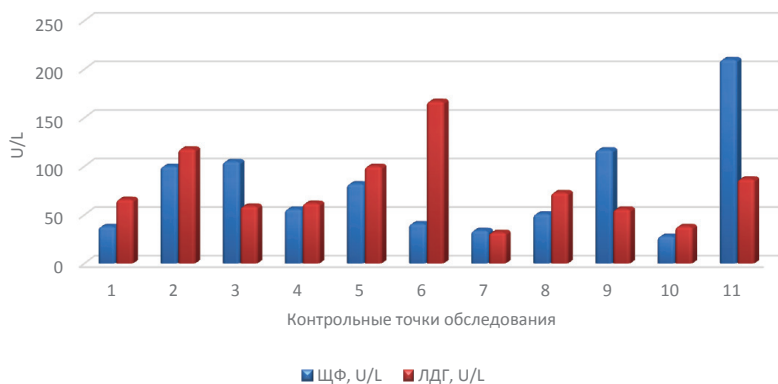
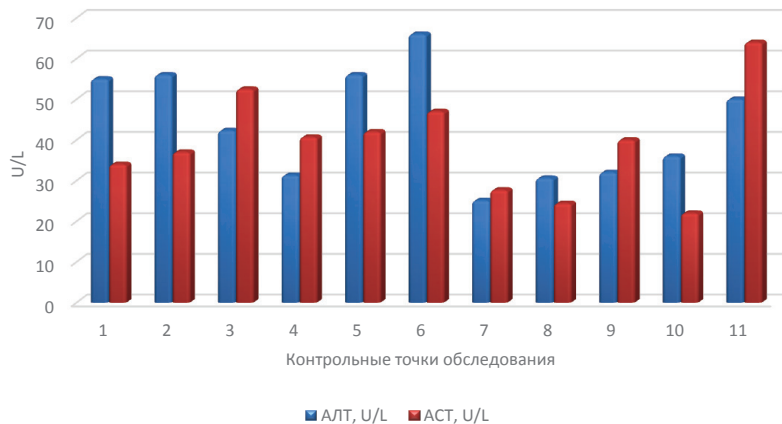
Мастоцитомы или «тучноклеточная» опухоль развивается из популяции мастоцитов, в которых дестабилизирована работа гена *c-Kit*, отвечающего за построение рецепторных тирозинкиназ. Такая дестабилизация работы рецептора на поверхности мастоцита проявляется в избыточной



экспрессии и усилении функциональных мутаций, что приводит к избыточной пролиферации и нарушениям в метаболизме и морфогенезе клетки [1–3]. Терапевтическое лечение мастоцитомы носит комплексный характер, сопряжено с определенными рисками для здоровья и часто сопровождается токсическими эффектами. Это приводит к повышенной нагрузке на организм. Такие условия требуют не только пристального внимания к работе и функциональному состоянию органов и систем, но и своевременной коррекции схемы лечения [1, 2]. Одним из наиболее удобных способов мониторинга функционального состояния организма является биохимический анализ крови. С его помощью мы наблюдали за ходом лечения собаки породы шарпей с установленным диагнозом «мастоцитомы». С момента начала терапии регулярно (1 раз в неделю) осуществляли клинический осмотр и мониторинг биохимического анализа крови животного. Определение мониторинговых показателей проводилось на автоматическом биохимическом анализаторе по стандартным методикам с использованием коммерческих реактивов. В связи с повышенной токсической нагрузкой на печень, особое внимание было уделено определению активности ферментов печени (см. рисунок) аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ).

На протяжении 11 недель терапии динамика ферментативной активности была довольно вариативна. На 3-ей неделе повысился уровень АСТ (+15 U/L), в то время как уровень АЛТ понизился (-14 U/L). Пиковые значения АСТ и ЩФ наблюдались на 11-ой неделе терапии и составили соответственно 64 U/L и 210 U/L. Для АЛТ и ЛДГ пиковые значения ферментативной активности наблюдались на 6-ой неделе курса терапии и составили 66 U/L и 167 U/L соответственно. Такое повышение активности ферментов наблюдалось в периоды после приема ингибиторов тирозинкиназ.

По результатам анализа корректировалась диета и назначались дополнительные препараты для поддержания работы и функции печени. Таким образом, биохимический мониторинг при лечении мастоцитомы позволяет предупредить развитие токсических эффектов агрессивной противоопухолевой терапии и в нужный момент поддержать состояние органов и систем организма.



Ферментативная активность сыворотки крови собаки при лечении мастоцитомы

## Литература

1. Воронина О. А., Зайцев С. Ю., Царькова М. С. Рецепторы тирозинкиназ в развитии и лечении мастоцитомы у собак / Известия международной академии аграрного образования. 2018 № 42 (11). с. 215–217.
2. Воронина О. А., Зайцев С. Ю., Царькова М. С. Рецепторы тирозинкиназ в развитии и лечении мастоцитомы у собак / Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны, Санкт-Петербург, 22–23 ноября 2018 г. С. 54–55.
3. Maryam Abbaspour Babaei Behnam Kamalidehghan 2,3 Mohammad Saleem4–6 Hasniza Zaman Huri1,7 Fatemeh Ahmadipour Receptor tyrosine kinase (c-Kit) inhibitors: a potential therapeutic target in cancer cells.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ СКАНИРУЮЩЕГО  
ПРОТОЧНОГО ЦИТОМЕТРА В ИЗМЕРЕНИИ  
ГЛИКИРОВАННОГО ГЕМОГЛОБИНА**

**INVESTIGATION OF THE POSSIBILITY OF A SCANNING FLOW  
CYTOMETER IN MEASURING GLYCATED HEMOGLOBIN**

А. В. Гисич<sup>1,2</sup>, Е. С. Ястребова<sup>1,3</sup>, Д. И. Строкотов<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>*Институт химической кинетики и горения им. В. В. Воеводского СО РАН*

<sup>2</sup>*Новосибирский национальный исследовательский  
государственный университет*

<sup>3</sup>*Национальный медицинский исследовательский центр  
им. Е. Н. Мешалкина*

<sup>4</sup>*Новосибирский государственный медицинский университет*

A. V. Gisich<sup>1,2</sup>, E. S. Yastrebova<sup>1,3</sup>, D. I. Strokov<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>*V. V. Voevodsky Institute of Chemical Kinetics and Combustion SB RAS*

<sup>2</sup>*Novosibirsk National Research State University*

<sup>3</sup>*National Medical Research Center. E. N. Meshalkina*

<sup>4</sup>*Novosibirsk State Medical University*

**Аннотация**

Целью работы являлся поиск оптимальных параметров для измерения гликированного гемоглобина в одиночных эритроцитах методом сканирующей проточной цитометрии.

Было показано, что на имеющейся практической реализации прибора, которая включает в себя лазеры: 405 нм (30 мВт, Radius, Coherent Inc., Santa Clara, USA) и 660 нм (LM-660-20-S, 40 мВт) не удается достоверно разделять концентрации гликированного гемоглобина у донора (5 % HbA1c) и пациента (10 % HbA1c).

Для решения этой задачи были проведены расчеты зависимости интенсивности рассеянного излучения от эритроцита в широком угловом диапазоне (индикатрис светорассеяния) для длин волн, находящихся в максимуме полосы поглощения гликированного гемоглобина. Максимальная чувствительность (не более 3 %) по концентрации гликированного гемоглобина была установлена на длине волны 415 нм.

### Abstract

The aim of the work was to evaluate the possibility of measuring glycosylated hemoglobin in single erythrocytes by scanning flow cytometry.

To achieve the goal, it was shown impossibility of reliable separation of glycosylated hemoglobin concentration in the donor (5% HbA1c) and patient (10% HbA1c) on the existing practical implementation of the device, which includes a 405 nm laser (30 mW, Radius, Coherent Inc., Santa Clara, USA) and 660 nm (LM — 660–20 — S, 40 mW).

To solve this problem, we calculated the dependence of the scattered radiation intensity on the erythrocyte in a wide angular range (indicatrix of light scattering) for wavelengths that are at the maximum of the absorption band of glycosylated hemoglobin. The maximum sensitivity (no more than 3%) for the concentration of glycosylated hemoglobin is set for a wavelength of 415 nm.

Гликированный гемоглобин (HbA1c) образуется в результате присоединения к белку гемоглобина (глобину) глюкозы. При длительном превышении уровня глюкозы в крови, возникающем при сахарном диабете, происходит рост уровня HbA1c. Определение концентрации HbA1c отражает среднее содержание сахара в крови за последние 3–4 месяца, поэтому он считается самым эффективным и необходимым методом в диагностике и лечении сахарного диабета.

Различают более 30 методов для определения HbA1c. Этот список включает в себя как лабораторные системы с низким уровнем точности и ручные микроколочные методы, так и высокоточные автоматизированные системы, и анализаторы, в основе которых лежит метод жидкостной ионообменной хроматографии высокого давления (ВЭЖХ). Но поиск метода для точного, быстрого, недорогого анализа с низким количеством расходных материалов продолжается по сей день.

Сканирующая проточная цитометрия выгодно отличается от других методов измерения, позволяя исследовать свойства одиночных клеток. Данный метод способен проводить многопараметрические измерения частиц в потоке на высокой скорости. Сканирующий проточный цитометр (СПЦ) основан на принципе измерения интенсивности рассеянного света от одиночной частицы в широких угловых диапазонах (индикатриса светорассеяния), а также рассеяние вперёд и в бок под  $90^\circ$ , которое используется в качестве триггерного сигнала, сообщая системе о пролете исследуемой частицы и запускающей запись её индикатрисы светорассеяния. Метод позволяет идентифицировать эритроциты и, благодаря информации, заключённой в индикатрисе светорассеяния, характеризовать их по размеру и показателю преломления, из которого в свою очередь представляется возможным выразить концентрацию гликированного гемоглобина.

Для проверки чувствительности текущей реализации прибора к определению содержанию гликированного гемоглобина в крови, были измерены сигналы светорассеяния в угловом диапазоне от 10 до 70 градусов на сферизованных эритроцитах. Измерения проводились одновременно на красном (660 нм) и синем (405 нм) лазерах. Полученные данные были обработаны с помощью теории Ми с учетом поглощения на длине волны 405 нм и без поглощения на 660 нм. Значительных отличий в показателе преломления у условно здоровых доноров ( $HbA1c=5\%$ ) и пациентов ( $HbA1c=5\%$ ) с использованием лазеров 660 и 405 нм не обнаружилось. Это послужило для теоретического расчета характеристик прибора, согласно которому уровень чувствительности по концентрации гликированного гемоглобина составит не менее 3 %.

Линии максимального поглощения  $HbA1c$  находятся на длинах волн 417 нм и 540 нм, следовательно, для этих значений было необходимо рассчитать индикатрисы светорассеяния. Обнаруженные оптические особенности гемоглобина позволили теоретически найти различие в регистрируемых сигналах на СПЦ для эритроцитов с варьируемой концентрацией  $HbA1c$ .

Чтобы оценить влияние различных концентраций гликированного гемоглобина на оптические характеристики клеток, были рассчитаны индикатрисы светорассеяния на длинах волн 415 и 540 нм. Мнимый показатель преломления эритроцита рассчитывался при варьировании  $HbA1c$  в диапазоне от 0 % до 50 % с шагом 1 %. Выраженное отличие проявилось на длине волны 415 нм, но заметная разница в значении интенсивности рассеяния (более 10 %) имела только в случае разности концентраций гликированного гемоглобина не менее 1 г/дл.

Это говорит о том, что в реализации прибора с лазером 415 нм точность определения  $HbA1c$  в одиночном эритроците будет составлять порядка 20 %. Такая чувствительность метода позволит отличить результаты исследования здорового донора от пациента с диагностированным диабетом, однако проследить динамику изменения гликированного гемоглобина на уровне 1 % в сравнении с методом жидкостной хроматографии обеспечить не сможет. Преимуществом рассмотренного подхода является возможность измерения  $HbA1c$  в одиночных эритроцитах в отличие от остальных методов, основанных на обработке сигналов от ансамбля клеток. Более того, достаточного одного измерения пробы на сканирующем проточном цитометре для детального описания как морфологии клетки, так и оценки доли гликированного гемоглобина, что уменьшает затраты необходимые для проведения анализов.

Таким образом, в ходе работы было решено три задачи:

- 1) Проверена чувствительность текущей конфигурации прибора к содержанию гликированного гемоглобина в эритроцитах доноров и пациентов;
- 2) Проведен теоретический расчет точности измерения концентраций HbA<sub>1c</sub> на оптимальных длинах волн;
- 3) Рассчитана оценка погрешностей, вносимых предположением, что для всех доноров и пациентов в каждом эритроците 25 % и 75 % дезоксигенированного и оксигенированного гемоглобина, соответственно.

В итоге, конфигурация сканирующего проточного цитометра с использованием лазеров 660 и 405 нм не позволяет достичь точности (менее 10 %) разделения популяций эритроцитов с высоким (10 %) и низким (5 %) содержанием HbA<sub>1c</sub>. Если на имеющейся практической реализации прибора поставить лазер с длиной волны 415 нм, то определение гликированного гемоглобина является возможным с точностью не менее 20 %.

## ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СОЛЕЙ ГЛУТАТИОНА С ДИТИОФОСФОРНЫМИ КИСЛОТАМИ\*

### ELECTROCHEMICAL PROPERTIES OF GLUTATHIONE SALTS OF DITHIOPHOSPHORIC ACIDS

Д. Р. Гумерова, Р. А. Ишкаева, Д. В. Салахиева, Е. А. Уракова,  
Д. С. Блохин, И. С. Низамов, Г. Р. Ахмедова, Т. И. Абдуллин

*ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский)  
федеральный университет, Казань, Россия*

D. R. Gumerova, R. A. Ishkaeva, D. V. Salakhieva, E. A. Urakova,  
D. S. Blokhin, I. S. Nizamov, G. R. Akhmedova, T. I. Abdullin

*Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia*

E-mail: dilka-gume@mail.ru, r.a.ishkaeva@gmail.com

#### **Аннотация**

Модификация дитиофосфорными кислотами является перспективным подходом к регуляции физико-химических и биологических свойств пептидов. В работе охарактеризована электрохимическая и радикал-связывающая активность солей трипептида глутатиона с дитиофосфорными кислотами с использованием электродов на основе оксида графена и DPPH-теста.

#### **Abstract**

Modification with dithiophosphoric acids is a promising approach to optimizing physicochemical and biological properties of peptides. In this work, electrochemical and radical-binding activity of salts of the tripeptide glutathione with dithiophosphoric acids was characterized using graphene oxide-based electrode and DPPH assay.

Окислительно-восстановительные процессы играют важную роль в функционировании живых организмов. Преобладающим антиоксидантом в клетках млекопитающих является трипептид глутатион (GSH), который участвует в защите от радикалов и токсичных электрофилов, а также в ре-

---

© Д. Р. Гумерова, Р. А. Ишкаева, Д. В. Салахиева, Е. А. Уракова, Д. С. Блохин, И. С. Низамов, Г. Р. Ахмедова, Т. И. Абдуллин, 2019

\* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-90139 и в рамках Программы повышения конкурентоспособности КФУ.

гуляции редокс-гомеостаза. Нарушение биосинтеза глутатиона ассоциировано с возрастными изменениями, развитием ряда острых и хронических заболеваний. Актуальной задачей является создание производных GSH с улучшенными физико-химическими свойствами и потенциальными применениями в качестве терапевтических средств. Перспективными модификаторами пептидов являются фосфорорганические молекулы, в частности, дитиофосфорные кислоты (DTP), образующие аммониевые соли с аминокетто-группами пептидов [1].

В настоящей работе исследованы электрохимические свойства полученных ранее аммониевых солей GSH с DTP [1]. Контроль целостности DTP был проведен с помощью регистрации одномерных спектров ЯМР по ядрам фосфора  $^{31}\text{P}$ . Взаимодействие между глутатионом и DTP подтверждается наличием сигнала от  $\text{NH}_2$  группы глутаминовой кислоты на протонном спектре ЯМР, что говорит о блокировании водородного обмена между амидной группой и растворителем.

В качестве электрода использовали модифицированный стеклоуглеродный электрод (СУЭ) диаметром около 1.5 мм, поверхность которого покрывали предварительно приготовленной суспензией коммерческого препарата оксида графена. Электрохимические измерения проводили на потенциостате EmStat PalmSens (Нидерланды) в режиме квадратно-волновой вольтамперометрии (частота 10 Гц, амплитуда 10 мВ, шаг потенциала 5 мВ). Модификация СУЭ оксидом графена, сходным образом с окисленными углеродными нанотрубками [2], существенно улучшала адсорбцию и электрохимическое поведение различных биомолекул.

Установлено, что на модифицированном электроде GSH окисляется со значительным перенапряжением при потенциале около 915 мВ относительно  $\text{Ag}/\text{AgCl}$ . В тех же условиях окисление GSH-DTP происходило при более низких потенциалах; при этом регистрируемые токи возрастали многократно, что свидетельствует об облегчении переноса электронов от фосформодифицированного трипептида на поверхность электрода. Дополнительно, в работе исследована антиоксидантная активность солей GSH и окисленного глутатиона (GSSG) с DTP с использованием хромогенного индикатора 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (DPPH). По данным DPPH-теста DTP-компонент значительно (почти в 5 раз) усиливает радикал-связывающую способность глутатиона в восстановленной форме.

В совокупности, результаты показывают, что модификация с DTP позволяет изменить физико-химические свойства GSH. Соли GSH-DTP обладают улучшенными электрохимическими/антиоксидантными свойствами по сравнению с GSH и представляют интерес для дальнейшего исследования в *in vitro* и *in vivo* моделях.



---

**Литература**

1. R. A. Akhmadishina, E. V. Kuznetsova, G. R. Sadrieva, L. R. Sabirzyanova, I. S. Nizamov, G. R. Akhmedova, I. D. Nizamov, T. I. Abdullin. *Peptides*. 2018. V. 99. P. 179–188.
2. D. V. Saifullina, I. I. Shakhmaeva, T. I. Abdullin. *Materials Science and Engineering C: Materials for Biological Applications*. 2012. V. 32. P. 1843–1848.

## РАЗРАБОТКА МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГРУППЫ КРОВИ С ПОМОЩЬЮ ИМПЕДАНСОМЕТРИИ

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR DETERMINING A BLOOD GROUP  
USING IMPEDANESOMETRY

В. А. Гусев<sup>1</sup>, А. А. Ломзов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Медико-Биологический Союз «Технология»,  
Новосибирский государственный университет*

<sup>2</sup> *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,  
Новосибирский государственный университет*

V. A. Gusev<sup>1</sup>, A. A. Lomzov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *MBU-Technology, Novosibirsk State University, Russia*

<sup>2</sup> *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS,  
Novosibirsk State University, Russia*

### Аннотация

В процессе исследования был разработан высокоточный метод определения группы крови и резус-фактора с использованием сканера импеданса AD5933. Данный метод требует малых затрат реагентов, то есть является очень чувствительным с сохранением точности определения.

### Abstract

In the course of the study, a high-precision method for determining the blood group and Rh factor using the AD5933 impedance scanner was developed. This method requires low reagent costs, which makes it possible to maintain high sensitivity while keeping the accuracy of determination.

Определение характеристик крови человека имеет важное значение в медицине. В настоящей работе был разработан метод, позволяющий удобно, быстро и достоверно идентифицировать группу крови человека.

Принцип данного метода заключается в регистрации изменения импеданса в процессе агглютинации крови цоликлонами — специфичными антителами к антигенам поверхности эритроцитов. Измерения были вы-

---

полнены на приборе, построенном на основе схемы прецизионного высокоинтегрированного однокристалльного сканера импеданса AD5933. Проведена калибровка прибора с использованием эталонных резисторов и конденсаторов. Точность измерения импеданса составила 8 %, чувствительность прибора — 30 Ом.

Исследования проведены для большого числа образцов крови (более 200) всех групп и резус-факторов, взятых от представителей разного пола, возраста и состояния здоровья. Изучено влияние гематокрита на возможность детекции.

Разработанная конструкция и методика определения групп крови являются очень чувствительными и позволяют регистрировать изменения импеданса величиной в несколько процентов.

Полученные результаты позволяют сделать вывод об универсальности метода определения группы и резус-фактора.

**ТОКСИЧНОСТЬ И АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ  
ФУЛЛЕРЕНОЛОВ. БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ МОНИТОРИНГ\*****TOXICITY AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF FULLERENOLS.  
BIOLUMINESCENT MONITORING**

Е. С. Ковель<sup>1,2</sup>, Н. С. Кудряшева<sup>1,3</sup>, А. С. Сачкова<sup>4</sup>

<sup>1</sup>*Институт биофизики СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН*

<sup>2</sup>*Институт физики СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН*

<sup>3</sup>*Сибирский федеральный университет*

<sup>4</sup>*Национальный исследовательский Томский политехнический университет*

E. S. Kovel<sup>1,2</sup>, N. S. Kudryasheva<sup>1,3</sup>, A. S. Sachkova<sup>4</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Biophysics*

<sup>2</sup>*Institute of Physics SB RAS, FRC KSC SB RAS, Russia*

<sup>3</sup>*Siberian Federal University, Russia*

<sup>4</sup>*National Research Tomsk Polytechnic University, Russia*

E-mail: kkoval@yandex.ru

**Аннотация**

Проведен анализ токсичности и антиоксидантной активности двух групп фуллеренолов с различным количеством кислородсодержащих заместителей. Мониторинг биологической активности растворов фуллеренолов был проведен с использованием биоломинесцентных клеточного и ферментативного биотестов (светящихся морских бактерий и их ферментативных реакций), где главный тестируемый параметр — интенсивность биоломинесценции. Все фуллеренолы оказывали токсическое действие при высоких концентрациях; их антиоксидантная активность проявлялась при низких и сверхнизких концентрациях. Фуллеренолы с меньшим количеством кислородсодержащих заместителей характеризовались меньшей токсичностью и большей антиоксидантной активностью.

**Abstract**

We analyzed the antioxidant activity and toxicity of two groups of fullerlenols with different number of oxygen substituents. Bioluminescent cellular and enzymatic assays

---

© Е. С. Ковель, Н. С. Кудряшева, А. С. Сачкова, 2019

\* Исследования выполнены при поддержке грантов РФФИ и правительства Красноярского края, 18-44-240004 р\_а и 18-29-19003; программы РАН № 32: Нанобиотехнологии. Нанодетекция и нанодиагностика.

(luminous marine bacteria and their enzymatic reactions, respectively) were applied to monitor biological activity in the fullereneol solutions and bioluminescence was applied as a signaling physiological parameter. All fullereneols produced toxic effect at high concentrations, while their antioxidant activity was demonstrated at low and ultralow concentrations. Lower toxicity and higher antioxidant activity were determined in solutions of fullereneols with fewer oxygen substituents.

Биолюминесцентные методы широко используются для мониторинга токсичности различных сред благодаря высокой скорости анализа и удобству регистрации люминесцентного сигнала. Эти характеристики биолюминесцентных биотестов позволяют осуществлять большое количество измерений в сопоставимых условиях, что чрезвычайно важно для статистической обработки результатов анализа. Классическим биолюминесцентным биотестом являются морские светящиеся бактерии, которые уже более 50 лет используются для оценки токсичности водных сред в связи с высокой чувствительностью к различным поллютантам. Тестовым физиологическим параметром их жизнедеятельности является интенсивность люминесценции. Величина ингибирования интенсивности биолюминесценции является количественной характеристикой общей (интегральной) токсичности среды.

В последние десятилетия находит широкое применение биотест, основанный на ферментативных реакциях люминесцентных бактерий, а именно, система двух сопряженных реакций, катализируемых бактериальной люциферазой и НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазой. Одной из особенностей этой системы является ее специфичность к группе окислителей: в присутствии окислителей, помимо уменьшения максимальной интенсивности свечения, изменяется еще один кинетический параметр биолюминесценции — период задержки свечения (индукционный период), который зависит неаддитивным образом от концентрации и редокс-потенциала окислителей-токсикантов. Благодаря этой особенности ферментативный биотест может дополнительно использоваться для мониторинга окислительной токсичности среды. Таким образом, биолюминесцентный ферментативный биотест может быть использован для определения как общей (или интегральной) токсичности растворов биологически-активных веществ, так и способности этих веществ изменять окислительную токсичность сред, т.е. их антиоксидантной активности.

Фуллеренолы — наноразмерные водорастворимые полигидроксилированные производные фуллеренов, биологически активные соединения и перспективные агенты для разработки лекарственных препаратов. В работе проведен анализ токсичности и антиоксидантной активности двух групп фуллеренолов с различным количеством кислородсодержащих замести-

телей: (1)  $C_{60}O_y(OH)_x$ ,  $C_{60,70}O_y(OH)_x$ , где  $x + y = 24-28$  и (2)  $C_{60,70}O_y(OH)_x$ ,  $Fe_{0,5}C_{60}O_y(OH)_x$ ,  $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$ , где  $x + y = 40-42$ . Для мониторинга токсичности растворов фуллеренолов использовали люминесцентные клеточные и ферментативные биотесты (соответственно светящиеся морские бактерии и их ферментативные реакции), где главный тестируемый параметр физиологической активности — интенсивность биолюминесценции. Для характеристики токсичности фуллеренолов определяли их концентрации, ингибирующие биолюминесценцию тестовых систем. Интервал токсичных концентраций фуллеренолов исключали в экспериментах по исследованию их антиоксидантной активности в растворе модельного окислителя (1,4-бензохинона); по уменьшению общей и окислительной токсичности растворов рассчитывали коэффициенты детоксикации (соответственно  $D_{GT}$  и  $D_{OxT}$ ).

Все фуллеренолы оказывали токсическое действие при высоких концентрациях ( $>0,01$  г/л); их антиоксидантная активность проявлялась при низких и сверхнизких концентрациях ( $<0,001$  г/л). Установлено, что количественные характеристики токсичности и антиоксидантной активности фуллеренолов (эффективные концентрации, диапазоны концентраций,  $D_{GT}$  и  $D_{OxT}$ ) зависят от количества кислородсодержащих заместителей. Фуллеренолы с меньшим количеством кислородсодержащих заместителей ( $x + y = 24-28$ ) характеризовались меньшей токсичностью и большей антиоксидантной активностью. Различия в свойствах фуллеренолов связаны с их каталитической активностью, обусловленной их электронно-акцепторными свойствами, способностью нейтрализовывать радикальные формы кислорода и содержанием этих форм в водных растворах. Полученные результаты формируют теоретическую базу для выбора углеродных наночастиц с заданными токсическими и антиоксидантными характеристиками. На основании полученных результатов мы рекомендуем способ снижения токсичности перспективного эндоздрального фуллеренола  $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$  путем уменьшения количества кислородсодержащих групп до  $x + y = 24-28$ .

В работе продемонстрирован высокий потенциал люминесцентных биотестов для сравнения токсичности и антиоксидантной активности углеродных наноструктур.

**ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ НЕЙРОНОВ  
МОЗЖЕЧКА В СРЕДАХ С РАЗЛИЧНЫМ ИЗОТОПНЫМ  $^2\text{H}/^1\text{H}$   
СОСТАВОМ**

CHANGE OF FUNCTIONAL STATE OF CEREBRAL NEURONS IN MEDIA  
WITH VARIOUS ISOTOPIC  $^2\text{H} / ^1\text{H}$  COMPOSITION

С. В. Козин, А. А. Кравцов

*Южный научный центр РАН, 344006, г. Ростов-на-Дону, Россия*

S. V. Kozin, A. A. Kravtsov

*FSBIS "FRC South scientific center of the Russian Academy of Sciences",  
Rostov-on-Don city, Russia*

E-mail: kozinsv85@mail.ru

**Аннотация**

В работе представлены данные, полученные методом культуры тканей, характеризующие функциональные показатели нейронов в среде с пониженным содержанием дейтерия в норме и условиях стрессового воздействия. Установлено, что глюкозная депривация и температурный стресс ( $39\text{ }^\circ\text{C}$ ) приводят к повышенной гибели культуры нейронов при инкубации в обедненной дейтерием воде, тогда как уровень гибели нейронов как в среде с природным содержанием дейтерия (150 ppm), так и при 50 ppm по дейтерию в физиологических условиях существенно не отличается. При этом в обедненной по дейтерию среде происходит уменьшение мембранного потенциала митохондрий нейронов мозжечка. В целом двухчасовая инкубация в среде с пониженным содержанием дейтерия не оказала цитопротективного эффекта на культуру нейронов мозжечка.

**Abstract**

The study presents data obtained by tissue culture, characterizing the functional parameters of neurons in an environment with a low deuterium content under normal and stressful conditions. It was established that glucose deprivation and temperature stress ( $39\text{ }^\circ\text{C}$ ) leads to increased neuronal culture death during incubation in deuterium-depleted water, whereas neuron death rates, both under 150 ppm and 50 ppm, do not differ significantly under physiological conditions. At the same time, in the environment depleted in deuterium, the mitochondrial potential of cerebellar neurons decreases. In general, a two-

hour incubation in a medium with a low deuterium content did not have a cytoprotective effect on the culture of cerebellar neurons.

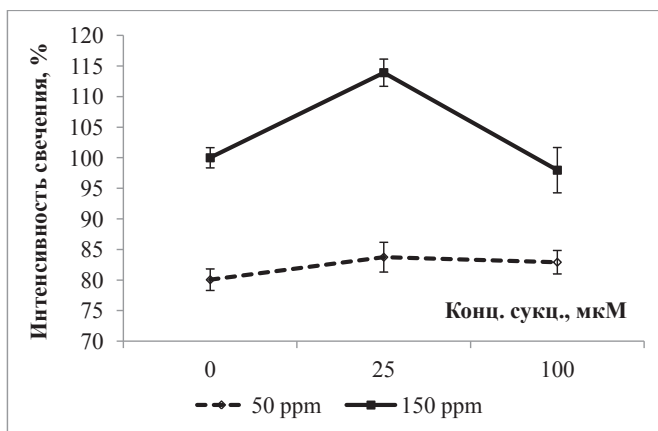
### **Введение**

К настоящему времени установлено, что относительно небольшие колебания в содержании дейтерия в организме оказывают выраженное влияние на динамику биохимических, клеточных, тканевых и системных регуляторных процессов [1,2]. Показаны антиоксидантное [3,4] и антитоксическое действие обедненной дейтерием воды [5], а также положительные эффекты данного алиментарного фактора на состояние различных защитных систем организма. Так, данные последних исследований указывают на способность обедненной дейтерием воды изменять изотопный D/H состав крови и тканей и повышать, таким образом, потенциал защитных систем организма, проявляя иммуномодулирующие свойства [6]. Изменение баланса между дейтерием и водородом во внутренней среде может иметь важные последствия для механизмов, опосредующих долговременную память [7], и может положительно влиять на уровень тревожности и стрессоустойчивость лабораторных животных [8]. При этом остается непонятным механизм влияния малых концентраций дейтерия на организм и в частности головной мозг.

Исследование влияния инкубационного солевого раствора (ИСР), приготовленного на воде с пониженным содержанием дейтерия, на культуру клеток мозжечка показали следующие результаты. Среда со сниженным содержанием дейтерия не оказала существенного влияния на уровень свободных радикалов в митохондриях. Интенсивность флуоресценции зонда не имела достоверных отличий в зависимости от концентрации сукцината и среды инкубации нейронов мозжечка. Напротив, мембранный потенциал митохондрий достоверно уменьшался ( $p < 0.05$ ) в ИСР, приготовленном на ОДВ при всех концентрациях сукцината. Так, в культурах, помещенных в среду с природным содержанием дейтерия, интенсивность флуоресценции составила 114 %, 103 %, 98 % и 103 %, соответственно, для точек 25, 50, 100 и 200 мкМ сукцината. В культурах, помещённых в среду с пониженным содержанием дейтерия — 50 ppm, интенсивность флуоресценции составила 80 %, 84 %, 83 %, соответственно, для 0, 25, 100 мкМ сукцината (см. рисунок).

Примечание: по оси ординат — интенсивность свечения в %. Данные представлены в виде  $M \pm m$  в % от 150 ppm при концентрации сукцината 0 мкМ.





Влияние среды с различным содержанием дейтерия на значение мембранного потенциала митохондрий в культивируемых нейронах мозжечка крыс

Анализ результатов экспериментов по исследованию влияния среды с пониженным содержанием дейтерия на уровень гибели нейронов при глюкозной депривации (ГД) показал следующее. Уровень гибели нейронов при ГД в среде с природным содержанием дейтерия (группа «150 ppm + ГД») возрастал на  $21 \pm 3,1\%$ , тогда как в среде с пониженным содержанием дейтерия (группа «50 ppm + ГД») уровень гибели нейронов возрастал на  $39 \pm 4,0\%$ , по отношению к культурам, не подвергшимся ГД в среде с природным уровнем дейтерия (группа «150 ppm»). Кроме того, в культурах, помещенных в среду с пониженным содержанием дейтерия и не подвергшихся ГД (группа «50 ppm»), уровень гибели нейронов был на  $9 \pm 1,5\%$  выше, чем в культурах, помещенных в среду с природным уровнем дейтерия.

Таким образом, ГД достоверно увеличивала гибель нейронов мозжечка в среде, как с природным, так и с пониженным содержанием дейтерия. При этом среда с пониженным содержанием дейтерия оказывала дополнительное стрессорное воздействие на культуру нейронов мозжечка, что проявлялось в повышении гибели нейронов, как при ГД, так и в её отсутствие.

В целом двухчасовая инкубация в среде с пониженным содержанием дейтерия не оказала цитопротективного эффекта на культуру нейронов мозжечка. Глюкозная депривация и температурный стресс приводят к повышенной гибели культуры нейронов при инкубации в ОДВ. Вероятно, данный эффект является следствием того, что созданный в среде инкубации изотопный D/H градиент вызывает дополнительный стресс, накладываемый на внешнее

воздействие. В результате клетка испытывает двойное стрессовое влияние. Вероятно, повышенной причиной гибели клеток послужило нарушение их энергетического равновесия.

### Литература

1. Zubarev R. A. Role of Stable Isotopes in Life Testing Isotopic Resonance Hypothesis // *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2011. 9(1–2). P. 15–20.
2. Pershin S. M., Ismailov E. Sh., Dibirova M. M., Akhmedov M. E., Tagirova F. V., Shashkov D. I., Abdulmagomedova Z. N. Multiple increase in productivity of the yeast at reducing the fraction of D<sub>2</sub>O in water // *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 2017, Vol. 476, P. 299–302.
3. Basov A. A., Elkina A. A., Samkov A. A., Volchenko N. N., Moiseev A. V., Fedulova L. V., Baryshev M. G., Dzhimak S. S. Influence of deuterium depleted water on the isotope D/H composition of liver tissue and morphological development of rats at different periods of ontogenesis // *Iranian Biomedical Journal*. 2019. Vol. 23 (2). P. 129–141.
4. Kozin S. V., Kravtsov A. A., Elkina A. A., Zlishcheva E. I., Barysheva E. V., Shurygina L. V., Moiseev A. V., Baryshev M. G. Isotope exchange of deuterium for protium in rat brain tissues changes brain tolerance to hypoxia // *Biophysics*. 2019. Vol. 64. № 2. P. 272–278.
5. Dzhimak S. S., Basov A. A., Elkina A. A., Fedulova L. V., Kotenkova E. A., Vasilevskaya E. R., Lyasota O. M., Baryshev M. G. Influence of deuterium-depleted water on hepatorenal toxicity // *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*. 2018. Vol. 13. № 2.
6. Goncharuk, V. V.; Pleteneva, T. V.; Grebennikova, T. V., et al. Determination of biological activity of water having a different isotope ratio of protium and deuterium // *Journal of Water Chemistry and Technology*. 2018. V. 40. № 1. P. 27–34.
7. Mladin C., Ciobica A., Lefter R., Popescu A., Bild W. Deuterium-depleted water has stimulating effects on long-term memory in rats. *NeurosciLett*. 2014;583:154–8.
8. Strekalova T., Evans M., Chernopiatko A., Couch Y., Costa-Nunes J., Cespuglio R., Chesson L., Vignisse Ju., Steinbusch H. W., Anthony D. C., Pomytkin I., Lesch K. P. Deuterium content of water increases depression susceptibility: the potential role of a serotonin-related mechanism // *Behavioural Brain Research*. 2015. T. 277. C. 237–244.

**ВЛИЯНИЕ ГЛИЦИРРИЗИНОВОЙ КИСЛОТЫ  
НА МОЛЕКУЛЯРНУЮ ПОДВИЖНОСТЬ ФОСФОЛИПИДОВ  
В МОДЕЛЬНЫХ МЕМБРАНАХ\***

**GLYCYRRHIZIN-INDUCED CHANGES IN THE DYNAMICS  
OF MODEL PHOSPHOLIPID BILAYERS**

П. А. Кононова<sup>1,2</sup>, О. Ю. Селютина<sup>1</sup>, Е. А. Шелепова<sup>1,2</sup>,  
М. В. Зеликман<sup>1,2</sup>, Н. Э. Поляков<sup>1,3</sup>

*<sup>1</sup>Институт химической кинетики и горения*

*им. В. В. Воеводского СО РАН, Новосибирск, Россия*

*<sup>2</sup>Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*

*<sup>3</sup>Институт химии твёрдого тела и механохимии, Новосибирск, Россия*

P.A. Kononova<sup>1,2</sup>, O.Yu. Selyutina<sup>1</sup>, E.A. Shelepova<sup>1,2</sup>,  
M.V. Zelikman<sup>1,2</sup>, N.E. Polyakov<sup>1,3</sup>

*<sup>1</sup>Voevodsky Institute of Chemical Kinetics and Combustion, Novosibirsk, Russia*

*<sup>2</sup>Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*

*<sup>3</sup>Institute of Solid-State Chemistry and Mechanochemistry, Novosibirsk, Russia*

E-mail: kononova\_polina@bk.ru

**Аннотация**

Глицирризиновая кислоты (ГК) встраивается в мембрану, её присутствие уменьшает подвижность фосфолипидов в модельных мембранах. ГК способна образовывать ассоциаты внутри бислоя. В депротонированной форме ГК аккумулируется на поверхности мембраны. ГК повышает температуру фазового перехода и увеличивает его коллективность.

**Abstract**

Glycyrrhizin acid (GA) in the protonated form embeds in the membrane; its presence reduces the mobility of phospholipids in model membranes. GA is capable of forming associates within a bilayer. In the deprotonated form, HA accumulates on the membrane surface. HA increases the temperature of the phase transition and increases its collectivity.

---

© П. А. Кононова, О. Ю. Селютина, Е. А. Шелепова, М. В. Зеликман, Н. Э. Поляков, 2019

\* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ № 18-33-00662, 18-416-540007.

Низкая биодоступность из-за плохой растворимости в водных средах является одним из основных препятствий в процессе разработки лекарств. Плохая растворимость может быть преодолена за счет высокой проницаемости через клеточную мембрану. Многие природные соединения, получаемые из лекарственных растений, обладают способностью увеличивать биодоступность. В данной работе изучалась глицирризиновая кислота (ГК). ГК — главный действующий компонент корня солодки. ГК способна повышать мембранную проницаемость. Цель работы — изучить взаимодействие ГК с мембраной, её влияние на подвижность фосфолипидов в мембране. Исследования проводились на модельных мембранах — фосфолипидных двухслойных везикулах — липосомах. Использовались три типа фосфолипидов: диолеил-фосфатидилхолин (DOPC), пальмитоил-олеил-фосфатидилхолин (POPC), дипальмитоил-фосфатидилхолин (DPPC).

Использование ЯМР-спектроскопии позволяет делать предположения о локализации ГК в мембране и её влиянии на подвижность. Определялись времена спин-спиновой и спин-решеточной релаксации, температура фазового перехода. Также были использованы методы молекулярной динамики.

Температуры фазового перехода мембраны важна, так как в переходной области увеличивается вероятность пассивной диффузии. Были проведены эксперименты с одно- и двухкомпонентными мембранами из DOPC и смеси DOPC с DPPC. В обоих случаях присутствие ГК повысило температуру фазового перехода на несколько градусов. Также увеличилась коллективность фазового перехода.

ЯМР-спектр позволяет наблюдать за различными функциональными группами фосфолипида. Добавление парамагнитных ионов позволяет разделить сигнал от внутренней и внешней части липидного бислоя. Времена спин-решеточной релаксации связаны с вращением фосфолипида. Времена спин-спиновой релаксации — с латеральной диффузией.

Были проведены эксперименты по концентрационной зависимости. Выявлена сильная зависимость подвижности липидов от концентрации ГК. Уменьшается времена спин-решеточной релаксации с увеличением концентрации ГК для всех типов липосом. Это может означать, что ГК входит в липидный бислой. Это хорошо согласуется с результатами молекулярной динамики.

Латеральная диффузия может быть затруднена если, внутри мембраны образовались ассоциаты ГК. По данным молекулярной динамики вероятность образования ассоциатов зависит от упорядоченности мембраны. Более вероятно образования ассоциатов в более упорядоченной мембране DPPC, чем в DOPC. В экспериментах не наблюдалась зависимости времен спин-спиновой релаксации от концентраций ГК для мембран DOPC. Для

мембран DPPC и смеси DOPC с DPPC зависимость была, что говорит об образовании ассоциатов ГК внутри этих мембран. Таким образом, ГК имеет тенденцию образовывать ассоциаты в более упорядоченных мембранах.

Более 80 % популярных лекарств применяются перорально. Препараты проходят через среды с различным pH. Изменение pH влияет на процесс взаимодействия ГК с мембраной. Во-первых, при изменении pH меняется упаковка фосфолипидов в мембране. Во-вторых, в кислой среде происходит процесс самоассоциации ГК.

Спектры фосфолипида POPC с ГК в не мицеллярной форме и мицеллярной форме показывают снижение интенсивности и увеличение ширины сигнала, когда pH постепенно увеличивается. Уширение линий ЯМР-спектра указывает на увеличение размеров липосом. Время спин-спиновой релаксации уменьшается с увеличением pH для внешних «голов» DOPC с ГК в не мицеллярной форме. Это указывает на то, что ГК в депротонированной форме накапливается на поверхности мембраны. Эксперименты с более упорядоченным POPC не показали зависимости от pH. ГК, вероятно, образует довольно стабильные ассоциаты в липидном бислое.

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ  
ПОЛИАСПАРАГИНОВЫХ КИСЛОТ МЕТОДОМ  
МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ \***

**MASS SPECTROMETRIC DETERMINATION  
OF MOLECULAR MASS OF POLY (ASPARTIC ACID)**

С. А. Кошкин, М. И. Камалов, Д. В. Салахиева

*ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет,  
Казань, Россия*

S. A. Koshkin, M. I. Kamalov, D. V. Salakhieva

*Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia*

E-mail: ser.a.koshkin@gmail.com

**Аннотация**

Молекулярную массу гомопептидов полиаспарагиновой кислоты (pAsp) анализировали с помощью масс-спектрометрии методом электрораспылительной ионизации. Декамер pAsp, полученный методом твердофазного синтеза, использовали в качестве стандарта. Изучено влияние pH на ионизацию pAsp. Молекулярно-массовое распределение pAsp было охарактеризовано в смеси органический растворитель-вода в присутствии гидроксида аммония.

**Abstract**

Molecular mass of poly (aspartic acid) (pAsp) homopeptides was analyzed using mass spectrometry with electrospray ionization. Decamer pAsp obtained by solid phase synthesis was used as a standard. The effect of pH on pAsp ionization was studied. The mass distribution of pAsp was characterized in organic solvent-water mixture in the presence of ammonium hydroxide.

Синтетические полиаминокислоты представляют собой универсальные полипептидные системы, которые можно использовать в качестве биоактив-

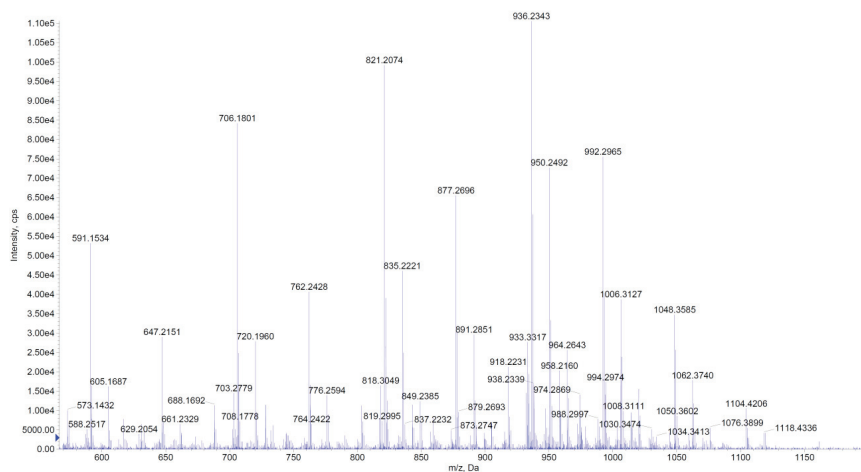
---

© С. А. Кошкин, М. И. Камалов, Д. В. Салахиева, 2019

\* Исследования выполнены при поддержке гранта РНФ № 19-74-00114 и в рамках программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров на 2013–2020 гг.

ных препаратов, материалов и носителей лекарственных средств. Полиаспарагиновая кислота (pAsp) и ее производные вызывают особый интерес из-за их высоких биосовместимых свойств и эффективных методов их получения. Важной характеристикой полимеров, в т.ч. пептидов, определяющей их применение, является их молекулярная масса. Определение молекулярной массы с целью контроля процесса синтеза и характеристики конечного продукта может осуществляться хроматографическими и масс-спектрометрическими и комбинированными методами. При этом прямой масс-спектрометрический метод не требующий использования стандартов является более надежным и требует меньше времени для анализа. Поэтому в данной работе мы сфокусировались на использовании масс-спектрометрии высокого разрешения для оценки молекулярно-массового распределения pAsp.

В рамках работы был получен десятимерный гомопептид аспарагиновой кислоты методом твердофазного синтеза с использованием микроволнового пептидного синтезатора Initiator<sup>+</sup> SP Wave (Biotage). Масс-спектрометрический анализ образцов pAsp проводился при использовании метода ионизации электрораспылением в режиме отрицательной ионизации, способствующим генерации анионов pAsp. В ходе анализа было установлено, что ионизация pAsp в стандартных условиях из растворов ацетата и формиата аммония и из растворов в чистых растворителях (вода, метанол, ацетонитрил) не приводит к эффективной ионизации и не позволяет оценить молекулярно-массовое распределение. С целью увеличения эффек-



Масс-спектр pAsp (0.1 мг/мл) зарегистрированный из 1 mM раствора аммиака в смеси ацетонитрил-вода 4:6

тивности ионизации было изучено влияние рН и ионной силы растворов, свойств ионизирующих добавок, растворителей и характера противоионов рAsp на выход масс-спектрометрического сигнала. Проведенное исследование позволило установить, что наибольшее влияние на ионизацию рAsp имеет рН распыляемого раствора. При использовании в ходе электрораспыления раствора аммиака с концентрацией 1–10 мМ в смеси воды и органического растворителя (ацетонитрил, метанол) достигается наиболее полная информация о молекулярно-массовом распределении в образцах рAsp. В данных условиях рAsp регистрируется в виде монозарядных ионов  $[M-H]^-$ . В спектрах детектируются сигналы как анионов свободной рAsp, так и ее монометиловых эфиров. Характер распределения зарегистрированных масс-спектрометрических сигналов свидетельствует о том, что приготовленные образцы рAsp представляют собой смесь олигомеров рAsp с числом аспарагиновых фрагментов от трех до девяти с преобладанием гепто-, окто- и нонамеров (см. рисунок).



**ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ МЕТОД ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ  
ТРАНСПОРТА ТИОМОЧЕВИНЫ В ЖИВЫХ КЛЕТКАХ\*****FLUORESCENT METHOD FOR REASEARCH OF THIOUREA  
TRANSPORT IN THE LIVING CELLS**

М. А. Кузовлева<sup>1</sup>, Л. Е. Каткова<sup>2</sup>, Г. С. Батурина<sup>2</sup>, Е. И. Соленов<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>*Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск, Россия*

<sup>2</sup>*Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск, Россия*

<sup>3</sup>*Новосибирский государственный технический университет,  
г. Новосибирск, Россия*

M. A. Kuzovleva<sup>1</sup>, L. E. Katkova<sup>2</sup>, G. S. Baturina<sup>2</sup>, E. I. Solenov<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>*Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*

<sup>2</sup>*Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy  
of Sciences, Novosibirsk, Russia*

<sup>3</sup>*Novosibirsk State Technical University, Novosibirsk, Russia*

**Аннотация**

Известно, что мочевины играют важную роль в работе механизма регуляции осмотического равновесия организма. В этой связи является актуальным изучение транспорта мочевины и ее производных. Данные исследования нуждаются в развитии эффективных методов изучения транспорта мочевины и ее производных. Целью настоящей работы было создание флуоресцентного метода для определения молекулярных механизмов транспорта тиомочевины в живых клетках. Созданный флуоресцентный метод позволяет исследовать характеристики транспорта тиомочевины в индивидуальных живых клетках. В работе определили энергию активации транспорта тиомочевины в клетках линии Met5A.

**Abstract**

It is known that urea plays an important role in the mechanism of regulation of the body's osmotic balance. In this regard the study of transport of urea and its derivatives is relevant. These researches need the development of effective methods for studying of the urea transport. The purpose of this work was to create a fluorescent method to determine the molecular mechanisms of the thiourea transport in the living cells. Our fluorescent method allows investigating the characteristics of the thiourea transport in the individual

© М. А. Кузовлева, Л. Е. Каткова, Г. С. Батурина, Е. И. Соленов, 2019

\* Исследования выполнены при поддержке РФФИ 17-04-00328.

living cells. In the work we have evaluated the activation energy of the thiourea transport in the cells of MET5A line.

### **Введение**

Мочевина является продуктом метаболизма азота в организме млекопитающих и участвует во многих физиологических процессах. В настоящее время транспортеры мочевины обнаружены, не только в почке, где она является компонентом концентрирующего механизма, но и в других органах. Интерес к исследованию транспорта мочевины связан с ее участием в регуляции осмотического баланса и поддержании жизнеспособности клеток при некоторых патологических состояниях и терапевтических воздействиях. При исследовании транспорта мочевины для конкурентного ингибирования используют производные мочевины. К таким аналогам относят: тиомочевину, метилмочевину, диметилтиомочевину и ряд других производных. В этой связи является значимым исследование физико-химических параметров взаимодействия данных аналогов с изучаемыми транспортерами. До настоящего времени такие исследования проводят с радиоактивно мечеными препаратами, что делает актуальной задачу создания чувствительного нерадиоактивного метода.

### **Задачи**

Задачами настоящего проекта было создание флуоресцентного метода для измерения энергии активации транспорта тимочевины в живых клетках, а также исследование транспорта тиомочевины в линии нормальных клеток мезотелиального происхождения.

### **Методы**

В работе использовали флуоресцентный метод, основанный на способности тиомочевины гасить флуоресценцию красителя Calcein (Sigma, USA). В эксперименте использовали нормальные иммортализованные мезотелиальные клетки линии Met5A, которые выращивали на покровных стеклах в культуральной среде RPMI-1640.

Стекла с клетками помещали в проточную камеру с терморегуляцией, позволяющую производить быструю ( $<100$  мс) замену среды. Камеру устанавливали на стол микроскопа Axiovert 40 (Zeiss, Germany). Затем производили загрузку клеток красителем Calcein-AM ( $5 \times 10^{-6}$  М, 20 мин.,  $37^\circ\text{C}$ ). В качестве нормотонического раствора использовали фосфатный солевой буфер (PBS: (124 мМ NaCl, 4,7 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2,7 мМ KCl, 1,5 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 5,5 мМ глюкозы, 1 мМ  $\text{CaCl}_2$ ), (280 mOsm/kg, pH=7,4). В эксперименте клетки уравнивали в гипертонической среде, которую со-

здавали PBS, содержащим 280 мМ маннитола, после этого среду замещали на изотонический PBS, содержащий 280 мМ тиомочевины (AppliChem, Germany). Тиомочевина, находясь в клетке, вызывает гашение флуоресценции красителя Calcein. Для определения внутриклеточной концентрации тиомочевины, строили калибровочную кривую для данного красителя путем измерения интенсивности флуоресценции при воздействии среды с различной концентрацией тиомочевины (рис. 1).

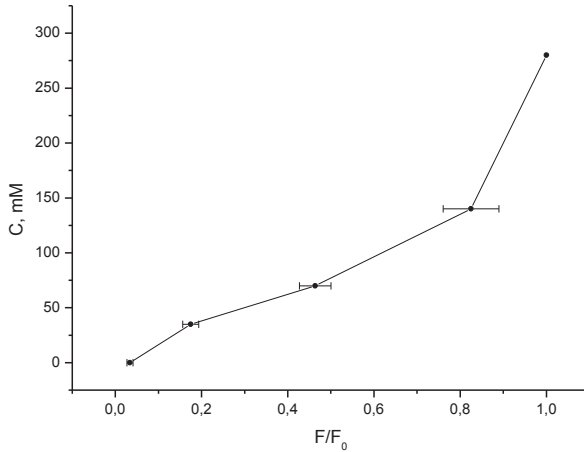


Рис. 1. Зависимость интенсивности флуоресценции красителя Calcein от концентрации тиомочевины в среде, где  $F/F_0$  — относительная величина флуоресценции,  $C$  — концентрация(мМ)

Для определения энергии активации исследуемых клеток, использовали уравнение Аррениуса:  $k(T) = Ae^{\frac{E_a}{RT}}$ , где  $k(T) = \frac{\Delta C}{\Delta t}$  — константа скорости химической реакции, из которого следует:

$$E_a = \frac{RT_1T_2}{(T_2 - T_1)} \ln \frac{k_2}{k_1}.$$

Поскольку в каждый момент времени клетка находится в состоянии близком к осмотическому равновесию, величина коэффициента линейной регрессии начального участка профиля флуоресценции, пропорциональна

потоку тиомочевины в клетку:  $K_{вт} = \frac{\left(\frac{F}{F_0}\right)}{t}$ .

Анализ экспериментальных профилей флуоресценции позволяет заключить, что такое приближение достаточно корректно (рис. 2).

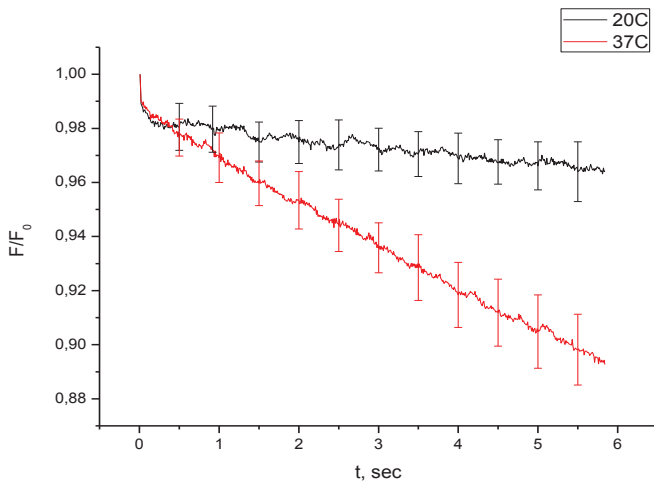


Рис. 2. Относительная флуоресценция клеток линии Met5A при температурах 20 °С и 37 °С соответственно

Статистическую погрешность оценивали с применением t-критерия.

### Результаты

Впервые создан флуоресцентный метод исследования транспорта тиомочевины в индивидуальных живых клетках. С использованием созданного метода определили энергию активации транспорта тиомочевины в клетках линий Met5A ( $E_a = 11 \pm 0.06$  kcal/mol).

### Заключение

В результате исследования можно сделать заключение о возможности применения созданного метода для исследования молекулярного механизма транспорта тиомочевины в индивидуальных живых клетках. Высказывается предположение о том, что новые возможности измерения транспорта тиомочевины могут способствовать прогрессу в разработке методов повышения устойчивости клеток и тканей к осмотическим шокам при патологиях, связанных с нарушениями осмотического равновесия.

**БИОФИЗИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ ПОВЕДЕНИЯ ПОПУЛЯЦИИ ТРОМБОЦИТОВ В ПРОЦЕССЕ АКТИВАЦИИ\***

## BIOPHYSICAL DESCRIPTION OF THE PLATELET POPULATION BEHAVIOR DURING ACTIVATION

А. Л. Литвиненко<sup>1,2</sup>, В. М. Некрасов<sup>2</sup><sup>1</sup>*Новосибирский национальный исследовательский государственный университет*<sup>2</sup>*Институт кинетики и горения СО РАН им. Воеводского*A. L. Litvinenko<sup>1,2</sup>, V. M. Nekrasov<sup>2</sup><sup>1</sup>*Novosibirsk State University*<sup>2</sup>*Voevodsky Institute of Chemical Kinetics and Combustion*

E-mail: a.litvinenko@g.nsu.ru

**Аннотация**

Тромбоциты крови играют огромную роль в поддержании гемостаза. В работе представлена биофизическая модель поведения популяции тромбоцитов после активации АДФ. Параметры данной модели могут быть диагностически значимы для оценки риска развития тромбозов.

**Abstract**

Blood platelets play a huge role in maintaining hemostasis. The report presents a biophysical model of platelet population behavior after ADP activation. The parameters of this model can be diagnostically significant for assessing the risk of thrombosis.

Тромбоциты крови человека вторые по многочисленности клетки крови, после эритроцитов. Данные клетки выполняют ключевую роль в поддержании гемостаза. Без их нормальной работы невозможен нормальный ответ организма на повреждения целостности сосудов, причём нарушения возможны не только в тромбоцитарном гемостазе, но и в коагуляционном. К сожалению, на сегодняшний день не существует распространённой технологии оценки состояния именно тромбоцитов, а не системы гемостаза

в целом. В тоже время активация тромбоцитов описана с точки зрения биохимии процесса для одиночных клеток и не несёт в себе диагностической значимости, исключительно научную.

Цель данной работы является описание поведения популяции тромбоцитов под воздействием аденозиндифосфата (АДФ).

Для достижения поставленной цели в первую очередь необходимо определиться с методом регистрации активированных тромбоцитов. На первом этапе активации происходит изменение формы, далее появление специфических рецепторов на поверхности и выпуск гранул. Также на любой стадии активации форму тромбоцитов, не учитывая псевдоподии, можно описывать сплюснутым сфероидом. В данной работе в качестве анализатора активированного состояния тромбоцитов использовался сканирующий проточный цитометр. Данный прибор позволяет зарегистрировать сигнал светорассеяния, из которого далее можно получить информацию об объёме и индексе сплюснутости сфероида наиболее похожего на данные тромбоцит. Данная операция выполняется для каждого тромбоцита.

На следующем этапе была построена теоритическая модель поведения популяции тромбоцитов. Данная модель включает в себя информацию о начальном состоянии тромбоцитов (распределение по форме в момент нахождения в сосудах, минимальное изменение формы для начала активации), силе ответа на АДФ, конечном состоянии тромбоцитов, а также о качестве забора пробы. С помощью этой модели были описаны данные парных измерений (нативная проба + проба после воздействие АДФ) для 5-ти условно-здоровых доноров. Получены параметры модели поведения популяции тромбоцитов с ошибками, не превышающими 10 % от значения самого параметра.

В результате данной работы было исследование поведение популяции тромбоцитов под воздействием АДФ, построена математическая модель, описывающая данное поведение популяции и получены параметры данной модели для 5-ти условно-здоровых доноров. Определяемые параметры могут иметь диагностическую значимость для оценки риска развития тромботических осложнений различных заболеваний.

## ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ РЕЦЕПТОРНОГО СВЯЗЫВАНИЯ ШТАММОВ ВИРУСА ГРИППА С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА БИОСЛОЙНОЙ ИНТЕРФЕРОМЕТРИИ\*

### STUDY OF INFLUENZA VIRUS RECEPTOR BINDING BY BIO-LAYER INTERFEROMETRY

Г. С. Онхонова<sup>1,2</sup>, П. Ю. Торжкова<sup>1</sup>, С. В. Святченко<sup>1</sup>,  
В. Ю. Марченко<sup>1</sup>, А. Б. Рыжиков<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия  
<sup>2</sup>Новосибирский государственный университет, Россия

G. S. Onkhonova<sup>1,2</sup>, P. Yu. Torzhkova<sup>1</sup>, S. V. Svyatchenko<sup>1</sup>,  
V. Yu. Marchenko<sup>1</sup>, A. B. Ryzhikov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>FBRI SRC VB «Vector», Rospotrebnadzor, Russia  
<sup>2</sup>Novosibirsk State University, Russia

#### Аннотация

Целью данного исследования являлась оценка рецепторной специфичности изолятов вирусов гриппа типа А, выделенных и охарактеризованных в 2018 году в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. В работе представлены результаты измерений констант диссоциации с помощью метода биослойной интерферометрии для двух актуальных штаммов — A/chicken/Kursk/284/2018 и A/chicken/Primorsky Krai/03/2018.

#### Abstract

The aim of this study was to evaluate the receptor specificity of influenza A viruses isolated and characterized in 2018 at SRC VB “Vector” Rospotrebnadzor. The results of dissociation constants measurements using bio-layer interferometry for the two actual strains — A/chicken/Kursk/284/2018 and A/chicken/Primorsky Krai/03/2018 are presented.

Мониторинг вируса гриппа является частью глобальной системы надзора и имеет важную научно-практическую значимость с точки зрения преду-

---

© Г. С. Онхонова, П. Ю. Торжкова, С. В. Святченко, В. Ю. Марченко, А. Б. Рыжиков, 2019

\* Работа выполнена в рамках государственного задания № 13/19 «Разработка генетических и фенотипических маркеров для количественной оценки пандемического потенциала зоонозных вирусов гриппа».

преждения и контроля ежегодных эпидемий, а также повышения готовности к пандемиям. Вирусологические и серологические методы исследования позволяют подтверждать клинические диагнозы, дифференцировать грипп от ОРВИ другой этиологии, изучать эволюцию штаммов, а также отслеживать уровень коллективного иммунитета. Оценка рецепторной специфичности на сегодняшний день не входит в перечень обязательных исследований, хотя ее практическая значимость очень высока. Одним из определяющих этапов в процессе жизненного цикла вируса гриппа является связывание вирусного белка гемагглютинина с рецепторами на поверхности клеток-мишеней. Такими рецепторами являются гликолипиды или гликопротеины, которые содержат терминальные сиалированные фрагменты (в основном N-ацетилнейраминавая кислота (Neu5Ac)). Структурное различие данных фрагментов является ключевым фактором для определения специфичности связывания различных субтипов вируса гриппа с клеточными рецепторами. Это взаимодействие определяет весь дальнейший ход событий: проникновение в клетку, репликацию, почкование и дальнейшую передачу вируса. Таким образом, возможность вирусного белка гемагглютинина связываться с рецепторами клеток организма является одним из факторов, определяющим видовую специфичность хозяина по отношению к вирусной инфекции.

Для оценки специфичности связывания вирусного белка гемагглютинина с рецепторами существуют различные стационарные и кинетические методы: иммуноферментный анализ, гликановый скрининг, поверхностный плазмонный резонанс, микроскопический термофорез и др. Также одним из методов является биослойная интерферометрия. Основой прибора является сенсор, на котором происходит взаимодействие лиганда и рецептора. Он представляет собой оптическое волокно, на одну из поверхностей которого иммобилизуются исследуемые вещества. Освещая сенсор с противоположного конца, можно наблюдать интерференционную картину, полученную путем наложения двух отраженных волн: одну от внутреннего референсного слоя, вторую — от слоя, иммобилизованного на поверхность сенсора. Любое изменение числа молекул на сенсоре вызывает изменение длины волны, что и является основой регистрации сигнала. Так как только те молекулы, которые связались с сенсором, могут влиять на изменение интерференционной картины, все несвязавшиеся молекулы, либо же изменения показателя преломления среды, изменения скорости потока — ничто не может повлиять на результат измерения. Это обстоятельство позволяет работать с образцами в культуральной или аллантоисной жидкости и является несомненным преимуществом метода перед всеми остальными.

В данной работе с помощью метода биослойной интерферометрии на приборе OctetRED 96 (ForteBio) была исследована рецепторная специфичность двух штаммов вируса гриппа птиц A/chicken/Kursk/284/2018 (H5N8) и A/chicken/Primorsky Krai/03/2018 (H9N2). На рис. 1 представлена схема эксперимента.



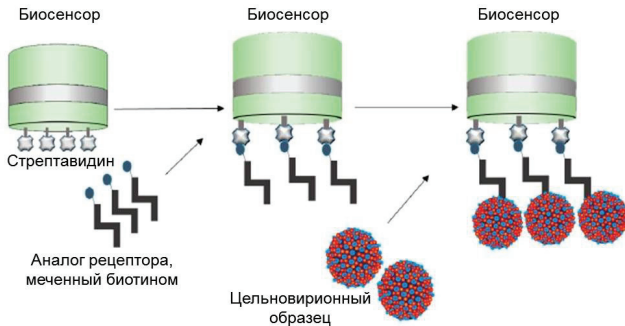


Рис. 1. Схема эксперимента, проводимого на приборе OctetRED 96 (ForteBio)

Измерения проводились для цельновирионных образцов в аллантоисной жидкости. В качестве аналога рецепторов был использован белок фетуин, меченный биотином. Для работы был выбран биосенсор, покрытый стрептавидином. Результаты измерений представлены на рис. 2.

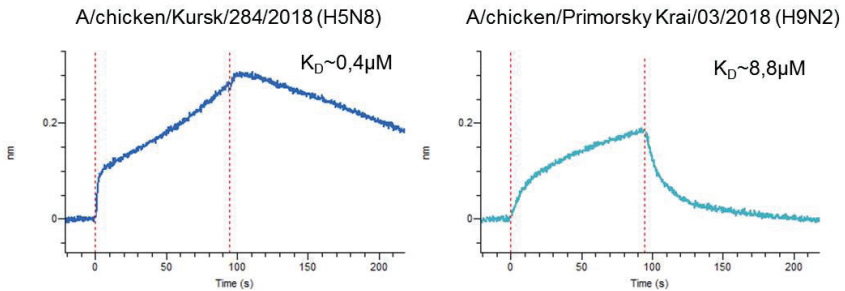


Рис. 2. Кинетические кривые комплексобразования и соответствующие константы диссоциации для штаммов вируса гриппа A/chicken/Kursk/284/2018 (H5N8) и A/chicken/Primorsky Krai/03/2018 (H9N2) с фетуином, полученные методом биослойной интерферометрии

Биослойная интерферометрия зарекомендовала себя как достаточно удобный и быстрый метод, не требующий выделения гемагглютинаина и, более того, физический принцип, заложенный в основу метода измерения, позволяет работать с неочищенным биоматериалом (вирус в аллантоисной и культуральной жидкости), что существенно упрощает и ускоряет процесс проведения анализа.

**ЗАПИСЬ И ВОССТАНОВЛЕНИЕ ГОЛОГРАММ  
В СИСТЕМАХ НАРУШЕННОГО ПОЛНОГО ВНУТРЕННЕГО  
ОТРАЖЕНИЯ ТЕРАГЕРЦОВОГО ДИАПАЗОНА \***

RECORDING AND RECONSTRUCTION OF HOLOGRAMS  
IN SYSTEMS OF IMPAIRED TOTAL INTERNAL REFLECTION  
IN THE TERAHERTZ RANGE

Н. Д. Осинцева, О. Э. Камешков, Ю. Ю. Чопорова

*Институт ядерной физики им. Г. И. Будкера СО РАН  
Новосибирский государственный университет*

N. D. Osintseva, O. E. Kameshkov, Yu. Yu. Choporova

*BINP SB RAS, NSU, Russia*

E-mail: natalyaosintseva@gmail.com

**Аннотация**

Исследования в терагерцовом диапазоне представляют большой интерес для биомедицинских приложений. Изображающие методики с использованием Новосибирского лазера на свободных электронах позволяют получать спектрально селективные изображения динамически меняющихся объектов. В данной работе были разработаны голографические методы для регистрации и восстановления изображений в спектрометре нарушенного полного внутреннего отражения.

**Abstract**

Terahertz research is of great interest for biomedical applications. Imaging techniques using the Novosibirsk free electron laser allow one to obtain spectrally selective images of dynamically changing objects. In this work, holographic methods were developed for recording and restoring images in a spectrometer of impaired total internal reflection.

Разработка изображающих методик на данный момент является одним из самых быстроразвивающихся направлений терагерцового (ТГц) диапазона частот. ТГц спектроскопия привлекает большой интерес в области биомедицинских приложений. Основная сложность в исследовании биологических субстанций ТГц излучением заключается в высоком поглощении последних.

---

© Н. Д. Осинцева, О. Э. Камешков, Ю. Ю. Чопорова, 2019

\* Исследования выполнены при поддержке гранта РФФИ 18-32-00407.

Для решения данной проблемы в работе была использована спектроскопия нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО). Суть метода заключается в измерении коэффициента отражения от образца, помещаемого на поверхность прозрачного вещества с высоким коэффициентом преломления. В таком случае коэффициент отражения остается макроскопическим, но содержит информацию о комплексном показателе преломления образца.

Использование НПВО-системы в качестве изображающей методики приводит к появлению практической проблемы, связанной с тем, что рабочая поверхность наклонена по отношению к оптической оси системы. Ранее на Новосибирском лазере на свободных электронах резкое ТГц изображение в НПВО спектрометре получали сканированием плоскости детектора вдоль оптической оси с последующим синтезом изображения. Этот способ не пригоден для получения изображений, например, динамически меняющихся объектов. В данной работе, были получены результаты по записи и восстановлению изображений рабочей поверхности в НПВО-системе голографическим методом, впервые реализованном в терагерцовом диапазоне.

## INTERACTION OF POLY (ASPARTIC ACID) AND ITS INTERPOLYMER COMPLEX WITH MAMMALIAN CELLS \*

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПОЛИАСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТЫ И ЕЕ ИНТЕРПОЛИМЕРНОГО КОМПЛЕКСА С КЛЕТКАМИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

А. М. Павлюк, М. И. Камалов, Д. В. Салахиева

*ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет,  
Казань, Россия*

A. M. Pavlyuk, M. I. Kamalov, D. V. Salakhieva

*Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia*

E-mail: anya-pavlyuk@yandex.ru

### Abstract

Poly (aspartic acid) (pAsp), its conjugate with fluorescent dye and cationic polyaspartamide derivative were synthesized. pAsp-polyaspartamide interpolymer complexes were prepared, and their colloidal properties in physiological solutions were characterized. Cellular uptake of free and complexed pAsp formulations and their effect on mammalian cell viability/proliferation were studied and compared.

### Аннотация

Синтезированы препараты полиаспарагиновой кислоты (ПАСП), ее конъюгата с флуоресцентной меткой и катионного полиаспартамидного производного. Получены интерполимерные комплексы ПАСП-полиаспартамид и охарактеризованы их коллоидные свойства в физиологических растворах. Проведено сравнительное исследование формуляций свободной ПАСП и ее комплекса с полиаспартамидом на предмет внутриклеточного проникновения и эффекта на жизнеспособность/пролиферацию клеток млекопитающих.

Synthetic polyamino acids are versatile polypeptide systems, which can be used to develop cell modulators, matrices and drug carriers. Poly (aspartic acid) (pAsp) and its derivatives are of particular interest owing to their biocompatible properties and effective methods for their preparation. In this work, pAsp was

---

© А. М. Павлюк, М. И. Камалов, Д. В. Салахиева, 2019

\* This work was funded by RSF (project 19-74-00114) and Program of Competitive Growth of KFU.

synthesized by thermal polycondensation of aspartic acid, and pAsp fluorescent conjugate with Lucifer Yellow ethylenediamine and totally amidated pAsp cationic derivative with 2,2-dimethylpropane-1,3-diamine (polyaspartamide) were also obtained. Intermolecular interactions of pAsp with cationic polyaspartamide were analyzed by dynamic light scattering technique.

pAsp and cationic polyaspartamide formed well-defined nanosized colloids; zeta potential of the complexes was generally negative even in excess of cationic units per aspartate residues. The complexes were stable at concentrations below  $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$  in physiological solutions. According to laser scanning confocal microscopy, fluorescently labelled pAsp did not penetrate mammalian cells in culture medium irrespective of serum supplementation. Effective cellular uptake of pAsp-polyaspartamide complexes was detected under the same conditions; their intracellular localization was characterized. In addition, treatment of fibroblasts with pAsp-polyaspartamide complexes noticeably promoted cell viability/proliferation, suggesting potential bioactivity of the prepared polypeptide formulation.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ФОТОАКТИВИРУЕМЫХ ДОНОРОВ ОКСИДА АЗОТА ДЛЯ ЛОКАЛЬНОЙ ВАЗОДИЛАТАЦИИ \*

### THE STUDY OF FOTOACTIVATABLE NITRIC OXIDE DONORS FOR LOCAL VASODILATION

Э. Писарев, А. Москаленский

*Лаборатория оптики и динамики биологических систем ФФ НГУ*

E. Pisarev, A. Moskalenskiy

*Laboratory of optics and dynamics of biological systems FF NSU*

#### **Аннотация**

Самая глобальная причина смерти людей во всем мире — болезни сосудов и сердца. Оксид азота (NO) является одним из основных регуляторов сосудистого тонуса. При заболевании сахарным диабетом или других заболеваниях, связанных с сужением сосудов, выделение NO в организме нарушено. Если заставить локально выделяться NO, то многие болезни и осложнения, связанные с ними, не будут такими страшными, то есть человек сможет с ними эффективно бороться, что нельзя сказать о сегодняшнем дне, когда так много людей страдает от этих болезней. В нашей работе планируется создать вещества, которые выделяют NO под действием света, что позволит управлять процессом.

#### **Abstract**

The most global cause of death of people around the world — diseases of the blood vessels and heart. Nitric oxide (NO) is one of the main regulators of vascular tone. With the disease of diabetes or other diseases related to vasoconstriction, the secretion of NO in the body is disrupted. If you make locally will be marked NO, then many of the diseases and complications associated with them will not be so terrible, a man will be able to fight effectively, what can be said about today, when so many people suffer from these diseases. In our work it is planned to create substances that produce NO under the action of light that allows you to manage the process.

В качестве фотодоноров мы берем порфирины, которые выделяют NO под действием света. На самом деле энергия возбужденного электрона

---

© Э. Писарев, А. Москаленский, 2019

\* Исследования выполнены при поддержке грантом Российского Научного Фонда № 18-15-00049.

в порфирине может пойти и на другие процессы, кроме выделения NO. Эти процессы мы сейчас и исследуем. Один из самых важных из них — образование синглетного кислорода, которого мы хотим количественно оценить оптическими методами. Зачем синглетный кислород нам нужен? Потому что его квантовый выход самый большой (66 %), то есть он будет основным продуктом, полученным облучением порфирина. Кроме этого, синглетный кислород разрушает сам порфирин и окисляет все вещества, клетки вокруг, тем самым разрушая их. Это также даст нам информацию о новых веществах (порфирины), которую используем для получения NO. При попадании света на диметилнитрофенил порфирин, электроны в порфирине поглощают фотон и переходят в возбужденное состояние (на более высокий энергетический уровень). Далее может произойти следующее. Энергия возбужденного электрона может перейти в тепловую энергию, тогда ничего интересного для нас не произойдет; может пойти на флуоресценцию и на другие процессы, нас, которые тоже не касающиеся. Но электрон с вероятностью  $\Phi\Delta = 66\%$  (квантовый выход) отдает свою энергию кислороду, тем самым превращая его в синглетный кислород (то, что нам не нужно, но для изучения синглетного кислорода это нам нужно). Далее с вероятностью  $\rho$  синглетный кислород испускает фотон света (начинается люминесценция). Эту люми-

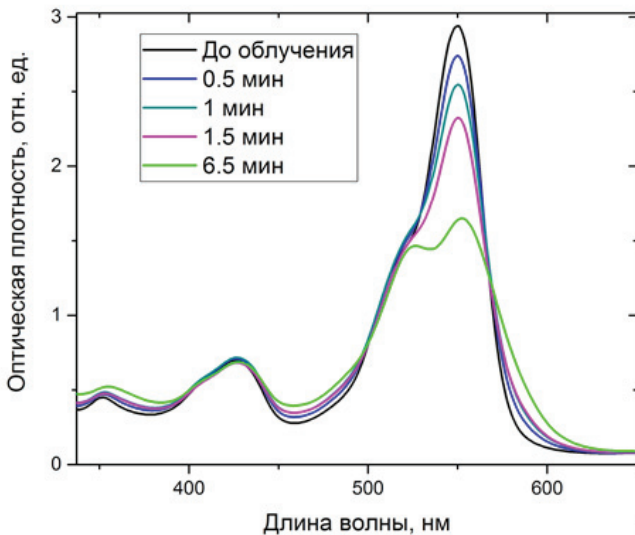


График зависимости оптической плотности диметилнитрофенил порфирина от длины волны при разном времени облучения этого вещества и при наличии ловушки DAO

несценцию можно оценить, а следовательно, можно оценить количество об-разованного сиглетного кислорода. Зная эти данные, мы можем попытаться минимизировать количество синглетного кислорода, то есть будем использовать различные способы, вещества, соединения, иные металлы, которые ликвидируют синглетный кислород в процессе облучения порфирина. А да-лее, когда основная причина, препятствующая образованию оксида азота, будет решена, мы сможем получать оксид азота NO.

Результаты: Мы взяли диметилнитрофенил порфирин и добавили ловушки DAR-2, чтобы она могла «забрать» себе NO и начать флуоресценцию, по которой мы сможем уже сказать сколько и выделяется ли вообще NO.

Видно по графику пик поглощения ловушки ( $\approx 560\text{nm}$ ) падает после об-лучения кюветы светом, это показывает, что количество ловушки умень-шается, то есть выделяется синглетный кислород, который окисляет её, в следствии чего она разрушается. Поэтому мы начали исследовать именно синглетный кислород.



## УФ-А ИНДУЦИРОВАННЫЕ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ ХРУСТАЛИКА ГЛАЗА \*

### UV-A INDUCED PROTEINS OF PROTEINS EYE CRYSTAL

С. А. Сеницын<sup>1,2</sup>, П. С. Шерин<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *ФГБУН Институт «Международный томографический центр»  
Сибирского отделения Российской академии наук*

<sup>2</sup> *ФГАОУ ВО Новосибирский национальный исследовательский  
государственный университет*

S. A. Sinitsyn<sup>1,2</sup>, P. S. Sherin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *International Tomography Center, Novosibirsk, Russia*

<sup>2</sup> *Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*

E-mail: sergey.sinitsin@tomo.nsc.ru

#### Аннотация

Отличительной особенностью хрусталика глаза является отсутствие обновления белков на протяжении всей жизни человека. С возрастом белки накапливают многочисленные химические модификации, что может приводить к образованию свето-рассеивающих областей — катаракты. Недавно было показано, что излучение УФ-А диапазона (315–400 нм) вносит вклад в общую модификацию белков посредством радикальных реакций между хромофорами УФ-А света и аминокислотными остатками белков (триптофан и тирозин). В настоящее время динамика, продукты и молекулярные механизмы этих реакций остаются малоизученными. В данной работе исследовалась устойчивость различных семейств белков хрусталика глаза к УФ-А индуцированным модификациям посредством фотоллиза белков и последующего анализа модификаций.

#### Abstract

A key feature of the eye lens is the absence of protein turnover during individual lifetime. With age, proteins accumulate many chemical modifications, which can lead to the formation of light-scattering domains within lens — cataracts. It has recently been shown

---

© С. А. Сеницын, П. С. Шерин, 2019

\* Работа выполнена при поддержке Фонда РФ, проект № 18-73-10014 «Механизмы фотоиндуцированных радикальных реакций в хрусталике глаза и их роль в нормальном старении и при катарактогенезе».

that UV-A radiation (315–400 nm) contributes to the overall modification of proteins via radical reactions between the UV-A light chromophores and the amino acid residues of the proteins (mainly, tryptophan and tyrosine). At present, the dynamics, products, and molecular mechanisms of these reactions remain poorly understood. In this work, we studied the susceptibility of various families of lens proteins to UV-A damage followed by analysis of the protein modifications.

Зрение является важнейшим источником информации для человека. Одной из наиболее распространенных причин потери зрения в зрелом возрасте является помутнение хрусталика глаза — катаракта. В настоящее время единственным способом лечения катаракты является хирургическое вмешательство путем замены исходного хрусталика на искусственный, однако этот метод не является совершенным. Более перспективным выглядит путь терапевтического лечения, направленный на предотвращение развития катаракты. Для этого необходимо понимание молекулярных механизмов возникновения катаракты, которые, в настоящее время, остаются во многом неясными.

Недавние исследования показали, что важным источником модификаций белков может являться излучение УФ-А диапазона (315 - 400 нм), которое напрямую не поглощается белками, но поглощается природными хромофорами хрусталика. На животных моделях было показано, что продолжительное воздействие УФ-А излучения приводит к развитию катаракты, однако точные механизмы установлены не были. Было предположено, что фотоиндуцированные радикальные реакции между хромофорами живых тканей и аминокислотными остатками белков, таких как триптофан и тирозин, могут приводить к изменениям белков и впоследствии к появлению светорассеивающих областей. В настоящее время детальные механизмы этих процессов остаются малоизученными.

В данной работе исследовалась устойчивость различных семейств белков хрусталика глаза (кристаллины) к УФ-А индуцированным модификациям посредством фотолиза белков и последующего анализа модификаций методами гель-электрофореза и масс-спектрометрии. По способности образовывать динамические мультимерные комплексы в водных растворах выделяют следующие семейства кристаллинов:  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -кристаллины — мультимеры, димеры и мономеры соответственно. В серии экспериментов было показано, что для каждого семейства различные белки обладают различной устойчивостью к фотосенсибилизированным модификациям. В рамках семейств  $\beta$  и  $\gamma$  кристаллинов устойчивость к фотоиндуцированным модификациям уменьшается с следующих рядов: для  $\beta$ -кристаллинов:  $\beta V2 \rightarrow \beta V3 \rightarrow \beta V1 \rightarrow \beta A1 \rightarrow \beta A2$ ; для  $\gamma$  кристаллинов:

$\gamma S \rightarrow \gamma A \rightarrow \gamma B \rightarrow \gamma D \rightarrow \gamma F \rightarrow \gamma C$ , для  $\alpha$ -кристаллинов разница не существенна. Для семейства  $\gamma$ кристаллинов обнаружена прямая корреляция между распадом белка и наличием и доступностью аминокислотных остатков триптофана, тирозина и цистеина способных вступать в реакцию с реакционно-активным триплетным состоянием KNA. Также показано, что устойчивость белка к фотоиндуцированным модификациям может быть связана с увеличением длины пептида, связывающего два основных домена  $\gamma$ -кристаллина.

На основе полученных данных было показано, что основным каналом гибели радикалов KNA и белков является обратный перенос электрона с образованием исходных реагентов. Квантовый выход деградации мономерных форм не превышает 15 % для  $\alpha$ кристаллинов и 7 % для  $\beta$ - и  $\gamma$ -кристаллинов. С увеличением мультимерности комплексов белков в ряду  $\gamma \rightarrow \beta L \rightarrow \beta H$  (мономерные-димеры-октомеры) уменьшается образование олигомерных форм в три раза при небольшом увеличении распада мономерных форм белков.

Полученные результаты показывают, что увеличение мультимерности белковых комплексов при физиологических условиях направляет радикальные реакции по пути модификаций мономерных форм, нежели образования ковалентных кросс-сшивок между белками. Высокие концентрации белков в хрусталике могут рассматриваться в качестве защитного механизма, препятствующего широкой агрегации белков внутри ткани. Квантовый выход радикальных реакций остаётся невысоким, что вместе с малым содержанием фотосенсибилизаторов в здоровой ткани хрусталика указывает на невысокую эффективность этих нежелательных реакций. Это может говорить о том, что в хрусталике сложились условия, которые эффективно поддерживают белки в их функциональном состоянии. Тем не менее, подобные реакции способны вносить модификации в структуру белка и тем самым предрасполагать белки к дальнейшим модификациям и агрегации.

**МУЛЬТИЭЛЕКТРОДНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ИЗОЛИРОВАННОГО СЕРДЦА В УСЛОВИЯХ МЕХАНИЧЕСКОГО РАСТЯЖЕНИЯ И БЛОКИРОВАНИЯ МЕХАНОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ИОННЫХ КАНАЛОВ\***

MULTI-ELECTRODE RESEARCH OF THE ELECTRICAL ACTIVITY OF THE ISOLATED HEART UNDER MECHANICAL STRETCH AND MECHANOSENSITIVE ION CHANNELS BLOCKING

Е. Е. Харьковская<sup>1</sup>, Г. В. Осипов<sup>1</sup>, И. В. Мухина<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского  
<sup>2</sup>Приволжский исследовательский медицинский университет

E. E. Kharkovskaya<sup>1</sup>, G. V. Osipov<sup>1</sup>, I. V. Mukhina<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod  
<sup>2</sup>Privolzhsky Research Medical University, Russia

**Аннотация**

В данной работе описываются возможности метода мультиэлектродной регистрации гибкими матрицами электрической активности изолированного сердца крысы для изучения интракардиальных регуляторных механизмов в зависимости от механического и химического воздействия.

**Abstract**

The work presents the capabilities of the method of multi-electrode registration by flexible arrays of electrical activity of an isolated rat heart for studying intracardiac regulatory mechanisms depending on mechanical and chemical effects.

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются основной причиной смерти во всем мире по данным Всемирной организации здравоохранения [1]. Механизмы развития многих ССЗ остаются невыясненными и требуют глубокого изучения для возможности их лечения и предотвращения. В организме осуществляется экстракардиальная, а именно нервная и гуморальная, регуляция работы сердца. Также существуют интракардиальные механизмы

---

© Е. Е. Харьковская, Г. В. Осипов, И. В. Мухина, 2019

\* Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ (проект № 17-02-00467).

регуляции сердечной активности, которые можно исследовать на изолированном органе. Так, механическое воздействие, например, растяжение тканей сердца, может влиять на ритм и силу его сокращений. В сердце широко распространены ионные механочувствительные каналы (МК) [2], которые отвечают за активацию ионных токов через клеточную мембрану в ответ на механический стимул, изменяя при этом электрическую активность сердца. Каналы *Transient receptor potential canonical 1* (TRPC<sub>1</sub>) являются механочувствительными [3] и обнаружены на мембранах всех типов клеток сердца [4]. Целью проведенной работы являлось установить роль каналов TRPC<sub>1</sub> в формировании электрической активности изолированного сердца крысы при растяжении правого предсердия (ПП).

За счет такого свойства, как автоматизм, сердце может сокращаться и сохранять свои функции вне организма на протяжении некоторого времени при поддержании ряда необходимых физических и биохимических условий. Данное исследование было проведено на изолированном сердце крысы по методу Лангендорфа. Аутбредных крыс сток *Wistar* массой 200–250 г наркотизировали (Золетил 100, *Virbac Sante Animale*, 35 мг/кг, в/б), затем изолированные сердца подвергались ретроградной перфузии раствором Кребса — Хензелейта (37 °С, 80 мм водного столба, рН 7,3–7,4), насыщенным карбогеном (95% O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub>). В качестве блокатора каналов TRPC<sub>1</sub> использовался *2-aminoethoxydiphenyl borate* (2-апб, *Sigma*, США) в растворе (С=10 мкМоль) [5]. Механическое растяжение ПП осуществлялось с помощью латексного баллончика.

Регистрация электрической активности сердца осуществлялась с помощью гибких мультиэлектродных матриц MEAFlex72, (*Multichannel systems*, Германия) с поверхности левого желудочка. Количество и конфигурация электродов в матрице позволяют оценить не только такие показатели как частота и вариабельность сердечных сокращений, но и электрическую проводимость миокарда.

Было показано, что при растяжении ПП изолированного сердца крысы с блокированием каналов TRPC<sub>1</sub> наблюдается повышение значений частоты и вариабельности сердечного ритма и неоднородности проводимости миокарда. При этом влияние блокатора МК усугубляет эффект растяжения ПП. Полученные данные позволяют рассматривать каналы TRPC<sub>1</sub> в качестве возможной мишени для лекарственных средств, направленных на контроль состояния сердца, вызванного непродолжительным механическим растяжением ПП.

Таким образом, в данной работе было продемонстрировано, что описанный экспериментальный подход, сочетающий метод перфузии изолированного сердца с одновременным мультиэлектродным исследованием его элек-

трической активности позволяет изучать влияния химических, физических, физиологических и др. факторов на работу и состояние органа.

### **Литература**

1. [https://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/ru/](https://www.who.int/cardiovascular_diseases/ru/)
2. Teng J., Loukin S., Kung C. Mechanosensitive Ion Channels in Cardiovascular Physiology. *Exp Clin Cardiol.* 2014. 20(10): 6550–6560.
3. Maroto R., Raso A., Wood T. G., Kurosky A., Martinac B., Hamill O. P. Trpc1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells. *Nature Cell Biology.* 2005. 7(2): 79–185.
4. Huang H., Wang W., Liu P., Jiang Y., Zhao Y., Wei H., Niu W. TRPC1 expression and distribution in rat hearts. *Eur J Histochem.* 2009. 53(4): e26.
5. Kojima A., Kitagawa H., Omatsu-Kanbe M., Matsuura H., Nosaka S. Ca<sup>2+</sup> paradox injury mediated through TRPC channels in mouse ventricular myocytes. *Br J Pharmacol.* 2010. 161(8): 1734–50.

## ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ГАЗОТРАНСПОРТНОЙ ФУНКЦИИ ЭРИТРОЦИТОВ В ДЕСТАБИЛИЗАЦИИ АТЕРОМ МЕТОДОМ СКАНИРУЮЩЕЙ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ \*

### ROLE OF ERYTHROCYTE GAS TRANSPORT FUNCTION IN THE DESTABILIZATION OF ATHEROSCLEROTIC PLAQUE BY SCANNING FLOW CYTOMETER

Е. С. Ястребова<sup>1,2,3</sup>, А. В. Чернышев<sup>1,2</sup>, Д. И. Строкотов<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> *Институт химической кинетики и горения им. В. В. Воеводского СО РАН*

<sup>2</sup> *Новосибирский национальный*

*исследовательский государственный университет*

<sup>3</sup> *Национальный медицинский исследовательский центр  
им. Е. Н. Мешалкина*

<sup>4</sup> *Новосибирский государственный медицинский университет*

E. S. Yastrebova<sup>1,2,3</sup>, A. V. Chernyshev<sup>1,2</sup>, D. I. Strokotov<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> *Voevodsky Institute of Chemical Kinetics and Combustion SB RAS*

<sup>2</sup> *Novosibirsk National Research State University*

<sup>3</sup> *National Medical Research Center. E. N. Meshalkina*

<sup>4</sup> *Novosibirsk State Medical University*

E-mail:kat30cer@gmail.com

#### Аннотация

Основным проявлением атеросклероза является формирование атеросклеротических бляшек (АБ), нестабильность которых во многом определяет риск развития фатальных сердечно-сосудистых событий. Данная работа направлена на исследование роли эритроцитов в патогенезе атеросклероза. И на проверку гипотезы, согласно которой нарушение газотранспортной функции эритроцитов, вследствие изменения морфологических и функциональных характеристик клеток, является одним из факторов риска дестабилизации атером и развития атеротромботических осложнений.

#### Abstract

The main atherosclerotic manifestations is the formation of atherosclerotic plaques (AP), the instability of which largely determines the risk of fatal cardiovascular events. This project

© Е. С. Ястребова, А. В. Чернышев, Д. И. Строкотов, 2019

\* Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФ в рамках научного проекта № 18-75-10030.

is aimed to verify the role of erythrocytes in the pathogenesis of atherosclerosis. We examined the hypothesis that the violation of the erythrocyte oxygen transport function, due to a change in the morphological and functional characteristics of cells, is one of the risk factors for destabilization of atherosclerosis and the development of atherothrombotic complications.

Дифференцирование стабильных и нестабильных АБ до сих остается наиболее сложной диагностической задачей, в решении которой особое место отводится выявлению новых факторов дестабилизации атером, которые имели бы наибольшую предсказательную ценность.

Согласно имеющимся литературным данным, среди множества процессов, способствующих дестабилизации АБ, важную роль играет возникновение гипоксических состояний в различных участках сосудов, которые так или иначе связаны с функцией эритроцитов. Можно выстроить предполагаемую цепь биохимических процессов, происходящих в организме, начиная от нарушений функционирования эритроцитов до дестабилизации АБ. Множество факторов, включая повышение содержания гликированного гемоглобина, затруднение диффузии кислорода через заблокированную холестерин мембрану эритроцитов, изменение формы клеток и снижение их деформируемости ослабляют способность эритроцитов к транспорту кислорода. Это приводит к риску возникновения гипоксического состояния в местах с повышенной кислородной потребностью, к которым относятся атеросклеротические бляшки. Возникающая в данных участках локальная гипоксия вызывает ряд негативных факторов, запускающих процесс воспаления и провоцирующих разрастание и дестабилизацию АБ, с последующей неоваскуляризацией.

При этом, несмотря на множество разрозненных литературных данных, напрямую или косвенно указывающих на важную роль, которую могут играть эритроциты в патогенезе атеросклероза, вопросы об их вкладе в развитие патологии и о месте, которое они занимают в цепи событий, приводящих к кардиоваскулярным и атеротромботическим осложнениям, до сих пор остаются открытыми.

Для решения поставленных задач проведено комплексное исследование морфологии и функциональных свойств эритроцитов в норме и при атеросклерозе с использованием самых современных методов оптического анализа дисперсных сред, а именно сканирующей проточной цитометрии. Данная технология позволяет измерять зависимость интенсивности рассеянного излучения от угла (индикатрису светорассеяния) для одиночных частиц в потоке с большой скоростью (до 1000 частиц в секунду). В совокупности с передовыми методами решения прямой и обратной задачи светорассеяния и математического моделирования внутриклеточных процессов (модель лизиса эритроцитов в изотоническом растворе), данный метод позволяет получить детальную информацию о форме клеток (диаметр, максимальная



и минимальная толщина, объем, площадь поверхности, индекс сферичности, спонтанная кривизна), структурно-функциональных свойствах мембраны (предельная растяжимость, скорость анионного обмена) и содержании гемоглобина в одиночных эритроцитах.

Всего было исследовано 15 пациентов с диагностированным атеросклерозом и 20 условно здоровых доноров. Для исследования эритроцитов брались образцы венозной крови в антикоагулянте ЕДТА. У всех доноров и пациентов были определены стандартные диагностические показатели, включающие оценку липидных нарушений (ХС, триглицериды,  $\alpha$ -ХС,  $\beta$ -ХС) и уровень гликированного гемоглобина. У пациентов с доказанным атеросклерозом была проведена оценка стабильности атером по результатам патоморфологического исследования бляшек, удаленных при каротидной эндартерэктомии. После чего было выделено три группы здоровья: пациенты со стабильными и нестабильными бляшками и условно здоровые доноры.

Сопоставление результатов комплексного анализа морфофункциональных свойств эритроцитов и стандартных биохимических показателей с результатами типирования атером позволило установить характер влияния отклонений газотранспортной функции на патогенез атеросклероза у различных групп пациентов.

Было выявлено различие в отношении числа эффективно работающих анионных обменников к их активированному числу — у пациентов с нестабильной бляшкой наблюдалась снижение работы анионных обменников в нативном состоянии до 80 %. Эффективность работы данных белков (трансмембранный белок полосы 3 эритроцитов) лимитирует процесс газотранспортного обмена в организме — отвечая за выведение углекислого газа из эритроцитов в форме аниона  $\text{HCO}_3^-$ . При помощи различных реагентов возможно регулировать скорость работы белка. В данном случае активированное число эффективно работающих анионных обменников было получено при добавлении нифедипина в образец за час перед измерением. Обнаруженные результаты, свидетельствуют о том, что у пациентов с выявленной нестабильной атеромой анионный обмен значительно занижен по сравнению с его потенциальной пропускной способностью.

В планах этой работы стоит задача по увеличению количества выборки доноров и пациентов для повышения статистической значимости обнаруженных отклонений. По результатам сопоставления совокупности полученных данных будут выявлены те характеристики эритроцитов, отклонения которых, во-первых, несут наибольший вклад в нарушение газотранспортной функции эритроцитов при атеросклерозе, а, во-вторых, имеют наибольший прогностический потенциал в оценке риска развития атеросклероза по результатам сопоставления со стандартными диагностическими показателями.

## РАЗДЕЛ 3

**ВИРУСОЛОГИЯ****ВЛИЯНИЕ ПИРИДОКСИНА НА ТЕЧЕНИЕ ВИРУС-  
ИНДУЦИРОВАННОГО ОСТРОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ЛЁГКИХ,  
ВЫЗВАННОГО ВИРУСАМИ ГРИППА А(Н1N1)PDM09 У МЫШЕЙ**

THE EFFECT PYRIDOXINE ON SWINE-ORIGIN  
INFLUENZA-VIRUS-INDUCED ACUTE LUNG INJURY IN MICE

А. Г. Александров

*ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России*

A. G. Aleksandrov

*FSBI “Research Institute of Influenza” of the Ministry of Health of Russia*

E-mail: forphchemistry@gmail.com

**Аннотация**

В работе была оценена возможность коррекции течения вирус-индуцированного ОПЛ/ОРДС, вызванного вирусом гриппа А(Н1N1)pdm09 путём применения пиридоксина гидрохлорида. Было показано влияние фармакологического зонда на накопление КПП и динамику изменения показателей, связанных с выраженностью провоспалительного ответа.

**Abstract**

In this study the effect of pyridoxine hydrochloride on virus-induced acute lung injury by influenza A(H1N1)pdm09 was evaluated. The effect of this compound on accumulation of advanced glycation end products and dynamic of proinflammatory parameters was shown.

Известно, что вирус гриппа является одним из распространённых респираторных патогенов способного вызвать тяжёлую острую респираторную вирусную инфекцию (ОРВИ). Одним из осложнений ОРВИ является острое повреждение лёгких (ОПЛ) и его тяжёлая форма острый респираторный дистресс синдром (ОРДС). По данным всемирной организации здравоохранения в период пандемии гриппа H1N1 в 2009 от 10 до 30 % госпитализированным больным потребовался перевод в палату интенсивной терапии из-за развития таких осложнений, как прогрессирующее заболевание нижних дыхательных путей, дыхательная недостаточность и ОРДС с тяжёлой гипоксией [1]. Однако, несмотря на предпринимаемую терапию, вероятность летального исхода достигала 40 % [2]. Одним из процессов характеризующих течение ОПЛ/ОРДС является развитие воспаления в лёгких. Помимо известной роли Толл-подобных рецепторов в развитии провоспалительного ответа, немалое значение имеют альтернативные пути развития воспаления, включающих в себя сигнальные пути с участием конечных продуктов гликирования (КПГ) [3]. Особую значимость КПГ в данной патологии придаёт тот факт, что в условиях гипоксии, вследствие поражения лёгких, наблюдается индукция неферментативного пути утилизации углеводов, приводящих к накоплению гликированных продуктов [4]. Целью данной работы являлось изучение возможности коррекции течения вирус-индуцированного ОПЛ/ОРДС путём применения блокаторов образования КПГ.

Эксперименты были выполнены на 95 аутбредных мышках самках. Животные были разделены на три группы: группа № 1 — интактные мыши, N=15, группа № 2 — мыши, инфицированные штаммом гриппа A/California/04/2009 (H1N1), получавшие плацебо, N=40; группа № 3 — мыши, инфицированные штаммом гриппа A/California/04/2009 (H1N1), получавшие пиридоксина гидрохлорид, N=40.

В качестве блокатора образования КПГ применяли пиридоксина гидрохлорид [5]. Вещество вводили в дозе 25 мг/кг вводили ежедневно подкожно в течение 7 дней после инфицирования [6]. Моделирование вирус-индуцированного ОПЛ осуществляли путём интраназального введения вирусосодержащего материала в дозе равной  $1LD_{50}$ . Животные в группах №№ 2 и 3 были разделены на две равные подгруппы. В первой подгруппе оценивали летальность в течение первый 14-ти суток. У животных во второй подгруппе на 4-е, 7-е и 14-е сутки оценивали уровень флуоресценции супернатанта гомогенатов лёгких (Длины волн:  $\lambda_{ex} = 360$  нм,  $\lambda_{em} = 440$  нм) [7] и гематологическую картину по следующим параметрам: общий уровень лейкоцитов, лейкоцитарная формула, индекс гранулоцитов/лимфоцитов, уровень тромбоцитов (N=5) Забор биоматериала у интактных животных проводили по окончании эксперимента. В течение всего периода наблюдения гибель

животных, получавших пиридоксина гидрохлорид (группа № 3), наступала в период с 5-ых суток по 9-е сутки с момента инфицирования, и совпадала с данными полученными в группе позитивного контроля (группа № 2). Выживаемость животных в эксперименте составила 50 % и 65 % для групп №№ 2 и 3 соответственно. Межгрупповое сравнение не выявило значимых различий между группами инфицированных животных, однако показатель выживаемости у животных, получавших пиридоксина гидрохлорид, был несколько выше на протяжении всего эксперимента.

Гематологическое исследование показало отсутствие значимого роста уровня тромбоцитов на 4-е сутки у животных, получавших пиридоксина гидрохлорид, в отличие от группы позитивного контроля в сравнении с интактными животными. На 7-е сутки после инфицирования значимых различий между группами инфицированных животных не было выявлено, хотя негативная динамика изменения гематологических показателей у животных, получавших блокатор образования КПП, была не столь выражена. К окончанию эксперимента при общей позитивной динамике изменения гематологических показателей, в группе № 2 уровень тромбоцитов, уровень лимфоцитов, сегментоядерных нейтрофилов и индекса гранулоциты/лимфоциты значимо отличались от интактных животных. Данные гематологического исследования представлены в табл. 1.

Таблица 1

**Данные гематологического исследования цельной крови подопытных животных в эксперименте (Mean±SE)**

Изучаемые показатели (Mean±SE)	Экспериментальные группы и сроки исследования						
	4 сутки		7 сутки		14 сутки		
	Группа № 2	Группа № 3	Группа № 2	Группа № 3	Группа № 1	Группа № 2	Группа № 3
Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> /л	6,32±0,78 *	6,20±0,66 *	4,24±0,39 *	4,72±0,25 *	8,33±0,37	6,69±0,57	7,22±0,43
Лимфоциты, %	65,50±1,32 *	60,75±1,31 *	54,25±1,31 *	59,25±2,21 *	76,50±2,40	67,00±1,78 *	69,25±2,29
Моноциты, %	2,00±0,41	3,50±1,04	4,00±1,08	3,25±0,63	2,25±0,25	2,00±0,71	2,50±0,29
Эозинофилы, %	0,50±0,29	1,50±0,29	1,00±0,00	1,00±0,41	1,00±0,41	0,50±0,29	1,25±0,48
Базофилы, %	1,25±0,48	1,75±0,48	2,25±0,75	2,00±0,41	1,25±0,25	1,00±0,41	1,75±0,25

Окончание табл. 1

Изучаемые показатели (Mean±SE)	Экспериментальные группы и сроки исследования						
	4 сутки		7 сутки		14 сутки		
	Группа № 2	Группа № 3	Группа № 2	Группа № 3	Группа № 1	Группа № 2	Группа № 3
П/я нейтрофилы, %	2,75±0,63	2,50±0,65	3,75±0,85	2,50±0,50	1,50±0,65	3,50±1,04	2,50±1,19
С/я нейтрофилы, %	28,00±0,82 *	30,00±1,08 *	34,75±1,11 *	32,00±0,91 *	17,50±1,66	26,00±0,71 *	22,75±2,90
Гранулоциты/Лимфоциты	0,47±0,03 *	0,51±0,02 *	0,72±0,02 *	0,59±0,04	0,26±0,04	0,44±0,03 *	0,37±0,04
Тромбоциты, 10 <sup>9</sup> /л	770,50±54,00 *	658,25±51,62	996,25±29,32 *	885,25±74,77 *	539,00±23,94	720,75±40,54 *	616,25±53,71

\* —  $p \leq 0,05$  по отношению к интактным животным

Оценка уровня флуоресценции показала значимое снижение уровня флуоресценции характерного для КПП у животных, получавших пиридоксина гидрохлорид, в течение всего эксперимента в сравнении с группой позитивного контроля.

Таблица 2

**Данные гематологического исследования цельной крови подопытных животных в эксперименте (Mean±SE, a.u.)**

Экспериментальные группы	Сроки исследования		
	4-е сутки	7-е сутки	14-е сутки
Группа № 1 (N=5)	-	-	12702,00±1585,89
Группа № 2 (N=5)	32377,00±1985,92 *	39098,80±2084,91 *	37477,40±2564,42*
Группа № 3 (N=5)	10384,40±1029,21#	32299,20±1779,76*#	22018,00±2529,99*#

\* —  $p < 0,05$  по отношению к интактным животным (группа № 1), # —  $p < 0,05$  по отношению к инфицированным животным, получавших плацебо (группа № 2)

Проведённое исследование показало возможность коррекции течения вирус-индуцированного ОПЛ/ОРДС с путём применения пиридоксина гидрохлорида, оказывая влияние на динамику показателей изменения, которых связано с выраженностью провоспалительного ответа. Полученные данные являются основанием для дальнейшего изучения эффективности коррекции течения ОРВИ путём применения соединений, влияющих на накопление КПП.

### Литература

1. Clinical management of human infection with pandemic (H1N1) 2009: revised guidance [Электронный ресурс] Режим доступа: [https://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/clinical\\_management\\_h1n1.pdf](https://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/clinical_management_h1n1.pdf) Заглавие с экрана (Дата обращения 23.09.2019)
2. Hendrickson C. M. and Matthay M. A. Viral Pathogens and Acute Lung Injury: Investigations Inspired by the SARS Epidemic and the 2009 H1N1 Influenza Pandemic // *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 2013, Vol. 34, Iss. 4, P. 475–486.
3. Davis K. E. et al. Advanced Glycation End Products, Inflammation, and Chronic Metabolic Diseases: Links in a Chain? // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2014, Vol. 56, Iss. 6, P 989–998.
4. Khan M. I. et al. Hypoxia driven glycation: Mechanisms and therapeutic opportunities // *Seminars in Cancer Biology*, 2018, Vol. 49, P. 75–82.
5. Morris M. S. et al. Vitamin B-6 intake is inversely related to, and the requirement is affected by, inflammation status // *Journal of Nutrition*, 2010, Vol. 140, Iss. 1, P. 103–110.
6. Kim H. H et al. The Postprandial Anti-Hyperglycemic Effect of Pyridoxine and Its Derivatives Using In Vitro and In Vivo Animal Models // *Nutrients*, 2018, Vol. 10, Iss 3, 285.
7. Yanagisawa, K. et al. Specific fluorescence assay for advanced glycation end products in blood and urine of diabetic patients // *Metabolism*, 1998, Vol. 47, Iss. 11, 1348–1353.

**МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКАЯ  
ИДЕНТИФИКАЦИЯ СТРУКТУРНЫХ БЕЛКОВ  
ПОТЕНЦИАЛЬНО-ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ БАКТЕРИОФАГОВ\***

MASS-SPECTROMETRIC IDENTIFICATION OF STRUCTURAL  
PROTEINS OF PROBABLY THERAPEUTIC BACTERIOPHAGES

И. К. Байков<sup>1</sup>, Е. А. Зеленцова<sup>2</sup>, В. В. Морозова<sup>1</sup>, Т. А. Ушакова<sup>1</sup>,  
О. В. Боковая<sup>1</sup>, М. В. Фофанов<sup>1</sup>, А. В. Чечушков<sup>1</sup>, Н. В. Тикунова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Институт химической биологии и фундаментальной медицины  
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия*

<sup>2</sup>*Институт «Международный томографический центр»  
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия*

I. K. Baykov<sup>1</sup>, E. A. Zelentsova<sup>2</sup>, V. V. Morozova<sup>1</sup>, T. A. Ushakova<sup>1</sup>,  
O. V. Bokovaya<sup>1</sup>, M. V. Fofanov<sup>1</sup>, A. V. Chechushkov<sup>1</sup>, N. V. Tikunova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS,  
Novosibirsk, Russia*

<sup>2</sup>*International Tomography Center SB RAS, Novosibirsk, Russia*

**Аннотация**

В данном исследовании методом масс-спектрометрии были проанализированы несколько потенциально-терапевтических бактериофагов, поражающих некоторые штаммы *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* и *Pseudomonas aeruginosa*. В результате было обнаружено несколько структурных белков с неизвестной функцией. Ряд рамок считывания, не имеющих гомологии с известными последовательностями, был также отнесен к генам структурных белков с неустановленной функцией. Анализ последовательности аминокислотных остатков некоторых структурных белков позволил установить интересные структурные особенности этих белков.

**Abstract**

In this study, several potential therapeutic bacteriophages affecting certain *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* strains were analyzed by

---

© И. К. Байков, Е. А. Зеленцова, В. В. Морозова, Т. А. Ушакова, О. В. Боковая, М. В. Фофанов, А. В. Чечушков, Н. В. Тикунова, 2019

\* Данная работа была выполнена при поддержке Фонда РФФИ, проект № 18-34-00636. Образцы бактериофагов были наработаны из коллекции, финансируемой по проекту ГЗ № 0309-2016-0002.

mass spectrometry. As a result, several structural proteins with unknown function were discovered. A number of open reading frames that do not have homology with known sequences were also assigned to structural protein genes with an unknown function. An analysis of the sequence of some phage structural proteins allowed us to determine interesting structural features of these proteins.

### **Введение**

Лечение бактериальных инфекций с помощью бактериофагов в последнее время становится все более актуальным. Это связано с тем, что повсеместное использование антибиотиков привело к повышению доли патогенных микроорганизмов, обладающих широкой лекарственной устойчивостью. В отличие от небольших химических соединений, бактериофаги представляют собой биологические объекты, которые в результате эволюции могут приспосабливаться к изменяющимся микроорганизмам, что в теории позволяет создавать на основе бактериофагов терапевтические средства, направленные на подавление практически любого бактериального микроорганизма. Вместе с тем, использование препаратов бактериофагов для терапии ставит ряд вопросов биобезопасности. Подобные препараты должны быть тщательным образом охарактеризованы, включая секвенирование генома и анализ свойств белков, кодируемых бактериофагом. Однако при отсутствии выраженной гомологии с известными белками сделать это на основе одной лишь последовательности гена затруднительно. В случае структурных белков масс-спектрометрический анализ является мощным методом, который позволяет сопоставить фрагмент генома с белковым продуктом. В данной работе были проанализированы несколько потенциально-терапевтических бактериофагов из «Коллекции экстремофильных микроорганизмов и типовых культур ИХБФМ СО РАН», поражающих некоторые штаммы *P. mirabilis*, *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa*. В результате было обнаружено несколько структурных белков с неизвестной функцией. Ряд рамок считывания, не имеющих гомологии с известными последовательностями, был также отнесен к генам структурных белков с неустановленной функцией. Анализ последовательности аминокислотных остатков некоторых структурных белков позволил установить интересные структурные особенности этих белков.

### **Результаты и обсуждение**

В данном тексте представлены лишь результаты, полученные для бактериофага КР8. На первом этапе работы был наработан препарат бактериофага КР8 с использованием микроорганизмов *K. pneumoniae* из «Коллекции экстремофильных микроорганизмов и типовых культур ИХБФМ СО РАН». Для удаления клеточных белков образец бактериофага был очищен методом



центрифугирования в градиенте хлористого цезия, после чего диализован против фосфатно-солевого буферного раствора. Титр бактериофага в очищенном препарате составил около  $10^{11}$  б.о.е./мл.

Препарат бактериофага КР8 был разделён в результате денатурирующего гель-электрофореза и окрашен серебром либо красителем “Coomassie brilliant blue G-250” (рис. 1). Было обнаружено, что некоторые белки бактериофага образуют ковалентные комплексы (рис. 1А, дор. 1, обозначены “\*”), которые при обработке дитиотреитолом разрушаются до индивидуальных белков (рис. 1А, дор. 2).

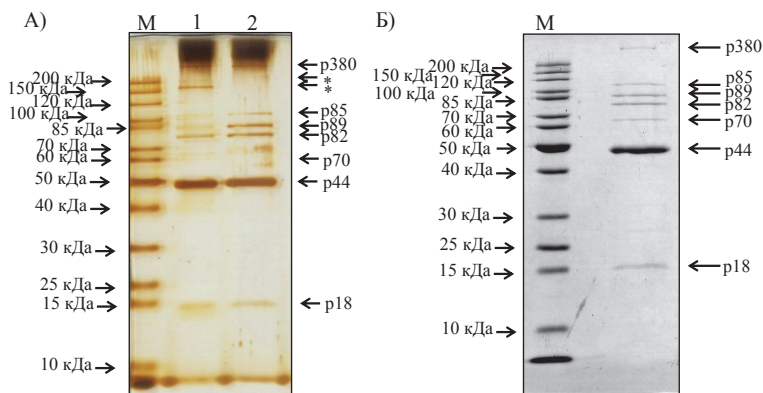


Рис. 1. Электрофореграмма препарата бактериофага КР8 в 12% SDS-полиакриламидном геле. А) 5 мкл препарата на дорожку, окраска серебром (1 — без обработки дитиотреитолом, 2 — с обработкой дитиотреитолом), Б) 60 мкл препарата на дорожку, окраска “Coomassie brilliant blue G-250”. М — маркер молекулярных масс (Thermo scientific #26614).

Белковые полосы с геля, окрашенного красителем Coomassie, были вырезаны, после чего был произведён триптический гидролиз белков. Полученные образцы были исследованы MALDI масс-спектрометрией в положительном режиме. В результате все проанализированные образцы идентифицированы как белки бактериофага КР8 (см. таблицу).

Согласно филогенетическому анализу, бактериофаг КР8 относится к N4-бактериофагам. Отличительной особенностью этих бактериофагов является уникальная РНК-полимераза, которая включена в состав капсида и попадает в бактерии вместе с ДНК бактериофага. Этот фермент был обнаружен при анализе структурных белков бактериофага КР8. Кроме того, бактериофаг КР8, по-видимому, содержит два типа белков хвостовых придатков: р82 и р89. Вместе с тем, лишь N-концевая часть белка р89 гомологична фаговым белкам

хвостовых придатков, тогда как С-концевая половина белка имеет выраженное сходство со многими бактериальными белками неустановленной функции.

### Идентифицированные структурные белки бактериофага КР8

Образец	Мол. масса	Функция белка (на основе гомологии)
p18	17.9 кДа	Декорирующий белок капсида либо белок придатков шеи
p44	44.1 кДа	Основной капсидный белок
p70	70.0 кДа	Гипотетический структурный белок
p82	82.2 кДа	Белок хвостовых фибрилл
p85	85.0 кДа	Портальный белок
p89	89 кДа	Белок хвостовых фибрилл (высокая вероятность)
p380	381.0 кДа	РНК-полимераза, входящая в состав бактериофага

Среди проанализированных образцов были обнаружены два белка, которые при исходной аннотации генома бактериофага КР8 были отнесены к гипотетическим белкам. Белок p18, имеет сходство с белками бактериофагов, однако роль этого белка неоднозначна: для ряда бактериофагов он указан как “capsid decorating protein”, тогда как для других белков он указан как “neck whiskers protein”. Белок p70 является сравнительно большим белком, гомологи которого встречаются в других бактериофагах. Вместе с тем, функциональная роль этого белка неизвестна. Анализ с помощью сервера PSIPRED показал, что белок имеет альфа-спиральную структуру, а также содержит coiled-coil мотив.

MAQITWRNVDPANFSGVGD SIRSFSGLLNATAGLS DALGNFQTAARQEVGNQVMQNALQYQDPTEYRNALASGALFQ  
 GVDPSLISNRTLENLDNRTGNLLNQATQQQALDYNTYRTGRMQDL DARGDAASPALRQLALAYQSGDPNTIARAQQQY  
 GGALDSL PADQVQEI MGR LQNQGSNAIGQRRLDFNLG TNMRDDADSQA AIGVLSQIVRGAENPNDARI LAEAYSKQLS  
 PTAQARLQGLLAQQYPGT YGNVNTSAPGTAGTRSGSPFDV TYQFQGT SKPITQMSIGEVNTHQANMIS SGGASPVGAY  
 QINKATLEDFAPKVLGENWRNMPLSPENQDKIGEAI FNARKNGNLKDTWAALPDSTV GAYKNRTWNEMKGLIAQAEVG  
 ANFLAVQQAVQGNQAVSNLATGMIGTRLMENNAVGNV PDYLRTLGDTATPGEVNVNRLLENDFKGADRNVVLARVNEIA  
 QRAGVSPAMAATVMQRAQT VNPENMIWRGLQGLNFFI SNEAGNGTRLNDDAVDQ MVGALQRGE PLEQSVRNLS T **QQA**  
**QNVQAAQQAYDAALAQLQNTQNKISTGQTALTAI** LPSRQAAVERAQMMLQAAQQQV TADPQN LAPRTFQSQATTDRAV  
 KREND SRAERYLRQANQ I PGYMQTR

Рис. 2. Последовательность аминокислотных остатков белка p70 бактериофага КР8. Желтым выделен coiled-coil мотив

Таким образом, масс-спектрометрически был идентифицирован ряд структурных белков бактериофага КР8. Был идентифицирован структурный белок p70 с неустановленной функцией.

**ВЫЯВЛЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСТРЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ  
ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В ЮЖНОМ  
КАЗАХСТАНЕ В 2019 Г.**

IDENTIFICATION OF CURRENTS ACUTE RESPIRATORY VIRAL  
INFECTIONS CIRCULATING IN SOUTH KAZAKHSTAN IN 2019

А. М. Баймухаметова, Н. С. Онгарбаева, М. Қ. Қалқожаева,  
Н. Т. Сактаганов, Г. В. Лукманова, Т. И. Глебова, Н. Г. Кливлеева

*ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии»,  
Алматы, Республика Казахстан*

A. M. Baimukhametova, N. S. Ongarbayeva, M. K. Kalkozhayeva,  
N. T. Saktaganov, G. V. Lukmanova, T. I. Glebova, N. G. Klivleyeva

*LLP Scientific Production Center for Microbiology and Virology, Almaty,  
Republic of Kazakhstan*

E-mail: [biochem\\_vir@mail.ru](mailto:biochem_vir@mail.ru)

**Аннотация**

В работе представлены результаты изучения особенностей циркуляции возбудителей острых респираторных вирусных инфекций в Южном Казахстане в 2019 г. Первичный скрининг выявил циркуляцию наиболее актуальных возбудителей ОРВИ с преобладанием респираторно-синцитиальной инфекции.

**Abstract**

The paper presents the results of study of the circulation of pathogens of acute respiratory viral infections in Southern Kazakhstan in 2019. Primary screening revealed the circulation of the most actual pathogens of acute respiratory viral infections with predominance of respiratory syncytial infection.

Несмотря на усилия медицинского сообщества, заболеваемость острыми респираторными вирусными инфекциями (ОРВИ) не снижается, приобретая в зимнее время характер эпидемии. Специфическую профилактику ОРВИ создать практически невозможно из-за высокой контагиозности вирусов, скорости и массовости поражения, выраженной изменчивости

антигенных свойств вирусов, появления все новых серотипов. Это свидетельствует о необходимости постоянного мониторинга за циркуляцией возбудителей ОРВИ для своевременного проведения профилактических и лечебных мероприятий.

С целью обнаружения возбудителей ОРВИ в РТ-ПЦР исследовано 522 назофарингеальных смыва, собранных от больных в лечебных учреждениях Южного Казахстана с января по май 2019 г. Исследования проводили с помощью наборов реагентов «РИБО-преп», «Реверта-L» и «АмплиСенс ОРВИ-скрин-FL» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) на амплификаторе «RotorGene Q6 Plex» (QIAGEN, Германия).

В таблице представлены результаты исследования в РТ-ПЦР носоглоточных смывов, собранных в 2019 г. в Южном Казахстане.

### Скрининг в РТ-ПЦР клинических образцов, собранных в 2019 г., на наличие возбудителей ОРВИ

Место сбора	Общее кол-во	Положительные пробы	hRSv Респираторно-синцициальный вирус	hAdv Аденовирусы	hRv Риновирусы	hPiv 2/4 Парагрипп	hCov Коронавирусы	hPiv 1/3 Парагрипп	hMpv Метапневмо вирус человека	hBov Бокавирус
Алматинская область	241	105	69	4	18	0	2	4	7	1
Кызылординская область	237	116	75	5	19	0	3	4	9	1
Туркестанская область	44	11	6	0	3	0	0	0	2	0
<b>Всего</b>	<b>522</b>	<b>232</b>	<b>150</b>	<b>9</b>	<b>40</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>8</b>	<b>18</b>	<b>2</b>

Как видно из таблицы, генетический материал возбудителей ОРВИ обнаружен в 232 образцах (44,4 % от общего числа). РНК респираторно-синцициального вируса обнаружена в 150 пробах (64,5 % от общего количества исследованных образцов), риновируса — в 40 (17,2 %), метапневмовируса — в 18 образцах (7,7 %), аденовируса — в девяти (3,8 %), парагриппа

---

1/3 типа — в восьми образцах (1,53 %), коронавируса — в пяти смывах (1,5 %). РНК бокавируса выявлена — в двух (1,3 %) образцах.

Таким образом, в результате первичного скрининга клинических образцов в РТ-ПЦР, в Южном регионе Казахстана выявлена циркуляция возбудителей ОРВИ с преобладанием респираторно-синцитиальной инфекции, на долю которой пришлось более половины положительных проб.

## ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ МУТАНТНОГО ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ С УВЕЛИЧЕННОЙ ПРОДУКЦИЕЙ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВИРИОНОВ\*

STUDY OF PROPERTIES OF THE MUTANT VIRUS OF OSPOVACCINE WITH AN INCREASED PRODUCTION OF EXTRACELLULAR VIRIONS

Т. В. Бауэр, А. А. Сергеев, А. С. Кабанов, С. Н. Якубицкий,  
О. С. Таранов, С. А. Пьянков, Т. В. Трегубчак, С. Н. Щелкунов

*ФБУН «Государственный научный центр  
вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора*

T. V. Bauer, A. A. Sergeev, A. S. Kabanov, S. N. Yakubitskiy, O. S. Taranov,  
S. A. Pyankov, T. V. Tregubchak, S. N. Shchelkunov

*State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR  
Rospotrebnadzor*

E-mail: bauer\_tv@vector.nsc.ru

### **Аннотация**

В работе представлены данные сравнительного исследования вирулентных и иммуногенных свойств вируса осповакцины (VACV), штамм LIVP клон 14, и его мутантного варианта по гену *A34R* (D110N, K151E) при подкожном, внутрикожном, интраназальном и интрацеребральном введении вирусов мышам линии Balb/C.

### **Abstract**

The data of comparative studies of virulence and immunogenic properties of vaccinia virus (VACV) strain LIVP clone 14 and its mutant variant with changed *A34R* (D110N, K151E) gene using subcutaneous, intradermal, intranasal or intracerebral virus inoculation of Balb/C mice are shown.

Вирус осповакцины (vaccinia virus, VACV) на поздних стадиях размножения формирует внеклеточные вирионы (EEV), покрытые липопротеидной оболочкой, состоящей из липидов клеточной мембраны и включающей вирусные белки. Данная EEV-форма обеспечивает эффективный транспорт

---

© Т. В. Бауэр, А. А. Сергеев, А. С. Кабанов, С. Н. Якубицкий, О. С. Таранов, С. А. Пьянков, Т. В. Трегубчак, С. Н. Щелкунов, 2019

\* Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-14-00006).

вируса в тканях инфицированного организма. Однако большую долю в потомстве VACV составляют зрелые внутриклеточные вирионы (IMV), которые выходят в окружающую среду только после разрушения зараженной клетки. Разные штаммы VACV различаются по эффективности формирования EEV-формы и, как следствие, по эффективности распространения вируса в зараженном организме. Кроме того, IMV и EEV формы VACV различаются по набору антигенов. До сих пор нет ясности, какая из этих форм вирионов имеет большее значение для формирования эффективного протективного иммунного ответа при вакцинации вирусом осповакцины. Поэтому в рамках данного исследования поставлена задача выяснить как влияет уровень продукции EEV VACV на свойства вирулентности и иммуногенности вируса в зависимости от способа иммунизации.

Ранее для штамма WR VACV экспериментально показано, что точечные нуклеотидные замены D110N, K151E в последовательности белка A34 приводят к значительному увеличению продукции EEV-формы [1].

Нами на основе клонового варианта VACV L1VP-14 получен мутант по гену *A34R* (L1VP-A34R\*, увеличенная продукция EEV). Для получения вируса с направленной мутацией по целевому гену использован метод временной доминантной селекции [2]. Данный метод основан на встройке в вирусный геном доминантного селективного маркера одновременно с целевым вариантом гена. В качестве доминантного маркера используется ген *gpt* ксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы *Escherichia coli*. На селективной среде с микофеноловой кислотой, ксантином, гипоксантином образуются бляшки только рекомбинантные вирусы, экспрессирующие *gpt*. Доминантный маркер *gpt* находится в гибридной плазмиде вне фрагмента вирусной ДНК, и поэтому он может включиться в вирусный геном только в результате одиночной рекомбинации гибридной плазмиды по области гомологии с вирусной ДНК, при этом интегрируется вся плаزمида, а не только вирусный сегмент ДНК. При снятии селективного давления по гену *gpt* в результате внутримолекулярной рекомбинации плазмидная часть с геном *gpt* исключается с высокой эффективностью, а измененный целевой ген у части клоновых вариантов сохраняется в составе стабильного вирусного генома [3].

С целью подтверждения неизменности вирусного генома за исключением направленно введенных изменений в целевом гене, для исходного клонового варианта и полученного на его основе мутантного варианта VACV была определена полная последовательность генома с использованием технологии Illumina MiSeq.

На первом этапе оценен уровень продукции внутриклеточных и внеклеточных вирионов в культуре клеток CV-1 для созданного мутантного вируса L1VP-A34R\* и исходного L1VP-14. На следующем этапе выполнены

объемные эксперименты на мышах линии Balb/C по сравнительному изучению инфекционных и вирулентных свойств этих штаммов VACV. На мышах-сосунках линии Balb/C при внутримозговом заражении изучена нейровирулентность полученных вариантов вирусов. Накопление вируса в мозгу мышей определяли путем определения титра вирусных частиц на культуре клеток CV-1.

На взрослых мышах линии Balb/C инфекционность и вирулентность штаммов VACV определяли при подкожном, внутрикожном и интраназальном введении вируса в разных его дозах. Накопление вируса в органах в динамике определяли с помощью титрования на культуре клеток и/или количественным ПЦР в реальном времени. Образцы органов, полученных от экспериментальных животных, подвергнуты патоморфологическому исследованию. Для обоих вирусов определен уровень продукции вирусспецифических антител в зависимости от дозы и способа иммунизации.

### Литература

- 1) Kim DH, Wang Y, Liang W, Contag CH, Thorne SH. Enhancing poxvirus oncolytic effects through increased spread and immune evasion // *Cancer Res.* 2008. V. 68. P. 2071–2075.
- 2) Falkner FG, Moss B. Transient dominant selection of recombinant vaccinia viruses. // *J. Virol.* 1990. V. 64. P. 3108–3111.
- 3) Yakubitskiy SN, Kolosova IV, Maksyutov RA, Shchelkunov SN. Attenuation of vaccinia virus // *Acta Naturae.* 2015. V. 7. P. 113–121.



**ЛИПОФИЛЬНЫЕ ПЕПТИДНЫЕ ИММУНОГЕНЫ ПРОТИВ ВГС****LIPOPHILIC PEPTIDE IMMUNOGENS AGAINST HCV**

А. Н. Белявцев<sup>1,2</sup>, Н. С. Шастина<sup>1</sup>, Л. И. Николаева<sup>2</sup>, В. В. Куприянов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Институт тонких химических технологий (РТУ), Москва*

<sup>2</sup>*ФГБУ НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи, Москва, Россия*

A. N. Belyavtsev<sup>1,2</sup>, N. S. Shastina<sup>1</sup>, L. I. Nikolaeva<sup>2</sup>, V. V. Koupriyanov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*IFCT (RTU)*

<sup>2</sup>*N. F. Gamaleya FRC EM, Russia*

**Аннотация**

Вирус гепатита С вызывает инфекционное заболевание, против которого на данный момент не существует профилактических вакцин. Это приводит к хронизации данной инфекции, которая становится фактически летальной. Была выявлена роль цитотоксического иммунного ответа в элиминации ВГС у спонтанных реконвалесцентов и это предопределило разработку терапевтических пептидных вакцин, направленных на стимуляцию цитотоксического ответа (на вирусные частицы). Для повышения химической стабильности пептидные эпитопы присоединяют к носителям, обычно выступающим также в качестве адъювантов иммунного ответа.

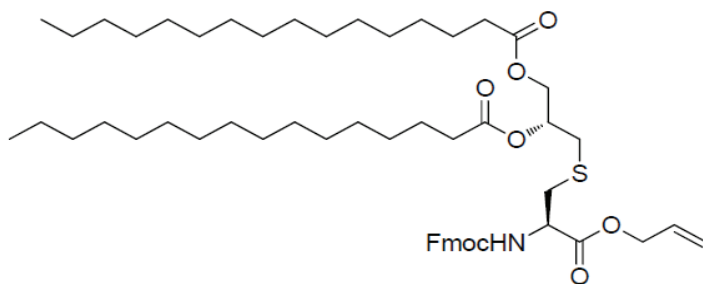
**Abstract**

The virus of hepatitis C causes an infectious disease against which at the moment there are no preventive vaccines. It leads to synchronization of this infection which becomes actually lethal. The role of a cytotoxic immune response in elimination of VGS at spontaneous convalescents was revealed and its predetermined development of the therapeutic peptide vaccines directed to stimulation of the cytotoxic answer (on virus particles). For increase in chemical stability peptide epitopes attach to the carriers which are usually acting also as adjuvants of an immune response.

Создание эффективных иммуногенов и вакцин — актуальная современная проблема с учетом новых и возвращающихся инфекций. Одним из вариантов данных соединений может быть сочетание полипептидных антигенных эпитопов и липофильного адъюванта, обеспечивающее взаимодействие с клеточной мембраной и Toll-подобными рецепторами, благодаря которому

возможна активация макрофагов, Т-клеточного и В-клеточного иммунного ответа. Цель данного исследования — создание перспективных вариантов липопептидов, обладающих выраженными иммуногенными свойствами, на основе антигенных детерминант NS4a вируса гепатита С и липофильных адъювантов, что позволит использовать их в разработке вакцины. При конструировании высокоиммуногенных молекул необходима информация о структуре антигенов патогена, их В- и Т-эпитопах, о традиционных и новых подходах к повышению иммуногенности.

Неструктурные белки ВГС, выполняющие важные функции в жизненном цикле вируса и вызывающие иммунный ответ в ходе инфекции, рассматриваются в качестве объекта для создания терапевтических вакцин от гепатита С. Однако на данный момент нет сообщений о создании вакцинных препаратов против ВГС, вследствие чего мы считаем целесообразным создать и проанализировать липопептиды, состоящие из В- и Т-эпитопов пептида NS4A ВГС и липофильного адъюванта [1–3], по структуре близкого липидному компоненту бактериальных липопротеинов (см. рисунок). В настоящее время на основе большого объема данных о пептидах ВГС, презентруемых иммунокомпетентными клетками в комплексе с белками главного комплекса гистосовместимости, стало возможным конструировать синтетические иммуногенные препараты из эпитопов неструктурных белков ВГС и затем изучать их способность вызывать иммунный ответ у лабораторных животных. Поэтому одним из перспективных направлений в разработке вакцин от гепатита С может стать создание синтетических иммуногенных липопептидов [4], обладающих одновременно и адъювантными свойствами.



N-флуоренилметоксикарбонил-S-[2,3-бис(пальмитоилокси)-(2R)-пропил]- (R)-цистеина аллиловый эфир [3]

В исследованиях, направленных на создание искусственных вакцинных препаратов, липопротеины и липопептиды используются как адъюванты, воздействующие на PRRs и клетки врожденной иммунной системы [5, 6]. В настоящее время в экспериментальных исследованиях нашли применение как прототипы рекомбинантных липидмодифицированных вакцин [7], так и синтетические липопептидные конструкции [8]. В отличие от многих химических адъювантов, липопептиды у людей либо не вызывают, либо дают слабые побочные эффекты [9]. Синтетические иммуногенные пептидные препараты оказываются более стабильными и иммуногенными после соединения с липидными компонентами [10]. Недавно предложен еще один подход — получение разветвленных липопептидных конструкций, содержащих сразу несколько Т- или В-эпитопных последовательностей, связанных по аминокетам лизина [11]. Это позволило повысить Т-клеточный ответ на липопептидные антигены. При конструировании искусственных иммуногенов пока нет высокой уверенности заранее, что будет получен высокоиммуногенный препарат, потому что существует много дополнительно влияющих факторов (влияние липидной части на пептидную, доступность для рецепторов, ферментов и т. д.). Практически сразу после открытия вируса гепатита С начались работы над созданием вакцины против этого патогена. Работы ведутся во многих странах уже несколько десятилетий, но зарегистрированных вакцин нет. Были эксперименты по изучению липидмодифицированных рекомбинантных иммуногенов на основе core- и NS3-белков вируса гепатита С [12]. Большинство работ по созданию вакцины от гепатита С ориентированы на создание мультиэпитопного рекомбинантного варианта, ДНК-овой конструкции или комбинации того и другого. Наш подход основан на выборе уязвимой мишени вируса — пептида NS4A.

Был осуществлен выбор подходящих эпитопов моделированием на основе сиквенса NS4A, синтезировано дипальмитоильное липофильное соединение, которое удалось присоединить к дипептиду глициллейцин, полученному твердофазным синтезом на смоле Ванга, а также в растворе была проведена реакция присоединения данного соединения к аминокетам метилового эфира лизина, что позволяет сделать вывод о принципиальной возможности получения липопептидов путем ковалентного связывания карбоксильной группы липофильного соединения с аминокетам аминокислот амидной связью. Доставка этих липопептидов с помощью липосом в биологические системы позволит оценить иммунный ответ и эффективность данного подхода.

## Литература

1. Metzger J. W., K.-H. Wiesmüller, and G. Jung. 1991. Synthesis of N-Fmoc protected derivatives of S-(2,3-dihydroxypropyl)-cysteine and their application in peptide synthesis. *Int. J. Pep. Protein. Res.* 38:545–554.
2. W. Zeng, B. Y Chua, L. Grollo, D. Jackson, 2010. Structural requirement for the agonist activity of the TLR2 ligand Pam2Cys. *Amino Acids*.
3. Brendan L. Wilkinson, Lara R. Malins, Candy K. Y. Chun and Richard J. Payne (2010). Synthesis of MUC1-Lipopeptide Chimeras. This journal is (c) The Royal Society of Chemistry.
4. Amabel C. L. Tan, Edin J. Mifsud, Weiguang Zeng, Kathryn Edenborough, Jodie McVernon, Lorena E. Brown, and David C. Jackson. Intranasal Administration of the TLR2 Agonist Pam2Cys Provides Rapid Protection against Influenza in Mice. *Mol. Pharmaceutics*, 2012, 9, 2710–2718.
5. BenMohamed L., Gras-Masse H., Tartar A. et al. Lipopeptide immunization without adjuvant induces potent and long-lasting B, T helper, and cytotoxic T lymphocyte responses against a malaria liver stage antigen in mice and chimpanzees. *Eur.J.Immunol.* 1997; 27:1242.
6. Chong P., Huang J. H., Leng C. H. et al. Recombinant lipoproteins as novel vaccines with intrinsic adjuvant. *Adv.Protein Chem. Struct.Biol.* 2015; 99:55.
7. Chiang C. Y., Pan C. H., Chen M. Y. et al. Immunogenicity of a novel tetravalent vaccine formulation with four recombinant lipidated dengue envelope protein domain IIIs in mice. *Sci.Rep.* 2016; 6: 30648.
8. Zeng W., Ghosh Lau Y. F. et al. Highly immunogenic and totally synthetic lipopeptides as self-adjuvanting immunocontraceptive vaccines. *J.Immunol.* 2002; 169:4905.
9. Moyle P. M., Toth I. Self-adjuvanting lipopeptide vaccines. *Curr.Med.Chem.* 2008;1: 506.
10. Brumeanu T. D., Casares S., Bot A. et al. Immunogenicity of a contiguous T-B synthetic epitope of the A/PR/8/34 influenza virus. *J.Virol.* 1997;7:5473.
11. Samayoa L., Diaz-Mitoma FD., Azizi A. Characterization of a branched lipopeptide candidate vaccine against influenza A/Puerto Rico 8/34 which is recognized by human B and T-cell immune responses. *Virology J.* 2011;8: 309.
12. Langhans B., Schweitzer S., Nischalke H. D. et al. Hepatitis C virus-derived lipopeptide differentially induce epitope-specific immune responses *in vitro*. *J.Inf.Dis.* 2004;18:248.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕПОЛИМЕРИЗУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ  
ХВОСТОВЫХ БЕЛКОВ БАКТЕРИОФАГОВ *PROTEUS MIRABILIS*  
С ЦЕЛЬЮ СОЗДАНИЯ БАКТЕРИОФАГА  
С РАСШИРЕННЫМ СПЕКТРОМ ХОЗЯЕВ\***

INVESTIGATION OF DEPOLYMERAZING ACTIVITY OF *PROTEUS*  
*MIRABILIS* BACTERIOPHAGES TAIL PROTEINS TO CREATE  
A BACTERIOPHAGE WITH AN EXPANDED HOST RANGE

О. В. Боковая<sup>1,2</sup>, В. В. Морозова<sup>1</sup>, И. В. Бабкин<sup>1,2</sup>,  
Ю. Н. Козлова<sup>1</sup>, Н. В. Тикунова<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,  
Новосибирск, Россия*

<sup>2</sup>*Новосибирский государственный национальный исследовательский  
университет, Новосибирск, Россия*

O. V. Bokovaya<sup>1,2</sup>, V. V. Morozova<sup>1</sup>,  
I. V. Babkin<sup>1,2</sup>, Yu. N. Kozlova<sup>1</sup>, N. V. Tikunova<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*ICBFM SB RAS, Russia*

<sup>2</sup>*Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*

E-mail: bokovaya.o.v@gmail.com

**Аннотация**

В связи с распространяющейся лекарственной устойчивостью бактерий ведется активный поиск альтернативных методов лечения вместо использования антибиотиков. Применение синтетических бактериофагов с расширенным спектром хозяев может стать такой альтернативой. Для создания подобных синтетических фагов против бактерии *Proteus mirabilis* требуется провести исследование деполимеризующей активности хвостовых белков фагов, специфичных к штаммам бактерии *Proteus mirabilis*.

**Abstract**

There is a need for alternative treatments instead of antibiotics due to the spreading bacteria drug resistance. The use of synthetic bacteriophages with an expanded host spec-

---

© О. В. Боковая, В. В. Морозова, И. В. Бабкин, Ю. Н. Козлова, Н. В. Тикунова, 2019

\*Работа выполнена при поддержке Фонда РФФИ, проект № 18-29-08015 «Разработка способов создания геномов искусственных бактериофагов для контроля патогенных бактерий».

trum can be one of alternative methods. Development of synthetic phages against the bacterium *Proteus mirabilis* requires a study of the depolymerizing activity of tail proteins of *Proteus* phages.

*Proteus mirabilis* — это грамм-отрицательный бактериальный патоген. Известно, что у некоторых штаммов рода *Proteus* возникает устойчивость к антибиотикам. Коктейли бактериофагов против лекарственно-устойчивых штаммов *Proteus mirabilis* могут быть использованы как биологическая альтернатива использованию антибиотиков. Однако использование бактериофагов для лечения бактериальных инфекций имеет свои недостатки. Зачастую бактериофаги обладают узким спектром бактерий-хозяев, что затрудняет их использование. Возможным выходом из этой ситуации является создание бактериофагов с расширенным спектром бактерий-хозяев.

Ранее в Лаборатории молекулярной микробиологии ИХБФМ СО РАН были выделены 5 литических бактериофагов, специфичных к некоторым штаммам патогенных бактерий *Proteus mirabilis*. Было проведено полногеномное секвенирование бактериофагов и проведена аннотация их геномов. Анализ методами биоинформатики выявил, что в геномах фагов PM93 и PM85 содержится по две ОПТ, предположительно кодирующие хвостовые белки с потенциальной деполимеразной активностью. В геномах фагов PM16, PM116 и PM75 было найдено по одной ОПТ, кодирующей подобные белки. Для характеристики этих белков были получены генетические конструкции в плазмиде Pet28b+, содержащие последовательности соответствующих фаговых генов, предположительно кодирующих белки с деполимеразной активностью.

Шесть генетических конструкций, кодирующих рекомбинантные хвостовые белки фагов PM93, PM85, PM16, PM116 и PM75 были получены. Индукция синтеза белка с полученных конструкций показала, что все белки присутствуют как в растворимой цитоплазматической фракции, так и в нерастворимой. Рекомбинантные белки P93GP46, P93GP47, P85GP47, P85GP46 и P75GP46 были наработаны, и была произведена их хроматографическая очистка на колонке с сорбентом Ni-NTA. Удалось очистить четыре белка: P93GP46, P93GP47, P85GP47 и P75GP46. Проведены предварительные эксперименты на способность деградировать поверхностный полисахаридный матрикс хозяйских штаммов *Proteus mirabilis*. Показано, что рекомбинантные белки P93GP47 и P75GP46 обладают полисахарид-деградирующей активностью.

## ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ВИРУСА ЕЧНО 3 ПРИ ЕГО АДАПТАЦИИ К РАЗЛИЧНЫМ КУЛЬТУРАМ КЛЕТОК\*

### THE STUDY OF THE PROPERTIES OF THE ECHO 3 VIRUS WHEN IT IS ADAPTED TO VARIOUS CELL CULTURES

А. В. Гладышева, Е. В. Протопопова, В. А. Терновой

*ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия*

A. V. Gladysheva, E. V. Protopopova, V. A. Ternovoi

*SRC VB "Vector", Russia*

#### **Аннотация**

Вирус ЕЧНО — РНК-содержащий вирус, принадлежащий к роду *Enterovirus*, семейству *Picornaviridae*. Этот вирус был в числе первых энтеровирусов, которые были исследованы в качестве онколитических агентов. Данная работа посвящена изучению цитолитической активности вируса ЕЧНО 3 *in vitro* и *in vivo*, а также картированию аминокислотных замен, происходящих в результате адаптации вируса к различным типам клеток, в том числе опухолевым.

#### **Abstract**

An ECHO virus is a type of RNA virus that belongs to the genus *Enterovirus* of the *Picornaviridae* family. This virus was among the first enteroviruses that were investigated as antitumor agents. This work is devoted to the study of the cytolitic activity of ECHO 3 virus *in vitro* and *in vivo*, as well as the mapping of amino acid substitutions resulting from the adaptation of the virus to various types of cells.

#### **Введение**

Вирус ЕЧНО «Enteric Cytopathic Human Orphan» — РНК-содержащий вирус, принадлежащий к роду *Enterovirus*, семейству *Picornaviridae*. Название «кишечная цитопатическая сирота человека» подразумевает, что вирусы ЕЧНО оказывают цитопатический эффект в клетках, но, как сироты, не связаны с какими-либо человеческими заболеваниями. Вирусы ЕЧНО были в чис-

---

© А. В. Гладышева, Е. В. Протопопова, В. А. Терновой, 2019

\* Работа выполнена за счет средств Государственного задания 13/19 «Разработка генетических и фенотипических маркеров для количественной оценки пандемического потенциала зоонозных вирусов гриппа».

ле первых энтеровирусов, которые были исследованы в качестве онколитических агентов. В серии различных работ было показано, что раковые клетки проявляют разные уровни чувствительности по отношению к эховирусам. Одним из предполагаемых механизмов, который требует дополнительного изучения, может быть избирательный процесс адаптации вируса к клеткам.

Данная работа посвящена изучению цитолитической активности вируса ЕСНО 3 *in vitro* на различных культурах клеток и *in vivo* на мышинной модели, а также картированию аминокислотных замен, происходящих в результате адаптации вируса к различным типам клеток.

### Результаты и обсуждение

Была произведена адаптация изолята Sakhalin/10 вируса ЕСНО 3 к культурам клеток почки эмбриона человека (293), рака шейки матки (С33А), рака предстательной железы (DU-145), рабдомиосаркомы (RD), аденокарциномы молочной железы (MCF-7) и эпидермоидного рака (А431). Были проведены 3 последовательных пассажа на культурах клеток 293, С33А, DU-145 и 4 пассажа на клетках RD, MCF-7 и А-431. Полученные адаптированные к клеткам варианты вируса, показали существенные различия в их репликационной активности от 3-х до 9 порядков (Таблица 1). Было обнаружено, что вирус обладает очень ограниченной способностью к репликации в линии клеток А431 и абсолютно не реплицируется в культуре клеток MCF-7. При этом характерное цитопатическое действие вируса на клетки наблюдалось только на культурах клеток 293, С33А, DU-145 и RD.

Таблица 1

**Цитолитическая активность  
*in vitro* ЕСНО 3 в различных клеточных линиях человека**

Вариант изолята Sakhalin/10 вируса ЕСНО3	Клеточная культура Титр вируса (ТЦП <sub>50</sub> /мл)					
	HEK293	С33А	DU-145	RD	MCF-7	А-431
ЕСНО 3 (293)	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>9</sup>	10 <sup>8</sup>	–	10 <sup>3</sup>
ЕСНО 3 (С33А)	10 <sup>6</sup>	10 <sup>8</sup>	Н.д.	10 <sup>7</sup>	–	–
ЕСНО 3 (DU-145)	10 <sup>9</sup>	Н.д.	10 <sup>8</sup>	Н.д.	–	–
ЕСНО 3 (RD)	10 <sup>7</sup>	10 <sup>7</sup>	Н.д.	10 <sup>7</sup>	–	–

При исследовании цитолитической активности *in vivo* на мышинной модели, было установлено, что наименее агрессивными оказались варианты



вируса ЕСНО 3, адаптированные к культурам клеток RD и С33А. В случае заражения мышей вариантом вируса ЕСНО 3 (RD) из 10 мышей выжило 8, что составляет 80 % выживаемость. А в случае ЕСНО 3 (С33А) на первом пассаже из 12 зараженных мышей выжило 4 (33 %), а на втором пассаже из 10 выжило 5 (50 %). В то время как, при заражении мышей вирусом, адаптированным к 293 клеткам, наблюдалась 100 % смертность на 1 и 2 пассажах. Особенно интересным оказался вариант вируса ЕСНО 3 (DU-145), поскольку на первом пассаже была 100 % смертность мышей, а на втором пассаже из 11 зараженных мышей выжило 8 (73 % выживаемости).

Секвенированием по Сенгеру было получено четыре полногеномные последовательности вируса ЕСНО 3, адаптированного к культурам клеток 293, С33А, DU-145 и RD после третьего и четвертого пассажей. Наиболее близкородственным к нашим вариантам вируса ЕСНО 3 являлся штамм LR31G7 вируса ЕСНО 3, который был изолирован из сточных вод Греции в 2005 году. Уровень гомологии составил 95 % по нуклеотидной последовательности и 98 % по аминокислотной последовательности.

При сравнении полногеномных последовательностей с 3-го пассажа относительно исходного изолята Sakhalin/10, были выявлены множественные нуклеотидные и аминокислотные замены, происходящие при адаптации вируса к различным культурам клеток (Таблица 2). У варианта ЕСНО 3 (293) было обнаружено 12 аминокислотных и 25 нуклеотидных замен, у ЕСНО 3 (С33А) 10 аминокислотных и 41 нуклеотидная, у ЕСНО 3 (RD) 12 аминокислотных и 43 нуклеотидных, а у ЕСНО 3 (DU-145) 13 аминокислотных и 90 нуклеотидных замен. Наибольшее количество замен произошло в регионе белка VP1, который обеспечивает прикрепление вириона к клеткам-мишеням хозяина и вызывает интернализацию вириона. Вариант вируса ЕСНО 3 (293) отличается особо большим количеством аминокислотных замен (5) в регионе белка 2С, который, как известно, индуцирует структурные перестройки внутриклеточных мембран перед началом репликации вирусной РНК.

Таким образом, полученные в ходе работы результаты указывают на то, что существуют механизмы избирательной адаптации вируса к клеткам. Значущую роль при адаптации играл структурный белок VP1, так как в нем происходило наибольшее количество аминокислотных замен, и они были одинаковы для всех линий клеток. Однако, следует уделить большое внимание и не структурным белкам, поскольку в них были обнаружены замены специфические для типа культуры клеток.

Таблица 2

## Аминокислотные замены

Регион	Позиция	Исходный изолят Sakhalin/10	ECHO 3 (293)	ECHO 3 (C33A)	ECHO 3 (RD)	ECHO 3 (DU-145)
VP4	41	A	A	A	P	A
VP2	217	S	S	S	S	N
VP3	411	Q	Q	Q	H	Q
	491	Q	Q	Q	Q	K
	492	S	S	S	S	Y
VP1	586	I	M	M	M	M
	589	L	G	G	G	G
	690	L	V	V	V	V
	693	I	S	S	S	S
	696	Y	D	D	D	D
	751	V	V	I	V	I
	773	E	E	E	E	G
	835	K	E	K	E	K
2C	1136	K	N	K	K	K
	1141	L	R	L	L	L
	1145	I	M	I	I	I
	1146	M	P	M	M	M
	1161	Q	Q	H	Q	Q
	1417	T	S	T	S	T
3A	1444	R	R	R	R	K
	1487	S	S	S	N	S
3C	1634	D	D	D	D	E
	1646	V	V	V	A	V
3D	1817	L	L	W	L	L
	2050	D	D	S	D	D
	2117	N	Y	Y	Y	Y

Дальнейшая работа по моделированию пространственных структур вирусных белков, позволит нам понять функциональную роль и значимость происходящих аминокислотных замен при адаптации вируса ECHO 3.

**ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ  
ШТАММА ВИРУСА ЗИКА, ИЗОЛИРОВАННОГО  
НА ТЕРРИТОРИИ ГВИНЕЙСКОЙ РЕСПУБЛИКИ**

GENETIC CHARACTERIZATION OF A STRAIN  
OF ZIKA VIRUS ISOLATED IN THE REPUBLIC OF GUINEA

А. В. Гладышева, Р. Б. Баяндин, В. А. Святченко

*ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора*

A. V. Gladysheva, R. B. Bayandin, V. A. Svyatchenko

*SRC VB "Vector", Russia*

E-mail: gladysheva\_av@vector.nsc.ru

**Аннотация**

*Вирус Зика — переносимый комарами флавивирус, распространенный в Африки и Азии. В 2018 году в Гвинейской Республике из сыворотки крови больного был выделен вирус Зика. Вирус был пассирован на культурах клеток C6/36, HEK-293, Vero. Далее была получена и задепонирована полногеномная последовательность выделенного штамма Faranah/18 вируса Зика. Анализ генома показал значительные различия между другими африканскими штаммами, которые требуют дальнейшего изучения.*

**Abstract**

Zika virus is a mosquito-borne flavivirus distributed throughout much of Africa and Asia. In 2018, in the Republic of Guinea, Zika virus was isolated from the patient's blood serum. The virus was passaged on cell cultures C6 / 36, HEK-293, Vero. Then, the full-genome sequence of the isolated Faranah / 18 strain of Zika virus was obtained and deposited. Genome analysis revealed significant differences between other African strains that require further study.

**Введение**

Вирус Зика (ZIKV) является членом семейства *Flaviviridae*, передающимся человеку главным образом через укусы комаров вида *Aedes*. Впервые вирус был выделен в апреле 1947 года из дозорной макаки-резуса, обитающей в лесу Зика возле озера Виктория, Уганда. После этого серологические и энтомологические данные указывали на инфекции ZIKV на африканском

континенте: Нигерии в 1971 и 1975 годах, Сьерра-Леоне в 1972 году, Габоне в 1975 году, Уганде в 1969 и 1970 годах, Центрально африканской Республике в 1979 году, Сенегале с 1988 по 1991 год и Кот-д'Ивуаре в 1999 году. Недавно ZIKV был обнаружен в Сенегале в 2011 и 2012 годах.

Геном ZIKV представлен одноцепочечной (+) РНК длиной примерно 11 т.п.н. Геном содержит 5' и 3' не транслируемые области, фланкирующие одну открытую рамку считывания, которая кодирует полипротеин, состоящий из трех структурных и семи неструктурных белков. В нашей работе особое внимание уделено белку Е, поскольку он является основным поверхностным белком вириона. Он участвует в различных аспектах вирусного цикла, опосредуя связывание и слияние мембран.

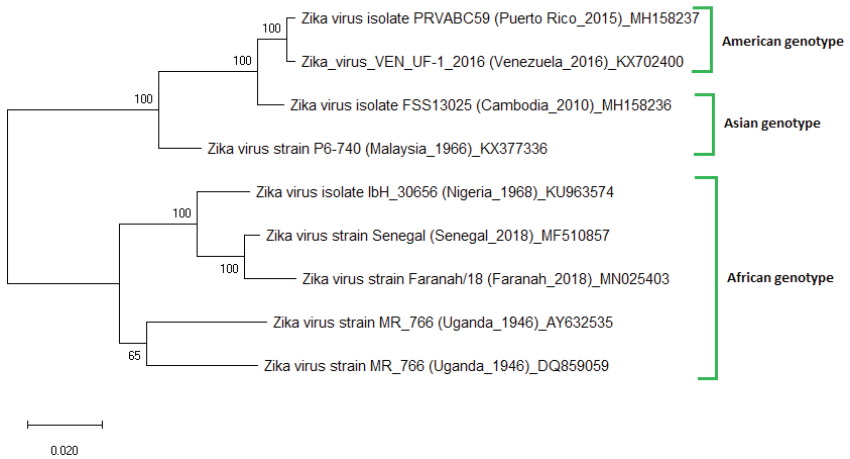
### Результаты и обсуждение

В 2018 году в Гвинейской Республике в г. Фарана из сыворотки крови больного, посредством пассирования на культуре клеток комара *Aedes albopictus* (С6/36), был выделен вирус Зика. При проведении серии последовательных пассажей вируса на клеточных культурах С6/36, почки африканской зеленой мартышки (Vero) и почки эмбриона человека (НЕК-293) было установлено, что вирус Зика активно реплицируется во всех трех культурах клеток. Инфекционный титр вируса составлял  $5 \times 10^6$  ИД<sub>50</sub>/мл для культуры клеток НЕК-293. При этом выраженного цитопатического действия вируса на клетки не обнаруживалось.

Определенная нами полногеномная последовательность выделенного штамма Faranah/18 вируса Зика (10710 н.) была депонирована в международную базу данных GenBank под номером: MN025403. Наиболее близкородственным к штамму Faranah/18 оказался штамм вируса Зика, изолированный в Сенегале из комара *Aedes taylori* в 1984 г (MF510857). Штамм Faranah/18 кластеризовался вместе с другими африканскими штаммами и образовал отдельную геногруппу со штаммом Senegal (рис. 1).

Уровень гомологии по нуклеотидной последовательности составлял 97% (193 замены), а по аминокислотной последовательности — 99% (13 замен). Причем, аминокислотные замены располагались в неструктурной части генома, а именно, белках NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4B и NS5 (см. таблицу).

При анализе множественного выравнивания различных штаммов вируса Зика, мы обнаружили, что большинство африканских вариантов вируса Зика имеют делецию в сайте гликозилирования белка Е (рис. 2).



*Рис. 1.* Филогенетическое дерево, построенное по региону белка E, методом максимального правдоподобия с использованием 2-х параметрической модели Кимуры

**Аминокислотные замены**

Region	Amino acid position	Faranah/18 (MN025403)	Senegal (MF510857)
NS1	886	P	S
	1058	V	L
NS2a	1354	M	I
NS2b	1396	A	T
NS3	1658	V	I
	1722	A	V
	1753	I	T
	1860	R	K
NS4b	2284	H	Q
	2382	I	T
NS5	3050	R	K
	3172	D	N
	3353	K	T

Делеция в 4 кодона наблюдалась, начиная со 153 аминокислоты белка Е штамма MR766 (AY632535), изолированного в Уганде в 1946 г. Делеции в 6 кодонов в позиции 156 выявляются у другого варианта штамма MR 766 (DQ859059), а также штамма ЫН 30656 (KU963574), изолированного в Нигерии в 1968 г.

	1430	1432	1434	1436	1438	1440	1442	1444	1446	1448	1450	1452	1454	1456	1458	1460																			
Камбоджа, 2010 (MN158236)	T	G	A	T	C	G	T	T	A	A	T	G	A	T	A	C	A	G	G	A	C	A	T	G	A	A	A	C	T	G	A				
Нигерия, 1968 (KU963574)	T	G	A	T	T	G	T	G	A	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	G	A		
Малайзия, 1966 (KX377336)	T	G	A	T	T	G	T	T	A	A	T	G	A	C	A	T	A	G	G	A	C	A	T	G	A	A	A	C	T	G	A	A			
Уганда, 1946 (AY632535)	T	G	A	T	T	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	G	A	
Уганда, 1946 (DQ859059)	T	G	A	T	T	G	T	T	A	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	G	A
Сенегал, 1984 (MF510857)	T	G	A	T	T	G	T	G	A	A	T	G	A	C	A	C	A	G	G	A	C	A	T	G	A	A	A	C	T	G	A	A			
Фарана, 2018 (MN025403)	T	G	A	T	T	G	T	G	A	A	T	G	A	C	A	C	A	G	G	A	C	A	T	G	A	A	A	C	T	G	A	A			

Рис. 2. Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей различных штаммов вируса Зика, показывающее делеции в потенциальных сайтах гликозилирования африканских штаммов

Однако у выделенного нами штамма сайт гликозилирования сохранен, что указывает на его уникальность. Интересно, что все штаммы, которые имели делецию, подвергались пассированию в мозге мыши. Как известно, белок Е участвует в различных аспектах вирусного цикла, опосредуя связывание и слияние мембран. Следовательно, обнаруженный нами факт может быть свидетельством существования некоторого механизма адаптации вируса Зика к мышинной модели и требует дальнейших исследований.

## ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ВИРУСОВ ГРИППА А(Н5N8) К ИНГИБИТОРАМ НЕЙРАМИНИДАЗЫ

### NEURAMINIDASE INHIBITORS SUSCEPTIBILITY OF A(H5N8) INFLUENZA VIRUSES

В. Коврижкина, С. В. Святченко, В. Ю. Марченко,  
Н. С. Гончарова, Н. П. Колосова, И. М. Суслопаров, А. Г. Дурьманов,  
Т. В. Трегубчак, Г. С. Онхонова, А. Н. Швалов,  
А. С. Гудымо, Т. Н. Ильичева, А. Б. Рыжиков

*ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия*

V. Kovrizhkina, S. V. Svyatchenko, V. Yu. Marchenko,  
N. S. Goncharova, N. P. Kolosova, I. M. Susloparov, A. G. Durymanov,  
T. V. Tregubchak, G. S. Onkhonova, A. N. Shvalov,  
A. S. Gudymo, T. N. Ilyicheva, A. B. Ryzhikov

*SRC VB "Vector" Rosпотrebnadzor, Russia*

#### **Аннотация**

Анализ чувствительности к ингибиторам нейраминидазы 103 вирусов гриппа А(Н5N8), выделенных в России в 2014–2018 гг., выявил лишь один штамм со сниженной чувствительностью к осельтамивиру.

#### **Abstract**

Neuraminidase inhibitors susceptibility assessment of 103 influenza A(H5N8) viruses, isolated in Russia in 2014–2018, revealed only one strain characterized by reduced inhibition by oseltamivir.

В период с 2014 по 2018 год в России регистрировалась циркуляция вирусов гриппа А(Н5N8), ставшая причиной значительных экономических потерь в сельском хозяйстве. В ходе ликвидации вспышек на птицефабриках работники оказываются в непосредственном контакте с зараженной птицей, что может создавать условия для передачи вируса человеку. В связи с этим важной является оценка чувствительности вирусов гриппа А(Н5N8) к инги-

---

© В. Коврижкина, С. В. Святченко, В. Ю. Марченко, Н. С. Гончарова, Н. П. Колосова, И. М. Суслопаров, А. Г. Дурьманов, Т. В. Трегубчак, Г. С. Онхонова, А. Н. Швалов, А. С. Гудымо, Т. Н. Ильичева, А. Б. Рыжиков, 2019

биторам нейраминидазы осельтамивиру и занамивиру, которые могут применяться в лечении в случае заражения человека зоонозным гриппом.

С 2014 по 2018 г. от птиц нами было выделено 103 изолята вируса гриппа А(Н5N8). Чувствительность к препаратам определяли в флуоресцентном тесте ингибирования нейраминидазы с использованием субстрата MUNANA, расщепление которого под действием нейраминидазы приводит к высвобождению флуоресцирующего продукта 4-метилумбеллиферона. Вирус инкубировали 45 минут с разведениями препарата (0,01–10000 нМ), после чего добавляли субстрат. После инкубации реакционной смеси при температуре 37 в течение часа проводили измерение интенсивности флуоресценции и рассчитывали концентрацию препарата, снижающую активность фермента на 50 % (IC<sub>50</sub>).

Для выборки значений IC<sub>50</sub>, рассчитанных для 103 исследованных штаммов, было определено среднее (после исключения выбросов). В соответствии с критериями ВОЗ, вирус характеризовался сниженной чувствительностью, если определенная для него IC<sub>50</sub> превосходила среднее более чем в 10 раз. Среднее значение IC<sub>50</sub> (±SD) для исследованных вирусов А(Н5N8) составило 0,54±0,17 нМ для осельтамивира и 0,68±0,25 нМ для занамивира, что было сопоставимо с концентрациями IC<sub>50</sub>, типичными для чувствительных к ингибиторам нейраминидазы сезонных вирусов гриппа А(Н1N1)pdм09. Среди проанализированных 103 изолятов А(Н5N8) не было найдено ни одного, которому была бы свойственна резистентность к занамивиру. Анализ выявил лишь один вирус со сниженной чувствительностью к осельтамивиру. Данный штамм был выделен в 2017 г. в Республике Татарстан. Определенное для него значение IC<sub>50</sub> осельтамивира превосходило среднее значение по подтипу в 62 раза. Генетический анализ выявил, что штамм имел в нейраминидазе аминокислотные замены N294S и I191V. Аминокислота в положении 294 играет важную роль в поддержании структуры активного центра нейраминидазы. Замену N294S ранее ассоциировали с возникновением резистентности к осельтамивиру у вирусов гриппа А(Н3N2), А(Н5N1) и В. Анализ международной базы данных нуклеотидных последовательностей вирусов А(Н5N8) показал, что ранее штаммы Н5N8 с данной заменой не выявлялись.



**ПРОГНОЗИРОВАНИЕ РИСКА РЕЦИДИВИРОВАНИЯ  
У ВПЧ16-ПОЗИТИВНЫХ БОЛЬНЫХ С ПЛОСКОКЛЕТОЧНЫМ  
ИНТРАЭПИТЕЛИАЛЬНЫМ ПОРАЖЕНИЕМ ТЯЖЕЛОЙ СТЕПЕНИ  
НА ОСНОВЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФИЗИЧЕСКОГО СТАТУСА ВИРУСА**

PREDICTING THE RISK OF RECURRENCE  
IN HPV16-POSITIVE PATIENTS WITH HIGH GRADE SQUAMOUS  
INTRAEPITELIAL LESION BASED ON THE DETERMINATION  
OF THE PHYSICAL STATUS OF THE VIRUS

Е. В. Кокорина<sup>1</sup>, М. К. Ибрагимова<sup>1,2</sup>, М. М. Цыганов<sup>2</sup>, А. М. Певзнер<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *НИ Томский государственный университет, Томск, Россия*

<sup>2</sup> *НИИ онкологии Томского НИМЦ, Томск, Россия*

E. V. Kokorina<sup>1</sup>, M. K. Ibragimova<sup>1,2</sup>, M. M. Tsyganov<sup>2</sup>, A. M. Pevsner<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *National Research Tomsk State University*

<sup>2</sup> *Cancer Research Institute, Tomsk NRC*

**Аннотация**

В исследование была включена 131 пациентка с наличием высокой степени интраэпителиального повреждения плоского эпителия (HSIL), среди которых была выделена группа с носительством ВПЧ 16 генотипа. Комплексное обследование включало гинекологический осмотр, кольпоскопию, цитологическое и гистологическое исследование, обнаружение и генотипирование ДНК ВПЧ ВКР, исследование вирусной нагрузки и физического статуса ДНК ВПЧ16. Было установлено, что частота возникновения рецидивов при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях определяется с учетом физического статуса ВПЧ16.

**Abstract**

The study included 131 patients with a high grade squamous intraepithelial lesion (HSIL), among which a group with HPV genotype 16 was allocated. The comprehensive survey included colposcopy, cytological and histological analysis, detection and genotyping of high-risk human papillomavirus, viral load and physical status of HPV16 DNA. It was found that the incidence of relapse in cervical interepithelial neoplasia is determined by the physical status of HPV 16.

Вирус папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска (ВКР) является важнейшим этиологическим фактором возникновения рака шейки матки (РШМ). ВПЧ инфицирует активно пролиферирующие клетки базального слоя эпителия, при этом высокоонкогенные типы поражают преимущественно зону трансформации шейки матки. Следствием инфицированности ВПЧ ВКР являются морфологические изменения эпителия шейки матки, приводящие к развитию цервикальных интраэпителиальных неоплазий различной степени тяжести — LSIL (Low grade squamous intraepithelial lesion, низкая степень интраэпителиального повреждения плоского эпителия) и HSIL (High grades quamous intraepithelial lesion, высокая степень интраэпителиального повреждения плоского эпителия) с возможным последующим озлокачествлением. Согласно мировым литературным данным, именно пациенткам с высокой степенью интраэпителиального повреждения плоского эпителия (HSIL) необходимо быстрое и точное назначение и проведение терапевтического и хирургического лечения с учетом всех сопутствующих клинических показателей. Кроме того, у данной группы пациенток повышен риск рецидивирования и малигнизации, что делает прогнозирование этого риска актуальной задачей.

В качестве стандартного показателя инфицирования вирусом применяется оценка вирусной нагрузки ВПЧ ВКР. Многократно показано, что клинически значимая вирусная нагрузка ( $>3 \text{ Ig}$ ) статистически чаще наблюдается у больных с высокой степенью интраэпителиального повреждения плоского эпителия по сравнению с пациентами с LSIL. Подобная закономерность прослеживается и при сформировавшейся злокачественной патологии шейки матки — у больных РШМ статистически чаще наблюдается клинически значимая вирусная нагрузка, чем у пациентов с интраэпителиальной неоплазией. Однако, согласно результатам предыдущих исследований, с помощью вирусной нагрузки нельзя прогнозировать безрецидивную выживаемость при раке шейки матки. Другим показателем вирусной инфекции, который исследуется в настоящее время, является физический статус вируса. Согласно современным литературным данным, ВПЧ после проникновения в клетку, может существовать в 3-х различных функциональных состояниях: эписомальная форма (вне хромосом клетки), интегрированная (встроена в геном клетки-хозяина) и смешанная форма (комбинация эписомальной и интегрированной форм). Показано, что физический статус может использоваться как прогностический фактор при РШМ и, используя его, можно прогнозировать течение и исход болезни.

Было проведено вирусологическое исследование с включением 131 пациентки с наличием высокой степени интраэпителиального поражения плоского эпителия. Материалом для исследования служил соскоб

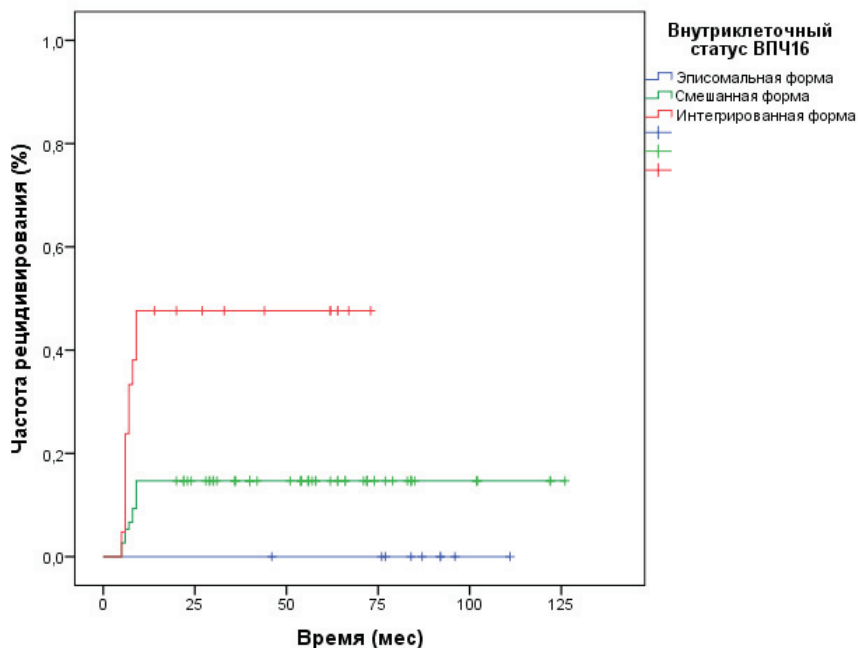
эпителии цервикального канала и наружной части шейки матки. Всем пациенткам было проведено комплексное обследование, которое включало следующие этапы: гинекологический осмотр, кольпоскопию, проведение цитологического и гистологического исследования для последующей верификации диагноза. После проведения генотипирования ДНК ВПЧ, среди всех обследованных пациенток была выделена группа с носительством ВПЧ 16 генотипа ( $n=112$ ). Основной методикой явилась технология ПЦР в режиме реального времени, с помощью которой было проведено качественное и количественное определение ДНК ВПЧ. ПЦР-анализ проводился при помощи набора реагентов «Amplisens®» ВПЧ ВКР скрин-титр-FL» (с дифференциацией 16 генотипа) (Россия, Москва). Анализ результатов исследования ДНК биологического материала осуществлялся при помощи программы, заложенной в стандартную инструкцию к набору реагентов «Amplisens®» ВПЧ ВКР скрин-титр-FL», обработка результатов в которой позволяет оценить вирусную нагрузку и степень интеграции ДНК ВПЧ 16 генотипа. Для оценки влияния внутриклеточного статуса ВПЧ16 и вирусной нагрузки на частоту рецидивирования применялся лог-ранговый критерий, для построения прогностической модели риска развития рецидивов использовался критерий Кокса.

В ходе исследования был проведен анализ частоты возникновения рецидивов при HSIL в зависимости от внутриклеточного статуса ВПЧ (физический статус) и вирусной нагрузки. Статистический анализ (log rank test) показал, что среди HSIL ВПЧ16-положительных пациентов частота рецидивирования зависит от формы интеграции вируса ( $p=0,000$ ) (см. рисунок). При определении у пациенток наличия эписомальной формы ВПЧ 16 типа прогнозируется риск рецидивирования в течение 5 лет равный 0, при этом при определении у пациенток только интегрированной формы вируса вероятность возникновения рецидива заболевания в течение 5 лет с момента возникновения диспластических изменений различной степени тяжести прогнозируется 57 %, при наличии смешанной формы риск рецидивирования оценивается в 25 % ( $p=0,000$ ).

При сравнении основных клинико-патологических параметров у больных всех 3-х представленных групп (эписомальной, смешанной и интегрированной формой вируса) статистически значимых различий в распределении параметров не установлено (данные не представлены). Это показывает, что физический статус ВПЧ является независимым фактором риска рецидивирования при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях тяжелой степени.

В результате исследования были получены данные о частоте рецидивирования при плоскоклеточном интраэпителиальном поражении тяжелой

степени в зависимости от физического статуса ВПЧ16+ больных. Показано, что наилучший прогноз имеют пациентки с эписомальной формой вируса, наихудший — с интегрированной формой. Таким образом, проведение данного анализа позволяет прогнозировать рецидивирование при интраэпителиальных неоплазиях тяжелой степени, что обеспечивает оптимальный выбор персонализированной терапии для больных HSIL.



Частота рецидивирования HSIL  
в зависимости от внутриклеточного статуса ВПЧ ( $p=0,000$ )

**СЕРОМОНИТОРИНГ ЖИВОТНЫХ НА БЛУТАНГ  
НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ ТАДЖИКИСТАН****SEROMONITORING ANIMALS FOR BLUETONGUE  
ON THE TERRITORY OF THE REPUBLIC OF TAJIKISTAN**

Ж. К. Курманбекова<sup>1</sup>, Ж. К. Кошеметов<sup>2</sup>, Х. Б. Абеуов<sup>2</sup>, М. Ж. Каукарбаева<sup>3</sup>

*<sup>1</sup> Костанайский государственный университет  
им. А. Байтурсынова Республики Казахстан*

*<sup>2</sup> РГП Научно-исследовательский институт проблем биобезопасности  
КН МОН Республики Казахстан*

*<sup>3</sup> Казахский Национальный аграрный университет Республики Казахстан*

J. K. Kurmanbekova<sup>1</sup>, Zh. K. Koshemetov<sup>2</sup>,  
Kh. B. Abeuov<sup>2</sup>, M. Zh. Kaukarbayeva<sup>3</sup>

*<sup>1</sup> Kostanay state University named after A. Baitursynov of the Republic of  
Kazakhstan*

*<sup>2</sup> RGE "Research Institute for Biological Safety Problems" of Science  
Committee of Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan*

*<sup>3</sup> Kazakh national agrarian University of the Republic of Kazakhstan*

E-mail: [zhumagali@srai.kz](mailto:zhumagali@srai.kz), [julduz\\_87@list.ru](mailto:julduz_87@list.ru)

**Аннотация**

Проведен серомониторинг среди овец на блутанг на территории Республики Таджикистан. Из исследованных 275 проб сыворотки крови овец наличие антител к вирусу блутанга были выявлены в 94 пробах. В ходе опыта для исследования сывороток крови животных в иммуноферментном анализе (ИФА) были использованы диагностические наборы французского и казахстанского производства.

**Abstract**

Held seromonitoring among the sheep to bluetongue on the territory of the Republic of Tajikistan. Out of the 275 serum samples of sheep the presence of antibodies to the virus of bluetongue was detected 94 samples. In the course of the experiment, diagnostic kits of French and Kazakh production were used for the study of animal blood sera in the immune-enzyme analysis.

**Блутанг** — инфекционное неконтагиозное заболевание крупного рога-

того скота, овец, коз и диких жвачных животных. По классификации МЭБ отнесено к опасным заболеваниям [1, 2, 3].

Возбудителем заболевания является вирус рода *Orbivirus* семейства *Reoviridae*. Серогруппа вируса **Блутанга** включает в себя 26 серотипа антигенно классифицированных в перекрестной реакции нейтрализации. Для каждой антигенной группы определен штамм — прототип. Вирус каждого серотипа создает прочный и длительный иммунитет только против гомологичного типа и незначительный — против гетерологичного [4].

Заболевание скота **блутангом** было впервые зарегистрировано на африканском континенте в Южной Африке и протекало среди местного скота практически бессимптомно. Злокачественный характер приобрело в связи с завозом в Африку европейских высокочувствительных к возбудителю пород овец.

За пределами Африканского континента болезнь регистрируют с 1943 г.: в виде тяжелой эпизоотии на о. Кипр, в Палестине и Сирии в 1943 г.; в 1944 г. — в Турции и Иране; в 1948 г. — в Америке; в 1962–1964 гг. — в Южной Америке; в 1972 г. — в Египте. В Европе до последнего времени заболевание было зарегистрировано в Испании и Португалии в 1956 г. а в 2007 г. в Англии. Германии и других европейских странах. С 1993 г. некоторые районы Бурятии на территории Российской Федерации считаются неблагополучными (по результатам серологического мониторинга) [5, 6].

В период с 2014 по 2017 годы на основе Генерального соглашения о научно-техническом сотрудничестве между РГП «НИИ проблем биологической безопасности» КН МОН Республики Казахстан и Институтом биологической безопасности ТАСХН Республики Таджикистан были проведены серомониторинг, с целью исследования наличие антител к особо опасным инфекционным заболеваниям, такие как блутанг, оспа овец, чума мелких жвачных животных и др.

На данной работе представлены результаты лабораторных исследований проб сывороток крови наличие антител к вирусу блутанга.

В ходе лабораторных исследований были применены диагностические наборы — *competitive ELISA for the detection of antibodies against the BTV VP7 protein in sheep, goat, buffalo or deer serum or plasma samples*. ID Vet. Innovative Diagnostics, France» и тест-система [набор] для выявления антител к вирусу блутанга методом иммуноферментного анализа, СТ 405-1919-04 ГП-042-2011, производства РГП «НИИ проблем биологической безопасности» КН МОН РК.

В качестве исследуемых проб были использованы сыворотки крови овец, отобранных из разных регионов Республики Таджикистан в количестве 275 шт.

Постановки ИФА проводили согласно наставлению набора.

Используемый французский набор рассчитан на выявление антител к вирусу блутанга из сывороток крови овец, коз и крупного рогатого скота и подошва лунки планшет сенсibiliзирoваны очищенным белком VP7, также для выявления результатов реакции использован субстрат тетраметилбензидин.

В состав казахстанского набора входит планшет, сенсibiliзирoванный очищенным антигеном вируса блутанга через сахарозный градиент. Также в качестве субстрата использован субстрат 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid).

В ходе исследований сывороток крови овец на наличие антител к вирусу блутанга одновременно даны оценки на эффективность и чувствительность вышеуказанных двух наборов.

В ходе мониторинга отобраны пробы сывороток крови овец в следующем количестве: из кишлака Алигалабон Нурободского района — 8, кишлака Гулгашт Восейского района — 70, кишлака Шурчашма Восейского района — 21, кишлака Сарои-малик Балджувонского района — 34, кишлака Санговак Ховалингского района — 30, кишлака Ярош Джиргитальского района — 43, кишлака Шахри нав Тавилдаринского района — 35 и кишлака Кибиль Нурекского района — 34.

В результате процент выявляемости антител к вирусу блутанга с французскими наборами составила от 9,3 до 58,8 %, а казахстанскими наборами в пределах 9,3–55,8.

Также из исследованных 275 сывороток крови овец антитела к вирусу блутанга французскими наборами в среднем выявлены 34,18 %, а казахстанскими наборами в 32,73 %.

Из данных опытов можно сделать вывод, что казахстанский набор не уступает по эффективности и чувствительности зарубежным аналогам.

В ходе проведенного методом ИФА-диагностических исследований серомониторинга, с использованием французского и казахстанского наборов, была доказана, что на территории Республики Таджикистан, среди поголовья овец циркулирует вирус блутанга.

## Литература

1. Wechsler, S. J. Detection of bluetongue virus by using bovine endothelial cells and embryonated chicken eggs/ S. J. Wechsler, A. J. Luedke// J. Clin. Microbiol. 1991. 29(1). P. 212–214.
2. White, D. M. Lack of detectable bluetongue virus in skin of seropositive cattle: implications for vertebrate overwintering of bluetongue virus/D. M. White, J. O. Mecham // Vet. Ital. 2004. 40 (4). P. 513–519.
3. Duration of bluetongue viraemia and serological responses in experimentally

---

infected European breeds of sheep and goats/ M. Koumbati [et al.] // Vet. Microbiol. 1998. 64. P. 277–285.

4. Вишняков И. Ф. Идентификация и типирование вируса катаральной лихорадки овец / И. Ф. Вишняков и др.// Ветеринария. 1995. № 4. С. 20–25.

5. Мониторинг блютанга у животных, импортированных из стран ЕС/ С. Ж. Цыбанов и др.//Ветеринария. 2008. 10. С. 25–27.

6. Meiswinkel, R.; Goffredo, M., et al. 2008. The *Culicoides* «snapshot»: A novel approach used to assess vector densities widely and rapidly during the 2006 outbreak of bluetongue (BT) in the Netherlands. Preventive veterinary medicine 87(1 2): 98–118.



**ПОЛУЧЕНИЕ И СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА СПЕЦИФИЧЕСКИХ  
СЫВОРОТОК К СЕРОТИПАМ ВИРУСА БЛУТАНГА****OBTAINING AND COMPARATIVE EVALUATION  
OF SPECIFIC SERUMS TO BLUTANG VIRUS SEROTYPES**

Ж. К. Курманбекова<sup>1</sup>, Ж. К. Кошеметов<sup>2</sup>, Х. Б. Абеуов<sup>2</sup>, М. Ж. Каукарбаева<sup>3</sup>

*<sup>1</sup>Костанайский государственный университет  
им. А. Байтурсынова Республики Казахстан*

*<sup>2</sup>РГП Научно-исследовательский институт проблем биобезопасности  
КН МОН Республики Казахстан*

*<sup>3</sup>Казахский Национальный аграрный университет Республики Казахстан*

J. K. Kurmanbekova<sup>1</sup>, Zh. K. Koshemetov<sup>2</sup>,  
Kh. B. Abeuov<sup>2</sup>, M. Zh. Kaukarbayeva<sup>3</sup>

*<sup>1</sup>Kostanay state University named after  
A. Baitursynov of the Republic of Kazakhstan*

*<sup>2</sup>RGE "Research Institute for Biological Safety Problems" of Science  
Committee of Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan*

*<sup>3</sup>Kazakh national agrarian University of the Republic of Kazakhstan*

E-mail: zhumagali@srai.kz, julduz\_87@list.ru

**Аннотация**

Получена специфическая сыворотка к серотипам 4 и 16 вируса блутанга на овцах, активность которых в реакции диффузионной преципитации (РДП) составила 1:16 и 1:32 к серотипу 4, в иммуноферментном анализе (ИФА) 1:3200 и 1:6400.

Полученные сыворотки проверены перекрестно вышеуказанными лабораторными методами.

**Abstract**

It was received a specific serum for serotype 4 and 16 in bluetongue virus, an activity in diffuse precipitation reaction was 1:16 and 1:32 for serotype 4 in ELISA test 1:3200 and 1:6400. Resulting serum is tested in this laboratory technique.

Блутанг — вирусная болезнь жвачных, характеризующаяся поражением слизистой оболочки ротовой и носовой полостей, опуханием языка, отёком морды, лихорадкой, поражением конечностей.

**Возбудитель** — РНК-геномный вирус, относится к семейству Reoviridae, роду Orbivirus. Серогруппа блутанга включает 26 серотипов [1, 2, 3, 4].

В настоящее время система диагностики блутанга, как совокупность связанных между собой вирусологических и серологических методов, основана на выявлении специфических антигенов и антител у наиболее восприимчивых к нему животных — овец, инфекция у которых обычно протекает в острой и подострой форме, и включает комплекс методов выделения вируса с использованием мышат-сосунов и культуры клеток.

Необходимость совершенствования средств и методов диагностики с учетом новых достижений науки и постановки диагноза при бессимптомном течении болезни у крупного рогатого скота поставило перед нами задачу разработки усовершенствованной системы диагностики блутанга у жвачных животных [5, 6].

В данной работе приведены результаты опытов получения специфических сывороток к серотипам 4 и 16 вируса блутанга на овцах, а также лабораторной проверки полученной сыворотки методом перекрестного исследований с антигенами серотипов 4 и 16 вируса блутанга.

Для проведения опыта в качестве объектов исследования выбраны серотипы 16 и 4 вируса блутанга, выращенные стационарным способом в культуре клеток Vero.

РДП и ИФА на блутанга ставили по методикам, отработанным в РГП Научно-исследовательский институт проблем биобезопасности КН МОН Республики Казахстан, которые включают следующие схемы постановки:

### **Реакция диффузионной преципитации**

Для постановки реакции использовали 1,5%-ный агаровый гель «Дифко», приготовленный на 0,01М фосфатно-буферном солевом растворе. В агаре, используя трафарета типа «звездочка», имеющего одну центральную трубку и 6 периферических, делали лунки. Вырезанные кусочки агара извлекали при помощи иглы.

Периферические лунки двух «звездочек» наполняли исследуемым патологическим материалом в цельном виде и разведениях, в центральную лунку одной «звездочки» вносили специфическую сыворотку в рабочем разведении, а второй «звездочки» — нормальную сыворотку в том же разведении. В третьей «звездочке» проводят реакцию с контрольными (специфическими и нормальными) компонентами реакции в рабочем разведении.

После постановки реакции чашки Петри закрывают крышками, ставят под стеклянный колпак с кусочком ваты, смоченным водой (влажная камера) и выдерживали 24 ч при 37 °С и 24 ч при 4 °С.

### **Иммуноферментный анализ**

- сенсibilизацию лунок полистироловых плашек специфическим антигеном проводили в течение 18 ч при 4 °С;
- вносили в каждую лунку раствор наполнителя, контакт 1 ч при 37 °С;
- в лунки плашки вносили разведения исследуемых и контрольных проб, начиная с разведения 1:200, контакт при 37 °С в течение 1,5 ч;
- взаимодействие антивидавого конъюгата с комплексом антиген-антитело в течение 1 ч в термостате при 37 °С;
- взаимодействие с субстратом в течение 15–45 мин при комнатной температуре.

Для иммунизации животных использовали очищенный антиген вируса блутанга. Для этого полученную культуральную вирусосодержащую суспензию с титром инфекционности —  $7,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$  центрифугировали в стерильных стаканах в рефрижераторной центрифуге с целью освобождения от клеточных балластов при 3500 об/мин в течение 30 мин. После окончания центрифугирования к надосадочной жидкости добавляли 7 % ПЭГ-6000 и 3 % хлористый натрия для осаждения антигена вируса блутанга, контакт в течение 2 час при  $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ . После чего суспензию центрифугировали при 3500 об/мин в течение 30 мин, осадок ресуспендировали в растворе 0,002М трис буфером pH-7,5 в объеме, в 100 раз меньшем объеме исходной суспензии. Осадок антигена пропускали через 40%-й сахарозы 35000 об/мин в течение 1 ч и осадок ресуспендировали в растворе 0,002М трис буфером pH-7,5. После этого, добавляли фреон-113 (1:1), и контакт 10 мин при комнатной температуре  $(22\text{--}25)^\circ\text{C}$ , постоянно перемешивали, и откручивали при 1000 об/мин и отбирали водную фазу. Полученный антиген вируса блутанга очищали через сахарозный градиент (20, 40 и 60 %). Очищенный таким способом антиген мы использовали для получения специфической сыворотки к вирусу блутанга.

Для получения специфической сыворотки к серотипам 4 и 16 вируса блутанга использованы клинические здоровые овцы 8–10 мес возраста, не содержащие в крови антитела к вирусу указанной инфекции.

С целью получения специфической сыворотки овец помещали в изолированное помещение и вводили им в область предлопаточных лимфатических узлов подкожно очищенный антиген вируса блутанга в объеме  $2 \text{ см}^3$  каждому животному. За иммунизированными животными вели ежедневное клиническое наблюдение.

По истечении 21 сут животных подвергали двукратной гипериммунизации с интервалом в 7 сут. С этой целью использовали очищенный вирус блутанга серотипов 4 и 16, антигены вводили в область предлопаточных лимфатических узлов с обеих сторон по 5 см<sup>3</sup> суспензию на каждое место введения.

Через каждые 7 сут после последней инъекции у животных из яремной вены брали кровь на сыворотку и определяли титр антител в РДП. При установлении в сыворотках крови необходимого титра проводили тотальное обескровливание.

После получения специфических сывороток серотипам вируса блутанга, их активность и специфичность сравнительно проверяли гомогенными антигенами серотипов 4 и 16, а также перекрестно между собой в РДП и ИФА.

Активность полученных сывороток к серотипу 4 с гомогенным антигеном в РДП составила 1:16, в ИФА — 1:3200, а серотипом 16 (гетерогенный антиген) соответственно 1:8–1:800.

Активность полученных сывороток к серотипу 16 с гомогенным антигеном в РДП составила 1:32, в ИФА — 1:6400, а серотипом 4 (гетерогенный антиген) соответственно 1:4–1:400.

На основании результатов проведенных опытов можно сделать вывод, что на овцах используя очищенного антигена серотипов 4 и 16 вируса блутанга можно получить довольно активную и специфичную сыворотку, в то же время сыворотки полученных к серотипам 4 и 16 при перекрестной постановке реакций активность сыворотки оказалась один порядок ниже.

## Литература

1. Duration of viraemia infectious to *Culicoides sonorensis* in bluetongue virus-infected cattle and sheep/ K. R. Bonneau [et al.] // *Vet. Microbiol.* 2002. 88(2). P. 115–125.
2. Experimental reproduction of bluetongue virus serotype 8 clinical disease in calves/ F. Dal Pozzo [et al.] // *Vet.Micr.* 2009. 136. P. 352–358.
3. Foster, N. M. Bluetongue in sheep and cattle: efficacy of embryonating chicken eggs in viial isolations/ N. M. Foster, A. J. Luedke, H. E. Metcalf // *Am. J. Vet. Res.* 1972. 33(1). P. 77–81.
4. Howard, T. H. Isolation of bluetongue virus from bull semen/ T. H. Howard, R. A. Bowen, B. W. Pickett // *Prog. Clin. Biol. Res.* 1985. 178. P. 127–134.
5. Вялых Иван Владимирович. Автореферат на соискание кандидата ветеринарных наук. Покров. 2011. Усовершенствование системы лабораторной диагностики Блютанга.
6. Shringi, S. Comparative efficacy of standard AGID, CCIE and competitive ELISA for detecting bluetongue virus antibodies in indigenous breeds of sheep and goats in Rajasthan, India/ S. Shringi, B. N. Shringi // *J. Vet. Sci.* 2005. 6(1). P. 77–79.

**АНТИВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНЫХ АЗОЛОАЗИНОВ  
ПРОТИВ ВИРУСА КОКСАКИ В3 *IN VITRO*****ANTIVIRAL ACTIVITY OF AZOLOAZINE-BASED COMPOUNDS  
AGAINST COXSACKIE VIRUS B3 *IN VITRO***

К. С. Ланцева<sup>1</sup>, А. С. Волобуева<sup>2</sup>, В. В. Зарубаев<sup>2</sup>,  
Р. А. Дрокин<sup>3</sup>, К. С. Савватеев<sup>3</sup>, В. Л. Русинов<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Санкт-Петербургский государственный университет,  
Санкт-Петербург*

<sup>2</sup>*НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург*  
<sup>3</sup>*ФГАОУ ВО «УрФУ им. первого Президента России Б. Н. Ельцина»*

K. S. Lantseva<sup>1</sup>, A. S. Volobueva<sup>2</sup>, V. V. Zarubaeв<sup>3</sup>,  
R. A. Drokin<sup>3</sup>, K. S. Savvateev<sup>3</sup>, V. L. Rusinov<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*SPBU, Russia*

<sup>2</sup>*Saint-Petersburg Pasteur Institute, Russia*

<sup>3</sup>*FSAEI HE UFU named after the first President of Russia B. N. Yeltsin»*

**Аннотация**

Соединения класса азолоазинов показывают низкую токсичность, прямое противовирусное действие против вируса Коксаки В3 и работают на ранних стадиях инфекционного цикла.

**Abstract**

Class of azoloazines is promising for the antiviral drugs development due to their low toxicity, certain cytoprotectively and direct antiviral activity against Coxsackie B3 virus. They work at early stages of virus infection cycle.

Вирус Коксаки В (CVB) — это патогенный энтеровирус, способный вызывать вирусный миокардит и вирусный энцефаломиокардит. Инфекция развивается в основном у новорожденных и маленьких детей и при тягчайших формах смерть пациента наступает в течение нескольких часов после появления первых симптомов. На сегодняшний день против данного вируса

не существует этиотропных препаратов, одобренных FDA, что делает поиск таких соединений перспективной темой исследований.

### Материалы и методы

Противовирусную активность в отношении CVB типа 3 (штамм Nancy) и цитотоксичность азолазинов определяли с использованием анализа цитопротекции в клетках Vero. Четырехкратные разведения исследуемых веществ (200 мкг/мл — 3 мкг/мл питательной среды) вносили в монослойную культуру клеток Vero в 96-луночных планшетах с последующим добавлением CVB3 в количестве MOI (multiplicity of infection) 0,01. После инкубации при 37 °С в течение 48 часов дыхательную активность клеток оценивали методом МТТ-теста при длине волны 535 нм. Ингибирование продукции вируса рассчитывали для каждой исследуемой концентрации соединения относительно контрольных образцов: контроль клеток и контроль вируса. Жизнеспособность клеток рассчитывали для каждой исследуемой концентрации. Значение полумаксимальной эффективной концентрации (EC50) и полумаксимальной цитотоксической концентрации (CC50) для каждого соединения определяли методом нелинейной регрессии, индекс селективности (IS) вычисляли из отношения значения CC50 к EC50. Прямая противовирусная активность была определена по снижению инфекционной активности вируса в клетках Vero. Трехкратные разведения исследуемых веществ (300 мкг/мл — 3 мкг/мл питательной среды) вносили в монослойную культуру клеток Vero в 96-луночных планшетах с последующим добавлением CVB3 при MOI 0,01. После инкубации при 37 °С в течение 1 часа клетки отмывали и добавляли к ним трехкратные разведения исследуемых веществ, после чего инкубировали при 37 °С в течение 24 часов. После инкубации десятикратные разведения инкубированной клеточной среды вносили в новую монослойную культуру клеток Vero в 96-луночных планшетах. После инкубации при 37 °С в течение 48 часов наличие цитопатического действия (ЦПД) вируса оценивали визуально. Критерием отбора перспективного соединения считали значение IS выше 10. Для определения, на каком из этапов вирусного цикла происходит действие препаратов, в монослойную культуру клеток Vero в 24-луночных планшетах соединения в дозе 1/3 CC50 добавляли через различные промежутки времени по отношению к моменту инфицирования клеток. Инфекционную активность вирусного потомства оценивали при помощи титрования на клетках. В монослойную культуру клеток Vero в 96-луночных планшетах вносили инкубированную клеточную среду в десятикратных разведениях и инкубировали при 37 °С в течение 48 часов. Наличие ЦПД оценивали визуально. Для моделирования

взаимодействия лиганда с рецептором использовали модель белка вирусного капсида CVB3 Nancy (PDB JEW1) и программное обеспечение MGL tools, Cygwin и Discovery Visualizer.

### **Результаты**

В общей сложности проанализировано 86 веществ. Из них являются нетоксичными 24 (CC50 больше 200 мкг/мл), из них 5 показали цитопротективную и противовирусную активность (IS больше 80) при MOI 0.01. Соединение-лидер имеет индекс селективности, равный 3749.

При анализе «структура-активность» были выявлены следующие закономерности: соединения с заместителем проп-2-инилсульфанил-1(проп-2-ине-1-тиол) в 2 позиции являются нетоксичными (4 соединения). Исключением является соединение с заместителем бензен-1,3-диол в 8 позиции, скорее из-за свойств данного заместителя (CC50 равно 8.37 мкг/мл). Также нетоксичны триазолоазины с тиофеновым заместителем в 8 позиции.

Перспективные препараты работают при начальных стадиях цикла вирусной инфекции, и профиль их действия схож с профилем плеконарила.

### **Вывод**

Класс азолоазинов является перспективным для разработки противовирусных препаратов с связи с низкой цитотоксичностью и определенной противовирусной активностью. Требуется дальнейшее изучение механизмов действия соединений-лидеров и проверка их активности и токсичности *in vivo*.

## ХИМЕРНОЕ АНТИТЕЛО ЗАЩИЩАЕТ МОДЕЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ ОТ ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО, СИБИРСКОГО И ЕВРОПЕЙСКОГО СУБТИПОВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА \*

CHIMERIC ANTIBODY PROTECTS MICE AGAINST THE FAR-EASTERN, SIBERIAN, AND EUROPEAN TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS

А. Л. Матвеев<sup>1</sup>, И. В. Козлова<sup>2</sup>, О. В. Стронин<sup>3</sup>, Л. А. Емельянова<sup>1</sup>,  
Я. А. Хлусевич<sup>1</sup>, И. К. Байков<sup>1</sup>, Н. В. Тикунова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины

<sup>2</sup> ФГБНУ «Научный центр проблем  
здоровья семьи и репродукции человека»

<sup>3</sup> Федеральное государственное унитарное предприятие «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген», филиал в г. Томск, НПО «Вирион»

A. L. Matveev<sup>1</sup>, I. V. Kozlova<sup>2</sup>, O. V. Stronin<sup>3</sup>,  
L. A. Emeljanova<sup>1</sup>, Ya. A. Khlusevich<sup>1</sup>, I. K. Baykov<sup>1</sup>, N. V. Tikunova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Federal State Public Scientific Institution  
«Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine»

<sup>2</sup> Federal State Public Scientific Institution «Scientific Centre for Family Health  
and Human Reproduction Problems»

<sup>3</sup> Federal State Unitary Company “Microgen Scientific Industrial Company  
for Immunobiological Medicines” of the Health Ministry of The Russian  
Federation, Branch in Tomsk

E-mail: guterus@gmail.com

### Аннотация

Для экстренной профилактики и терапии клещевого энцефалита (КЭ) в России применяют сывороточный иммуноглобулин, получаемый из донорской крови. С це-

---

© А. Л. Матвеев, И. В. Козлова, О. В. Стронин, Л. А. Емельянова, Я. А. Хлусевич, И. К. Байков, Н. В. Тикунова, 2019

\* Исследования выполнены при поддержке стипендии Президента Российской Федерации молодым ученым и аспирантам, осуществляющим перспективные научные исследования и разработки по приоритетным направлениям модернизации российской экономики, на 2019–2021 годы».



люю создания альтернативного препарата, в производстве которого не используется донорская кровь, было сконструировано химерное антитело FVN-145 против гликопротеина Е вируса КЭ.

Цель настоящего исследования: изучение протективных свойств антитела FVN-145 в отношении Дальневосточного, Сибирского и Европейского субтипов в экспериментах *in vivo*.

Результаты показали высокую эффективность антитела FVN-145 для экстренной профилактики инфекции у мышей, зараженных любым из использованных штаммов ВКЭ.

В работе использовали периферийную мышиную модель КЭ; антитело FVN-145 вводили внутримышечно через один день после интраперитонеального заражения мышей штаммами ВКЭ Софьин, Васильченко и Абсеттаров. Препаратом сравнения являлся противоклещевой сывороточный иммуноглобулин.

Показано, что в животной модели протективная активность антитела FVN-145 превышает таковую противоклещевого сывороточного иммуноглобулина, и антитело FVN-145 может быть использован для создания терапевтического препарата для экстренной профилактики КЭ.

### Abstract

In Russia, serum immunoglobulin produced from the donor blood is currently used for post-exposure prophylactic and therapy of tick-borne encephalitis virus (TBEV). To develop an alternative preparation, which does not include donor blood, chimeric antibody FVN-145 against glycoprotein E of TBEV was constructed.

This study was aimed to investigation of protective efficacy of antibody FVN-145 against the Far-Eastern, Siberian, and European subtypes of TBEV in *in vivo* experiments.

A peripheral mouse model of tick-borne encephalitis was used in this study: antibody 14D5 was administrated intravenously in mice one day after intraperitoneal infection them with TBEV strains Sofjin, Vasilchenko, and Absettarov. Anti-TBEV serum immunoglobulin was used as a control preparation.

Obtained results demonstrated high efficacy of the FVN-145 in post-exposure prophylaxis of the disease in mice infected with any of the used TBEV strains.

It was shown that protective efficacy of antibody FVN-145 is higher than that of the anti-TBEV serum immunoglobulin, and antibody FVN-145 could be used for development of a therapeutic preparation for post-exposure prophylaxis.

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ), представитель семейства Flaviviridae, является этиологическим агентом одной из наиболее грозных нейроинфекций на территории Российской Федерации. Кроме РФ, заболевания, вызванные ВКЭ, регистрируются во многих европейских странах, причем наибольшая заболеваемость клещевым энцефалитом (КЭ) регистрируется в России, Словении и в странах Балтии [1]. В Российской Федерации в последние годы более половины всех случаев КЭ и летальных исходов

от этого заболевания регистрировались в Сибирском федеральном округе [2]. Следует также отметить, что расширение ареала ВКЭ, наблюдаемое в последние годы в ряде эндемичных регионов, заметнее всего в СФО, где в пяти территориальных образованиях (Красноярский край, Новосибирская и Омская области, Республики Тыва и Хакасия) ареал КЭ увеличился по крайней мере на одну административную территорию в каждом [2].

В настоящее время официально признано наличие трех субтипов ВКЭ — Дальневосточного, Сибирского и Европейского [3], причем считается, что Дальневосточный субтип ВКЭ вызывает наиболее тяжелые формы заболевания, а Европейский субтип — легкие формы КЭ [4].

Для экстренной профилактики и терапии КЭ в Российской Федерации применяют сывороточный иммуноглобулин, получаемый из крови доноров, проживающих в природных очагах заболевания. Этот препарат обладает защитным эффектом особенно при введении в 1–2 день после укуса клеща. К сожалению, эффективность защиты таким препаратом колеблется от партии к партии. Кроме того, как и все препараты на основе донорской крови, он обладает определенными недостатками.

С целью создания альтернативного препарата, в производстве которого не используется донорская кровь, было сконструировано оригинальное химерное антитело против гликопротеина E ВКЭ. Антитело сконструировали на основе переменных доменов вируснейтрализующего моноклонального антитела 14D5, полученного ранее [5], и константных доменов IgG1/карра человека. Сродство созданного антитела FVN-145 к белку E ВКЭ составило  $2,6 \times 10^{10}$  M<sup>-1</sup>; индекс нейтрализации (IC<sub>50</sub>) в экспериментах *in vitro* — 0,043 мкг/мл; степень гуманизации — 98,3 % [6]. В предварительных экспериментах с использованием мышиной модели было показано, что сконструированное антитело обладало специфической противовирусной активностью и обеспечивало экстренную профилактику мышей от инфекции, вызванной ВКЭ, штамм Абсеттаров, принадлежащим к Западному субтипу [6]. Однако, наибольшую опасность на территории РФ представляют штаммы ВКЭ, относящиеся к Дальневосточному и Сибирскому субтипам [3].

Протективную активность антитела FVN-145 исследовали в периферической мышиной модели, описанной ранее [7]. Животным, зараженным вирусами клещевого энцефалита штамм Абсеттаров (КЭ Европейского субтипа), штамм Софьин (ВКЭ сибирского субтипа) и штамм Васильченко (ВКЭ Сибирского субтипа), через 24 часа однократно вводили антитело FVN-145 в дозировках 100 мкг/мышь и 10 мкг/мышь, а также противоклещевой сывороточный иммуноглобулин в дозировках 100 мкг/мышь и 10 мкг/мышь. Результаты экспериментов показали наличие протективной активности у антитела FVN-145, которое в дозировке 100 мкг/мышь обеспечило не

менее 90 % выживаемость у экспериментальных животных, а в дозировке 10 мкг/мышь — не менее 50 % выживаемость при введении каждого из субтипа ВКЭ. Эффективность коммерческого противоклещевого сывороточного иммуноглобулина была ниже, и в дозировке 100 мкг/мышь препарат обеспечил выживаемость менее 40 % мышей, а в дозировке 10 мкг/мышь он был неэффективен.

Проведенные эксперименты показали, что химерное антитело FVN-145 обладает протективной активностью в отношении Дальневосточного, Сибирского и Западного субтипов ВКЭ и эффективно защищает мышей при введении через 24 часа после их заражения летальными дозами штаммов этих субтипов. Показано, что в животной модели протективная активность антитела FVN-145 превышает таковую противоклещевого сывороточного иммуноглобулина.

### Литература

1. World Health Organization (WHO) (2011). Vaccines against tick-borne encephalitis. WHO position paper: recommendations // *Vaccine*. 2011. V. 29 № 48. P. 8769–8770.
2. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2016 году: Государственный доклад. М // Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. 2017 1 220с
3. Gritsun TS et al. Tick-borne encephalitis // *Antiviral Research*. 2003 57. P. 129–146.
4. Mandl CW. Steps of the tick-borne encephalitis virus replication cycle that affect neuropathogenesis // *Virus Res*. 2005. V. 111 № 2. P. 161–174.
5. Tsekhanovskaya NA et al. Epitope analysis of tick-borne encephalitis (TBE) complex viruses using monoclonal antibodies to envelope glycoprotein of TBE virus (persulcatus subtype) // *Virus Res*. 1993. V. 30. P. 1–16.
6. Байков ИК, et al. A protective chimeric antibody to tick-borne encephalitis virus // *Vaccine* 2014. V. 32. P. 3589–3594.
7. Тимофеев А. В., и соавт. Протективная активность бактериальной плазмиды, несущей ген неструктурного белка NS1 вируса клещевого энцефалита // *Вопросы вирусологии*. 2001. Т. 46. С. 22–24.

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ ХЛАМИДИОЗНОГО АБОРТА ОВЕЦ

### COMPARATIVE EFFICIENCY OF SEROLOGICAL METHODS OF DIAGNOSTICS OF SHEEP CHLAMYDIA ABORTION

К. Г. Маткеримова<sup>1</sup>, Х. Б. Абеуов<sup>2</sup>, Ж. К. Кошеметов<sup>2</sup>, М. Ж. Каукарбаева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Казахский национальный аграрный университет Республики Казахстан

<sup>2</sup>РГП Научно-исследовательский институт проблем биобезопасности  
КН МОН Республики Казахстан

K. G. Matkerimova<sup>1</sup>, Kh. B. Abeuov<sup>2</sup>,  
Zh. K. Koshemetov<sup>2</sup>, M. Zh. Kaukarbayeva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Kazakh national agrarian University of the Republic of Kazakhstan*

<sup>2</sup>*RGE "Research Institute for Biological Safety Problems" of Science  
Committee of Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan*

E-mail: arshyn\_91-91@mail.ru

#### Аннотация

Сравнительно изучена эффективность серологических реакций при диагностике хламидиозов сельскохозяйственных животных. В результате исследований была показана высокая чувствительность иммуноферментного анализного (ИФА) метода диагностики хламидиозного аборта овец, далее по эффективности идут реакций: связывания комплемента (РСК), непрямой гнемаагглютинации (РНГА) и непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ).

#### Abstract

The efficiency of serological reactions in the diagnosis of chlamydia of farm animals was studied comparatively. The studies demonstrated a high sensitivity ELISA diagnostic method chlamydioses abortion of sheep, then go for the efficiency of reactions: binding of complement, indirect hemagglutination and indirect immunofluorescence assay.

Хламидийные инфекции широко распространены среди всех видов млекопитающих животных и птиц. Хламидиозы животных, также известный как энзоотический аборт, вызывается бактерией *Chlamydomphila abortus* [1, 2].

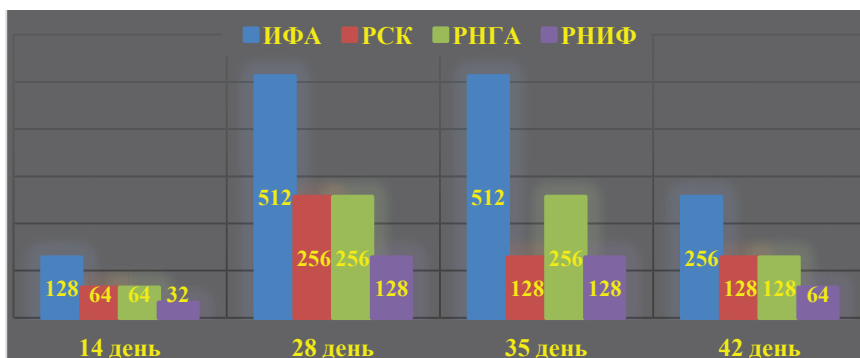
Энзоотической аборт обычно происходит в последние 2–3 недель беременности и характеризуется рождением мертвых приплодов и воспалением плаценты. Однако инфекция может также проявляться рождением живых или слабых приплодов, которые живут не дольше, чем 48 часов.

Часто, латентное, стертое или хроническое течение инфекционного процесса при хламидиозе, значительно усложняет контроль хламидийных энзоотий. Очень редко можно наблюдать признаки, прогнозирующие аборт, хотя изменения в поведении и вагинальные выделения можно наблюдать в последние 48 часов беременности. Диагностика хламидиозов животных зависит от выделения и идентификации возбудителя или его нуклеиновой кислоты в материалах аборта или вагинальных выделений у недавно абортировавших маток [3].

В результате проведенных научно-исследовательских работ (НИР) нами изучена динамика комплементсвязывающих, гемагглютинирующих и флуоресцирующих антител в сыворотке крови экспериментальных зараженных и привитых эмульсин-вакциной против хламидиозного аборта овец животных.

В процессе выполнения НИР методами серологических и микроскопических исследований были обследованы на хламидийную инфекцию пробы сывороток и патматериалов от овец, принадлежащих крестьянским хозяйствам Алматинской области.

В качестве серологического теста использовали реакции связывания комплемента, непрямых гемагглютинации, иммунофлуоресценции и иммуноферментный анализ с пробами сывороток животных. Реакции ставили по общепринятой методике по лабораторной диагностике хламидиозного аборта овец. Результаты сравнительного изучения эффективности серологических тестов при диагностике хламидиозного аборта приведены в диаграмме.



В результате исследований была показана высокая чувствительность иммунноферментного анализного (ИФА, титр обнаруженных антител — 1:512) метода диагностики хламидиозного аборта овец, далее по эффективности идут реакции: связывания комплемента (РСК, титр обнаруженных антител — 1:256), непрямого гемагглютинации (РНГА, титр обнаруженных антител — 1:256) и непрямо́й иммунофлуоресценции (РНИФ, титр обнаруженных антител — 1:128).

Таким образом, нами установлено, что при диагностике хламидиозного аборта овец высокой чувствительностью обладает ИФА-метод, далее идут РСК, РНГА и РНИФ.

### Литература

1. Абеуов Х. Б. Разработка технологии приготовления диагностического антигена хламидиозного аборта овец для реакции связывания комплемента [Текст]: дисс... канд. вет. наук: 06.00.03: защищена 15.09.2004 г., утверждена: 26.05.2005 г. Абеуов Хайрулла Бялович. Алматы, 2004. 129 с.
2. Хусаинов Ф.М Клинико-эпизоотологические особенности и разработка средств специфической профилактики хламидиоза сельскохозяйственных животных / Ф.М Хусаинов, В. В. Евстифеев, Л.А Барбарова, Р.Х Хамадеев // Ветеринарный врач. 2005. № 2. С. 42–48.
3. Kh. Abeuov E. Mahashov A. Kuldeev et. al. Electron microscopic studies of Chlamydia grown in cell culture // Seattle-2013: 4th International Academic Research Conference on Business, Education, Nature and Technology. Part 4: Kazakhstan. November 4–5, 2013, Seattle, WA, USA.

**ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ВИРУСА  
ЛЕСА СЕМЛИКИ И ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ  
В ОРГАНАХ МЫШЕЙ ЛИНИИ BALB/C, ИНФИЦИРОВАННЫХ ИМ**

STUDYING THE GENETIC VARIABILITY OF SEMLIKA FOREST VIRUS  
AND PATHOMORPHOLOGICAL CHANGES IN ORGANS  
OF THE BALB/C MICE INFECTED BY THEM

А. С. Межевалова, В. А. Терновой, Т. П. Микрюкова,  
Е. В. Протопопова, А. Н. Швалов, О. С. Таранов, В. Б. Локтев

*ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия*

A. S. Mezhevalova, V. A. Ternovoi, T. P. Mikryukova, E. V. Protopopova,  
A. N. Shvalov, O. S. Taranov, V. B. Loktev

*FBRI SRC VB «Vector», Rospotrebnadzor, Russia*

**Аннотация**

В исследовании использовался штамм вируса леса Семлики, выделенный из крови пациента в 1953 году в Танзании. В ходе работы получена полногеномная последовательность штамма Tanzania53, а также изучена его способность к адаптации на различных клеточных культурах при проведении трех последовательных пассажей. Проведено светооптическое исследование органов мышей, инфицированных данным штаммом.

**Abstract**

The study used the strain of Semliki forest virus which isolated from a patient's blood in 1953 in Tanzania. The complete genome sequence of Tanzania53 strain was obtained and adaptive ability of this strain to various cell cultures during three consecutive passages was studied in this research. The light-optical examination of the mice organs which was infected with this strain was conducted.

В последнее десятилетие наблюдается тенденция к росту частоты эпидемий, вызываемых вирусами, передающихся трансмиссивным путем. Бесконтрольное распространение вирусных заболеваний, передающихся комарами, создает серьезную проблему для общественного здравоохранения во всем мире. Стремительная миграция данных инфекций по земному шару

связана не только с расширением ареала членистоногих переносчиков возбудителей данных заболеваний, но и с высокой мобильностью людей между континентами с помощью авиаперелетов. Естественными членистоногими переносчиками представителей рода *Alphavirus* (семейство *Togaviridae*) являются комары рода *Aedes*, которые распространены в Европе, укоренились в средиземноморском бассейне и встречаются в районах Черноморского побережья.

В настоящее время данные, имеющиеся в научной литературе, не дают в полной мере понять особенности адаптивного потенциала и механизмы адаптации к различным хозяевам некоторых альфавирусов, а также их патогенез.

Цель исследования: изучить особенности адаптации вируса леса Семлики к различным хозяевам при инфицировании различных культур клеток и особенности патогенеза заболевания на модели мышей линии Balb/c.

Для исследования был использован штамм вируса Chikungunya Ross late, выделенный из крови пациента в Танзании в 1953 году, также содержащий вирус леса Семлики. Культивирование вирусного материала осуществлялось на клетках С6/36 (клетки комара *Aedes albopictus*), Vero E6 (клетки почки африканской зеленой маргитки), СПЭВ (клетки почки эмбриона свиньи), НЕК293 (клетки почки эмбриона человека). На данных культурах клеток проводилось 3 последовательных пассажа вируса. Для идентификации наличия вируса и изменений в его геноме при пассировании использовался метод ОТ-ПЦР с использованием специфических праймеров и последующим секвенированием полученных ампликонов по Сэнгеру. Для получения полногеномной последовательности использовался метод NGS-секвенирования. Для изучения патогенеза вируса леса Семлики проводилось подкожное инфицирование мышей линии BALB/c различными дозами вируса —  $10^8$  ТЦПД<sub>50</sub>/мл,  $10^7$  ТЦПД<sub>50</sub>/мл,  $10^6$  ТЦПД<sub>50</sub>/мл; животным из контрольной группы подкожно вводили стерильную культуральную среду. У животных, проявивших симптомы заболевания, производился забор органов (головной мозг, селезенка, почка, печень) для светооптической микроскопии. Образец головного мозга, имеющего наибольшие патоморфологические изменения, был использован для электронной микроскопии.

После заражения клеточной культуры Vero E6 штаммом Chikungunya Ross late методом ОТ-ПЦР с использованием специфических для генома альфавирусов праймеров и секвенированием по Сэнгеру полученных ампликонов и дальнейшего сравнения их с последовательностями из базы данных GenBank, было определено, что данная последовательность принадлежит геному вируса леса Семлики. Данный штамм был отделен от смеси вирусов в пробе и назван Tanzania53, получена его полногеномная после-



довательность, которая была депонирована в международной базе данных GenBank с номером МК 280688.

Филогенетический анализ полногеномной последовательности вируса леса Семлики Tanzania 53 показал, что наибольшая гомология наблюдалась между штаммом Tanzania 53 и штаммом VietNam (EU350586) (рис. 1).

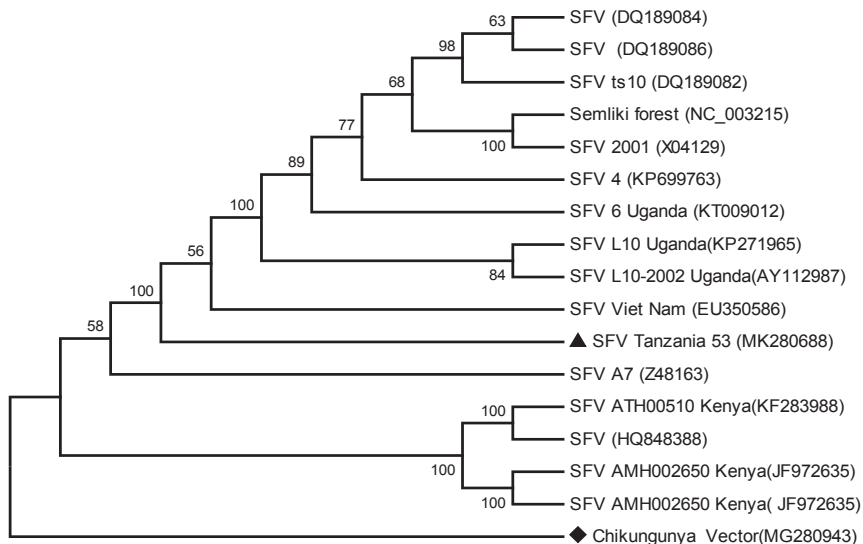


Рис. 1. Филогенетический анализ полногеномной последовательности вируса леса Семлики. Вирус леса Семлики Tanzania53 обозначен символом ▲, в качестве группы сравнения взят штамм чикунгуньи Ross (Vector), обозначенный ◆

После проведения 3 последовательных пассажей на каждой культуре клеток ЦПД наблюдалось через 24 часа после инфицирования у культур VeroE6 и СПЭВ, а на культурах клеток С6/36 и НЕК293 — через 48 часов.

Далее был проведен анализ последовательностей генома альфавирусов на наличие нуклеотидных замен при пассировании. В области гена nsP4 обнаружена несинонимичная нуклеотидная замена после третьего пассажа на культуре клеток С6/36, которая привела к изменениям в первичной структуре белка — замене аминокислоты метионин на лизин (М→К) по 426 положению в пептиде. Также, после второго пассажа на этой культуре клеток произошла замена аминокислоты глутамат на лизин (Е→К) в 544 положении. В области гена Е2 обнаружены замены при пассировании на клетках НЕК293, которые были выявлены после 3го пассажа и также привели к за-

менам аминокислот. В 209 положении произошла замена глицина на аминокислоту валин (G→V), а в 200 положении — аспарагина на лизин (N→K) (рис. 2).

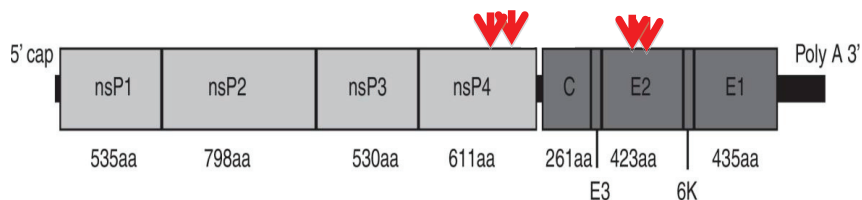


Рис. 2. Нуклеотидные замены, произошедшие при пассировании вируса леса Семлики на различных клеточных культурах

Для изучения вирулентности и патогенеза вируса были заражены мыши линии Balb/c. Среди мышей из группы, зараженных дозой  $10^8$  ТЦПД<sub>50</sub>/мл, спустя 48 часов произошла гибель двух животных, образцы их органов изъяты не были. Среди подопытных мышей из группы, зараженных дозой  $10^7$  ТЦПД<sub>50</sub>/мл проявились симптомы заболевания у одного животного — слабость задних конечностей, неактивное состояние. Исследование морфологии печени этого животного показало, что ткань имеет признаки умеренной белковой дистрофии. Из 3й группы опытных животных, зараженных дозой  $10^6$  ТЦПД<sub>50</sub>/мл, симптомы заболевания проявились у двух животных. После изучения образцов органов животных, было выявлено, что селезенка и почка находятся в нормальном состоянии, однако, образец мозга имел вакуолизацию клеток серого вещества и рассеянные диффузные инфильтрации у одной мыши, и очаги некроза и лейкоцитарные инфильтрации у другой мыши.

**РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ  
ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ С В ГОРОДЕ СЕВАСТОПОЛЕ****A RETROSPECTIVE ANALYSIS OF THE INCIDENCE  
OF HEPATITIS C IN THE CITY OF SEVASTOPOL**

А. И. Морозов

*Медицинская академия им. С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО  
«КФУ им. В.И. Вернадского», Симферополь, Россия*

A. I. Morozov

*Medical Academy named after S.I. Georgievsky of Federal State Autonomous  
Educational Institution «Crimean Federal University. V.I. Vernadsky»,  
Simferopol, Russia*

E-mail: mpompo28.03.1997@mail.ru

**Аннотация**

Статья посвящена ретроспективному анализу заболеваемости вирусного гепатита С в городе Севастополе. Наиболее распространенной формой острого вирусного гепатита в мире является вирусный гепатит С (ВГС). Актуальность инфекции определяется огромными экономическими затратами, отсутствием тенденции к снижению заболеваемости, поражением лиц разных возрастов. Заболеваемость и распространенность ВГС обусловлены передачей через кровь (гематогенный путь) передачи. В данной работе представлены результаты статистического исследования Межрегионального управления Роспотребнадзора по г. Севастополю.

**Abstract**

The article is devoted to a retrospective analysis of the incidence of viral hepatitis C in the city of Sevastopol. The most common form of acute viral hepatitis in the world is viral hepatitis C (HCV). The relevance of the infection is determined by the huge economic costs, the lack of a tendency to reduce the incidence, the defeat of people of different ages. The incidence and prevalence of HCV is due to blood-borne (hematogenous) transmission. This paper presents the results of a statistical study of the Interregional Department of Rospotrebnadzor in Sevastopol.

По данным ВОЗ, около 3 % населения планеты, или около 300 миллионов человек, инфицировано гепатитом С. В последние годы в России

регистрируют более 6,5 тыс. случаев первичного рак печени, причиной которого, как правило, является гепатит С. В 60–80 % случаев вызывает хронические формы инфекции. За последние три года заболеваемость опасным вирусом снизилась на 15,3 %, хронических больных уменьшилось на 9 %. Также снизилось число новых зараженных гепатитом С. Если в 2015 году уровень заболеваемости составлял 1,44 на 100 тыс. населения, по итогам 2017 года — 1,22, то есть на 15,3 % меньше. Значительно снизилось число тех, у кого обнаружили хронический гепатит С — на 9 % (34,68 на 100 тыс. населения в 2017-м против 38,06 в 2015-м). Все это свидетельствует о появлении новых препаратов и схем лечения; больницы, салоны красоты и стоматологии практически полностью перешли на использование одноразовых инструментов. Изменение геополитической ситуации в городе Севастополе привело к уменьшению заболеваемости вирусным гепатитом С. Это свидетельствует внедрении новых лекарств, Госпрограммы для бесплатного лечения гепатита С.

Цели и задачи исследования — провести ретроспективный эпидемиологический анализ многолетней динамики заболеваемости ВГС в городе Севастополе за 2014–2018 гг., выявить закономерности эпидемического процесса при данном заболевании.

Материалом для проведения ретроспективного эпидемиологического анализа заболеваемости ВГС в городе Севастополе послужили статистические данные Межрегионального управления Роспотребнадзора по г. Севастополю за 2014–2018 гг. При обработке данных использовался эпидемиологический метод. Анализ годовой динамики заболеваемости проводился с вычислением показателя верхнего предела круглогодичной заболеваемости, величин верхних и нижних границ доверительного интервала среднесноголетнего показателя. Расчет помесечных показателей заболеваемости проводился с учетом численности населения. Интенсивность и структура годовой динамики определены с использованием приемов статистической обработки материала. Достоверность различий между показателями оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Разность результатов считали статистически значимой при  $p < 0,05$ .

За период с 2014 по 2018 гг. отмечалось снижение заболеваемости ВГС в общей структуре вирусных заболеваний. В 2014 году доля ВГС составляла 68,9 % от всех вирусных гепатитов, а в 2015, 2016, 2017, 2018 гг. показатели равнялись 39,5, 35,3, 30,3, и 28,5 % соответственно. Всего за последние 5 лет в городе Севастополе зарегистрировано 120 случаев ВГС, самый высокий уровень заболеваемости отмечен в 2014 году, а самый низкий в 2018 году. Характерной особенностью эпидемического процесса ВГС в городе Севастополе является преобладание лиц пожилого возраста, удельный вес мо-

лодых людей (преимущественно наркоманов) за последние пять лет варьировал от 55 % до 35 %. Это свидетельствует об оказании должного лечения лицам ведущие асоциальный образ жизни, получении новых препаратов, излечивающие гепатит С в 100 % случаев.

Анализ многолетней динамики заболеваемости показал, что для эпидемического процесса ВГС в Крыму за 2014–2018 гг. характерна ярко выраженная тенденция к снижению заболеваемости. Средняя величина ежегодного снижения составила 60 случаев, а средний темп снижения — 45 %.

Таким образом, для эпидемического процесса ВГС в городе Севастополе характерна ярко выраженная тенденция к снижению заболеваемости ВГС.

### **Литература**

1. Демиденко Т. П., Неверов В. А. Вирусные гепатиты: Пособие для врачей // под. ред. Ю. В. Лобзина СПб.: 2011. С. 25.
2. Серов В. В. Хронический вирусный гепатит // М.: Медицина, 2014. С. 351.
3. Сухарев В. М. Инфекционный гепатит // М.: Медицина, 2015. С. 543.
4. Подымова С. Д. Хронический гепатит // М.: Медицина, 2016. С. 280.
5. Мигунов А. И. Гепатит. Современный взгляд на лечение и профилактику // М.: ИГ «Весь», 2017. С. 128.

## ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОПЫТНО-ПРОМЫШЛЕННЫХ СЕРИЙ ВАКЦИН ИЗ АКТУАЛЬНЫХ ШТАММОВ ГРИППА ПТИЦ

### PREPARATION OF PILOT VACCINE BATCHES FROM TOPICAL AVIAN INFLUENZA STRAINS

А. С. Нурпейсова, Ж. Кыдырбаев, М. М. Касенов,  
Н. Н. Асанжанова, Д. А. Инкарбеков, Б. М. Хайруллин, К. Д. Закарья

A. S. Nurpeisova, Zh. Kydyrbayev, M. M. Kassenov, N. N. Assanzhanova,  
D. A. Inkarbekov, B. M. Khairullin, K. D. Zakarya

*Research Institute of Biological Safety Problems, Science Committee under  
Ministry of Education and Science of Kazakhstan, Gvardeyskiy, Kazakhstan*

E-mail: nurai1005@gmail.com

#### **Abstract**

We have prepared pilot batches of inactivated emulgated vaccines for avian influenza from WHO-recommended recombinant strains with antigen and clade characteristics similar to those in environmental avian influenza strains of H5 and H7 subtypes. We have optimized conditions for cultivating subtype H9 avian influenza recombinant strain to update the strain composition of our commercial vaccine.

The field of application of the vaccines is veterinary virology.

#### **Аннотация**

Приготовлены опытно-промышленные серии инактивированных эмульгированных вакцин против гриппа птиц из рекомендованных ВОЗ рекомбинантных штаммов, близких по антигенным и кладовым признакам к циркулирующим в природе диким штаммам вирусов гриппа птиц субтипов H5 и H7. Оптимизированы условия культивирования рекомбинантного штамма гриппа птиц субтипа H9 для актуализации штаммового состава коммерческой вакцины.

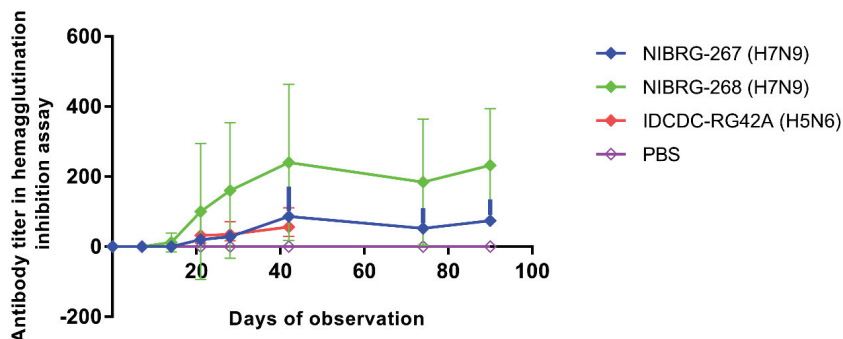
Область применения — ветеринарная вирусология.

Because various subtypes of avian influenza (AI), such as H5N1, H5N6, H7N9, H7N2, and H9N2, are circulating concurrently throughout the world, which presents a characteristic sign of the third wave of AI panzootic, the composition of existing commercial vaccines is considered not to be sufficiently

effective. To ensure better protection from new variants of highly pathogenic avian influenza (HPAI), in 2017 and 2018 we acquired NIBRG-267 (H7N9), NIBRG-268 (H7N9), IDCDC-RG42A (H5N6, clade 2.3.4.4) and other strains from National Institute for Biological Standards and Control UK (NIBSC UK) following WHO's recommendation. At RIBSP we optimized viruses' growth properties, prepared pilot batches of inactivated emulgated vaccines for AI H5 and H7 subtypes from strains mentioned above using RIBSP's commercial vaccine technology.

We performed quality control of the pilot vaccine batches to our institute's standards.

Comparative studies of the pilot vaccines from the NIBRG-267 (H7N9) and NIBRG-268 (H7N9) recombinant strains for AI subtype H7 and IDCDC-RG42A strain (H5N6), clade 2.3.4.4) for AI H5 subtype have shown dissimilar immunity levels in vaccinated birds (see Figure).



Post-vaccination immunity level in birds inoculated with different vaccines for AI type A

Birds inoculated with pilot vaccines started actively developing antibodies at day 21 after vaccination; at day 28 after a single inoculation, the recombinant strain NIBRG-268 (H7N9) vaccine caused high immunity levels in 85 % of vaccinated birds with the geometric mean antibody titer (GMT) at 80.0 (20–320); the NIBRG-267 (H7N9) vaccine caused high immunity in 75 % of vaccinated birds with a low GMT compared to the previous group — 24.62 (20–80); while the RG42A (H5N6) vaccine brought about high immunity levels only in 70 % of immunized birds with a GMT of 34.82 (20–160).

We observed the highest levels of antihemagglutinin accumulation at day 42 (Figure 1). GMT in birds immunized with the NIBRG-268 vaccine was at 171.48 (80–640), with the NIBRG-267 vaccine at 60.62 (20–320) and with the RG42A (H5N6) vaccine at 56.56 (20–160).

In our subsequent studies we observed birds immunized with NIBRG-268 and NIBRG-267 vaccines, which ensured high immunity levels for 3 months with a stable rate of antihemagglutinin accumulation (Figure 1).

Based on our results, we recommend the inactivated emulgated NIBRG-268 vaccine for wide application and future duration-of-immunity studies. 90 days after immunization, antibody levels in birds vaccinated with the NIBRG-268 vaccine were 3.9 times higher than in birds immunized with the NIBRG-267 vaccine.

We optimized conditions for culturing AI subtype H9N2 recombinant strain RG-A/HONG-KONG/308/2014. We acquired a highly active virus material suitable for developing inactivated vaccine for AI subtype H9.

This study was part of a project titled Updaing the Strain Composition of an Inactivated Emulgated Commercial Vaccine for Avian Influenza under a research program Veterinary Safety of Kazakhstan: Epizootic Monitoring, Trial, Introduction and Commercialization of Specific Prophylaxis and Diagnostics of Especially Dangerous Infectious Diseases 2018–2020, IRN BR06249226.



**АНТИГЕННОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВИРУСОВ ГРИППА  
А(Н3N2), ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ  
В ЭПИДЕМИЧЕСКОМ СЕЗОНЕ 2018–2019 ГГ. \***

ANTIGENIC VARIETY OF INFLUENZA A(H3N2) VIRUSES  
CIRCULATED IN EPIDEMIC SEASON 2018–2019 IN RUSSIA

П. А. Петрова, Н. И. Коновалова, Д. М. Даниленко, М. Ю. Еропкин

*ФГБУ «НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева» Минздрава России*

P. A. Petrova, N. I. Konovalova, D. M. Danilenko, M. Yu. Eroptkin

*Smorodintsev Research Institute of Influenza*

**Аннотация**

Вирусы гриппа А(Н3N2) человека имеют наибольшую скорость эволюционной изменчивости. Антигенный анализ вирусов гриппа данного подтипа позволяет выбрать вакцинный компонент на предстоящий эпидемический сезон. В результате эволюции, нейраминидаза вирусов А(Н3N2) приобрела способность связываться с эритроцитами. В результате этого интерпретировать результаты РТГА с такими вирусами становится невозможным. В настоящее время ведется поиск методов, которые позволят получить достоверные результаты антигенного анализа для вирусов гриппа А(Н3N2).

**Abstract**

Influenza A(H3N2) viruses have the highest rate of evolutionary variability. Antigenic analysis of influenza virus is used for the selection of candidate vaccine viruses for the production of influenza vaccine for the upcoming epidemic season. As a result of evolution, the neuraminidase of the A(H3N2) viruses has acquired the ability to bind to RBC. As a result, the interpretation of HI-test of A(H3N2) became difficult or impossible. A search is currently underway for methods that will provide reliable results of antigenic analysis for influenza viruses A (H3N2).

В последние годы вирусы гриппа А(Н3N2), циркулируют совместно с вирусами А(Н1N1)рdm09 и вирусами гриппа типа В. Достаточно часто регистрируются эпидемии, в которых вирусы А(Н3N2) становятся домини-

---

© П. А. Петрова, Н. И. Коновалова, Д. М. Даниленко, М. Ю. Еропкин, 2019

\* Исследования выполнены при поддержке стипендии Президента Российской Федерации молодым ученым и аспирантам (Конкурс СП-2018).

рующим этиологическим агентом, вызывая тяжелые случаи перенесения гриппозной инфекции. Наиболее подвержены заболеванию лица, входящие в группы риска: дети в возрасте от 6 месяцев до 5 лет, беременные женщины, лица старше 65 лет, медицинские работники, а также лица, имеющие хронические сопутствующие патологии. Установлено, что вирусы А(Н3N2) обладают наибольшей скоростью антигенного дрейфа, по сравнению с другими вирусами гриппа. Как следствие, имеющиеся вакцины не обеспечивают должной защиты населения от инфекции.

В 2018–2019 г. вирусы гриппа А(Н3N2), циркулировали на всем протяжении сезона. При одновременной циркуляции с доминирующими вирусами А(Н1N1) pdm09, доля А(Н3N2) увеличилась во второй половине эпидемии.

Для анализа эволюционных изменений вирусов А(Н3N2) использовался стандартный метод РТГА и реакция нейтрализации (РН) cell-ELISA. Нами были изучены антигенные связи между 143 эпидемическими штаммами и мировыми эталонными вирусами. Вирусы, циркулирующие на территории России, были антигенно подобны штамму, введенному в состав противогриппозных вакцин А/Сингапур/INFIMH-16-0019/2016 и реагировали с антисывороткой, полученной к клеточному варианту данного штамма до 1-1/4 гомологичного титра. Однако, нами отмечено, что антитела к этому же вирусу, но накопленному в куриных эмбрионах, очень слабо взаимодействовали с большинством изолятов, что не может не отразиться на показателях эффективности вакцин по компоненту А(Н3N2). Многие из проанализированных штаммов также хорошо узнавались антисыворотками, полученными к клеточному варианту вируса А/Гонконг/4801/2014. Однако, довольно отчетливо проявилась группа изолятов, которые утратили антигенное родство к группе А/Гонконг/4801/2014. Большинство штаммов, по своим антигенным характеристикам относились к антигенной и генетической группе 3С.2a1b — А/Ла Риоха/2202/2017 и взаимодействовали с антисывороткой к этому штамму до 1-1/4 гомологичного титра.

Вирусов, подобных штамму А/Канзас/14/2017, рекомендованному в состав вакцин на 2019–2020 гг. для Северного полушария, в России, в данном сезоне зарегистрировано не было.

Результаты параллельного тестирования штаммов в РТГА и РН показали независимость полученных данных антигенного анализа от используемого аналитического метода.

**РАЗРАБОТКА ПРОТИВОВИРУСНОГО СРЕДСТВА  
НА ОСНОВЕ ЭКСТРАКТОВ ДЕРЕВОРАЗРУШАЮЩЕГО  
БАЗИДИОМИЦЕТА *BJERKANDERA ADUSTA***

DEVELOPMENT OF AN ANTIVIRAL AGENT ON THE BASIS  
OF EXTRACTS FROM WOOD-DESTRUCTING BASIDIOMYCETA  
*BJERKANDERA ADUSTA*

М. А. Проценко<sup>1</sup>, Е. И. Филиппова<sup>1</sup>, Ж. Б. Ибрагимова<sup>1</sup>,  
В. А. Власенко<sup>2</sup>, Е. В. Макаревич<sup>1</sup>, Н. А. Мазуркова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии  
«Вектор» Роспотребнадзора, Россия

<sup>2</sup> ФГБУН Центральный Сибирский ботанический сад СО РАН, Россия

М. А. Protsenko<sup>1</sup>, Е. I. Filippova<sup>1</sup>, Zh. B. Ibragimova<sup>1</sup>,  
V. A. Vlasenko<sup>2</sup>, E. V. Makarevich<sup>1</sup>, N. A. Mazurkova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> SRC VB "Vector", Russia

<sup>2</sup> Central Siberian Botanical Garden SB RAS, Russia

E-mail: protsenko\_ma@vector.nsc.ru

**Аннотация**

Получены сухие этанольные и водные экстракты из плодовых тел дереворазрушающего базидиомицета *Bjerkandera adusta*. Выявлена противовирусная активность экстрактов гриба в отношении вируса гриппа А (субтипов Н3N2, Н1N1pdm09 и Н5N1) и вируса простого герпеса 1-го и 2-го типа.

**Abstract**

Dry ethanol and water extracts were obtained from the fruiting bodies of the wood-destroying basidiomycete *Bjerkandera adusta*. The antiviral activity of the extracts of fungus was detected against influenza A virus (subtypes Н3N2, Н1N1pdm09 and Н5N1) and herpes simplex virus type 1 and type 2.

Заболевания, вызываемые вирусами, являются одной из ведущих причин смертности людей. Периодически возникают пандемии и эпидемии,

причинами которых является тот или иной вирус. Созданные в результате многолетних и интенсивных поисков противовирусные препараты представлены на сегодняшний день ограниченным набором лекарственных средств, большинство из которых характеризуются узконаправленным действием, при наличии нежелательных побочных эффектов или проявляют токсичность, что значительно ограничивает их применение в медицине и фармации. Ситуацию усугубляет то, что одной из главных проблем профилактики и лечения вирусных инфекций является высокая скорость изменчивости многих вирусов вследствие быстропотекающих мутаций вирусов, что приводит к снижению эффективности применяемого лекарственного препарата, что требует замены лекарства. Поэтому разработка новых эффективных и безопасных противовирусных средств, обладающих активностью в отношении широкого спектра вирусов, будет актуальна всегда.

Народная медицина и многолетние научные исследования показали, что препараты на основе источников природного происхождения имеют преимущества перед лекарственными средствами, получаемыми синтетическим способом. Такими преимуществами являются широкий спектр биологической активности, что связано с разнообразием химического состава природного сырья, низкая частота наступления побочных эффектов и возможность применения, как для профилактики, так и для лечения заболеваний [3].

Одним из важных вопросов создания новых лекарственных средств на основе источников природного происхождения является выбор оптимального с технологической точки зрения метода выделения групп биологически активных веществ из сырья. Следует отметить, что именно сложность и разнообразие химического состава грибов и обуславливают их широкий спектр фармакологического действия на организм человека. Вот почему именно метод экстракции является оптимальным для выбора способа выделения биологически активных соединений. Кроме того, выделение индивидуальных веществ из природного сырья не является высоко рентабельным вследствие очень низкого выхода продукта в пересчете на исходное сырье.

Среди разных экстракционных препаратов наиболее рациональным типом следует считать сухие экстракты, так как они удобны в применении, хранении и транспортировке, а благодаря довольно высокой концентрации веществ, возможно использование сухих экстрактов в оптимально дозируемом количестве и комбинирование их на стадии изготовления с другими компонентами.

Ранее нами была разработана, оптимизирована и апробирована технология получения экспериментальных образцов препаратов в виде сухих этанольных и водных экстрактов из грибного сырья [2].

Проведенные нами ранее скрининговые исследования противовирусной активности экстрактов базидиомицетов выявили наличие противовирусной активности этанольных извлечений плодовых тел дереворазрушающего гриба *Bjerkandera adusta* из семейства *Meruliaceae* в отношении вируса простого герпеса 2-го типа, осповакцины, оспы мышей [1].

Объектом настоящего исследования служили высушенные и измельченные плодовые тела лесного гриба *Bjerkandera adusta*, собранные в окрестностях Академгородка г. Новосибирска, в 2013 году. Из грибного сырья получали сухие этанольные и водные экстракты по разработанной методике [2].

Этанольные и водные экстракты *Bjerkandera adusta* тестировали на противовирусную активность в отношении вируса гриппа А (субтипов H3N2, H1N1pdm09 и H5N1) в культуре клеток MDCK и вируса простого герпеса 1-го (штамм VR-3) и 2-го (штамм MS) типа в культуре клеток Vero. В экспериментах по анализу противовирусной активности экстрактов в культурах клеток MDCK и Vero использовали предварительно определенные их максимально переносимые концентрации для этих клеточных культур.

Результаты проведенных нами вирусологических исследований показывают наличие противовирусной активности *in vitro* как этанольных, так и водных экстрактов *Bjerkandera adusta*, в отношении вируса гриппа А и вируса простого герпеса. В исследованиях ингибирования репродукции вирусов гриппа и герпеса в культуре клеток MDCK и Vero соответственно под действием грибных экстрактов в профилактической схеме было обнаружено, что экстракты подавляли инфекционность всех исследуемых вирусов. Отмечено, что водный экстракт гриба *Bjerkandera adusta* по сравнению с этанольным проявлял более высокую активность в отношении всех исследуемых вирусов.

Таким образом, водный экстракт дереворазрушающего гриба *Bjerkandera adusta*, является перспективным источником для разработки и создания новых противовирусных лекарственных препаратов, обладающих активностью в отношении широкого спектра вирусов.

## Литература

1. Костина Н. Е., Ибрагимова Ж. Б., Проценко М. А., Макаревич Е. В., Скарнович М. А., Филиппова Е. И., Горбунова И. А., Власенко В. А., Трошкова Г. П., Мазуркова Н. А., Шишкина Л. Н. Выделение, характеристика и противовирусные

свойства биологически активных веществ из высших грибов Западной Сибири / Современные проблемы науки и образования. 2013. № 3.

2. Проценко М. А., Костина Н. Е., Теплякова Т. В. Подбор питательных сред для глубинного культивирования дереворазрушающего гриба *Daedaleopsis tricolor* (Bull.) Bondartsev et Singer / Биотехнология. 2018. Т. 34. № 1. С. 45–51.

3. Самбукова Т. В., Овчинников Б. В., Ганapolский Г. В., и др. Перспективы использования фитопрепаратов в современной фармакологии. / Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2017. Т. 15. № 2. С. 56–63.

**РАЗРАБОТКА КАТИОННЫХ АМФИФИЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ НА  
ОСНОВЕ МОНОТЕРПЕНОИДОВ  
В КАЧЕСТВЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРОТИВОВИРУСНЫХ  
АГЕНТОВ ШИРОКОГО СПЕКТРА ДЕЙСТВИЯ \***

DEVELOPMENT OF CATIONIC AMPHIPHILIC SUBSTANCE BASED  
ON MONOTERPENOIDS AS POTENTIAL ANTIVIRAL AGENTS  
OF A BROAD SPECTRUM OF ACTION

А. С. Соколова<sup>1</sup>, Д. В. Баранова<sup>1,2</sup>, О. И. Яровая<sup>1,2</sup>, А. В. Зыбкина<sup>3</sup>,  
Д. Н. Щербаков<sup>3</sup>, Н. И. Бормотов<sup>3</sup>, Л. Н. Шишкина<sup>3</sup>, Н. Ф. Салахутдинов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Новосибирский институт органической химии  
им. Н. Н. Ворожцова СО РАН, Россия

<sup>2</sup>Новосибирский государственный университет, Россия

<sup>3</sup>ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия

A. S. Sokolova<sup>1</sup>, D. V. Baranova<sup>1,2</sup>, O. I. Yarovaya<sup>1,2</sup>, A. V. Zybkina<sup>3</sup>,  
D. N. Shcherbakov<sup>3</sup>, N. I. Bormotov<sup>3</sup>, L. N. Shiskina<sup>3</sup>, N. F. Salakhutdinov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>NIOCH SB RAS, Russia

<sup>2</sup>NSU, Russia

<sup>3</sup>SRC VB "Vector", Russia

E-mail: asokolova@nioch.nsc.ru

**Аннотация**

В данной работе изучена противовирусная активность широкого ряда производных бициклических терпеноидов в отношении различных вирусных инфекций.

**Abstract**

The antiviral activity of a wide range of bicyclic terpenoid derivatives against the different viruses has been studied.

Инфекционные заболевания представляют собой одну из основных проблем здравоохранения и, как следствие, приносят большой ущерб для наци-

---

© А. С. Соколова, Д. В. Баранова, О. И. Яровая, А. В. Зыбкина, Д. Н. Щербаков, Н. И. Бормотов, Л. Н. Шишкина, Н. Ф. Салахутдинов, 2019

\* Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (N 19-73-00125).

ональной экономики и мировой экономики в целом. Вследствие увеличения туризма и глобализации торговли, распространение инфекционных агентов становится быстрее и шире. Поэтому разработка эффективных противовирусных агентов является актуальной задачей медицинской химии.

Недавно было обнаружено, что небольшие молекулы, принадлежащие к классу катионных амфифильных лекарств (CADs от англ. cationic amphiphilic drugs) способны ингибировать проникновение различных вирусных инфекций. Катионные амфифильные соединения это широкая группа химических веществ, которые имеют как гидрофобный фрагмент, содержащий чаще всего ароматическую систему, так и гидрофильный домен, содержащий способную к ионизации вторичную или третичную аминогруппу. Эти структурные особенности, позволяют агентам легко диффундировать в клетки. Попадая в кислотные компартменты, такие как поздние эндосомы или лизосомы, аминогруппы протонируются и аккумулируются в них, тем самым изменяя их морфологию и функционирование. Поскольку поздние эндосомы или лизосомы являются важными участниками стадии проникновения вируса в клетку, нарушение их взаимодействия с вирусом приводит к ингибированию инфекции на ранних стадиях.

Анализируя структурные особенности CADs показавших противовирусную активность, можно заметить, что в качестве гидрофобного фрагмента выступает, как правило, ароматическая система. В литературе отсутствуют данные по систематическим исследованиям катионных амфифильных соединений, где природный остов выполняет функцию гидрофобного фрагмента. В свою очередь, природные соединения являются привлекательной платформой для синтеза биологически активных веществ.

Таким образом, предметом исследования настоящей работы являются химические модификации монотерпеноидов, содержащих в своем остове бицикло-[2.2.1]-каркасный фрагмент — (+)-камфора и (-)-борнеол с целью выявления соединений, обладающих широким спектром противовирусной активностью.

Нами было обнаружено, что N-содержащие гетероциклические производные борнеола, представленные на рис. 1 обладают широким спектром противовирусной активности. Соединения **Ia-Id** относятся к классу катионных амфифильных соединений и ингибируют вирусные инфекции такие как, вирус Марбург, вирус гриппа, вирус осповакцины. Так, например, соединения **Ia-Ic** эффективно блокируют вирус гриппа и филовирусы. Соединение **Id** блокирует Эбола псевдовирус, вирус гриппа и вирус осповакцины.



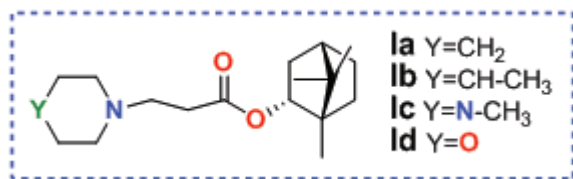


Рис. 1

Таблица 1

Значение IC<sub>50</sub> соединений Ia-Id для различных типов вируса

Тип вируса	Ia	Ib	Ic	Id
MARV*	3,7	2,2	—	—
p-MarvGP**	9	4	19	78
p-EbovGP***	8.3	1.3	5.6	11.5
H1N1****	7,8	15	1,9	12
<b>вирус осповакцины</b>	>100	>100	>100	3.5

\* MARV — натуральный вирус Марбург, (штамм Popr); \*\* p-MarvGP — псевдовиральный препарат, имеющий капсид рекомбинантного вируса везикулярного стоматита, но снабженный поверхностным гликопротеином вируса Марбург; \*\*\* p-EbovGP — псевдовиральный препарат вируса Эболы; \*\*\*\* H1N1 — вирус гриппа

Расширяя спектр исходных природных объектов, нами был синтезирован ряд катионных амфифильных веществ на основе (+)-камфорной кислоты, (+)-камфора-10-сульфо кислоты и изоборниламина (рис. 2).

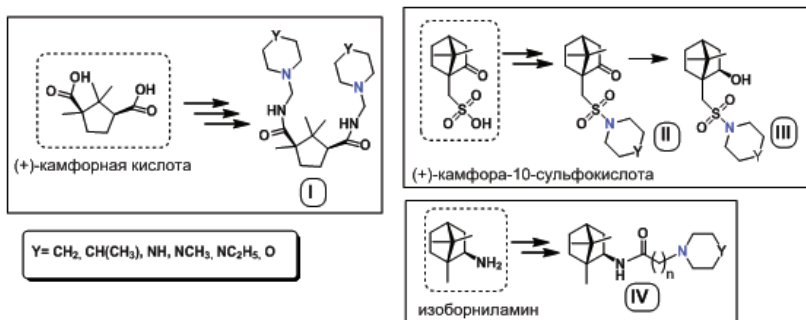


Рис. 2

Была исследована противовирусная активность синтезированных производных в отношении филовирусов (вирус Эбола и Марбург), ортопоксвирусов (вирус осповакцины, вирус экстремелии, вирус натуральной оспы), флавивирусов (вирус желтой лихорадки, вирус клещевого энцефалита). Среди производных камфорной кислоты **I** наибольшую ингибирующую активность в отношении псевдовируса Эбола показало соединение, включающее 4-этилпиперазиновый цикл ( $Y=NC_2H_5$ ). Кроме того, большинство данных производных эффективно ингибируют гликопротеин вируса Марбург (GP MARV). Вместе с тем, обнаружено, что производные 10-камфорасульфокислоты **II** ингибируют гликопротеин вируса Эболы (GP EBOV) эффективнее, чем GP MARV. При этом наиболее эффективными ингибиторами GP EBOV среди соединений, содержащих карбонильную группу, оказались производные содержащие в качестве гетероцикла морфолин и триазол или этильные заместители у атома азота. Интересно отметить, что при восстановлении производных **II** в соответствующие спирты **III** наблюдалось значительное уменьшение токсичности и увеличение ингибирующей активности. Амиды **IV**, на основе изоборниламина показали высокую противовирусную активность, как в отношении ортопоксвирусов, так и в отношении филовирусов.

Таким образом, нами показано, что бициклические монотерпеноиды, содержащие каркасный структурный фрагмент являются перспективным источником агентов, обладающих широким спектром противовирусной активности.

**МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ ВИРОМА  
*LEPTINOTARSA DECEMLINEATA***

**METAGENOMIC ANALYSIS  
OF *LEPTINOTARSA DECEMLINEATA* VIROME**

М. Е. Старчевская<sup>1,2</sup>, Ю. В. Вяткин<sup>3</sup>, Д. В. Антонец<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> *ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии*

*«Вектор» Роспотребнадзора*

<sup>2</sup> *Новосибирский государственный университет*

<sup>3</sup> *Новые программные системы*

М. Е. Starchevskaya<sup>1,2</sup>, Y. V. Vyatkin<sup>3</sup>, D. V. Antonets<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> *SRC VB “Vector” Rospotrebnadzor, Novosibirsk, Russia*

<sup>2</sup> *Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*

<sup>3</sup> *Novel Software Systems LLC, Novosibirsk, Russia*

e-mail: starchevskayamaria@mail.ru

**Аннотация**

Колорадский жук (*Leptinotarsa decemlineata* из семейства *Chrysomelidae*) является одним из наиболее серьезных насекомых-вредителей, питающихся пасленовыми растениями. На сегодняшний день используются агенты биоконтроля, основанные на энтомопатогенных грибах и бактериях, но не на вирусах. Исследование вирусов колорадского жука поможет расширить арсенал биопестицидов. Данное метагеномное исследование выявило вирусные последовательности представителей различных вирусных семейств в образцах *Leptinotarsa decemlineata*, полученных из базы NCBI SRA, таких как *Baculoviridae*, *Iridoviridae*, *Polydnaviridae*, а также полноразмерные геномы некоторых вирусов растений.

**Abstract**

Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* from *Chrysomelidae* family) is one of the most serious insect pests feeding on *Solanaceae* plants. Currently, biocontrol agents based on entomopathogenic fungi and bacteria, but not viruses, are used. Colorado potato beetle virus research will help the arsenal of biopesticides. This metagenomic study revealed the presence of viruses in the *Leptinotarsa decemlineata* family extracted from the NCBI SRA database, such as *Baculoviridae*, *Iridoviridae*, *Polydnaviridae*, as well as the full-sized genome of some plant viruses.

Недавние метагеномные исследования вирусов в различных природных сообществах выявили колоссальное количество новых вирусов, вирусных последовательностей и значительно расширили понимание виросферы насекомых. Изучение вирома насекомых позволит получить новые представления об экологии и эволюции вирусов, а также поможет решать задачи здравоохранения по контролю арбовирусных инфекций. Кроме того, патогенные вирусы насекомых могут использоваться для биологической борьбы с насекомыми-вредителями, а идентификация новых вирусов насекомых может расширить арсенал потенциальных агентов биоконтроля.

Колорадский жук (*Leptinotarsa decemlineata* из семейства *Chrysomelidae*) является одним из наиболее серьезных насекомых-вредителей картофеля по всему миру. Кроме того, жуки-листоеды передают вирусы растений. В настоящее время биологические стратегии борьбы с *Leptinotarsa decemlineata* основаны на энтомопатогенных грибах или бактериях, но не на вирусах. Тем не менее энтомопатогенные вирусы успешно используются против вредителей *Lepidoptera* на протяжении десятилетий. Кроме того, виром колорадского жука до сих пор не был изучен, и наша работа является первой попыткой обнаружить вирусный материал в данных полногеномного секвенирования *Leptinotarsa decemlineata*.

Целью данной работы является поиск вирусных последовательностей в образцах *Leptinotarsa decemlineata*, полученных из базы данных NCBI SRA. Исследуемые образцы анализировали, низкокачественные и короткие прочтения, представленные последовательности и адаптеры удаляли. Для контроля контаминации удаляли прочтения, выравненные на геном человека (GRCh38), и прочтения, имеющие синтетическое происхождение (база данных UniVec). Проводили выравнивание, используя в качестве референса геном *Leptinotarsa decemlineata*, полученный из базы данных NCBI Genome (сборка GCA\_000500325.2 Ldec\_2.0), а также вирусные геномы, полученные из базы данных NCBI RefSeq. Не выравненные на геном *Leptinotarsa decemlineata* прочтения собирали в контиги (SPAdes, Quast). Контиги с покрытием более 30 анализировали (nr/nt), для неустановленных последовательностей использовали предсказание генов (MetaGeneMark).

В результате исследования были проанализированы 25 транскриптомных и 7 геномных образцов *Leptinotarsa decemlineata*. Найдены полноразмерные геномы ряда вирусов растений, в том числе *Potato virus S*, *Potato virus Y*, *Grapevine virus*, *Ligustrum virus*. Найдены фрагменты последовательностей вирусов насекомых: представители семейств *Iridoviridae*, *Baculoviridae*, *Polydnaviridae*. В результате предсказания генов и открытых рамок считывания в образцах были предположены последовательно-

---

сти представителей рода *Bracovirus* (*Polydnaviridae*). В результате анализа референсного генома *Leptinotarsa decemlineata* были обнаружены многочисленные фрагменты (более 25 тыс. нт) представителей рода *Bracovirus*. Вирусы рода *Bracovirus* связаны с паразитоидными осами и способны изменять обмен веществ хозяев для подавления иммунных реакций. Кроме того, данная группа вирусов участвует в горизонтальном переносе генов и способна интегрироваться в геном ос-хозяев. Ранее было показано, что оса *Edovium puttleri* паразитирует на яйцах колорадского жука, однако представители рода *Bracovirus* ранее не были выявлены для *Leptinotarsa decemlineata*.

**КОНСТРУИРОВАНИЕ ХИМЕРНОГО РЕАССОРТАНТА  
НА ОСНОВЕ ВИРУСОВ ГРИППА А И В  
С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДОВ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ \***

CONSTRUCTION OF A CHIMERIC REASSORTANT  
STRAIN BASED ON INFLUENZA A AND B VIRUSES  
WITH GENETIC ENGINEERING APPROACH

Е. А. Степанова, Е. В. Крутикова, P.-F. Wong

*ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»,  
Санкт-Петербург, Россия*

E. A. Stepanova, E. V. Krutikova, P.-F. Wong

*FSBSI «Institute of experimental medicine», Saint-Petersburg, Russia*

E-mail: fedorova.iem@gmail.com

**Аннотация**

Современные вакцины для профилактики гриппа включают в себя штаммы вирусов гриппа А и В. Разработки универсальных гриппозных вакцин направлены на стимуляцию иммунного ответа на консервативные области белков вирусов гриппа, для создания защиты широкого спектра действия. В данной работе был получен реассортантный вирус на основе штаммов вирусов гриппа А и В, путем внесения ряда модификаций в геном. Внутренние гены реассортанта унаследованы от донора отечественной живой гриппозной вакцины А/Ленинград/134/17/57 (H2N2). Гемагглютинин и нейраминидаза унаследованы от актуального вируса гриппа В/Брисбан/60/2008, и содержат модификации в областях, отвечающих за упаковку сегментов в вирион. Штамм был получен методом обратной генетики. Планируется оценка свойств химерного реассортанта в качестве вакцины для комбинированной профилактики гриппа А и В.

**Abstract**

Seasonal influenza vaccines include influenza A and B strains. The development of universal influenza vaccines is focused on stimulation of the immune response to the conserved regions of influenza virus proteins to provide a broad-spectrum protection. In this study, preparation of a reassortant virus based on strains of influenza A and B viruses by intro-

---

© Е. А. Степанова, Е. В. Крутикова, P.-F. Wong, 2019

\* Исследование выполнено при поддержке гранта Президента РФ № МК-3336.2019.4.

ducing a number of modifications to the genome was performed. The internal genes of the reassortant are inherited from master donor virus of Russian live attenuated influenza vaccine A/Leningrad/134/17/57 (H2N2). Hemagglutinin and neuraminidase are inherited from the actual influenza virus B/Brisbane/60/2008 with modifications in the genome-packaging signals. The strain was rescued with reverse genetics. The chimeric strain is to be studied as an experimental vaccine for the combined prophylaxis of influenza A and B.

## **Введение**

Грипп — острое респираторное инфекционное заболевание, ежегодно вызывающее эпидемии по всему миру. Основной проблемой в разработке гриппозных вакцин является крайне высокая изменчивость возбудителя, что приводит к необходимости регулярного обновления штаммового состава вакцин и повторной вакцинации. В состав сезонной гриппозной вакцины входят два штамма вируса гриппа А (подтипов H1N1 и H3N2), а также один или два (в случае квадριвалентных вакцин) штамма вируса гриппа В.

Вирусы гриппа А и В — отдельные биологические виды, в природе не вступающие в реассортацию между собой. По данным литературы известно, что получение рекомбинантных штаммов возможно при условии внесения модификаций в области генома, ответственные за упаковку генетических сегментов в вирион.

Целью данной работы было получение химерного reassortанта на основе донора аттенуации живой гриппозной вакцины А/Ленинград/134/17/57 (H2N2), содержащего модифицированные генетические сегменты, кодирующие гемагглютинин (НА) и нейраминидазу (НА) вируса гриппа В/Брисбан/60/2008.

## **Материалы и методы**

Вирус гриппа В/Брисбан/60/2008 был получен из Центра по контролю за заболеваемостью (CDC, Атланта, США). Донор аттенуации живой гриппозной вакцины (ЖГВ) А/Ленинград/134/17/57 (далее — А/Лен17) является собственностью ФГБНУ «ИЭМ». Вирусный материал накапливали в 11-дневных развивающихся куриных эмбрионах. Реакции ПЦР проводились с использованием наборов реагентов SuperScript III One-Step RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen) и Phusion Green Hot Start II High-Fidelity PCR (Thermo Scientific). Использовались эндонуклеазы рестрикции BsmBI (New England Biolabs) и SapI (New England Biolabs), лигаза T4 (Евроген), вектор для обратной генетики вируса гриппа pCIPolISapIT.

## **Результаты**

Химерный сегмент генома, кодирующий НА штамма В/Брисбан/60/2008, был получен методом ПЦР со специфическими олигонуклеотидами к кон-

цевым участкам кодирующей последовательности NA. На 5'-конце олигонуклеотидов содержалась последовательность соответствующих не кодирующих фрагментов NA вируса гриппа А/Лен17, для замены не транскрибируемых регионов (НТР) NA вируса гриппа В на соответствующие участки вируса гриппа А. На втором этапе была проведена ПЦР с олигонуклеотидами к концам НТР NA вируса гриппа А для добавления на 5'-концы сайтов рестрикции SapI, по которым далее было произведено клонирование химерного гена в вектор для обратной генетики pCIPollSapIT.

Химерный сегмент генома, кодирующий NA штамма В/Брисбан/60/2008 был получен путем лигирования фрагментов, кодирующих эктодомен NA вируса В/Брисбан/60/2008 с фрагментами, кодирующими НТР и сигнальный пептид вируса гриппа А/Лен17, а также НТР, трансмембранный и цитоплазматический домены вируса гриппа А/Лен17. Схема получения химерного сегмента NA приведена на рисунке 1. На первом этапе были получены ПЦР-продукты трех отдельных фрагментов NA, с помощью праймеров на концы фрагментов добавлены сайты для рестрикции BsmBI и последующего лигирования трех фрагментов в один. Далее, произведена рестрикция и тройное лигирование фрагментов. Полученный химерный ген был также клонирован в вектор для обратной генетики pCIPollSapIT по сайтам рестрикции SapI.

Генетические сегменты, кодирующие PB1, PB2, PA, NP, M, NS донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57, были клонированы в вектор для обратной генетики вируса гриппа pCIPollSapIT по методике, описанной в [Isakova-Sivak, et al. Genetic bases of the temperature-sensitive phenotype of a master donor virus used in live attenuated influenza vaccines: A/Leningrad/134/17/57 (H2N2)// *Virology*. 2011. Т. 412, № 2. С. 297–305].

Жизнеспособный химерный вирус H2-Брисбан был получен путем трансфекции клеток Vero набором из 8 плазмид, кодирующих гены PB1, PB2, PA, NP, M, NS штамма А/Лен17 и химерных плазмид, кодирующих NA и NA вируса В/Брисбан/60/2008. Трансфекцию проводили методом электропорации с использованием системы Neon Transfection System (Invitrogen). Через трое суток клетки были сняты с субстрата, суспензия внесена в развивающиеся куриные эмбрионы. Полученный вирус был накоплен в 11-дневных развивающихся куриных эмбрионах.

До сих пор в литературе было описано получение химерных штаммов гриппа А и В на основе вируса гриппа А подтипа H1N1, эффективность получения химерных вирусов варьировала в зависимости от длины встраиваемых фрагментов и штаммоспецифических особенностей. Дизайн химерного вируса H2-Брисбан был выбран на основе данных о максимально эффективных методиках получения химерных вирусов, целью было встро-



ить фрагменты НА и NA вируса гриппа В максимально возможной длины с сохранением способности штамма к репликации.

В связи с тем, что внутренние гены химерного вируса получены от донора аттенуации ЖГВ, штамм является холодоадаптированным реассортантом, предназначенным для использования в качестве живой вакцины с интраназальным путем введения. За счет внутренних генов, полученных от гриппа А, штамм потенциально может стимулировать развитие кросс-реактивного иммунного ответа на консервативные эпитопы, расположенные во внутренних белках. Поверхностные антигены штамма при этом будут создавать защиту против вирусов гриппа В. Планируется оценка ростовых характеристик полученного вируса, а также оценка его иммуногенных и протективных свойств по отношению к вирусам гриппа А и В на животной модели.

## Выводы

Химерный реассортант, содержащий внутренние гены от донора аттенуации ЖГВ А/Ленинград/134/17/57, а НА и NA от вируса В/Брисбан/60/2008 был получен путем замены не кодирующих регионов 4 и 6 генетического сегмента, а также участков, кодирующих сигнальный пептид, трансмембранный и цитоплазматический домены НА, на соответствующие участки генома вируса А/Ленинград/134/17/57.

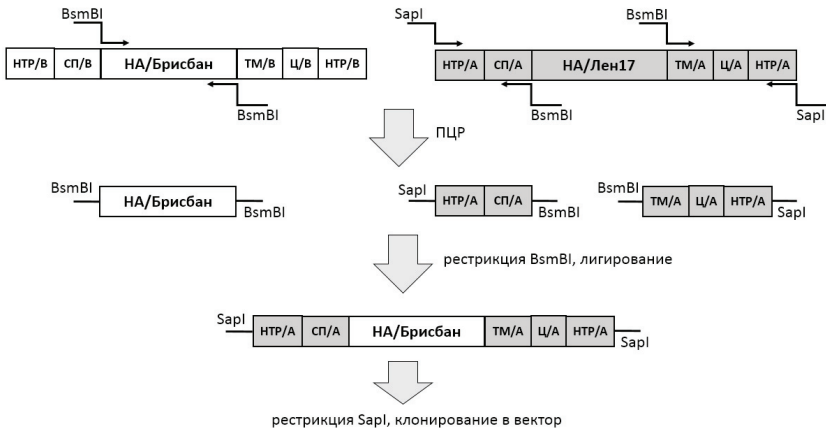


Схема получения химерного сегмента НА. Обозначения: НТР — не транслируемый регион, СП — сигнальный пептид, ТМ — трансмембранный домен, Ц — цитоплазматический домен, BsmBI, SapI — сайты рестрикции для соответствующих эндонуклеаз рестрикции

**КОНСТРУИРОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА  
MVA ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ, ЭКСПРЕССИРУЮЩЕГО  
ВИРУСОПОДОБНЫЕ ЧАСТИЦЫ ВИРУСА МАРБУРГ**

CONSTRUCTION OF VACCINIA VIRUS RECOMBINANT MVA STRAIN  
EXPRESSING VIRUS-LIKE PARTICLES OF MARBURG VIRUS

А. В. Ткачёва, Г. Ф. Сиволобова, А. А. Гражданцева,  
О. С. Таранов, С. А. Пьянков, Г. В. Кочнева

*ФБУН Государственный научный центр  
вирусологии и биотехнологии «Вектор»*

A. V. Tkacheva, G. F. Sivolobova, A. A. Grazhdantseva,  
O. S. Taranov, S. A. P'yankov, G. V. Kochneva,

*SRC VB "Vector", Russia*

E-mail: tkacheva\_av@mail.ru

**Аннотация**

Целью настоящего исследования является разработка безопасной вакцинной конструкции, имитирующей природную инфекцию вирусом Марбург (MARV). В качестве основы для такой конструкции мы использовали высокоаттенуированный штамм вируса осповакцины MVA, в геном которого встроили кассету трансгенов GP и VP40 вируса Марбург (рекомбинантный штамм MVA-GP-VP40-MARV). Мы показали экспрессию трансгенов в клетках CER, инфицированных рекомбинантным штаммом MVA-GP-VP40-MARV, и секрецию белков GP и VP40 MARV в культуральную среду. Электронно-микроскопический анализ подтвердил формирование полноценных ВПЧ вируса Марбург на мембранах клеток через 12 часов после инфицирования. Двукратная вакцинация морских свинок рекомбинантным штаммом MVA-GP-VP40-MARV в дозе  $10^8$  БОЕ/животное индуцировала формирование антител к вирусу Марбург в сыворотках крови в титрах от 1:100 до 1:800 и антител к вирусу осповакцины в титрах от 1:10K до 1:100K.

**Abstract**

The aim of this study is to design a safe vaccine construct that mimics a natural Marburg virus infection. As the basis for this construction, we used a highly attenuated strain

MVA of vaccinia virus with insertions of the cassette of Marburg virus GP and VP40 transgenes (recombinant strain MVA-GP-VP40-MARV). We showed the expression of transgenes in CER cells infected with the recombinant MVA-GP-VP40-MARV strain, and the secretion of GP and VP40 MARV proteins into the culture medium. Electron microscopy analysis confirmed the formation of a complete Marburg virus VLP on cell membranes 12 hours after infection. Double vaccination of guinea pigs with a recombinant strain MVA-GP-VP40-MARV at a dose of  $10^8$  PFU/animal induced the formation of antibodies to Marburg virus in blood serum in titers from 1:100 to 1:800 and antibodies to vaccinia virus in titers from 1:10K to 1:100K.

Проблема создания эффективных вакцин против особо опасных инфекций с высоким уровнем смертности и инвалидности, таких как флавивирусные, филовирусные инфекции и другие, остается нерешенной в настоящее время. Наиболее перспективной платформой, на наш взгляд, является комбинация двух подходов — использование безопасного вирусного вектора и непатогенных вирусоподобных частиц (ВПЧ), имитирующих вирионы особо опасного патогена.

Штамм MVA вируса осповакцины (VACV) является признанной во всем мире безопасной противооспенной вакциной и может использоваться в качестве высокоперспективного вируса-вектора для вакцин. Большая ёмкость генома VACV позволяет встраивать протяженные полицистронные конструкции.

В качестве трансгена для продукции ВПЧ особо опасных вирусов человека необходимо использовать кассету из несколько генов структурных белков этих вирусов, один из которых обладает способностью к самосборке (как правило, это матриксный вирионный белок), а другой/другие являются поверхностными гликопротеинами.

Поверхностный гликопротеин филовирусов GP является наиболее важным с точки зрения иммуногенности белком вириона. Антитела к поверхностному гликопротеину обладают протективной способностью, поэтому экспрессия гена этого белка является необходимым условием при создании противовирусных вакцин. Вирионный белок VP40 является матриксным белком, обладает способностью к самосборке и направляет почкование вирусных частиц на поверхности инфицированных клеток.

На первом этапе работы нами была получена инсерционная плаزمиды pDel2-GPppp-VPppp-Pat, содержащая вставку кассеты генов VP40 и GP вируса Марбург штамма Pppp. Инсерционная плаزمиды pDel2-GPppp-VPppp-Pat обеспечивает вставку кассеты двух генов GPppp и VPppp MARV в район второй делеции генома MVA и экспрессию гена GPppp под контролем ранне-позднего синтетического промотора VACV, а гена VPppp

под контролем мощного природного промотора VACV. Экспрессия этих двух генов MARV должна направлять формирование ВПЧ вируса Марбург в инфицированной рекомбинантным вирусом MVA клетке.

Рекомбинантный штамм MVA-GP-VP40-MARV получали методом временной доминантной селекции с использованием в качестве доминантного селективного маркера гена устойчивости к пуромицину Pat. Трансфекцию проводили на клетках CER с использованием инсерционной плазмиды pDel2-GPpporр-VPpporр-Pat для получения рекомбинантного варианта со встройкой кассеты генов GPpporр-VPpporр.

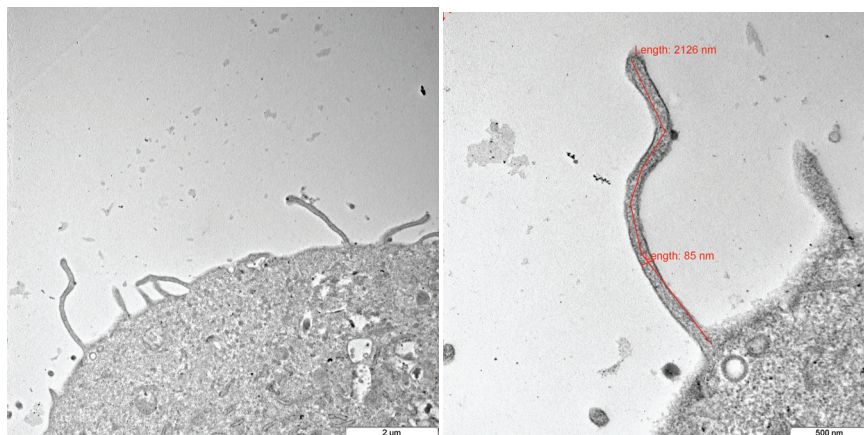
На следующем этапе работы провели Вестерн-блот анализ экспрессии трансгенов вируса Марбург в составе рекомбинантного штамма MVA-GP-VP40-MARV. Оба белка GP и VP40 MARV выявляются как в лизатах, так и в культуральной среде инфицированных клеток, что может происходить только в том случае, если они секретируются в виде ВПЧ. Для проверки и подтверждения этой гипотезы нами были подготовлены образцы инфицированных клеток и концентрированной культуральной среды для проведения электронно-микроскопического анализа.

Электронно-микроскопический анализ концентрированных образцов среды клеток, инфицированных рекомбинантным вариантом MVA-GP-VP40-MARV, выявил наличие большого количества ВПЧ размером 35–40 нм × 700–900 нм с характерной формой вирионов MARV. Предположительно, эти ВПЧ образованы белком VP40 и не имеют дополнительной мембранной оболочки с белком GP.

Электронно-микроскопический анализ клеток CER, инфицированных вариантом MVA-GP-VP40-MARV, показал формирование полноценных ВПЧ на мембранах клеток через 12 часов после инфицирования (см. рисунок). В более поздние сроки после инфицирования (24 и 32 часа), количество ВПЧ существенно уменьшается вследствие активной сборки вирионов вируса осповакцины на мембранах клеток. Однако в культуральной среде клеток, инфицированных рекомбинантным штаммом MVA-GP-VP-MARV, на протяжении всего времени наблюдения (32 часа) выявлено наличие большого количества ВПЧ с характерной формой вирионов MARV.

Для оценки иммуногенности проведена двукратная иммунизация 4-х морских свинок рекомбинантным штаммом MVA-GP-VP40-MARV внутримышечно в дозе  $10^8$  БОЕ/животное. Контрольную группу из 4-х морских свинок иммунизировали аналогичным образом с использованием ранее полученного штамма MVA-GFP, несущего встройку репортерного трансгена GFP в районе делеции II генома MVA (аналогично встройке кассеты GP-VP40 MARV). Наличие антител против вирусов Марбург и осповакцины детектировали в ИФА с использованием в качестве антигена инактивиро-

ванных цельновирионных препаратов вирусов. Через 2 недели после второй иммунизации (6 недель после первой иммунизации) рекомбинантным вариантом MVA-GP-VP40-MARV и контрольным вариантом MVA-GFP, ИФА выявил наличие антител к вирусу Марбург в опытной группе в титрах от 1:100 до 1:800, а также к вирусу осповакцины в титрах от 1:10К до 1:100К как в контрольной, так и в опытной группе.



Формирование ВПЧ вируса Марбург на мембранах клеток CER, инфицированных рекомбинантом MVA-GP-VP40-MARV. 12 часов после инфекции

В результате проделанной работы получен рекомбинантный штамм вируса осповакцины MVA-GP-VP40-MARV, экспрессирующий кассету генов структурных белков вируса Марбург с образованием иммуногенных ВПЧ, имитирующих природную инфекцию вируса.

## РОЛЬ НЕОНАТАЛЬНОГО Fc РЕЦЕПТОРА В ДЕПРОТЕИНИЗАЦИИ ВИРУСОВ ЕЧНО И КОКСАКИ А9

THE ROLE OF THE NEONATAL Fc RECEPTOR IN THE UNCOATING  
OF ECHOVIRUSES AND COXSACKIEVIRUS A9

П. С. Усольцева

*ФБУН «Екатеринбургский научно-исследовательский  
институт вирусных инфекций» Роспотребнадзора, Екатеринбург, Россия*

P. S. Usoltseva

*FBIS “Yekaterinburg Scientific Research Institute of Viral Infections” of the  
Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human  
Well-Being, Yekaterinburg, Russian Federation*

E-mail: savina\_polina@mail.ru

### **Аннотация**

Цель настоящей работы — определение функции человеческого неонатального рецептора для Fc фрагмента IgG (hFcRn) в качестве общего депротеинизирующего клеточного рецептора для вирусов ЕЧНО (эховирусов) и Коксаки А9. В экспериментах на культуре клеток RD были использованы вирусы ЕЧНО 3, 9, 11, 30-го типа и вирусы Коксаки А9, В4, В5; альбумин, очищенный от глобулинов, и поликлональные антитела к FcRn. Наблюдавшийся протективный эффект альбумина был обусловлен конкуренцией эховирусов и альбумина за один и тот же клеточный рецептор. Обнаружено защитное действие антител к FcRn аналогичное таковому у альбумина. В совокупности с ранее опубликованными данными, это позволило идентифицировать FcRn в качестве общего депротеинизирующего рецептора для эховирусов и вируса Коксаки А9.

### **Abstract**

The aim of this study was to determine the role of the human neonatal receptor for the Fc fragment of IgG (hFcRn) as a common uncoating cellular receptor for echoviruses and coxsackievirus A9. The experiments were carried out in RD cell line using echoviruses of types 3, 9, 11, 30; coxsackievirus A9, B4, B5; essentially globulin free albumin and polyclonal antibodies to FcRn. The observed protective effect of the albumin was caused by competition of echoviruses and the albumin for the same cellular receptor. Antibodies

to FcRn exerted protective effect similar to that of the albumin. These findings, combined with earlier published data, allowed identifying FcRn as a common uncoating receptor for echoviruses and coxsackievirus A9.

Согласно современной классификации, все типы вирусов ЕСНО (эховирусы) и вирус Коксаки А9 относят к виду *Enterovirus B* рода *Enterovirus* семейства *Picornaviridae*. К настоящему времени для многих представителей семейства пикорнавирусов описаны как первичные клеточные рецепторы, обеспечивающие связывание вирионов с плазматической мембраной клетки, так и основные — депротенинирующие рецепторы, взаимодействие с которыми приводит к трансформации вирионов в А-частицы с последующим освобождением вирусной геномной РНК [1]. Все известные депротенинирующие рецепторы пикорнавирусов относятся к суперсемейству иммуноглобулинов: 1) PVR (CD155) — рецептор для всех типов полиовирусов; 2) CAR — коксакивирусный-аденовирусный рецептор для всех типов вирусов Коксаки В; 3) ICAM-1 — рецептор для всех типов мажорной группы риновирусов и трех типов вирусов Коксаки А (А13, А18, А21).

В 1992 году Mbida et al. [2] сообщалось о гликопротеине с молекулярной массой 44 кДа (gp44), моноклональные антитела (MAb) к которому, полученные авторами работы, защищали культуру клеток P2002 от инфицирования практически всеми типами эховирусов. Однако, сведения о дальнейших исследованиях клеточного рецептора gp44 в общедоступных поисковых системах отсутствуют. Ward et al. [4] был продемонстрирован защитный эффект моноклональных антител к бета-2-микроглобулину при заражении культуры клеток RD широким спектром типов эховирусов, но эффект наблюдался лишь в культуре клеток RD. Также Ward et al. [5] было установлено, что добавление альбумина в среду поддержания культуры клеток RD ингибировало инфекцию эховирусом 7 типа, подавляя образование А-частиц, но не препятствовало связыванию вируса с клетками.

Нами было сформулировано предположение об идентичности описанного ранее клеточного рецептора gp44 и человеческого неонатального рецептора для Fc фрагмента IgG человека (hFcRn). FcRn является трансмембранным гетеродимером, состоящим из тяжелой альфа-цепи (FCGRT), и нековалентно связанного с ней бета-2-микроглобулина. Молекула FCGRT представлена гликопротеином с молекулярной массой 45 кДа и имеет характерную для суперсемейства иммуноглобулинов структуру внеклеточных доменов. На поверхности клеток hFcRn выполняет функцию рецептора альбумина, а внутри клеток — функцию рецептора IgG и транспортного белка, обеспечивающего защиту IgG и альбумина от протеолитической деградации в лизосомах за счет рециркуляции или транцитоза связанного лиганда.

Целью настоящей работы было определение роли hFcRn в качестве общего депротеинизирующего рецептора для эховирусов и CVA9 в культуре клеток RD.

В работе использовали перевиваемую культуру клеток RD (клетки рабдомиосаркомы человека). Для проверки гипотезы были выбраны эховирусы с заведомо разными первичными клеточными рецепторами. Гемагглютинирующий (Daf<sup>+</sup>) клон 431-1 эховируса 11 типа (E11), использующий DAF (Decay-Accelerating Factor) в качестве первичного клеточного рецептора, и негемагглютинирующий (Daf<sup>-</sup>) клон 431-6, использующий другой, не идентифицированный клеточный рецептор, были получены и охарактеризованы ранее [3]. Daf<sup>+</sup> клинический изолят эховируса 3 типа (E3) и Daf<sup>-</sup> — клинические изоляты эховирусов 9 типа (E9), 30 типа (E30) и Коксакивируса A9 (CVA9) были выделены из ликвора больных энтеровирусным менингитом, генотипированы и охарактеризованы в лаборатории энтеральных вирусных инфекций ФБУН «ЕНИИВИ» Роспотребнадзора. В качестве отрицательного контроля использовали Daf<sup>-</sup> — клинические изоляты вирусов Коксаки типа B4 (CVB4) и B5 (CVB5).

Для ингибирования репродукции вирусов в работе использовали очищенный от глобулинов человеческий сывороточный альбумин (HSA-GF) (Sigma, США) в концентрации от 0,25 % до 4 %, и очищенные кроличьи поликлональные антитела (PAb) к hFcRn (Sino Biological, KHP) в концентрации от 0,15 до 10 мкг/мл.

Инфекционную активность вирусосодержащих жидкостей оценивали методом конечных разведений. Для определения инфекционного титра вирусов использовали формулу Спирмена–Кербера с расчётом суммарной аналитической погрешности. Для статистической обработки результатов использовали стандартные методы вариационной статистики. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

В начальной серии экспериментов было показано, что HSA-GF в физиологических концентрациях защищал культуру клеток RD при заражении несколькими типами эховирусов (E3, E9, E11) и вирусом CVA9, независимо от используемых ими связывающих рецепторов. Кроме того, HSA-GF не ингибировал инфекцию клеток RD вирусом CVB5, который использует в качестве депротеинизирующего рецептора CAR.

Аналогичный спектр протективной активности был показан при использовании PAb к hFcRn, которые защищали клетки RD от инфицирования эховирусами (E3, E9, E11, E30) и CVA9, но не вирусами CVB4 и CVB5. Поскольку связывание альбумина является физиологической функцией hFcRn, то общий механизм протективного эффекта, наблюдавшегося при использовании альбумина и PAb к hFcRn, был обусловлен их связыва-



нием с hFcRn, которое нарушало взаимодействие hFcRn с эховирусами и CVA9.

Ранее нами было показано [3], что *daf*<sup>+</sup> клон E11 в культуре клеток RD использовал рецептор DAF в качестве первичного рецептора и были получены косвенные доказательства того, что *daf*<sup>+</sup> и *daf* — клоны E11 используют общий клеточный рецептор, взаимодействующий с вирионом E11 в области каньона. Клеточный рецептор, блокированный альбумином и антителами, являлся общим для обоих клонов, что подкрепляло предположение о его каньон-связывающих свойствах и, следовательно, депротеинизирующей функции.

Спектр протективной активности HSA-GF и PAb к hFcRn, наблюдавшийся в культуре клеток RD, соответствовал спектру протективной активности описанных ранее MAб к gp44 в культуре клеток человеческого происхождения P2002 [2]. Поскольку MAб к gp44 ингибировали репродукцию практически всех типов эховирусов, а gp44 идентичен FCGRТ (альфа-цепи hFcRn), полученные нами результаты можно экстраполировать на всю группу эховирусов.

Таким образом, протективные эффекты HSA-GF и PAb к FcRn, независимые от типа вируса и способности вируса взаимодействовать с первичным клеточным рецептором, подтверждают роль FcRn в качестве общего каньон-связывающего и депротеинизирующего рецептора для эховирусов и CVA9 при репродукции в культуре клеток RD. Кинетика и величина протективных эффектов HSA-GF и PAb к hFcRn, были менее выраженными у эховирусов, способных к связыванию с DAF, по сравнению с вирусами, не взаимодействовавшими с DAF, при условиях неполного блокирования hFcRn. Данное наблюдение подтверждает двухэтапную схему взаимодействия DAF-зависимых эховирусов с рецепторами при входе в клетку: сначала со связывающим рецептором (DAF), затем — с депротеинизирующим (hFcRn).

## Литература

1. Bergelson J. M. Picornavirus entry. / Bergelson J. M., Coyne C. B // Adv. Exp. Med. Biol. 2013. V. 790. P. 24–41.
2. Mbida A. D. Monoclonal antibody specific for the cellular receptor of echoviruses / Mbida A. D., Gaudin O. G., Sabido O., Pozzetto B., Le Bihan J. C // Intervirology. 1992. V. 33. № 1. P. 17–22.
3. Novoselov A. V. A single amino acid substitution controls DAF-dependent phenotype of echovirus 11 in rhabdomyosarcoma cells. / Novoselov A. V., Rezaikin A. V., Sergeev A. G., Fadeyev F. A., Grigoryeva J. V., Sokolova Z. I // Virus Res. 2012. V. 166. № 1–2. P. 87–96.

4. Ward T. Role for beta2-microglobulin in echovirus infection of rhabdomyosarcoma cells. / Ward T., Powell R. M., Pipkin P. A., Evans D. J., Minor P. D., Almond J. W // *J. Virol.* 1998. V. 72. № 7. P. 5360–5365.

5. Ward T. Serum albumin inhibits echovirus 7 uncoating. / Ward T., Powell R. M., Evans D. J., Almond J. W // *J. Gen. Virol.* 1999. V. 80. № 2. P. 283–290.

**ОЦЕНКА ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ  
НА ОСНОВЕ СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ МАНЖЕТКИ  
ОБЫКНОВЕННОЙ (*ALCHEMILLA VULGARIS L.*)  
ПРИ ЗАРАЖЕНИИ МЫШЕЙ ВИРУСОМ ГРИППА А**

EVALUATION OF ANTIVIRAL ACTIVITY OF PREPARATIONS ON THE  
BASIS OF THE LADY'S MANTLE (*ALCHEMILLA VULGARIS L.*) TOTAL  
FLAVONOIDS AT MICE INFECTED WITH INFLUENZA A VIRUS

Е. И. Филиппова<sup>1</sup>, И. Е. Лобанова<sup>2</sup>, Г. И. Высочина<sup>2</sup>,  
Н. А. Мазуркова<sup>1</sup>, Л. Н. Шишкина<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии  
«Вектор» Роспотребнадзора

<sup>2</sup>ФГБУН Центральный Сибирский ботанический сад СО РАН

E. I. Filippova<sup>1</sup>, I. E. Lobanova<sup>2</sup>, G. I. Vysochina<sup>2</sup>,  
N. A. Mazurkova<sup>1</sup>, L. N. Shishkina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>SRC VB "Vector", Russia

<sup>2</sup>CSBG, SB RAS, Russia

E-mail: filippova\_ei@vector.nsc.ru

**Аннотация**

Показано, что экстракты, выделенные из манжетки обыкновенной (*Alchemilla vulgaris L.*) методами этилацетатного и этанольного извлечения, увеличивают выживаемость и продолжительность жизни мышей, инфицированных вирусом гриппа субтипов А(Н5N1) и А(Н3N2). Наибольшую защиту животных проявлял экстракт, полученный методом этилацетатного извлечения из корней растения.

**Abstract**

It was shown that extracts isolated from the Lady's mantle (*Alchemilla vulgaris L.*) obtained by the methods of ethyl acetate and ethanol extraction increase the survival rate and the average life expectancy of mice infected with the influenza virus subtypes A(H5N1) and A(H3N2). The extract obtained by ethyl acetate extraction from the roots of the plant showed the greatest protection of animals.

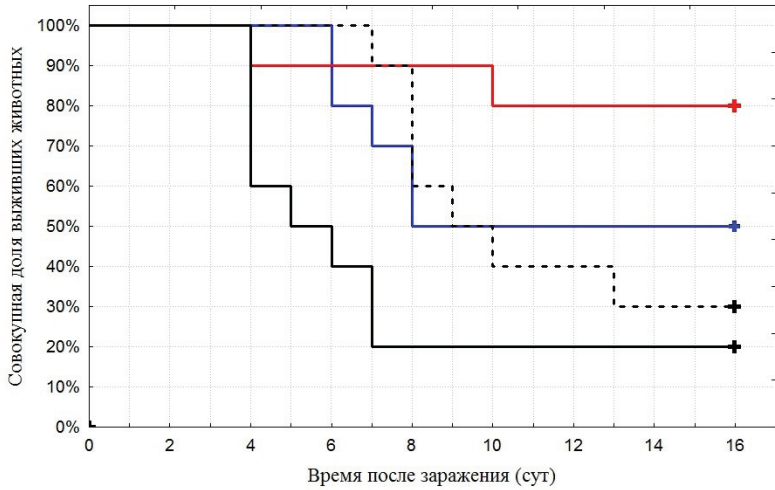
Эпидемическое распространение гриппа известно человечеству еще со времен Гиппократата, а массовые эпидемии и пандемии, охватывающие многие страны, — с XVI века. В XIX веке описано 12 крупных эпидемий, 8 из которых можно было отнести к пандемиям.

Пандемии возникают по причине появления новых подтипов вируса гриппа, против которых у людей нет иммунитета. Это происходит благодаря уникальной способности вируса гриппа к постоянной мутации, возникающей в следствии антигенного дрейфа или реассортации (обмена) генов.

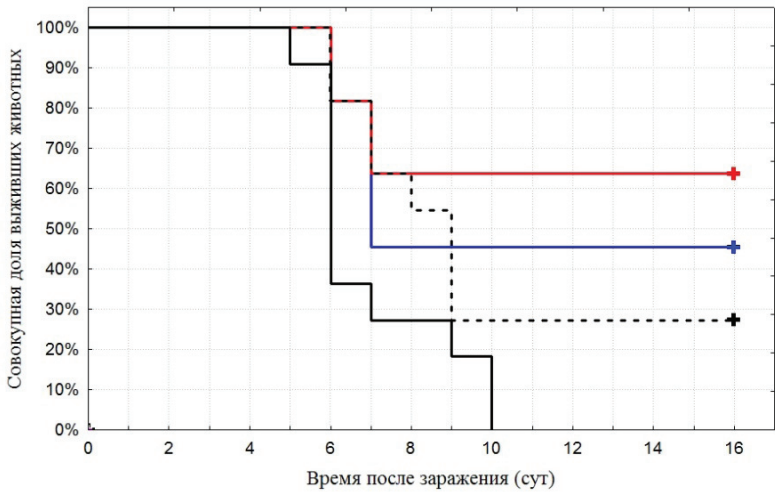
В последние годы значительно вырос интерес к противовирусным препаратам растительного происхождения, что обусловлено в первую очередь их доступностью, меньшей токсичностью и широким спектром действия по сравнению с синтетическими препаратами. *Alchemilla vulgaris* L. — манжетка обыкновенная является кормовым и лекарственным растением с чрезвычайно широким спектром биологической активности. Экспериментально доказано, что основным действующим началом *A. vulgaris* является полифенольный комплекс и, в первую очередь, флавоноиды.

Материалы и методы исследования. Для оценки противовирусной активности исследуемых образцов мы использовали штаммы вируса гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) и человека A/Aichi/2/68 (H3N2), полученные из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

В работе использовали водный раствор высушенного этилацетатного извлечения (экстракта) из корней манжетки обыкновенной (препарат № 5) и этанольные извлечения из ее надземной части (препараты № 7-1 и № 7-2), полученные по опубликованным методикам [1, 2]. Эксперименты проведены на аутбредных мышах ICR массой 14–16 г, полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», по 10–11 животных в каждой группе. Мышам перорально вводили экстракты в разовой дозе 12,5 мг/г массы мыши в объеме 0,2 мл (суточная доза составляла 25 мг/г) за 1 ч до заражения вирусом гриппа и далее в течение 5 сут после заражения. За животными наблюдали в течение 16 суток, определяли долю погибших и рассчитывали среднюю продолжительность жизни (СПЖ). При определении СПЖ в каждой экспериментальной группе учитывали число животных, проживших определенное количество дней после заражения до гибели, и число выживших животных. За максимальное значение СПЖ для выживших животных принимали 16 суток, т.е. гарантированное время прекращения гибели инфицированных мышей, что было установлено эмпирически при многократном повторении аналогичных экспериментов. Различия показателей выживаемости животных оценивались с помощью построения кривых Каплана — Мейера со сравнением СПЖ и доли выживших животных по логранговому критерию [3].



А



В

Графики выживаемости мышей, построенные по методу Каплана-Мейера:

А — после заражения ВГ А/Aichi/2/68 (H3N2)

и В — после заражения ВГ А/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1)

в дозе 10 ЛД<sub>50</sub> при введении препаратов и в контроле

Обозначения: — — контроль вируса; — — препарат № 5; — — препарат № 7-1; ··· — препарат № 7-2; «+» — окончание срока наблюдения, т. е. время прекращения гибели мышей, инфицированных ВГ

Результаты исследования. Анализ кривых выживаемости Каплана — Мейера, представленных на рисунке, выявляет значимые отличия по логранговому критерию между контрольными и опытными (получавшими образцы *A. vulgaris*) группами мышей, инфицированных соответствующими штаммами вируса гриппа А.

Так, выживаемость мышей, инфицированных штаммом A/Aichi/2/68 (H3N2), при введении образцов *A. vulgaris* № 5, № 7-1 и № 7-2 увеличивалась до 80, 50 и 30 % соответственно, относительно значения (20 %) в контрольной группе (рис. А).

При введении образцов *A. vulgaris* № 5, № 7-1 и № 7-2 мышам, инфицированным штаммом A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1), также наблюдалось значимое повышение показателей выживаемости до 64, 46 и 27 % соответственно, тогда как в контрольной группе выживаемость была 0 % (рис. В).

### Литература

1. Кукушкина Т. А., Жанаева Т. А., Зыков А. А., Обухова Л. А., Селянитская В. Г. Способ получения Р-витаминного средства. Патент № 2128516. 1999 г.
2. Филиппова Е. И., Кукушкина Т. А., Лобанова И. Е., Высочина Г. И., Мазуркова Н. А. Противовирусные свойства препарата на основе суммы флавоноидов манжетки обыкновенной (*Alchemilla vulgaris* L.) в отношении вируса гриппа // Фундаментальные исследования. 2015. № 2 (часть 23). С. 5139–5144.
3. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М.: Медиа Сфера, 2006. 312 с.

**ПРОТИВОВИРУСНЫЕ СВОЙСТВА ФЛАВОНОИДОСОДЕРЖАЩИХ  
ЭКСТРАКТОВ ИЗ *ALCHEMILLA VULGARIS L.***

ANTI-VIRAL PROPERTIES OF FLAVONOID-CONTAINING ETRACTS  
FROM *ALCHEMILLA VULGARIS L.*

Е. И. Филиппова<sup>1</sup>,  
Т. А. Кукушкина<sup>2</sup>, М. А. Проценко<sup>1</sup>, Г. И. Высочина<sup>2</sup>, И. Е. Лобанова<sup>2</sup>,  
О. Ю. Мазурков<sup>1</sup>, Л. Н. Шишкина<sup>1</sup>, Н. А. Мазуркова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии  
«Вектор» Роспотребнадзора

<sup>2</sup>ФГБУН Центральный Сибирский ботанический сад СО РАН

E. I. Filippova<sup>1</sup>, T. A. Kukushkina<sup>2</sup>, M. A. Protsenko<sup>1</sup>, G. I. Vysochina<sup>2</sup>,  
I. E. Lobanova<sup>2</sup>, O. Yu. Mazurkov<sup>1</sup>, L. N. Shishkina<sup>1</sup>, N. A. Mazurkova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>SRC VB “Vector”, Russia

<sup>2</sup>CSBG, SB RAS, Russia

E-mail: protsenko\_ma@vector.nsc.ru

**Аннотация**

Противовирусную активность в отношении ортопоксвирусов (вирусов осповакцины и оспы мышей) показали этилацетатные и этанольные экстракты, полученные из корней *Alchemilla vulgaris*, а также этанольные экстракты из травы растения. При этом очищенные хлороформом этилацетатные и этанольные экстракты *Alchemilla vulgaris* проявляли наивысшую вируснейтрализующую активность.

**Abstract**

Ethyl acetate and ethanol extracts obtained from the roots of *Alchemilla vulgaris* and ethanol extracts from the herb of the plant showed antiviral activity against orthopoxviruses (vaccinia virus and ectromelia virus). At the same time, ethyl acetate and ethanol extracts of *Alchemilla vulgaris* purified by chloroform demonstrated the highest neutralizing activity.

Флавоноиды являются наиболее многочисленным классом растительных фенольных соединений, для которых характерно структурное многообра-

зие, разносторонность биологических эффектов и невысокая токсичность. Флавоноиды обладают широким спектром фармакологической активности, например, капилляроукрепляющей, антиоксидантной, противовоспалительной, антибактериальной. Кроме этого, в настоящее время внимание исследователей привлекают вирусингибирующие свойства флавоноидов.

Показано что, из 50 исследуемых индивидуальных флавоноидов, 25 проявили противогерпетическую активность [1]. Выявлено, что флавоноиды способны ингибировать ферменты и рибозимы репликации и транскрипции. В этом направлении разрабатывается стратегия производства препаратов природного происхождения на основе включения флавоноидов с доказанной ингибирующей активностью в препараты противовирусного действия [5]. В работе [6] показано, что кверцетин 3-рамнозид обладал сильным эффектом против вируса гриппа. Доказано ингибирующее действие 5-гидрокси-7-метоксифлавона, 5,7-диметоксифлавона и 5-гидрокси-3,7-диметоксифлавона на активность протеаз вирусов иммунодефицита человека 1 типа, вируса гепатита С и цитомегаловируса [10]. Результаты исследований в работе [9] показывают, что глабранин и 7-О-метил-glabranine оказывают дозозависимое ингибирующее действие *in vitro* на вирус денге. 7-О-альфа-L-дирамнозид обладает противовирусным действием в отношении вируса парагриппа-3 [8]. В работе [7] показано, что кверцетин вызывал дозозависимое снижение инфекционности вируса простого герпеса типа 1, вируса полиомиелита типа 1, вируса парагриппа 3-го типа, и респираторно-синцитиального вируса в монослое культуры клеток.

Манжетка обыкновенная *Alchemilla vulgaris* L. из семейства Rosaceae благодаря высокому содержанию флавоноидов может стать перспективным источником для разработки и создания новых противовирусных средств. В надземной части *Alchemilla vulgaris* обнаружены кверцетин, астрагалин, рутин, гиперозид, кемпферол, рамноглокозид кемпферола, изо-кверцитрин и авикулярин. В корнях манжетки обыкновенной найдены катехины и лейкоантоцианы [2].

Объектом исследования служили измельченные высушенные корни и трава, а также сырая масса травы *Alchemilla vulgaris*, собранные на Семинском перевале Горного Алтая в фазу бутонизации в 2012 году. Из сухой травы получали водные и этанольные экстракты по разработанной технологии [3]. Из сырой массы травы получали этанольное извлечение, которое затем очищали хлороформом и этилацетатом [4]. Из корней исследуемого растения получали как сухие водные и этанольные экстракты, так и этилацетатное извлечение, очищенное хлороформом.

Для качественного анализа флавоноидов в экстрактах *Alchemilla vulgaris* использовали хроматографические методы. Количественное содержание



флавоноидов в экстрактах определяли с помощью спектрофотометрических методов. Тестирование токсичности и противовирусной активности образцов *in vitro* проводили на перевиваемой линии клеток почки зеленой марьшанки Vero. Вируснейтрализующие свойства растительных образцов оценивали по изменению инфекционности ортопоксвирусов (титра) в монослое клеток в профилактической схеме внесения экстрактов и вирусов. Титры вируса определяли методом подсчета бляшек и выражали в десятичных логарифмах (lg) бляшкообразующих единиц в мл, изменение титров, то есть индекс нейтрализации вируса в присутствии препарата по сравнению с контролем оценивали в lg.

Содержание флавоноидов в очищенном этилацетатном извлечении, выделенном из корней *Alchemilla vulgaris*, и в очищенном этанольном экстракте, выделенном из сырой массы травы растения, составило 70 % и 71 % соответственно. При этом, очищенный этилацетатный экстракт корней содержит в основном катехины и лейкоантоцианы. В неочищенных этанольных экстрактах из корней и травы растения содержание флавоноидов составило 5 % и 6 % соответственно. Показано, что флавоноиды в неочищенном этанольном экстракте травы представлены в основном катехинами и флавонолами, а в этанольном экстракте корней манжетки, полученным тем же методом, представлены катехинами и лейкоантоцианами.

Индексы нейтрализации вируса осповакцины и вируса оспы мышей под действием очищенного этилацетатного извлечения из корней манжетки в клеточной культуре Vero составили 3,01 и 3,50 lg соответственно, а под действием очищенного этанольного экстракта из сырой массы травы индексы нейтрализации вируса осповакцины и вируса оспы мышей составили 1,80 и 2,17 lg соответственно. В то же время, индексы нейтрализации ортопоксвирусов под действием неочищенных этанольных экстрактов были не выше 1,68 lg. Водные экстракты растения заметной активности в отношении исследуемых вирусов не проявляли.

Результаты исследований противовирусных свойств в культуре клеток Vero выявили, что этанольные и этилацетатные экстракты корней *Alchemilla vulgaris*, а также этанольные экстракты, полученные из травы манжетки, проявляют активность в отношении ортопоксвирусов (вирусов осповакцины и оспы мышей). Следует отметить, что очищенные экстракты из корней и травы растения, содержащие в своем составе повышенное содержание флавоноидов, обладают более высокой противовирусной активностью.

Таким образом, препараты *Alchemilla vulgaris*, содержащие комплекс флавоноидов, могут являться перспективными источниками при создании противовирусных препаратов для лечения заболеваний, вызываемых ортопоксвирусами.

### Литература

1. Корулькин, Д. Ю. Природные флавоноиды / Д. Ю. Корулькин, Ж. А. Абилов, Р. А. Музычкина, Г. А. Толстик; Рос. акад. наук, Сиб. отд., Новосиб. ин-т органической химии. Новосибирск: Академическое изд-во «Тео», 2007. 232 с.
2. Мазуркова Н. А., Кукушкина Т. А., Высочина Г. И., Ибрагимова Ж. Б., Лобанова И. Е., Филиппова Е. И., Мазурков О. Ю., Макаревич Е. В., Шишкина Л. Н., Агафонов А. П. Изучение противовирусной активности экстрактов манжетки обыкновенной (*Alchemilla vulgaris* L.) // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 1(14). С. 118–127.
3. Проценко М. А., Трошкова Г. П., Косогова Т. А., Теплякова Т. В. Биологически активные соединения плодовых тел и культивируемого мицелия базидиального гриба *Daedaleopsis tricolor*. Фундаментальные исследования, 2014. (12–1). С. 136–140.
4. Патент РФ № 2128516. Способ получения Р-витаминного средства / Т. А. Кукушкина, Т. А. Жанаева, А. А. Зыков, Л. А. Обухова, В. Г. Селянитская. 1999.
5. Цыдендамбаев П. Б., Хышиктуев Б. С., Николаев С. М. Биологические эффекты флавоноидов / Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2006. № 6 (52). С. 229–233.
6. Choi H. J., Song J. H., Park K. S., Kwon D. H. Inhibitory effects of quercetin 3-rhamnoside on influenza A virus replication // European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2009. P. 329–333.
7. Kaul T. N., Middleton E. Jr., Ogra P. L. Antiviral effect of flavonoids on human viruses // Journal of Medical Virology. 1985. V. 15. № 1. P. 71–79.
8. Özcelika B. Antiviral and Antimicrobial Assessment of Some Selected Flavonoids / B. Özcelika, I. Orhanb, G. Tokerb // Naturforsch. 2006. V. 61. P. 632–638.
9. Sanchez I., Gómez-Garibay F., Taboada J., Ruiz. B. H. Antiviral effect of flavonoids on the dengue virus // Phytother Res. 2000. V. 14. № 2. P. 89–92.
10. Sookkongwaree K., Geitmann M., Roengsumran S., Petsom A., Danielson UH. Inhibition of viral proteases by Zingiberaceae extracts and flavones isolated from *Kaempferia parviflora* // Pharmazie. 2006. V. 61 (8). P. 717–721.

**РЕКОМБИНАНТНЫЕ ПЛАЗМИДЫ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЕ  
СБОРКУ ФИЛОВИРУСНЫХ ВИРУСОПОДОБНЫХ ЧАСТИЦ\***RECOMBINANT PLASMIDS FOR ASSEMBLY  
OF FILOVIRUS VIRUS-LIKE PARTICLES

Д. Н. Щербаков<sup>1,2</sup>, А. А. Исаева<sup>1</sup>, А. В. Зыбкина<sup>1</sup>, Н. В. Волкова<sup>1</sup>,  
А. В. Иванова<sup>1</sup>, Е. И. Казачинская<sup>1</sup>, О. В. Пьянков<sup>1</sup>,  
А. В. Зайковская<sup>1</sup>, О. С. Таранов<sup>1</sup>, Н. С. Щербакова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФБУН Государственный научный центр  
вирусологии и биотехнологии «Вектор»

<sup>2</sup>Алтайский государственный университет

D. N. Shcherbakov<sup>1,2</sup>, A. A. Isaeva<sup>1</sup>, A. V. Zybkina<sup>1</sup>, N. V. Volkova<sup>1</sup>,  
A. V. Ivanova<sup>1</sup>, E. I. Kazachinskaya<sup>1</sup>, O. V. Pyankov<sup>1</sup>, A. V. Zaykovskaya<sup>1</sup>,  
O. S. Taranov, N. S. Shcherbakova

<sup>1</sup>SRC VB "Vector", Koltsovo, Russia

<sup>2</sup>Altai State University, Barnaul, Russia

**Аннотация**

Геморрагическая лихорадка Эбола — острое вирусное заболевание, смертность людей от которой может достигать 90 %. Вспышка геморрагической лихорадки Эбола в западной Африке в 2013–2015 годах оказалась необычайно продолжительной и массовой. Традиционные методы изучения вирусов требуют работы с использованием «живых» вирусов. Но работа с высокопатогенными вирусами, к которым относится вирус Эбола, ограничена необходимостью соблюдать специальные условия биобезопасности (BSL-4). Адекватной безопасной заменой инфекционным вирусам в таких работах могут служить псевдовирусы. В работе был сконструирован ряд рекомбинантных плазмидных векторов содержащих гены белков NP и VP40 а так же ген GP вируса Эбола. Было показано, что сконструированные плазмиды при трансфекции ими культуры клеток НЕК293Т обеспечивают формирование вирусоподобных частиц, имеющих вытянутую форму. Добавление вирусоподобных частиц к клеткам TZM-bl приводит к достоверному увеличению уровня люминесценции.

© Д. Н. Щербаков, А. А. Исаева, А. В. Зыбкина, Н. В. Волкова, А. В. Иванова, Е. И. Казачинская, О. В. Пьянков, А. В. Зайковская, О. С. Таранов, Н. С. Щербакова, 2019

\* Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ № 18-04-00458.

**Abstract**

Ebola hemorrhagic fever is an acute viral disease, the mortality of people from which can reach 90%. The outbreak of Ebola hemorrhagic fever in West Africa in 2013–2015 was unusually long and massive. Traditional methods for studying viruses require working with live viruses. But work with highly pathogenic viruses, which include the Ebola virus, is limited by the need to comply with special biosafety conditions (BSL-4). Pseudoviruses can serve as an adequate safe replacement for infectious viruses in such works. In the work, a number of recombinant plasmid vectors containing the NP and VP40 protein genes as well as the GP Ebola virus gene were constructed. It was shown that the constructed plasmids upon transfection of HEK293T cell culture by them provide the formation of virus-like particles having an elongated shape. The addition of virus-like particles to TZM-bl cells leads to a significant increase in the level of luminescence.

Геморрагическая лихорадка Эбола — острое вирусное заболевание, смертность людей от которой может достигать 90%. Возбудитель лихорадки Эбола был открыт в 1976 году. В течение 30 лет этот вирус напоминал о себе внезапными вспышками, которые сопровождалась высокой смертностью, однако быстро затухали. Ситуация изменилась в 2013 году. Вспышка геморрагической лихорадки Эбола в западной Африке в 2013–2015 годах оказалась необычайно продолжительной и массовой. По данным Всемирной организации здравоохранения, количество погибших от вспышки вируса Эбола в 2014 году, превысило 11 тысяч человек (WHO, 2015). Традиционные методы изучения вирусов требуют работы с использованием «живых» вирусов. Но работа с высокопатогенными вирусами, к которым относится вирус Эбола, ограничена необходимостью соблюдать специальные условия биобезопасности (BSL-4). Адекватной безопасной заменой инфекционным вирусам в таких работах могут служить псевдовirusы. Инфекционность псевдовirusных частиц ограничена лишь одним циклом инфекции, что обеспечивает биологическую безопасность этой системы [1]. Не маловажным преимуществом использования псевдовirusных систем является то, что стоимость работ с псевдовirusами многократно ниже, чем при использовании инфекционных изолятов [2].

Таким образом, разработка новой системы получения псевдовirusов Эбола, способных имитировать особенности натурального вируса является актуальной задачей.

Первая часть работы включала получение рекомбинантных плазмид содержащих последовательности, кодирующие три вирусных белка вируса Эбола отвечающие за почкование и морфогенез вируса, GP (поверхностный гликопротеин), NP (нуклеопротеин) и VP40 (матриксный белок).

В последовательность праймеров для амплификации генов NP и VP40 было решено включить сайты гидролиза BamHI и HindIII для встройки продуктов в вектор pQE30. Такой подход был выбран для проверки сохранности функциональности генов NP и VP40 при помощи прокариотической системы экспрессии. Анализ биомассы клонов *E.coli* штамм BL21(DE3) содержащих рекомбинантные плазмиды показал наличие целевых белков. Белки взаимодействовали с иммунными сыворотками человека и лабораторных животных в ИФА и иммуноблоте.

Исходя из полученного результата было решено перенести гены белков NP и VP40 а так же ген GP в челночный вектор pcDNA3.1. Структуры полученных плазмид pcDNA3-NPE, pcDNA3-VP40E и pcDNA3-GPE были подтверждены секвенированием. Для получения вирусоподобных частиц была проведена кальций-фосфатная котрансфекция эукариотических клеток HEK293T тремя полученными плазмидами. Микроскопические исследования показали формирование филоментоподобных структур спустя сутки после трансфекции культуры клеток. Несмотря на получения вирусоподобных частиц (ВПЧ) необходимой морфологии, они не обладают маркерным признаком, на основе которого можно было бы проводить количественные измерения. Поэтому следующим этапом работы стало проектирование плазмид обеспечивающих сборку филовирусных вирусоподобных частиц, содержащих маркерный признак. В качестве маркера была выбрана люциферза, фермент, уровень синтеза которого можно детектировать при помощи добавления специфического субстрата.

Для реализации этого подхода было решено сконструировать две дополнительные плазмиды, pcDNA3-NPE-P2A-VP40E и pcDNA3-VP40E<sub>tat</sub>. Первая, при попадании в клетки HEK293T должна обеспечивать одновременный синтез двух белков вируса Эбола NP и VP40. Продуктом синтеза второй плазмиды выступает химерный белок включающий белок Tat ВИЧ-1 и VP40 вируса Эбола. Белок Tat является активатором вирусного промотера, под контролем которого находится синтез люциферазы в клетках TZM-bl, которые можно использовать для анализа инфекционности полученных ВПЧ. Структура полученных плазмид была подтверждена секвенированием по Сенгеру.

Для сборки ВПЧ, плазмидами pcDNA3-GPE, pcDNA3-NPE-P2A-VP40E и pcDNA3-VP40E<sub>tat</sub> проводили кальций-фосфатную котрансфекцию эукариотических клеток HEK293T. Микроскопический анализ препаратов клеток после трансфекции показал формирование вытянутых структур.

Для проверки, способности полученных частиц проникать в клетки мишени, спустя двое суток после трансфекции собирали клеточный супернатант. Затем супернатант добавляли к монослою клеток TZM-bl. Спустя двое

суток после добавления супернатанта, проводили лизис клеток и добавляли люциферин (субстрат для люциферазы). Регистрацию сигнала люминесценции проводили при помощи люцинометра (LuMate). В результате было показано что для лунок планшета, в которые были добавлен препарат полученных ВПЧ наблюдается повышение уровня люминесцентного сигнала в 50–100 раз, по сравнению с контролем.

Таким образом, было показано, что сконструированные плазмиды при трансфекции ими культуры клеток НЕК293Т обеспечивают формирование ВПЧ, имеющих вытянутую форму. Добавление вирусоподобных частиц к клеткам TZM-bl приводит к достоверному увеличению уровня люминесценции.

### **Литература**

1. Whitt M. A. Generation of VSV pseudotypes using recombinant  $\Delta$ G-VSV for studies on virus entry, identification of entry inhibitors, and immune responses to vaccines // *Journal of virological methods*. 2010. Т. 169. №. 2. С. 365–374.
2. Wang Y., Cui R., Li G., Gao Q., Yuan S., Altmeyer R., Zou G. Teicoplanin inhibits Ebola pseudovirus infection in cell culture // *Antiviral research*. 2016. Т. 125. С. 1–7.



## РАЗДЕЛ 4

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ**

---

**РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА  
GFAP СПЕЦИФИЧЕСКОГО МАРКЕРА АСТРОЦИТОВ \***DESIGN A SYSTEM VISUALIZATION OF GENE EXPRESSION GFAP  
MARKER SPECIFIC ASTROCYTES

А. А. Авдеев, А. А. Малахова, С. М. Закиян

*ФГБУН Федеральный исследовательский центр институт цитологии  
и генетики СО РАН*

A. A. Avdeev, A. A. Malakhova, S. M. Zakiyan

*THE FEDERAL RESEARCH CENTR, Institute Cytology and Genetic, Russia*

E-mail: avdeev@bionet.nsc.ru

**Аннотация**

Астроглиальные клетки выполняют важные функции в гомеостазе нейронов, регулируют поддержание жизнеспособности и нейропластичности. Протоколы дифференцировки ИПСК позволяют получать лишь небольшую популяцию релевантных астроглиальных клеток в гетерогенной популяции нейронов. Для получения чистой популяции астроцитов необходимо проводить отбор нужного типа клеток, например, с помощью интегрированных в геном флуоресцентных генов репортеров, которые помогают визуализиро-

---

© А. А. Авдеев, А. А. Малахова, С. М. Закиян, 2019

\* Работа поддержана Программой фундаментальных исследований Президиума РАН I.2.44 и бюджетным проектом 0259-2019-0002.

вать экспрессию специфичных генов маркеров, характерных для релевантных клеток.

### Abstract

Astroglial cells play important functions in neuronal homeostasis, maintain viability, regulate neuroplasticity. The iPSC differentiation protocols allow obtaining only a small population of relevant astroglial cells in a heterogeneous population of neurons. To enrich an astrocyte population, it is necessary to carry out cell sorting, for example, by fluorescent reporter genes integrated into the genome that help to visualize the expression of the specific marker genes in relevant cells.

Исследование астроглиальных клеток представляет большой интерес при изучении процессов нейродегенерации и нейропластичности. Клетки астроглии выполняют важные функции поддержания нормального гомеостаза нейронов, регуляции синаптической пластичности, участвуют в энергетическом обеспечении специфических функций нейронов и являются неотъемлемым компонентом глутаматергического синапса, влияют на выброс проапоптотических факторов. Несмотря на схожесть выполняемых функций, астроглия представляет собой гетерогенную популяцию клеток. Для изучения механизмов взаимодействия астроглии с нейрональными клетками, важным условием является получение чистых популяций целевых типов клеток. Несовершенство протоколов дифференцировки ИПСК приводит к незначительному выходу релевантных типов клеток. Решением этой проблемы может стать отбор целевых клеток с использованием интегрированных в геном флуоресцентных репортеров, которые помогают осуществлять визуализацию экспрессии специфических генов-маркеров. Ранее нами была получена линия ИПСК с геном флуоресцентного белка RFP, маркирующим экспрессию глиального фибриллярного кислого белка GFAP. Ген RFP был интегрирован в 3'-конец гена GFAP через P2A-пептид, что обеспечивало совместную экспрессию целевого гена и флуоресцентного белка-репортера. Последующим шагом была дифференцировка ИПСК в астроциты, у которых репортерный ген *RFP* должен маркировать экспрессию астроцит-специфичного гена *GFAP*. ОТ-ПЦР анализ выявил наличие РНК-продукта гена *RFP* в дифференцированных астроглиальных производных, однако свечения не наблюдалось, что говорило о недостаточной функции промотора GFAP для визуализации работы гена. Нами была изготовлена донорная плазмидная конструкция, содержащая ген CRE-рекомбиназы, фланкированный плечами гомологии к 3'-концу гена GFAP. Ген CRE-рекомбиназы интегрировали в локус GFAP с помощью системы CRISPR/Cas9. Другую репортерную конструкцию LoxP-GFP-LoxP-RFP интегрировали в локус



AAVS1. При синтезе CRE-рекомбиназы с промотора GFAP, происходит вырезание последовательности ДНК, расположенной между LoxP сайтами. Таким образом, ген GFP вместе со стоп кодоном убирается из конструкции, ранее интегрированной в локус AAVS1. В результате происходит изменение свечения GFP зеленого, на RFP красный. Для интеграции генетических конструкций в геном нами были использованы плазмидные конструкции, кодирующие систему CRISPR/Cas9, спейсерные последовательности которых были подобрана к локусу AAVS1 и GFAP. Работоспособность созданной системы визуализации была проверена на клетках линии НЕК 293 А. Внесение конструкций осуществлялось с помощью набора для трансфекции липофектамин 3000. Клетки были селектированы антибиотиками пурамицин и неомицин, гены устойчивости к которым несли интегрируемые в геном генетические конструкции. Точность встройки подтверждали с помощью ПЦР и секвенированием по Сенгеру. Оценка свечения проводилась под флуоресцентным микроскопом TI-Eclipse (Nikon). Таким образом, разработанная система позволяет интегрировать в геном клеток трансген флуоресцентного белка для визуализации астроглиальных производных в смешанной популяции дифференцированных клеток человека. Также на дальнейшем этапе будет выбран и отработан оптимальный протокол дифференцировки ИПСК в астроциты.

**ДИНАМИКА И УРОВЕНЬ ИНФИЦИРОВАННОСТИ КЛЕЩЕЙ  
ВОЗБУДИТЕЛЯМИ ТРАНСМИССИВНЫХ ИНФЕКЦИЙ  
НА ТЕРРИТОРИИ НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ В 2018 г.**

THE DYNAMICS AND INFECTION RATE OF TICKS INFECTED WITH  
ATOGENS OF NON-VECTOR-BORNE INFECTIONS  
IN THE NOVOSIBIRSK REGION IN 2018

А. С. Акимова<sup>1,2</sup>, Н. Л. Тупота<sup>1</sup>, Е. И. Кривошеина<sup>1,3</sup>, А. И. Кузнецов<sup>1,3</sup>,  
М. Ю. Карташов<sup>1,3</sup>, Т. П. Микрюкова<sup>1</sup>, В. А. Терновой<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФБУН Государственный научный центр  
вирусологии и биотехнологии «Вектор»

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Новосибирский ГАУ»

<sup>3</sup> Новосибирский государственный университет

A. S. Akimova<sup>1,2</sup>, N. L. Tupota<sup>1</sup>, E. I. Krivosheina<sup>1,3</sup>, A. I. Kuznetsov<sup>1,3</sup>,  
M. Yu. Kartashov<sup>1,3</sup>, T. P. Mikryukova<sup>1</sup>, V. A. Ternovoi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> FBRI SRC VB «Vector», Rospotrebnadzor, Russia

<sup>2</sup> FSBEI HE «Novosibirsk SAU», Russia

<sup>3</sup> Novosibirsk State University, Russia

**Аннотация**

С помощью полимеразной цепной реакции была изучена зараженность риккетсиями, боррелиями и вирусом клещевого энцефалита 1000 клещей, напавших на людей на территории Новосибирской области в 2018 г. Генотипирование клещей путем определения и сравнения нуклеотидной последовательности фрагмента цитохромоксидазы показало, что 107 были отнесены к виду *Ixodes persulcatus*, 436 — *Ixodes pavlovskyi*, 413 — *Dermacentor reticulatus*, 39 — *Dermacentor marginatus*, 5 — *Dermacentor nuttalli*. Уровень зараженности клещей вирусом клещевого энцефалита составил  $3,6 \pm 0,6\%$ , бактериями рода боррелии —  $8,0 \pm 0,9\%$ , риккетсиями —  $21,6 \pm 1,3\%$ .

**Abstract**

We have studied 1000 ticks, which were found in the Novosibirsk Region in 2018, and tick's infection of rickettsia, borrelia, and tick-borne encephalitis viruses using a polymer chain reaction. The research on genetic typing by determination and comparison nucleotide fragments of cytochrome oxidase showed that 107 of them belonged to *Ixodes per-*

*sulcatus*, 436 belonged to *Ixodes pavlovskyi*, 413 belonged to *Dermacentor reticulatus*, 39 belonged to *Dermacentor marginatus*, 5 belonged to *Dermacentor nuttalli*. The tick infection rate of tick-borne encephalitis virus was  $3.6 \pm 0.6\%$ , Borrelia bacteria —  $8 \pm 0.9\%$ , Rickettsia —  $22 \pm 1.3\%$ .

Природно-очаговые инфекции, передающиеся клещами, представляют серьезную проблему для здравоохранения на большинстве территорий России, в частности для Западной Сибири. Известно, что с иксодовыми клещами связано существование и передача человеку целого ряда возбудителей заболеваний вирусной, бактериальной и протозойной природы. Группами риска по заболеваемости инфекциями, передающимися иксодовыми клещами, являются люди, посещающие природные биотопы. Широкое распространение клещей семейства *Ixodidae* в различных природных зонах России, мозаичность их пространственного распределения, потенциальная опасность клещей как переносчиков инфекционных болезней человека и определяют актуальность изучения видового разнообразия иксодовых клещей и переносимых ими инфекций в Новосибирской области (НСО).

**Целью** данной работы является изучение уровня инфицированности клещей возбудителями трансмиссивных инфекций (вирус клещевого энцефалита (ВКЭ), боррелии, риккетсии) на территории Новосибирской области в 2018г. Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Создание коллекции ДНК и кДНК из клещей, снятых с людей в НСО;
2. Определение родовой принадлежности клещей методом полимеразно-цепной реакции (ПЦР) и последующего секвенирования гена субъединицы I цитохромоксидазы (*COI*);
3. Скрининг клещей на наличие генетических маркеров возбудителей инфекционных заболеваний (ВКЭ, боррелиоз, риккетсиоз)

### **Материалы и методы**

Всего в исследование было взято 1000 клещей, которые были сняты с людей с мая по сентябрь в НСО в 2018 году. Гомогенизация клещей осуществлялась с использованием лабораторного гомогенизатора Tissue Lyser (Qiagen, Германия) в 300 мкл стерильного физраствора. Выделение нуклеиновых кислот проводилось методом фенол-хлороформной экстракции с использованием коммерческого набора («Литех», Россия), согласно инструкции производителя, из 100 мкл гомогената. Гомогенизация, выделение нуклеиновых кислот проводились в стерильном боксе биологической безопасности II класса с отсекающим воздушным потоком. Установление вида клеща проводили путем определения нуклеотидной последовательности фрагмента гена субъединицы I цитохромоксидазы (*COI*), локализованного в митохондри-

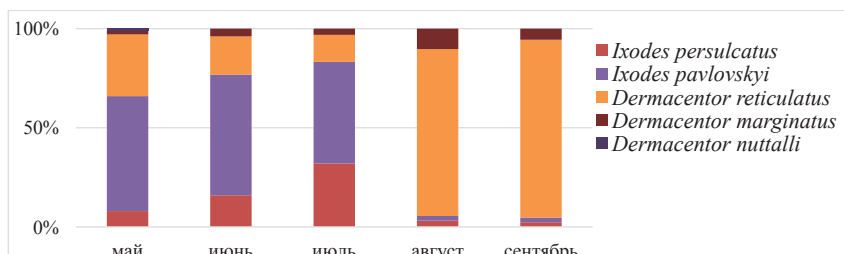
альном геноме клеща. Скрининг клещей на наличие генетического материала ВКЭ проводили с помощью метода ПЦР с использованием праймеров на фрагмент гена белка E ВКЭ. ДНК была исследована на наличие *Rickettsia spp.* гена *gltA* и на наличие генетических маркеров *Borrelia spp* гена *omp66*. Секвенирование продуктов амплификации проводили по обеим цепям методом Сэнгера на основе капиллярного электрофореза с помощью автоматического секвенатора 3130xl Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США). Все последовательности были идентифицированы с помощью программного обеспечения BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) и сравнены с последовательностями, доступными в GenBank.

### Результаты и их обсуждение

Путем определения нуклеотидной последовательности фрагмента гена *COI* митохондриального генома клещей удалось восстановить видовую принадлежность клещей, снятых с людей. Из 1000 исследованных клещей 107 были отнесены к виду *Ixodes persulcatus*, 436 — *Ixodes pavlovskyi*, 413 — *Dermacentor reticulatus*, 39 — *Dermacentor marginatus*, 5 — *Dermacentor nuttalli*.

Среди 500 клещей, напавших на людей в мае 2018 г., 330 (66 %) принадлежат к роду *Ixodes*, а 270 (34 %) к роду *Dermacentor*. В июне того же года среди 125 клещей, напавших на жителей НСО, 96 (77 %) были отнесены по результатам ПЦР с родоспецифичными праймерами к роду *Ixodes*, а 29 (23 %) к роду *Dermacentor*. По результатам ПЦР с родоспецифичными праймерами среди 125 клещей, напавших на людей в июле 2018 г., 104 (83 %) были отнесены к роду *Ixodes*, а 21 (17 %) к роду *Dermacentor*. Среди 125 клещей, напавших на людей в августе 7 (6 %) были отнесены по результатам ПЦР с родоспецифичными праймерами к роду *Ixodes*, а 128 (94 %) к роду *Dermacentor*. Среди 125 клещей, напавших на людей в сентябре 6 (5 %) были отнесены по результатам ПЦР с родоспецифичными праймерами к роду *Ixodes*, а 119 (95 %) к роду *Dermacentor* (см. рисунок).

Генетический материал ВКЭ был обнаружен в 36 образцах клещей, суммарный уровень инфицированности составил  $3,6 \pm 0,6$  %. Пики уровня инфицированности клещей ВКЭ наблюдаются в июне ( $8,0 \pm 5,6$  %) и августе ( $7,2 \pm 5,4$  %) (см. таблицу). К дальневосточному генотипу было отнесено 13 %, к сибирскому — 87 % выявленных изолятов ВКЭ. Циркуляция этих двух генотипов характерна для юга Западной Сибири и Новосибирской области. Характерной особенностью этих генотипов ВКЭ является способность сибирского генотипа вызывать хронические формы клещевого энцефалита, а дальневосточный генотип ассоциируется с тяжелыми формами клещевого энцефалита с высоким уровнем летальности.



Динамика видовой принадлежности клещей, нападающих на людей, во время эпидемиологического сезона 2018 г. (Новосибирская обл.)

Генетический материал боррелий был обнаружен в 80 ( $8,0 \pm 0,9$  %) исследуемых образцах. Была установлена видовая принадлежность найденных боррелий: 70 ( $87,0 \pm 3,8$  %) *B. garinii*, 9 ( $11,0 \pm 3,5$  %) *B. afzelii*, 1 ( $2,0 \pm 1,6$  %) *B. tuamotoi*. Пик уровня инфицированности клещей боррелиями наблюдался в июле ( $44,0 \pm 19,7$  %). *B. afzelii*, *B. garinii* вызывают иксодовый клещевой боррелиоз, *B. tuamotoi* — беззритемный боррелиоз, имеющий более продолжительную лихорадку.

Генетический материал риккетсий был обнаружен в 216 ( $21,6 \pm 1,3$  %) исследуемых образцах. На основании последовательности фрагмента гена *gltA* была определена видовая принадлежность риккетсий: 121 ( $56 \pm 3,4$  %) *R. raoultii*, 3 ( $1,5 \pm 0,8$  %) *R. helvetica*, 91 ( $42 \pm 3,4$  %) *R. tarasevichiae*, 1 ( $0,5 \pm 0,2$  %) *R. sibirica* (выделена из клеща вида *D. marginatus*).

### Встречаемость изучаемых инфекций в течение эпидемиологического сезона 2018 г.

Инфекции	Май		Июнь		Июль		Август		Сентябрь	
	Количество клещей									
	Шт.	%	Шт.	%	Шт.	%	Шт.	%	Шт.	%
ВКЭ	12	$2,4 \pm 0,2$ %	10	$8,0 \pm 5,6$ %	5	$4,0 \pm 3,1$ %	9	$7,2 \pm 5,4$ %	—	—
Боррелии	52	$10,4 \pm 1,9$ %	15	$12,0 \pm 8,5$ %	11	$44,0 \pm 19,7$ %	1	$0,8 \pm 0,6$ %	1	$0,8 \pm 0,6$ %
Риккетсии	134	$26,8 \pm 3,9$ %	11	$8,8 \pm 6,4$ %	2	$1,6 \pm 1,3$ %	19	$15,2 \pm 10,3$ %	50	$40,0 \pm 19,2$ %

### **Заключение**

Преобладание клещей рода *Ixodes* сменилось в августе преобладанием клещей рода *Dermacentor*. Выявленный уровень инфицированности клещей ВКЭ составил  $3,6 \pm 0,4$  %. Уровень инфицированности клещей боррелиями  $8,0 \pm 0,9$  %. Пик выявленного уровня инфицированности боррелиями в июле ( $44,0 \pm 19,7$  %). Уровень инфицированности клещей риккетсиями —  $21,6 \pm 1,3$  %. Пик выявленного уровня инфицированности риккетсиями в сентябре —  $40 \pm 19,2$  %.

**РАК ЛЕГКОГО И ПАРАДОКС ДЛИНЫ ТЕЛОМЕР****LUNG CANCER AND TELOMERE LENGTH PARADOX**М. А. Асанов<sup>1,2</sup>, М. Л. Баканова<sup>2</sup><sup>1</sup> *ФГБНУ Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний*<sup>2</sup> *ФГБНУ Федеральный исследовательский центр угля и углекислоты Сибирского отделения Российской академии наук*М. А. Asanov<sup>1,2</sup>, М. L. Bakanova<sup>2</sup><sup>1</sup> *NIH KPSSZ FRC, Russia*<sup>2</sup> *CCC SB RAS, Russia*

E-mail: asmaks988@gmail.com

**Аннотация**

Рак легкого — один из наиболее часто встречающихся видов злокачественных новообразований, вызванных накоплением множества генетических мутаций, индуцируемых различными канцерогенами и генотоксическими факторами окружающей среды. Теломеры — это короткие повторяющиеся нуклеотидные последовательности, участки ДНК, расположенные на концах хромосом, сохраняющие целостность и стабильность генома во время репликации, защищая хромосомы от ошибочного распознавания системой восстановления повреждений ДНК при разрыве. Оценивалась длина теломерных участков ДНК здоровых жителей угледобывающего региона и пациентов с раком легкого. Относительная длина теломер пациентов с онкологией достоверно превышала данный показатель здоровых людей в два раза. Полученные данные подтверждают парадокс длины теломер при раковых заболеваниях.

**Abstract**

Lung cancer is one of the most common types of malignant neoplasms caused by the accumulation of many genetic mutations induced by various carcinogens and genotoxic environmental factors. Telomeres are short repeating nucleotide sequences, DNA sections located at the ends of chromosomes that preserve the integrity and stability of the genome during replication, protecting the chromosomes from erroneous recognition by the system for repairing DNA damage at break. The length of telomere DNA sections of healthy residents of the coal-mining region and patients with lung cancer was estimated. The relative length of the telomeres of patients with oncology significantly exceeded this indicator of healthy people twice. The data obtained confirm the paradox of telomere length in cancer.

Бронхогенная карцинома, или рак легкого (РЛ) — один из наиболее часто встречающихся видов злокачественных новообразований. Ежегодно отмечается более 1.5 миллиона случаев заболевания, при этом на Россию приходится не менее 70 случаев на 100 тысяч человек. По одной из теорий онкологические заболевания являются результатом накопления множества генетических мутаций, вследствие которых клетка приобретает генетическую и хромосомную нестабильность. Накопленные изменения ДНК индуцируются различными канцерогенами (табачный дым) и генотоксическими факторами окружающей среды (тяжелые металлы и радиоактивные вещества).

Угольная промышленность в настоящее время является ведущей отраслью Кемеровской области. Угольная пыль, образующаяся в процессе деятельности шахт и разрезов, способствует увеличению генотоксической нагрузки на организм человека. Угольная пыль является одним из сильнейших загрязнителей воздуха в местах добычи угля. Угольная пыль — это совокупность твердых частиц, служащая переносчиком таких токсических веществ как тяжелые металлы, радиоактивные изотопы, которые, в свою очередь, имеют свойство накапливаться в организме и проявлять генотоксические эффекты. Данные частицы угольной пыли могут оседать на эпителии дыхательных путей и непосредственно легких, значительно экспонируя клетки и индуцируя злокачественные новообразования.

Теломеры — это короткие повторяющиеся нуклеотидные последовательности, участки ДНК, расположенные на концах хромосом и их длина отражает продолжительность жизни клетки. Теломеры поддерживают целостность и стабильность генома во время репликации, защищая хромосомы от ошибочного распознавания системой восстановления повреждений ДНК при разрыве. Теломерные участки состоят из повторяющейся последовательности из шести азотистых оснований, богатых гуанином (TTAGGG), повторяющаяся в нескольких тысячах пар оснований на 3'-конце ДНК (от 4 до 15 килобаз у человека), и комплекса ассоциированного белка, называемого шелтерином (телосома), который защищает хромосому от нуклеолитической деградации.

Целью данного исследования является сравнение длин теломерных участков ДНК у больных раком легкого и здорового населения в условиях угледобывающего региона.

### **Материалы и методы исследования**

**Материал исследования.** В группу больных раком легкого были включены 52 мужчин, проживающих в Кемеровской области (Российская Федерация). У всех пациентов кровь для исследования забиралась до любых лечебных процедур (в первый день обращения в стационар). Средний возраст



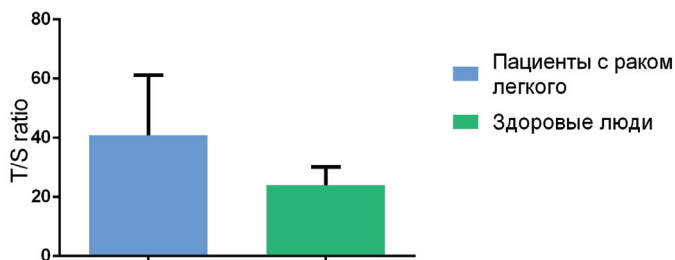
группы пациентов составил 60 лет. Среди пациентов 42 (81 %) были курильщиками, а 10 (19 %) — некурящими. Пациенты работали на производстве, где воздействие химических веществ было в пределах, разрешенных в соответствии с российским законодательством. Согласно патогистологическим параметрам, у 72 % больных диагностирован немелкоклеточный рак легкого, а у 28 % — мелкоклеточный рак легкого. Что касается стадии заболевания, то 44 % больных находились на I — II стадии, 56 % на стадиях III — IV, а в 54 % случаях зарегистрированы метастазы в отдалённых органах.

Образцы крови получены от 52 здоровых доноров мужчин Кемеровской станции переливания крови (Кемеровская обл., Российская Федерация), средний возраст — 48 лет. Контрольные участники не подвергались рентгенографии в течение как минимум 3 месяцев до участия в исследовании. В контрольной группе почти половина людей являются некурящими.

**Методы исследования.** Выделение ДНК проводили с использованием стандартного метода фенол-хлороформной экстракции. Длина теломерных участков ДНК оценивалась при помощи количественной полимеразной реакции с детекцией результата в режиме реального времени с флуоресцентным красителем SYBR Green на амплификаторе CFX96 Real-Time System (Bio-Rad, USA). Праймеры были синтезированы ЗАО «Евроген». В качестве референсного гена был использован ген HBG ( $\beta$ -глобулин). Для оценки эффективности ПЦР анализировали графики амплификации и стандартные кривые в программе Bio-Rad CFX Manager. Длину теломер рассчитывали по формуле:  $T/S \text{ ratio} = 2^{\Delta C_t}$ , где T/S ratio — это отношение циклов,  $C_t$  — пороговый цикл.

### Результаты исследования.

Результаты исследования представлены на графике (см. рисунок).



Относительная длина теломер в клетках периферической крови здоровых людей и больных раком легкого

Относительная длина теломер у обследованных пациентов с раком легкого статистически значимо (двукратно) превышала данный показатель у здоровых ( $p=0,000001$ ). На сегодняшний день описаны заболевания, связанные как с короткими, так и с длинными теломерами. Генетическая основа этих коротко- и длиннотеломерных синдромов может быть связана с мутациями в таких генах, как обратная транскриптаза теломеразы (через дифференциальные воздействия на длину теломер). Короткие теломерные синдромы имеют преобладающий дегенеративный фенотип, отмеченный органной недостаточностью, который чаще всего проявляется как легочный фиброз и связан с относительно низкой заболеваемостью раком, и напротив, длинные теломеры связаны с риском развития онкозаболеваний.

Известно, что у здоровых индивидов длина теломер уменьшается с возрастом, что приводит к соответствующему нарастанию геномной нестабильности. Фактически считается, что наличие коротких теломер в комбинации с другими онкогенными изменениями может привести к нестабильности генома, которая повышает вероятность раковых заболеваний. Таким образом, налицо парадокс: короткие теломеры, по данным многих авторов, связаны с геномной нестабильностью, но полученные результаты однозначно указывают на большую длину теломер у больных раком легкого.

Данные литературы относительно длины теломер в клетках крови больных раком легкого противоречивы, однако многие современные исследования с использованием анализа длины теломер при помощи количественной полимеразной реакции указывают на большую длину теломер у больных со злокачественными новообразованиями легких. Точный молекулярный механизм данного явления еще предстоит выяснить, но уже можно предположить, что целостность теломер может регулировать канцерогенез путем пролонгирования выживаемости клеток и накопления мутаций.

**ИЗУЧЕНИЕ ПОЛОВЫХ РАЗЛИЧИЙ В ЭФФЕКТЕ  
ФАКТОРА РОСТА ФИБРОБЛАСТОВ 21 У МЫШЕЙ  
С ДИЕТ-ИНДУЦИРОВАННЫМ ОЖИРЕНИЕМ\***

STUDYING OF THE SEX DIFFERENCES IN THE EFFECT  
OF FIBROBLAST GROWTH FACTOR 21 IN MICE  
WITH DIET-INDUCED OBESITY

Н. Ю. Балыбина<sup>1</sup>, Т. В. Яковлева<sup>2</sup>, Е. Н. Макарова<sup>2</sup>, Н. М. Бажан<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup>Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

N. Yu. Balybina<sup>1</sup>, T. V. Iakovleva<sup>2</sup>, E. N. Makarova<sup>2</sup>, N. M. Bazhan<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup>Institute of Cytology and Genetics, The Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

e-mail: n.balybina@g.nsu.ru

**Аннотация**

Ожирение глобальная проблема, затрагивающая большую часть населения планеты. Оно возникает при нарушении обмена веществ, когда количество поступающей в организм энергии превышает ее расход. Известно, что существуют половые различия в процессе обмена веществ, которые вносят свой вклад в особенности развития ожирения у особей разных полов.

Фактор роста фибробластов 21 (FGF21) способствует снижению веса тела и повышению чувствительности к инсулину за счёт усиления окисления жиров. FGF21 является перспективным средством для создания на его основе лекарств для борьбы с ожирением. Большинство исследований влияния FGF21 на организм животных, страдающих ожирением, было проведено на самцах, и существует мало данных о половых особенностях действия FGF21. Мы выяснили, что половые различия в ответе на введение FGF21 у мышей с ожирением, вызванным потреблением высокожирной пищи, отсутствуют. Применение FGF21 в качестве потенциального средства борьбы с такого рода диетарным ожирением возможно для особей обоих полов.

© Н. Ю. Балыбина, Т. В. Яковлева, Е. Н. Макарова, Н. М. Бажан, 2019

\* Исследование выполнено при поддержке РНФ (проект 17-15-01036).

**Abstract**

Obesity is a global problem affecting most of the world's population. Obesity occurs in metabolic disorders, when the amount of energy entering the body exceeds its consumption. It is known, there are sex differences that contribute to the development of obesity in individuals of different sexes.

Fibroblast growth factor 21 (FGF21) helps to reduce body weight, increase insulin sensitivity and lipid oxidation. FGF21 is a promising candidate for creating anti-obesity drugs. Most studies of the effects of FGF21 on obese animals have been conducted on males, and there is little data on the sex characteristics of the FGF21 action. We found that there are no sex differences in the response to FGF21 administration in mice with diet-induced obesity. The use of FGF21 as a potential means of combating obesity is perspective for individuals of both sexes.

В развитых странах ожирение занимает лидирующие позиции среди болезней, снижающих качество жизни населения. С этим заболеванием связан повышенный риск развития сахарного диабета второго типа, болезней сердечно-сосудистой системы и опорно-двигательного аппарата, безалкогольной жировой болезни печени и др. Большое количество ученых занимается поиском методов борьбы с ожирением, однако до сих пор не разработано эффективных средств для быстрого и безопасного снижения веса.

Ожирение возникает при нарушении обмена веществ, когда количество поступающей в организм энергии превышает ее расход. Излишки энергии запасаются организмом в виде жировых отложений. Известно, что половые различия вносят свой вклад в особенности развития ожирения у особей разных полов [1, 2, 3].

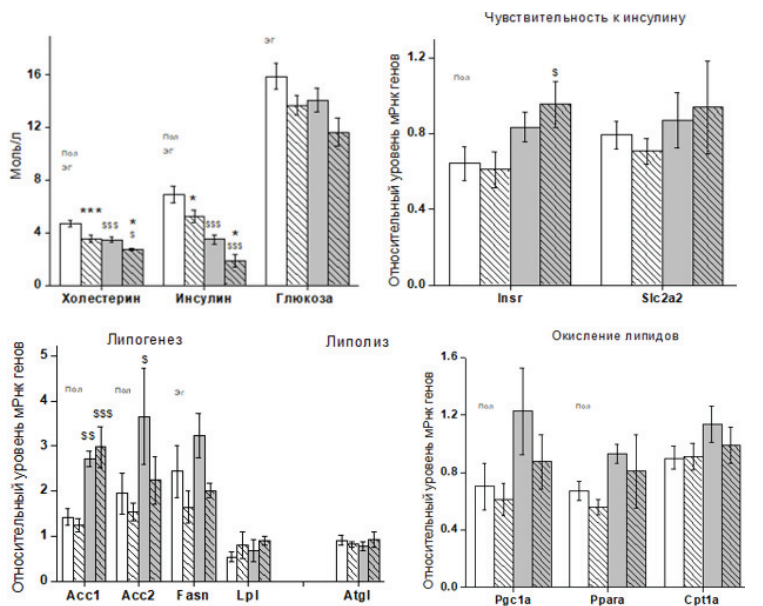
Печень является основным метаболическим органом, регулирующим углеводно-жировой обмен во всем организме, и основным источником фактора роста фибробластов 21 (FGF21), гормона, способствующего снижению веса тела, повышению чувствительности к инсулину, а также повышению интенсивности обмена веществ в организме [4]. FGF21 является перспективным средством для создания на его основе лекарств для борьбы с ожирением и диабетом второго типа. Однако большинство исследований влияния FGF21 на организм животных, страдающих ожирением, было проведено на самцах, и существует мало данных о половых особенностях действия FGF21. Исходя из вышесказанного, целью нашей работы было изучить половые особенности влияния FGF21 на гормональную регуляцию и транскрипцию генов печени у мышей, страдающих ожирением.

В эксперименте были использованы самцы и самки мышей линии C57Bl. Животные содержались на смешанной диете, состоящей из жирного и стандартного корма. Самцам и самкам с развитым диет-индуцированным ожирением (ДИО) опытных групп ежедневно в течение 7 дней вводили

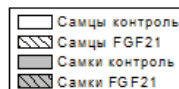
FGF21 (1 мкг/г веса тела), животным контрольных групп вводили фосфатно-солевой буфер. На 8-й день производили взятие крови для биохимического исследования и ткани для проведения молекулярных исследований.

Методом ПЦР в реальном времени мы оценивали экспрессию следующих генов в печени: инсулиновый рецептор (*Insr*), переносчик глюкозы 2 (*Slc2a2*) — чувствительность к инсулину; ацил-КоА карбоксилаза 1 и 2 (*Acc1* и *Acc2*), синтаза жирных кислот (*Fasn*), липопротеин липаза (*Lpl*) — липогенез; жировая триглицеридная липаза (*Atgl*) — липолиз; рецепторы, активируемые пероксисомными пролифераторами (*Ppara*), карнитин-пальметоил трансфераза 1a (*Cpt1a*), коактиватор рецептора, активируемого пролифераторами пероксисом 1a (*Pgc1a*) бета-окисление свободных жирных кислот.

При введении FGF21 мышам с ДИО уровень холестерина, инсулина и глюкозы снижался у особей обоих полов. Полученные результаты свидетельствуют о улучшении чувствительности к инсулину у мышей с ДИО при введении FGF21 независимо от пола животного.



Уровень гормонов в крови и мРНК генов в печени у контрольных мышей (белый столбик) и мышей с введением FGF21 (серый столбик). \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ : сравнение с контролем;  $\$P < 0,05$ ,  $\$\$P < 0,01$ ,  $\$\$\$P < 0,001$ : сравнение с самцами по Fisher *Post-hoc* test. «Пол», «ЭГ» — влияние фактора по ANOVA



На фоне введения FGF21 усиливались половые различия в уровне экспрессии мРНК генов чувствительности к инсулину: у самок, получавших FGF21, уровень экспрессии гена *Insr* был выше, чем у самцов, в то время как у животных контрольной группы различия по данному показателю были недостоверными. Уровень мРНК генов, участвующих в липогенезе (*Acc1* и *Acc2*), у самок был выше, чем у самцов, — как в контрольной, так и в опытной группе. FGF21 достоверно снижал уровень экспрессию *Fasn* и не влиял на уровень мРНК генов, участвующих в липолизе.

У самок уровень мРНК генов, участвующих в окислении СЖК, был выше, чем у самцов, то есть введение FGF21 не оказывало влияния на экспрессию этих генов.

На основании полученных результатов можно сделать заключение, что введение FGF21 мышам с ДИО способствует повышению чувствительности к инсулину и снижению уровня липогенеза в печени у мышей обоих полов. Половые различия в ответе на введение FGF21 у мышей с ДИО отсутствуют, однако у самок на фоне введения FGF21 экспрессия генов, контролирующей чувствительность к инсулину, была выше, чем у самцов. Применение FGF21 в качестве потенциального средства борьбы с ожирением, вызванным потреблением жирной пищи, возможно для особей обоих полов.

### Литература

1. Kajimura S., Saito M. A new era in brown adipose tissue biology: molecular control of brown fat development and energy homeostasis // Annual review of physiology. 2014. Vol. 76. P. 225–249.
2. Mauvais-Jarvis F. Sex differences in metabolic homeostasis, diabetes, and obesity // Biology of sex differences. 2015. Vol. 6. №. 1. P. 14.
3. Palmer B. F., Clegg D. J. The sexual dimorphism of obesity // Molecular and cellular endocrinology. 2015. Vol. 402. P. 113–119.
4. Adams A. C., Yang C., Coskun T., Cheng C., Gimeno R, et al. The Breadth of FGF21's Metabolic Actions Are Governed by FGFR1 in Adipose Tissue // Molecular Metabolism. 2013. Vol. 2(1). P. 31–37.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ 5-HT1A РЕЦЕПТОРА И ЕГО ЭКСПРЕССИИ В МОЗГЕ МЫШЕЙ ЛИНИИ BTBR — МОДЕЛИ АУТИЗМА \*

### STUDY OF THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF 5-HT1A RECEPTOR AND ITS EXPRESSION IN THE BRAIN OF THE BTBR MICE — THE MODEL OF AUTISM

И. И. Белокопытова<sup>1,2,\*\*</sup>, А. Я. Родный<sup>1,\*\*</sup>, Е. М. Кондаурова<sup>1</sup>,  
Е. В. Антонов<sup>1</sup>, Е. А. Куликова<sup>1</sup>, В. С. Наumenко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр  
Институт цитологии и генетики Сибирского отделения  
Российской академии наук» (ФИЦ ИЦиГ СО РАН)

<sup>2</sup>Новосибирский национальный исследовательский  
государственный университет

I. I. Belokopytova<sup>1,2,\*\*</sup>, A. Ya. Rodnyy<sup>1,\*\*</sup>, E. M. Kondaurova<sup>1</sup>,  
Y. V. Antonov<sup>1</sup>, E. A. Kulikova<sup>1</sup>, V. S. Naumenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia*  
<sup>2</sup>*Novosibirsk State University*

E-mail: belokopytovaii@mail.ru

#### Аннотация

Были измерены уровни мРНК гена *Htr1a*, кодирующего 5-HT1A рецептор и его белка у мышей линий BTBR и C57Bl/6J. Оценка уровня экспрессии мРНК и белка данного гена была проведена в следующих структурах: фронтальная кора, гиппокамп и средний мозг. В отдельной серии экспериментов мышам линий BTBR и C57Bl/6J вводили внутрибрюшинно однократно агонист 5-HT1A рецептора 8-OH-DPAT [8-гидрокси-2-(ди-н-пропиламин)тетралин] в концентрации 1.0 мг/кг для определения функциональной активности 5-HT1A рецептора, отражаемой в выраженности гипотермической реакции, вызванной активацией рецепторов. Температуру тела оценивали до введения препарата и через 20 мин после острого введения.

© И. И. Белокопытова, А. Я. Родный, Е. М. Кондаурова, Е. В. Антонов, Е. А. Куликова, В. С. Наumenко, 2019

\* Исследования выполнены при поддержке гранта Президента РФ для докторов наук МД-1120.2019.4 и бюджетного проекта № 0324-2019-0041.

\*\* Авторы внесли равный вклад в выполнение данной работы.

У мышей линии BTBR не было выявлено значительного гипотермического ответа при введении 8-ОН-DPAT в отличие от мышей контрольной линии C57Bl/6J, что указывает на снижение функциональной активности 5-HT<sub>1A</sub> рецепторов у мышей линии BTBR. Достоверных различий в уровнях экспрессии мРНК гена *Htr1a* и белка 5-HT<sub>1A</sub> рецептора выявлено не было.

### **Abstract**

The mRNA levels of the *Htr1a* gene encoding the 5-HT<sub>1A</sub> receptor and its protein were measured in BTBR and C57Bl/6J mice. Evaluation of the mRNA and protein expression level of this gene was carried out in the following structures: frontal cortex, hippocampus and midbrain. Another BTBR and C57Bl/6J mice were treated with 8-OH-DPAT (i.p., 1.0 mg/kg) in order to determine the functional activity of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor reflected in hypothermic reaction severity caused by receptor activation. Body temperature was evaluated twice: before and 20 minutes after an acute 8-OH-DPAT treatment. There was no significant hypothermic response in BTBR mice when 8-OH-DPAT was administered, in contrast to the control strain C57Bl/6J that indicates the decrease of 5-HT<sub>1A</sub> functional activity in BTBR mice. No significant differences in the levels of *Htr1a* gene mRNA expression and 5-HT<sub>1A</sub> receptor protein were detected.

### **Актуальность**

Количество пациентов, страдающих расстройствами аутистического спектра (РАС) с каждым годом растёт, а такая психопатология как аутизм имеет огромное социальное значение. Имеются данные, указывающие на участие в этой патологии серотониновой системы. В связи с этим, особый интерес представляет 5-HT<sub>1A</sub> рецептор, поскольку именно этот рецептор осуществляет регуляцию секреции серотонина в синаптическую щель. Изучение посмертных образцов мозга у людей с РАС демонстрируют снижение радиолигандного связывания 5-HT<sub>1A</sub> рецептора с 8-ОН-DPAT. Однако, чтобы в совокупности исследовать роль 5-HT<sub>1A</sub> рецептора в механизмах развития аутизма, необходимо использовать животных, моделирующих основные симптомы аутизма.

Наиболее популярной моделью аутизма является линия мышей BTBR. Мыши этой линии демонстрируют дефицит социального взаимодействия, а также повторяющееся и стереотипное поведение. Эти особенности поведения могут быть связаны с измененной морфологией мозга, такой как уменьшение мозолистого тела и комиссуры гиппокампа. Однако молекулярный процесс, лежащий в основе изменений в поведении, до сих пор неизвестен.

### **Цель работы**

Исследовать функциональную активность 5-HT<sub>1A</sub> рецептора и его экспрессию в мозге у мышей линии BTBR — модели аутизма.



## Методы

ОТ-ПЦР в реальном времени для измерения уровня экспрессии мРНК гена *Htr1a*, кодирующего 5-HT<sub>1A</sub> рецептор; Western-blotting анализ для оценки уровня белка 5-HT<sub>1A</sub> рецептора; количественная оценка функциональной активности рецептора 5-HT<sub>1A</sub> по выраженности гипотермического ответа на острое введение агониста рецептора 8-OH-DPAT.

## Результаты

Известно, что стимуляция рецептора 5-HT<sub>1A</sub> вызывает выраженную гипотермию. Однократное введение 8-OH-DPAT вызвало значительный гипотермический эффект только у мышей линии C57Bl/6J, но не у B6BR, что указывает на снижение функциональной активности 5-HT<sub>1A</sub> рецептора в мозге мышей с генетической предрасположенностью к аутизму. В то же время, влияния генотипа на экспрессию мРНК гена 5-HT<sub>1A</sub> рецептора и уровень белка этого рецептора выявлено не было.

Таким образом, обнаружено снижение функции 5-HT<sub>1A</sub> рецептора при его неизменной экспрессии в мозге мышей линии B6BR. Этот факт хорошо согласуется с данными о роли 5-HT<sub>1A</sub> рецептора в механизмах аутизма у людей.

**ВЛИЯНИЕ РАННЕГО НАКОПЛЕНИЯ  
ДОДЕКАНОИЛГОМОСЕРИНАКТОНА НА ДИНАМИКУ РОСТА  
КУЛЬТУРЫ PSEUDOMONAS AERUGINOSA\***

INFLUENCE OF EARLY ACCUMULATION  
OF DODECANOILGOMOSERINLACTONE ON THE GROWTH  
DYNAMICS OF THE PSEUDOMONAS AERUGINOSA CULTURE

А. С. Бобикова<sup>2</sup>, В. Н. Афонюшкин<sup>1</sup>, В. Ю. Коптев<sup>1</sup>, Н. А. Сigareва<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Сибирский федеральный научный центр  
агробиотехнологий РАН, п. Краснообск

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО Новосибирский ГАУ, г. Новосибирск

A. S. Bobikova<sup>2</sup>, V. N. Afonyushkin<sup>1</sup>, V. Yu. Koptev<sup>1</sup>, N. A. Sigareva<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Siberian Federal Scientific Center for Agrobiotechnology RAS, Krasnobsk, Russia  
<sup>2</sup> FSBEI HE Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia

**Аннотация**

*Pseudomonas aeruginosa* (синегнойная палочка, СГП) широко представленный вид (убиквитарный), обладающий патогенным потенциалом. Данный инфекционный агент является возбудителем раневых инфекций, фиброзного цистита, фиброзирующей пневмонии, бактериального сепсиса и т. д. Микроорганизм отличается высокой устойчивостью к антисептикам, дезинфектантам реакциям иммунной системы организма. Одним из важных особенностей синегнойной палочки является ее способность к образованию биопленок, это считается одним из факторов устойчивости к антибиотикам и антисептикам. Подавление некоторых реакций кворум-сенсинга синегнойной палочки в объектах окружающей среды и в организме человека и животных может являться важным фактором, снижающим риск развития госпитальных инфекций, хронических инфекций, плохо поддающихся антибиотикотерапии. Подавление роста самой синегнойной палочки не менее важно, чем образование ей биопленок.

**Abstract**

*Pseudomonas aeruginosa* (CGP) is a widely represented species (ubiquitous) with pathogenic potential. This infectious agent is the causative agent of wound infections, fibrous cystitis, fibrosing pneumonia, bacterial sepsis, etc. The microorganism is highly re-

© А. С. Бобикова, В. Н. Афонюшкин, В. Ю. Коптев, Н. А. Сigareва, 2019

\* Исследования выполнены при поддержке гранта РФФИ «Раннее накопление додеканоилгомосеринактона в качестве фактора подавления роста *Pseudomonas aeruginosa* (Проект 18-016-00045 А)».

sistant to antiseptics, disinfectants, reactions of the body's immune system. One of the important features of *Pseudomonas aeruginosa* is its ability to form biofilms, this is considered one of the factors of resistance to antibiotics and antiseptics. Suppression of certain quorum sensing reactions of *Pseudomonas aeruginosa* in environmental objects and in humans and animals can be an important factor reducing the risk of developing hospital infections and chronic infections that are not amenable to antibiotic therapy. Suppressing the growth of *Pseudomonas aeruginosa* itself is no less important than the formation of biofilms.

Цель исследования: проверить гипотезу о влиянии раннего накопления додеканойлгомосеринлактона на динамику роста культуры *Pseudomonas aeruginosa*.

Для изучения влияния додеканойлгомосеринлактона на начальной фазе роста *P. aeruginosa* использовали культуру *P. aeruginosa* 669, депонированного в коллекции экстремофильных микроорганизмов ИХБФМ СО РАН. Предварительно было проведено 3 12-часовых пассажа культуры на триптиказо-соевом бульоне.

Для изучения динамики размножения *P. aeruginosa* проводили прямой подсчет бактериальных клеток в камере Горяева. Как следует из таблицы, статистически значимо концентрация клеток была меньше в присутствии додеканойлгомосеринлактона в концентрации 25 мкМ на 6 часов культивирования. В 12 часов концентрация бактерий была напротив больше в сравнении с интактной культурой. К 18 часам концентрация бактериальных клеток в культуре, обработанной додеканойлгомосеринлактоном в концентрации 25 мкМ, опять снизилась в сравнении с интактной культурой, что может быть связано с переходом в биопленочную форму.

### Концентрация бактериальных клеток, Log<sub>10</sub> /ml±SD

Концентрация 3-охо-C12-HSL	6 ч	12 ч	18 ч
0 мкМ	7,22 ± 0,023	7,48 ± 0,05	7,77 ± 0,02
12,5 мкМ	7,14 ± 0,058	7,53 ± 0,073	7,81 ± 0,08
25 мкМ	7,01 ± 0,09**	7,63 ± 0,076*	7,68 ± 0,12

Примечание. \* P<0.05, \*\* P<0.01

Через 6 часов эксперимента культуры *P. aeruginosa*, культивируемые в присутствии додеканойлгомосеринлактона, формировали по флюоресценции биосенсоров общий кластер вне зависимости от концентрации внесенных в культуральную среду додеканойлгомосеринлактона. Интактные культуры *P. aeruginosa* формируют отдельный кластер, характеризующийся

меньшим уровнем флюоресценции на канале TexasRed, что подразумевает меньший уровень продукции бутаноилгомосеринлактонов у интактных культур *P. aeruginosa*, в сравнении с культурами, контактирующими с додеканоилгомосеринлактонами на раннем этапе культивирования. Однако, уже через 6 ч. после посева уже наблюдалась флюоресценция биосенсоров, чувствительных к додеканоилгомосеринлактону.

Через 12 часов эксперимента культуры *P. aeruginosa*, культивируемые в присутствии додеканоилгомосеринлактона, формировали по флюоресценции биосенсоров более эллиптический кластер. Флюоресценция обеих биосенсорных культур менялась в зависимости от концентрации додеканоилгомосеринлактона в культуральной среде. Интактные культуры *P. aeruginosa* на 12 часов культивирования уже не выделяются на фоне остальных экспериментальных культур, что подразумевает дальнейшее накопление как бутаноилгомосеринлактона, так и додеканоилгомосеринлактона.

Динамика активности додеканоилгомосеринлактона как в интактных культурах *P. aeruginosa*, так и в культурах с добавлением данного субстрата, не была линейной. Уже через 6 часов после посева додеканоилгомосеринлактон детектировался в интактной культуре. Через 12 часов культивирования активность додеканоилгомосеринлактона была статистически значимо ниже в культуре, куда это вещество было заранее добавлено ( $P=0.016$ ), что предполагает его разрушение. На 18 часов культивирования концентрация додеканоилгомосеринлактона статистически значимо выросла ( $P=0.021$ ), что предполагает синтез данного соединения *denovo*.

Контакт культуры *P. aeruginosa* с додеканоилгомосеринлактоном в концентрации 25 мкМ сопровождался статистически значимым ( $P=0.018$ ) замедлением размножения клеток впервые 6 часов культивирования. Концентрация додеканоилгомосеринлактона, введенная на начальной фазе культивирования, стимулировала образование биопленки на 18 часов культивирования. Введение додеканоилгомосеринлактона в культуры *P. aeruginosa* индуцировало дозозависимое накопление бутаноилгомосеринлактона, что и обусловило дальнейшую реализацию разнообразных реакций чувства-кворума. Быстрое, но временное снижение активности додеканоилгомосеринлактона в опыте и снижение концентрации этой молекулы в интактной культуре *P. aeruginosa* после 18 часов культивирования несинхронно с динамикой активности бутаноилгомосеринлактона, что предполагает наличие механизма обратной связи, сопровождающейся инактивацией гомосеринлактонов. Раннее накопление додеканоилгомосеринлактона способно замедлить скорость размножения *P. aeruginosa* на начальной фазе роста, однако саморегуляция концентрации гомосеринлактона в дальнейшем нивелирует эту реакцию.

**МОДИФИЦИРОВАННЫЙ МЕТОД ФРАГМЕНТАЦИИ ГЕНОМНОЙ ДНК ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ БИБЛИОТЕК NGS****MODIFIED GENOMIC DNA FRAGMENTATION METHOD FOR NGS LIBRARY PREPARATION**

Д. С. Болдырева<sup>1,2</sup>, А. А. Кечин<sup>1,2</sup>, У. А. Боярских<sup>1</sup>, М. А. Макарова<sup>3</sup>,  
Л. А. Кафтырева<sup>3</sup>, С. Г. Щербак<sup>4,5</sup>, С. В. Апалько<sup>5</sup>, М. Л. Филипенко<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Институт химической биологии и фундаментальной медицины  
Сибирского отделения Российской академии наук*

<sup>2</sup>*Новосибирский государственный университет*

<sup>3</sup>*Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии  
и микробиологии им. Пастера*

<sup>4</sup>*Санкт-Петербургский государственный университет*

<sup>5</sup>*СПб ГБУЗ «Городская больница № 40*

*Курортного административного района»*

D. S. Boldyreva<sup>1,2</sup>, A. A. Kechin<sup>1,2</sup>, U. A. Boyarskikh<sup>1</sup>, M. A. Makarova<sup>3</sup>,  
L. A. Kaftyreva<sup>3</sup>, S. G. Scherbak<sup>4,5</sup>, S. V. Apalko<sup>5</sup>, M. L. Filipenko<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian  
Branch of the Russian Academy of Sciences*

<sup>2</sup>*Novosibirsk State University*

<sup>3</sup>*Saint-Petersburg Pasteur Institute*

<sup>4</sup>*Saint-Petersburg State University*

<sup>5</sup>*St. Petersburg State Medical Academy*

*“City Hospital No. 40 of the Resort Administrative District”*

**Аннотация**

Для приготовления библиотек NGS необходима фрагментация геномной ДНК. Существует ряд коммерческих физических и ферментативных способов фрагментации ДНК, недостатком которых является их высокая стоимость. В данной работе мы описали модифицированный способ физической фрагментации ДНК с помощью стеклянных шариков и ультразвука. При сравнении результатов фрагментации разработанным методом и коммерческим прибором Covaris, были получены близкие средние длины фрагментов для обоих методов, также равномерность покрытия гено-

ма и размер наибольшего контига для разработанного способа были значимо выше, чем для Covaris. Различие между двумя методами было обусловлено меньшей нуклеотидной специфичностью разрыва ДНК для разработанного метода.

### Abstract

Preparation of NGS libraries requires fragmentation of genomic DNA. There are a number of commercial physical and enzymatic methods of DNA fragmentation, the disadvantage of which is their high cost. In this paper we describe a modified method of physical DNA fragmentation using glass beads and ultrasound. When comparing the fragmentation results with the developed method and commercial instrument Covaris, was obtained close to the average length of fragments for both methods, also the uniformity of genome coverage and the size of the largest contig the developed method was significantly higher than for Covaris. The difference between the two methods was due to the lower nucleotide specificity of the DNA break for the developed method.

Массовое параллельное секвенирование, также известное как секвенирование нового поколения (NGS), произвело революцию в геномных исследованиях. NGS позволяет идентифицировать клинически значимые мутации и получать последовательности всего генома для множества образцов одновременно. Важным этапом NGS является приготовление ДНК библиотек. Приготовление библиотек для полногеномного секвенирования включает в себя такие этапы, как выделение геномной ДНК, фрагментация ДНК и прикрепление адаптеров к ее восстановленным концам. Существует ряд коммерческих физических и ферментативных способов фрагментации ДНК (Covaris, NEBNext), недостатком которых является их высокая стоимость за счет необходимости использования специальных устройств и/или сложных химических веществ. В данной работе мы опробовали эффективный и недорогой метод фрагментации ДНК при помощи ультразвука и стеклянных шариков для последующего приготовления NGS библиотек.

Нами были приготовлены библиотеки для геномных ДНК трех изолятов *E.coli*. Для приготовления библиотек была проведена механическая фрагментация модифицированным методом и на коммерческом приборе Covaris. Фрагментация модифицированным методом была проведена в пробирках Axugen MCT-060-C со стеклянными шариками на ультразвуковой ванне (BANDELIN) с охлажденной водой. Для оптимизации метода варьировали такие показатели, как температура воды в ультразвуковой ванне (от 5 до 10 °C), общая масса шариков (от 0,01 до 0,3 г), время фрагментации (от 15 до 60 секунд) и количество одновременно фрагментированных образцов (1, 2 или 4 образца). Полученная длина фрагментов ДНК была проанализирована с помощью гель-электрофореза. После фрагментации концы ДНК были восстановлены, проведено прикрепление NEB-адаптеров, после чего би-

библиотеки были очищены магнитными частицами (Beckman Coulter). Чтобы объединить несколько библиотек в один пул, с помощью ПЦР были добавлены индексирующие последовательности. Концентрации библиотек были определены с помощью кПЦР с использованием специфических праймеров и флуоресцентно меченного зонда относительно стандартов PhiX Control v3. Библиотеки были секвенированы на приборе MiSeq (Illumina) с использованием набора реагентов MiSeq v2 (500 циклов). Для сборки генома из полученных прочтений и оценки качества сборки были использованы программы SPAdes v3.9.0 и QUAST v5.0.2, соответственно. Графики были построены при помощи собственных Python-скриптов с модулем matplotlib. Статистическую обработку данных по покрытию генома проводили с помощью GenomeAnalysisToolKit (GATK) и собственных Python-скриптов, статистические сравнения — парным t-тестом с использованием Python-модуля SciPy.

При определении оптимальных условий для фрагментации ДНК до длин 500–600 п.о. нами были подобраны следующие параметры: температура воды 5–8 °С, время фрагментации 50 секунд, масса используемых шариков 0,06 г и один образец ДНК, фрагментированный за цикл. Были получены близкие распределения длин фрагментов для обоих методов:  $523 \pm 169$ ,  $663 \pm 261$ ,  $619 \pm 290$  п.о. для образцов, фрагментированных разработанным методом, и  $607 \pm 207$ ,  $480 \pm 147$  и  $646 \pm 294$  п.о. для образцов, фрагментированных Covaris.

При сравнении результатов секвенирования библиотек, приготовленных после фрагментации со стеклянными шариками и инструментом Covaris, наиболее высокое покрытие генома было для библиотек, приготовленных предложенным методом. Размер наибольшего контига был длиннее для библиотек, приготовленных после фрагментации со стеклянными шариками. Количество непокрытых позиций генома и его среднее покрытие были значительно выше для библиотек, приготовленных с помощью Covaris ( $p$ -value=0,036 и 0,019, соответственно). Фрагментация ДНК с помощью стеклянных шариков дала более равномерное покрытие генома при секвенировании ( $p$ -value=0,040), чем фрагментация ДНК с помощью инструмента Covaris. Это связано с тем, что для фрагментации на приборе Covaris характерна более высокая нуклеотидная специфичность при разрыве ДНК, чем для предложенного способа, что и было нами показано при анализе встречаемости различных моно- и динуклеотидов на концах прочтений.

Также нами были подсчитаны материальные средства и время, которые необходимы для фрагментации одного и двадцати образцов ДНК. Стоимость приборной базы для фрагментации разработанным методом в 44 раза ниже, чем ее стоимость с помощью прибора Covaris, расходные материа-

лы — в 2000 раз дешевле. Также фрагментация описанным методом занимает меньше времени, чем прибором Covaris, за счет быстрого охлаждения с помощью льда.

Таким образом, был разработан эффективный, быстрый и недорогой метод фрагментации ДНК для приготовления библиотек: полученные распределения длин фрагментов были близки к распределениям, получаемым с помощью Covaris; равномерность покрытия генома и размер наибольшего контига были значительно выше, чем для Covaris. Нами было показано, что различие между двумя методами было обусловлено меньшей нуклеотидной специфичностью разрыва ДНК для описанного метода.



**ПОИСК ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ НЕЙРОФИБРОМАТОЗОВ,  
ОСНОВАННОЙ НА ИЗМЕНЕНИИ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО  
ПРОФИЛЯ КЛЕТОК ОПУХОЛЕЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ  
С НЕЙРОФИБРОМАТОЗОМ 1 И 2 ТИПА**

A SEARCH FOR NEUROFIBROMATOSES TARGETED THERAPY BASED  
ON THE CHANGES IN THE METABOLIC PROFILE OF TUMOR CELLS  
ASSOCIATED WITH NEUROFIBROMATOSES TYPE 1 AND 2

Л. А. Браун, Д. С. Степанова, Ф. В. Куликов,  
Э. Э. Варпетян, Д. С. Татаркова, Н. Л. Шимановский

*ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский  
университет им. Н. И. Пирогова*

L.A. Braun, D. S. Stepanova, F. V. Kulikov,  
E. E. Varpetyan, D. S. Tatarkova, N. L. Shimanovskiy

*Pirogov Russian National Research Medical University (RNRMU), Russia*

E-mail: Lanitabraun@gmail.com

**Аннотация**

Нейрофиброматозы — группа крайне тяжёлых аутосомно-доминантных наследственных заболеваний. Заболевания редко встречаются в популяции, характеризуются постоянным появлением доброкачественных, но активно малигнизирующихся опухолей в центральной и периферической нервной системе. Известно, что причиной заболевания являются инактивирующие мутации в генах *NF1* и *NF2*, но молекулярный патогенез опухолевой трансформации до сих пор не определен. Кроме того, не разработана фармакотерапия нейрофиброматозов и единственный вид лечения, доступный пациентам — хирургические операции на постоянной основе.

**Abstract**

Neurofibromatosis is a group of extremely severe autosomal dominant hereditary diseases. They are rare in the population and characterized by the constant appearance of benign, but actively maligning tumors in the Central and peripheral nervous system. It is known that the cause of the disease are inactivating mutations in the genes *NF1* and *NF2*, but the molecular pathogenesis of tumor transformation has not yet been determined. In

addition, pharmacotherapy of neurofibromatosis has not been developed and the only type of treatment available to patients is permanent surgery.

**Целью** нашей работы являлось исследование метаболических особенностей клеток опухолей, ассоциированных с нейрофиброматозами I и II типов, для выявления потенциальных мишеней для таргетной терапии нейрофиброматозов.

### **Материалы и методы**

1. ВЭЖХ-МС/МС, ГХ-МС/МС
2. ПЦР и RT-ПЦР
3. Трансфекции

### **Результаты**

Выполнено метаболическое профилирование *NF2*-отрицательных и контрольных клеточных линий. В *NF2*-отрицательных клетках обнаружено изменение метаболического профиля, по сравнению с контролем, а именно значительное повышение уровня жирных кислот и метаболитов цикла трикарбоновых кислот, а также, понижение уровня метаболитов глутамина, свидетельствующее о повышенном глутаминолизе. Также в *NF2*-отрицательных клетках обнаружено существенное повышение уровня экспрессии белков, участвующих в липогенезе, которое связано с активацией комплекса Torc1 в результате повреждения гена *NF*.

*NF2*-отрицательные клетки оказались более чувствительны к воздействию ингибиторов синтазы жирных кислот церуленина, по сравнению с нормальными клетками. Было доказано, что гибель *NF2*-отрицательных клеток вызвана накоплением токсичного малонил-коА, а не отсутствием конечного продукта пальмитоил-коА. Также для увеличения чувствительности *NF2*-отрицательных клеток был проведен ряд экспериментов с добавлением модуляторов метаболических ферментов, наилучший результат показала комбинация церуленина с дихлорацетатом натрия, который является ингибитором киназы пируватдегидрогеназы.

Кроме того, был проведён ряд экспериментов для исследования чувствительности *NF1*-отрицательных клеток к церуленину — ингибитору синтазы жирных кислот. Результаты показали, что *NF1*-отрицательные клеточные линии также чувствительны к церуленину. Далее мы планируем провести полное метаболическое профилирование *NF1*-отрицательных линий и надеемся, что будет обнаружено универсальное лекарство для нейрофиброматозов обоих типов.

## Выводы

1. Для *NF*-отрицательных клеток характерны изменения метаболического профиля, схожие с таковыми при злокачественной трансформации: повышение уровня метаболитов цикла Кребса, глютаминолиза и синтеза жирных кислот.

2. *NF2*-отрицательные клетки более чувствительны к токсическому действию ингибиторов синтазы жирных кислот, по сравнению с контролем.

3. Использование модуляторов метаболических ферментов таких, как дихлорацетат натрия, увеличивает чувствительность *NF2*-отрицательных клеточных линий.

4. *NF1*-отрицательные клеточные линии проявили аналогичную чувствительность с *NF2*-отрицательными линиями к ингибитору синтазы жирных кислот и модулятору его активности.

## ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРОВ ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОГО ПЕРЕХОДА В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ПРИ ПЛОСКОКЛЕТОЧНЫХ КАРЦИНОМАХ ОБЛАСТИ ГОЛОВЫ И ШЕИ И ИХ СВЯЗЬ С МЕТАСТАЗИРОВАНИЕМ\*

EXPRESSION OF EMT MARKERS IN HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMAS AND THEIR ASSOCIATION WITH METASTASIS

В. А. Бычков<sup>1</sup>, Ю. А. Небова<sup>1,2</sup>, И. В. Ларионова<sup>2</sup>,  
Л. Н. Бондарь<sup>1</sup>, В. М. Перельмутер<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт онкологии «Томский национальный исследовательский медицинский центр» Российской академии наук

<sup>2</sup>Национальный исследовательский Томский государственный университет

V.A. Bychkov<sup>1</sup>, J.A. Nebova<sup>1,2</sup>,  
I.V. Larionova<sup>2</sup>, L.N. Bondar<sup>1</sup>, V.M. Perelmuter<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center  
of the Russian Academy of Sciences

<sup>2</sup>National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia

E-mail: va.bych@gmail.com

### Аннотация

Ранее нами было показано, что уже на этапе гистологического исследования плоскоклеточных карцином головы и шеи можно сделать предположение о наличии или отсутствии метастатического поражения сторожевых лимфоузлов пациента на основании наличия в опухоли высоковариабельных низкодифференцированных клеточных структур и одиночных опухолевых клеток, а также низкой выраженности воспалительного инфильтрата. Целью данной работы было установить возможный механизм лимфогенного метастазирования путем оценки количества клеток, экспрессирующих маркеры эпителиально-мезенхимального перехода (Snail, Vimentin) в 5 типах клеточных структур разной степени дифференцировки. Показано, что по мере снижения дифференцировки доля опухолевых клеток в состоянии эпителиально-мезенхимального перехода увеличивается.

© В. А. Бычков, Ю. А. Небова, И. В. Ларионова, Л. Н. Бондарь, В. М. Перельмутер, 2019

\* Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ и администрации Томской области в рамках научного проекта № 18-415-703014\18.

### Abstract

We previously showed that already at the stage of histological examination of head and neck squamous cell carcinomas, one can make an assumption about the presence or absence of a metastatic lesion of the patient's sentinel lymph nodes on the basis of the presence of highly variable low-differentiated cell structures and single tumor cells in the tumor, as well as low severity of inflammatory infiltrate. The aim of this work was to establish a possible mechanism of lymphogenous metastasis by estimating the number of cells expressing markers of the epithelial-mesenchymal transition (Snail, Vimentin) in 5 types of cell structures of different degrees of differentiation. It was shown that as the differentiation decreases, the proportion of tumor cells in the state of epithelial-mesenchymal transition increases

### Введение

Общеизвестно, что популяции опухолевых клеток неоднородны. Отличия между ними обнаруживаются как на уровне генома, протеома, так и в их биологическом поведении. Именно эта опухолевая гетерогенность обуславливает сложности лечения онкологических заболеваний, является причиной возникновения рецидивов и метастазов.

Патологам хорошо известна фенотипическая вариабельность плоскоклеточных раков (HNSCC), которая прежде всего проявляется наличием клеточных структур разной степени дифференцировки. В настоящее время большинство исследователей определяет гистопатологическую степень плоскоклеточных карцином согласно рекомендациям ВОЗ [Amin, M.V. et al., 2017], однако многие авторы отмечают, что общепринятая классификация далеко не всегда правильно позволяет оценить прогноз HNSCC.

В этой связи, ранее нами был предложен новый способ прогноза течения HNSCC на основе гистопатологического описания среза опухоли. В каждой опухоли идентифицировали 5 типов устойчивых клеточных структур разной степени дифференцировки: структуры с ороговением (I тип), с клетками базалоидного и шиповатого типов без ороговения (II тип), с клетками базалоидного типа (III тип), структуры с выраженным клеточным полиморфизмом (IV тип) и одиночные опухолевые клетки (V тип) [Савенкова ОВ с соавт., 2015]. Кроме того, на каждом срезе определяли уровень и характер воспалительного инфильтрата. Было показано, что частота метастазирования в лимфоузлы повышена у пациентов со слабо выраженным воспалением и наличием в опухоли структур IV и V типов [Бычков В. А. с соавт., 2017]. На основании косвенных признаков (потеря клеточных контактов, низкая степень дифференцировки, вытянутая форма некоторых клеток) была высказана гипотеза, что, по крайней мере, часть клеток может находиться в состоянии эпителиально-мезенхимального перехода (EMT). Важным

транскрипционным фактором этого процесса является белок Snail, приводящий к потере клетками полярности, адгезии (за счет репрессии E-кадгерина), снижению пролиферации, реорганизации цитоскелета, увеличению подвижности клеток. Обособление опухолевых клеток, приобретение ими вытянутой фибробластоподобной формы уже являются признаками мезенхимальных клеток. В части случаев опухолевые клетки при этом экспрессируют и соединительнотканый маркер Vimentin. В таких случаях говорят о полном ЕМТ, в отличие от неполного при потере признаков эпителия без приобретения мезенхимальных маркеров.

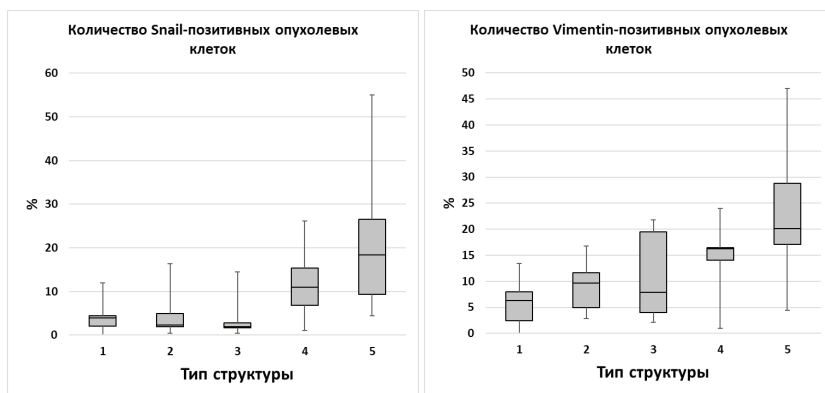
В этой связи, целью данной работы было изучить выраженность ЕМТ в 5 типах клеточных структур и оценить его значение в поражении лимфоузлов метастазами.

### Материалы и методы

Материалом исследования служили срезы опухоли от 16 пациентов с плоскоклеточным раком головы и шеи  $T_{1-4}N_{0-2}M_0$ , обратившихся за помощью в НИИ онкологии Томского НИМЦ. Клинико-морфологические данные пациентов HNSCC были получены из амбулаторных карт и при использовании световой микроскопии. При окрашивании гистологических срезов антителами маркерами плоскоклеточного рака служили опухоль-специфичные цитокератины HMW (Dako, USA), маркерами эпителиально-мезенхимального перехода — белки Snail и Vimentin (SantaCruzBiotechnology, USA). Для окраски ядер клеток применялся Dapi (Sigma-Aldrich, USA). Детекция флуоресцентного сигнала осуществлялась при помощи конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 780 NLO («Carl-Zeiss», Германия). На каждого пациента мы делали 3–7 микрофотографий плоскоклеточной карциномы, для каждого типа структур подсчитывали общее количество клеток и количество клеток, экспрессирующих маркеры ЭМП. Результат выражали в процентах. Всего проанализировано 11 пациентов с пораженными метастазами лимфоузлами ( $N_{1-2}$ ) и 5 пациентов без поражения лимфоузлов ( $N_0$ ).

### Результаты

Согласно полученным данным, доля Snail- и Vimentin-позитивных опухолевых клеток в общей когорте пациентов значимо друг от друга не отличалась в структурах I, II и III типов, но имела тенденцию к увеличению в структурах IV типа и была достоверно выше в структурах V типа ( $p < 0,05$ ) (см. рисунок).



Количество опухолевых клеток в состоянии эпителиально-мезенхимального перехода в 5 типах клеточных структур (%)

Анализ содержания клеток в состоянии ЕМТ в группе пациентов с метастазированием в лимфоузлы ( $N_{1-2}$ ) и в контрольной группе ( $N_0$ ) не выявил значимых отличий. Возможно, это может быть следствием небольшой выборки пациентов, вошедших в исследование. Тем не менее, ЕМТ является одним из возможных механизмов, объясняющих увеличение частоты лимфогенного метастазирования у пациентов, поэтому уточнение его масштабов и особенностей является важной фундаментальной задачей онкологии.

## Литература

1. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, Meyer L, Gress DM, Byrd DR, Winchester DP. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging // *CA Cancer J Clin.* 2017. V. 67(2) P. 93–99.
2. Савенкова ОВ, Завьялова МВ, Бычков ВА, Чойнзонов ЕЛ, Перельмутер ВМ. Связь экспрессии матриксных металлопротеиназ с морфологической гетерогенностью, дифференцировкой опухоли и лимфогенным метастазированием плоскоклеточной карциномы гортани // *Сибирский онкологический журнал* 2015. № 1. С. 51–58.
3. Бычков В. А., Бондарь Л. Н., Чойнзонов Е. Л., Перельмутер В. М. Характер течения плоскоклеточных карцином головы и шеи в зависимости от морфологических особенностей исходной опухоли // *Сибирский онкологический журнал.* 2017. Т. 16, № 1. С. 20–26.

**ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА АКТИВАЦИИ  
LTR-РЕТРОТРАНСПОЗОНОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ  
ТЕПЛОВОГО ШОКА У МОДЕЛЬНОГО РЕГЕНЕРИРУЮЩЕГО  
ПЛОСКОГО ЧЕРВЯ *MACROSTOMUM LIGNANO* \***

A STUDY FOR THE MECHANISM OF LTR RETROTRANSPOSONS'  
ACTIVATION BY HEAT SHOCK IN A MODEL REGENERATING  
FLATWORM *MACROSTOMUM LIGNANO*

В. Ю. Вавилова<sup>1</sup>, Я. Вударски<sup>2</sup>, Е. В. Березиков<sup>1,2</sup>, К. В. Устьянцев<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия*

<sup>2</sup> *Европейский исследовательский институт биологии старения,  
Университетский медицинский центр Гронингена, Гронинген, Нидерланды*

V. Y. Vavilova<sup>1</sup>, J. Wudarski, E. V. Berezikov<sup>1,2</sup>, K. V. Ustyantsev<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia*

<sup>2</sup> *European Research Institute for the Biology of Ageing, University Medical  
Center Groningen, Groningen, the Netherlands*

**Аннотация**

Мобильные элементы являются важными факторами генетической изменчивости и эволюции геномов. Однако на уровне отдельных клеток и даже организмов их активность находится под жестким регулированием и часто подавляется совсем за счет внутренних молекулярных защитных клеточных механизмов.

В данной работе мы показываем, как мобильные элементы группы LTR-ретротранспозонов приспособились к активации своей экспрессии в условиях температурного стресса в геноме свободноживущего плоского червя *Macrostomum lignano* — модельного организма для исследования процессов регенерации и регуляции стволовых клеток.

**Abstract**

Mobile elements are important factors of the genetic variation and evolution of genomes. However, at the level of individual cells and even organisms, their activation is under a tight control and often completely repressed by the internal cellular molecular defense mechanisms.



Here we demonstrate how mobile elements belonging to LTR retrotransposons have evolved the mechanism to activate their expression under temperature stress conditions in the genome of a free-living flatworm *Macrostomum lignano* — a model organism to study regeneration and stem cell regulation.

Молекулярные механизмы, определяющие активацию ретротранспозонов тепловым шоком, хорошо изучены у растений, но все еще остаются неясными у животных. *Macrostomum lignano* — базальный свободноживущий плоский червь, все более используемый в качестве модельного организма для исследования биологии стволовых клеток и процессов регенерации [1]. *M. lignano* — пока что единственный плоский червь для которого доступна эффективная технология получения трансгенных линий [2], что открывает широкий простор. Исследуя влияние теплового шока на транскрипционный профиль у *M. lignano* с помощью метода RNA-Seq, мы обнаружили, что среди известных генов теплового шока свою экспрессию также значительно увеличили транскрипты, кодируемые последовательностями LTR-ретротранспозонов. Это открывает широкие возможности для детального исследования молекулярных механизмов, определяющих активацию LTR-ретротранспозонов под влиянием теплового шока у животных, а также позволит углубить наше понимание роли внешних стрессовых факторов на стабильность генома.

В качестве первого шага мы провели биоинформационный анализ разнообразия и структур LTR-ретротранспозонов, отвечающих на тепловой шок у *M. lignano*, и поиск консервативных мотивов теплового шока в последовательностях их промоторов, а затем сравнили полученные результаты с известными данными по чувствительным к тепловому шоку LTR-ретротранспозонам растений. Мы обнаружили, что LTR-ретротранспозоны двух филогенетически удаленных кластеров группы *Ty3/gypsy* (*Mag* и *CsRN1*) у *M. lignano* содержат в своих промоторах различные наборы множественных палиндромных канонических мотивов теплового шока (nGAAnnTTCnnGAAn) [3,4]. Данные мотивы ранее были описаны лишь у LTR-ретротранспозонов растений, элемент *ONSEN Arabidopsis thaliana* (филогенетическая группа *Ty1/copia*) и других близкородственных крестоцветных. Элементы *ONSEN* также отвечают на тепловой шок, но содержат другие наборы мотивов теплового шока [5,6]. Далее, мы определили чувствительность исследуемых LTR-ретротранспозонов к длительности теплового шока с помощью количественной ОТ-ПЦР, установив, что минимальное время, необходимое для активации их экспрессии, находится в диапазоне от 5 до 15 минут, достигая пика экспрессии после 30 минут воздействия.

Далее, используя возможность получения трансгенных линий на *M. lignano* [2], мы решили убедиться, может ли лишь одна промоторная последовательность длинных концевых повторов (long terminal repeats — LTR) исследуемых LTR-ретротранспозонов индуцировать экспрессию трансгенного репортерного флуоресцентного белка под влиянием теплового шока. В качестве положительного контроля был взят промотор гена белка теплового шока — Hsp20, уже проверенный нами ранее в предыдущем исследовании [7]. Для этого были сконструированы плазмиды, содержащие вставку последовательности красного флуоресцентного белка mScarlet-I под контролем LTR-промоторов элементов *LTR\_Mag* и *LTR\_CsRNI*. Плазмиды также содержали маркер положительной селекции трансгенных червей — конститутивный промотор фактора элонгации альфа и зеленого флуоресцентного белка mNeonGreen. Контрольная плаزمида содержала промотор гена Hsp20 вместо последовательности LTR-промоторов.

Трансгенные линии были получены с помощью метода микроинъекций плазмидных конструкций в одноклеточные стадии яиц *M. lignano* с последующим облучением дозой 4 Грэй. В отсутствие теплового шока красной флуоресценции не наблюдалось. А при его наличии, экспрессия флуоресцентного белка наблюдалась в случае трансгенных линий с промоторами гена Hsp20, а также транспозона *LTR\_Mag*. Для линии с промотором *LTR\_CsRNI* не удалось задетектировать флуоресцентного сигнала. Для линии *LTR\_Mag* экспрессия красного белка наблюдалась в различных соматических тканях червя — наибольшая яркость в тканях пищеварительной системы — и отсутствует в гонадах (семенниках и яичниках). В тоже время экспрессия под контролем промотора Hsp20 была почти повсеместной. Отсутствие экспрессии в гонадах, с одной стороны, говорит о слабом адаптационном значении чувствительности к тепловому шоку у исследуемых LTR-ретротранспозонов. Однако очень важно учесть, что *M. lignano* — регенерирующий червь, который может восстанавливать потерянные органы и ткани за счет деления прижизненной популяции соматических стволовых клеток — необластов [1]. Если размножение (перемещение) ретротранспозона произойдет в необластах, то он имеет шанс быть перенесенным потомству в случае, если необласт с транспозицией даст начало линии полового пути.

Для поддержки данной гипотезы мы провели визуальное исследование экспрессии трансгенных конструкций во время регенерации *M. lignano* в условиях без и при наличии теплового шока. После ампутации хвостовой пластины через несколько часов на месте разреза сформировалось скопление недифференцированных стволовых клеток, называемое бластемой. В условиях теплового шока, в случае с трансгенной линией *LTR\_Mag*, уже спу-

ся несколько часов наблюдается значительное увеличение свечения флуоресцентного маркера в бластеме.

Таким образом, функциональные регуляторные элементы, отвечающие за чувствительность к тепловому шоку действительно находятся в промоторных последовательностях LTR исследуемых ретротранспозонов, а процесс активации ретротранспозонов *M. lignano* аналогичен регуляции экспрессии генов белков теплового шока. Наши результаты представляют собой первые убедительные данные по молекулярному механизму активации LTR-ретротранспозонов тепловым шоком у *M. lignano* и у животных в целом. Анализы структуры и филогении позволяют предположить конвергентную эволюцию стратегий приспособления LTR-ретротранспозонов животных и растений к использованию клеточных механизмов стрессового ответа для своей активации. Возможность транспозиции в необластах с последующим клональным распространением также представляется интересной для дальнейших исследований.

### Литература

1. Mouton S. et al. The regenerative flatworm *Macrostomum lignano*, a model organism with high experimental potential // Int. J. Dev. Biol. Europe PMC Funders, 2018. Vol. 62, № 6–7–8. P. 551–558.
2. Wudarski J. et al. Efficient transgenesis and annotated genome sequence of the regenerative flatworm model *Macrostomum lignano* // Nat. Commun. Nature Publishing Group, 2017. Vol. 8, № 1. P. 2120.
3. Mittal D. et al. Binding affinities and interactions among different heat shock element types and heat shock factors in rice (*Oryza sativa* L.) // FEBS J. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 2011. Vol. 278, № 17. P. 3076–3085.
4. Li Z., Srivastava P. Heat-Shock Proteins // Current Protocols in Immunology. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2004. Vol. Appendix 1. P. Appendix 1T.
5. Cavrak V. V. et al. How a Retrotransposon Exploits the Plant's Heat Stress Response for Its Activation // PLOS Genet. 2014. Vol. 10, № 1. P. e1004115.
6. Pietzenuk B. et al. Recurrent evolution of heat-responsiveness in Brassicaceae COPIA elements // Genome Biol. BioMed Central, 2016. Vol. 17, № 1. P. 209.
7. Wudarski J. et al. Influence of temperature on development, reproduction and regeneration in the flatworm model organism, *Macrostomum lignano* // Zool. Lett. BioMed Central, 2019. Vol. 5, № 1. P. 7.

**ВЛИЯНИЕ СЕЛЕНСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ  
НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ РАКОВЫХ КЛЕТОК  
МЛЕКОПИТАЮЩИХ И ЭКСПРЕССИЮ  
КЛЮЧЕВЫХ УЧАСТНИКОВ СТРЕССА  
ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА \***

INFLUENCE OF SELENIUM CONTAINING COMPOUNDS ON THE  
VILITY OF VARIOUS MAMMAL CANCER CELLS AND EXPRESSION  
OF KEY PARTICIPANTS OF ENDOPLASMATIC RETICULUM STRESS

Е. Г. Варламова, М. В. Гольтяев

*Институт биофизики клетки Российской академии наук-обособленное  
подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр  
«Пушкинский научный центр биологических исследований Российской  
академии наук», Пушкино, Россия*

E. G. Varlamova, M. V. Goltyaev

*Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences*

e.mail:1928lv@mail.ru

**Аннотация**

Установлено влияние селенита натрия и метилселениновой кислоты на жизнеспособность раковых клеток HT-1080 (фибросаркома человека) и F-9 (тератокарцинома семенников мыши), а также предположен механизм апоптотической гибели клеток при длительном стрессе эндоплазматического ретикулума (ЭР-стресс).

**Abstract**

The effect of sodium selenite and methylselenenic acid on the viability of cancer cells HT-1080 (human fibrosarcoma) and F-9 (mouse testicular teratocarcinoma) was established, and the mechanism of apoptotic cell death during prolonged endoplasmic reticulum stress (ER-stress) was also suggested.

Селенит натрия (СН) и метилселениновая кислота (МСК) являются широко используемыми потенциальными противоопухолевыми селен-содержащими соединениями, что было неоднократно подтверждено в ряде ис-

---

© Е. Г. Варламова, М. В. Гольтяев, 2019

\* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-34-00118 мол\_а и грантом Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

следований [1–5]. В рамках данной работы нами изучено влияние данных соединений на жизнеспособность раковых клеточных линий HT-1080 (фибросаркома человека) и F-9 (тератокарцинома семенников мыши), а также предположен механизм апоптотической гибели клеток при длительном стрессе эндоплазматического ретикулаума (ЭР-стресс).

Для установления варианта гибели изучаемых клеток при воздействии на них СН и МСК в концентрациях 1 мкМ и 10 мкМ спустя 24 ч инкубирования использовали набор реагентов Apoptosis/Necrosis Detection Kit (Abcam, США) в тандеме с флуоресцентной микроскопией. В случае обеих клеточных линий механизмом из гибели явился апоптоз, но не некроз, однако результаты весьма неоднозначны. При обработке клеток HT-1080 1 мкМ СН только приблизительно 50 % клеток подверглись апоптозу, тогда как остальные 50 % остались жизнеспособными. В случае обработки данной клеточной линии 10 мкМ СН, а также 1 мкМ и 10 мкМ МСК у 100 % клеток установлена апоптотическая гибель с потерей ими адгезивных свойств. При обработке клеток F-9 как 10 мкМ СН, так и 10 мкМ МСК для 100 % из них подверглись апоптозу, тогда как воздействие на клетки 1 мкМ МСК вызвало апоптотическую гибель только у приблизительно 50 %, 1 мкМ СН практически не повлиял на их жизнеспособность (рис. 1).

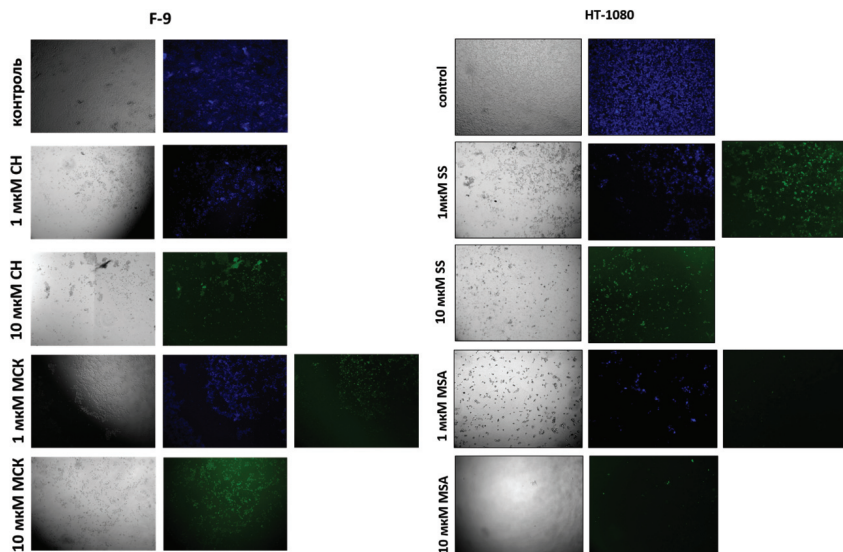
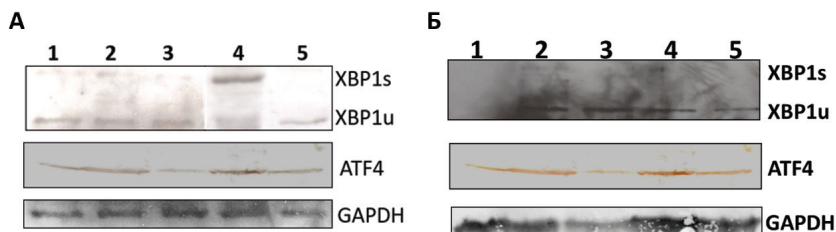


Рис. 1. Флуоресцентный анализ жизнеспособности раковых клеток линии F-9 и HT-1080 после 24 ч воздействия на клетки СН и МСК в концентрациях 1 мкМ и 10 мкМ. Живые клетки окрашены CytoCalcein Violet 450 (синие), апоптотические клетки окрашены Apoptin Green Indicator (зеленые)

Известно, что гибель клеток при воздействии на них СН и МСК сопряжена с ЭР-стрессом, который связан с сигнальными путями, объединенными общим триггерным механизмом и представленных триадой трансмембранных белков: PERK, IRE1 и ATF6. Для установления сигнальных путей, активируемых при обработке исследуемых клеток СН и МСК в каждом конкретном случае, проверили как меняется экспрессия ключевых участников двух путей: PERK-ATF4, IRE1-XBP1s методом Вестрен-блот анализа (рис. 2).



*Рис. 2.* Анализ экспрессии белков (XBP1s, ATF4 и GAPDH) в лизатах раковых клеток F-9 (А) и HT-1080 (Б) после 24 ч воздействия на них СН и МСК в концентрациях 1 мкМ и 10 мкМ методом иммуноблотинга. 1 — количество белка в интактных клетках, 2 — количество белка после воздействия на клетки 1 мкМ СН, 3 — 10 мкМ СН, 4 — 1 мкМ МСК, 5 — 10 мкМ МСК

Установлено, что при обработке клеток 1мкМ МСК экспрессия XBP1s значительно усиливалась, что может свидетельствовать об активации IRE1-сигнального пути. XBP1 (X-box связывающий белок 1) — транскрипционный фактор, который принимает участие в регуляции экспрессии генов, необходимых для функционирования иммунной системы и в регуляции ответа на ЭР-стресс. Активированный IRE1 (индозитол-требующий фермент 1) катализирует удаление нетрадиционного интрона (26 нуклеотидов) из повсеместно экспрессируемой мРНК XBP1u (несплайсированной XBP1), что вызывает сдвиг рамки в кодирующей последовательности XBP1 и трансляцию изоформы массой 40кДа (XBP1s) вместо 33 кДа (XBP1u). Во всех остальных образцах обработанных клеток как СН, так и МСК уровень экспрессии XBP1u и XBP1s приблизительно одинаковый. При активации PERK-сигнального пути ожидалось выявить усиление экспрессии ATF4-транскрипционного фактора, вызванное фосфорилированием eIF2 $\alpha$  (ключевой участник трансляции белков), активированным в свою

---

очередь PERK. Однако для обеих раковых линий клеток, обработанных СН и МСК в исследуемых концентрациях, уровень экспрессии ATF4 не отличался от контроля. Скорее всего апоптоз раковых клеток, в которых не наблюдалось усиления экспрессии ни ATF4, ни XBP1s, вызван активацией третьего сигнального пути ATF6, что требует подтверждения в дальнейших исследованиях.

**ПОЛУЧЕНИЕ ПАНЕЛИ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИГЕНОВ —  
КОМПОНЕНТОВ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ  
ДИАГНОСТИКИ ЛИХОРАДКИ МАРБУРГ**

**PREPARATION OF SEVERAL RECOMBINANT ANTIGENS  
FOR USE AS COMPONENTS FOR DEVELOPMENT  
OF SEROLOGICAL DIAGNOSTIC FEVER MARBURG**

Н. В. Волкова

*ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии  
«Вектор» Роспотребнадзора*

N. V. Volkova

*SRC VB “Vector”, Russia*

E-mail: tasha\_wolkowa11.93@mail.ru

**Аннотация**

Вирус Марбург (*Marburg virus*, MARV) был открыт в 1967 г., когда одновременно в Германии и Югославии научные сотрудники заразились неизвестным патогеном при контакте с тканями инфицированных африканских зеленых марышек (*Cercopithecus aethiops*), импортированных из Уганды. Этот вирус стал родоначальником рода *Marburgvirus* семейства *Filoviridae*. Национальным институтом аллергии и инфекционных заболеваний США MARV, также как и вирус Эбола (*Ebola virus*), занесен в категорию приоритетных инфекционных агентов, представляющих высокий риск для национальной безопасности и здравоохранения, т.к. может быть завезен на неэндемичные территории с заболевшими туристами, инфицированными животными или с целью биотерроризма. Ранняя лабораторная диагностика в форматах ПЦР, ИФА или иммунохроматографического анализа (ИХА) имеет решающее значение для предотвращения распространения филовирусов. В РФ не зарегистрированы тест-системы для выявления антигенов или антител, специфичных к MARV. Поэтому целью данной работы стало получение рекомбинантных белков — аналогов основных иммуногенов MARV — гликопротеина (GP), нуклеопротеина (NP), матриксного белка VP40 в прокариотической системе экспрессии и исследование их антигенных и иммуногенных свойств. Полученные рекомбинантные белки GP, NP и VP40 MARV были использованы в ИФА для выявления специфических антител в сыворотках крови переболевшего человека, а также кур и морских свинок, иммунизированных



вирусоподобными частицами и экспериментальной ДНК-вакциной, соответственно. Антитела мышей, иммунизированных рекомбинантными белками, взаимодействовали с аналогичными вирусными белками в составе инактивированного MARV в ИФА и иммуноблоттинге. Таким образом, можно сделать вывод, что полученные рекомбинантные белки GP, NP и VP40 MARV обладают антигенностью и иммуногенностью и их можно использовать в различных иммунохимических тестах.

### Abstract

The Marburg virus (MARV) was discovered in 1967, when researchers in Germany and Yugoslavia simultaneously infected an unknown pathogen when they came into contact with tissues of infected African green monkeys (*Cercopithecus aethiops*) imported from Uganda. This virus became the ancestor of the Marburgvirus genus of the family Filoviridae. The US National Institute of Allergy and Infectious Diseases, MARV, as well as the Ebola virus, is included in the category of priority infectious agents, which pose a high risk to national security and public health, because may be brought to non-endemic areas with infected tourists, infected animals or for the purpose of bioterrorism. Early laboratory diagnosis in PCR, ELISA or immunochromatographic analysis (ICA) is crucial to prevent the spread of filovirus. No test systems have been registered in the Russian Federation to detect antigens or antibodies specific for MARV. Therefore, the purpose of this work was to obtain recombinant proteins — analogues of the main immunogens of MARV — glycoprotein (GP), nucleoprotein (NP), matrix protein VP40 in the prokaryotic expression system and study their antigenic and immunogenic properties. The resulting recombinant proteins GP, NP, and VP40 MARV were used in ELISA to detect specific antibodies in the blood sera of the ill person, as well as in chickens and guinea pigs immunized with virus-like particles and an experimental DNA vaccine, respectively. Antibodies of mice immunized with recombinant proteins interacted with similar viral proteins as part of inactivated MARV in ELISA and immunoblotting. Thus, it can be concluded that the obtained recombinant proteins GP, NP and VP40 MARV have antigenicity and immunogenicity and can be used in various immunochemical tests.

С момента открытия MARV, от одноименной лихорадки во время природных вспышек погибло более 500 человек, что кажется не слишком много по сравнению с числом погибших (11000 человек) в результате, самой крупной вспышки болезни, вызванной вирусом Эбола (БВВЭ), в Африке в 2014–2015 г. Но летальность от болезни, вызванной MARV, также как и при БВВЭ, может достигать 90 % от числа заболевших, как, например, это произошло в Анголе 2005 г. [1]. Описана длительная персистенция филовирусов в репродуктивном тракте выживших мужчин и приматов [2, 3], а также аэрозольный путь инфицирования морских свинок и приматов. К заражению филовирусами восприимчивы обычные домашние свиньи, летучие мыши и хомяки, что может способствовать распространению филовирусов в популяции людей, а также стать основой для использования этих патогенов в качестве биологического оружия. Ранняя лабораторная диагностика в форматах ПЦР, ИФА или иммунохромато-

графического анализа (ИХА) имеет решающее значение для предотвращения распространения филовирюсов. Для проведения ПЦР необходимы специализированные лаборатории с дорогим оборудованием и высококвалифицированным персоналом. Иммуноферментные тест-системы в формате ИФА и ИХА для выявления вирусных антигенов или специфических антител, просты в использовании, даже при отсутствии электроэнергии. Кроме того, иммуноферментные тест-системы необходимы для исследования эффективности разрабатываемых вакцинных препаратов. Такие тест-системы для выявления антигенов или антител, специфичных к MARV, в РФ не зарегистрированы. Поэтому **целью** данной работы стало получение рекомбинантных белков — аналогов основных иммуногенов MARV — гликопротеина (GP), нуклеопротеина (NP), матриксного белка VP40 в прокариотической системе экспрессии и исследования их антигенных и иммуногенных свойств.

### Материалы и методы

Был проведен биоинформативный анализ генома MARV (штамм Popr), синтез генов, кодирующих целевые белки, а также расчет специфических праймеров. Соответствующие гены были амплифицированы и клонированы в составе экспрессионного вектора pET21a по уникальным сайтам рестрикции NheI и XhoI по общепринятым методикам. Наличие встройки подтверждали рестрикционным анализом и секвенированием по методу Сэнгера. Далее клетки *E.coli* штамма BL21(DE3), трансформированные рекомбинантными плазмидами, селективно культивировали в 100 мл жидкой питательной среды LB с добавлением натриевой соли ампициллина в рабочей концентрации 20 мкг/мл. Синтез целевых рекомбинантных белков индуцировали 0,5 мМ IPTG (изопропил-β-D-тиогалактозидом). Отбор клонов *E.coli* — продуцентов проводили по наличию синтезируемых целевых белков по результатам электрофореза лизатов клеток в 10%-м полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-ПААГ). В качестве отрицательного контроля использовали, полученный аналогичным способом, лизат клеток *E.coli* штамма BL21(DE3), содержащий плазмиду pET21. Очистку рекомбинантных белков, содержащих полигистидиновый блок, проводили аффинной хроматографией на Ni-хеллатной смоле. Иммунизацию мышей линии Balb/c рекомбинантными белками, а также ИФА и иммуноблоттинг проводили по лабораторным схемам.

### Результаты и обсуждение

Препараты очищенных рекомбинантных белков GP, NP и VP40 MARV были использованы в ИФА в качестве антигенов для выявления титров специфических антител в сыворотках крови человека, переболевшего ге-

моррагической лихорадкой Марбург в результате лабораторной аварии [2], а также кур и морских свинок, иммунизированных вирусоподобными частицами [4] и экспериментальной ДНК-вакциной, соответственно.

Специфичность взаимодействия антител с рекомбинантными и нативными антигенами подтверждали методом иммуноблоттинга. В качестве положительного и отрицательного контроля использовали инактивированные препараты MARV и вирус Эбола (любезно предоставленные д-ром А. А. Чепурновым). Было показано, что антитела сывороток мышей линии Balb/c, иммунизированных рекомбинантными белками GP, NP и VP40, взаимодействовали с аналогичными вирусными белками в составе инактивированного MARV в ИФА и иммуноблоттинге. На основании полученных результатов, можно сделать вывод, что рекомбинантные белки MARV обладают антигенностью/иммуногенностью и могут быть использованы:

- в клинической практике для серологического тестирования сывороток крови пациентов на содержание иммуноглобулинов классов IgM и IgG, специфичных к MARV, методами ИФА, иммуноблоттинга и иммунохроматографического анализа (ИХА);
- при создании контрольных панелей сывороток крови, содержащих и не содержащих IgM и IgG, специфичных к MARV;
- для тестирования иммунного ответа животных и добровольцев на введение экспериментальных вакцин, содержащих белки NP, VP40 и GP вируса Марбург;
- для иммунизации мышей при получении препаратов гибридных моноклональных антител, используемых при разработке иммуноферментных тест-систем в формате «сэндвич» для выявления вирусного антигена.
- как положительный контроль в иммуноферментных тест-системах по выявлению аналогичных вирусных белков-антигенов MARV.

## Литература

1. Towner J. S., Khristova M. L., Sealy T. K. et al. Marburgvirus genomics and association with a large hemorrhagic fever outbreak in Angola. / *J. Virol.* 2006; 80 (13):6497–6. doi: 10.1128/JVI.00069–06).
2. Никифоров В. В., Туровской Ю.И, Калинин П. П. и др. Случай лабораторного заражения лихорадкой Марбург. / *Микробиология.* 1994. № 3. С. 104–110.
3. Coffin K. M., Liu J., Warren T. K. et al. Persistent Marburg Virus Infection in the Testes of Nonhuman Primate Survivors. / *Cell Host Microbe.* 2018;24(3):405–416. e3. doi: 10.1016/j.chom.2018.08.003.
4. Полежаева О. А., Щербаков Д. Н. Разработка панели псевдовирусных частиц, экспонирующих гликопротеин вируса Марбург. *Международный научно-исследовательский журнал.* № 08 (62). Часть 2., август.

## УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ МРНК BRCA1 КАК ПОКАЗАТЕЛЬ ХИМОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

### BRCA1 mRNA EXPRESSION LEVEL AS A CHEMICAL SENSITIVITY INDICATOR IN BREAST CANCER

К. А. Гаптулбарова, А. М. Певзнер, М. К. Ибрагимова, М. М. Цыганов

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Томский национально исследовательский медицинский центр  
Российской академии наук», Томск, Россия*

K. A. Gaptulbarova, A. M. Pevzner, M. K. Ibragimova, M. M. Tsyganov

*Cancer Research Institute, Tomsk NRMC*

#### Аннотация

Большинство современных исследований ограничены изучением лишь герминальных мутаций гена *BRCA1* (чаще всего 5382insC) и очень мало работ, которые характеризуют различные соматические изменения гена *BRCA1* в опухоли. Данный ген играет центральную роль в репарации ДНК и его активность определяет эффективность многих химиопрепаратов. С учетом того, что наличие мутации 5382insC (отсутствие активности *BRCA1*) обуславливает высокую чувствительность больных к цитостатикам, то, уровень экспрессии так же может иметь высокую предиктивную и прогностическую значимость и определять эффективность проводимого лечения. Цель работы: оценить связь уровня экспрессии гена *BRCA1* в опухоли молочной железы с эффективностью неoadъювантной химиотерапии (НХТ) и прогнозом заболевания. Исследования проводилось среди 105 больных раком молочной железы (РМЖ). Оценена экспрессия *BRCA1* в опухолевом материале до и после НХТ. В результате исследования была выявлена связь экспрессии гена *BRCA1* в опухоли молочной железы с эффективностью неoadъювантной химиотерапии и прогнозом заболевания. Было установлено, что объективный ответ на НХТ сопряжен с высоким уровнем *BRCA1* в группе больных со схемой САХ ( $p=0,04$ ) и при применении таксо-тера в монорежиме ( $p=0,01$ ). Установлено, что гиперэкспрессия исследуемого гена является маркером плохого прогноза заболевания.

---

© К. А. Гаптулбарова, А. М. Певзнер, М. К. Ибрагимова, М. М. Цыганов, 2019

\* Исследования выполнены при поддержке гранта РНФ № 19-75-00027 «Исследование соматического статуса гена *BRCA1* в опухоли молочной железы для персонализированного назначения лечения».

### Abstract

Most modern studies are limited to the study of only germline mutations of the *BRCA1* gene (most often 5382insC) and very few studies that characterize the different somatic changes in the *BRCA1* gene in the tumor. Given the fact that various gene mutations, such as chromosomal aberrations (Litviakov, N.V., et al., 2016), genetic polymorphisms (Litviakov, N.V., et al., 2011), loss of heterozygosity, etc., may affect the effectiveness treatment, it can be assumed that the expression of the *BRCA1* gene will also be associated with the sensitivity of the neoplasm to treatment. Aim: to evaluate the correlation between expression of the *BRCA1* gene in a breast tumor with neoadjuvant chemotherapy (NACT) efficiency. The study was conducted among 105 patients with breast cancer. The expression of *BRCA1* in the tumor material before and after NACT was evaluated. The study revealed a relationship between the expression of the *BRCA1* gene in a breast tumor and the effectiveness of neoadjuvant chemotherapy and the prognosis of the disease. It was found that an objective response to NACT is associated with a high level of *BRCA1* in the group of patients with the CAX regimen ( $p=0.04$ ) and when using taxotere in mono mode ( $p=0.01$ ). It was found that overexpression of the studied gene is a marker of poor prognosis of the disease.

### Материалы и методы

В исследование было включено 105 больных РМЖ со стадией ПА — ПИВ, получавших в 2006–2015 годах лечение в клинике НИИ онкологии Томского НИМЦ. Все больные получали 2–4 курса неoadъювантной химиотерапии по схемам FAC (фторурацил, доксорубин, циклофосфан), CAX (циклофосфан, доксорубин, кселода) и монотерапию таксотером. Затем проводилась операция и 2 курса адъювантной химиотерапии по схеме FAC, лучевая терапия и/или гормональное лечение назначались по показаниям. РНК выделяли из 105 парных образцов до и после лечения с помощью набора RNeasy Plus mini Kit (Qiagen, Germany) в соответствии с инструкцией производителя. Оценку экспрессии гена BRCA1 проводили при помощи qRT-PCR. Относительная экспрессия была оценена с помощью метода Pfaffl, относительно гена-рефери *GAPDH* и нормальной ткани молочной железы.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ «STATISTICA 8.0» (StatSoft Inc., USA). Для проверки гипотезы о значимости различий между исследуемыми группами использовали критерий Вилкоксона — Манна — Уитни.

### Результаты

На первом этапе нашего исследования мы оценили уровень экспрессии гена BRCA1. Среднее значение экспрессии данного гена до лечения составило  $0,85 \pm 0,1$  в операционном материале после НХТ —  $0,65 \pm 0,08$ . Далее мы оценили ассоциацию уровня экспрессии гена *BRCA1* в опухоли до лечения

с эффектом НХТ в общей группе и при различных схемах лечения. Начальный уровень экспрессии гена *BRCA1* и эффект НХТ при разных схемах химиотерапии представлен на рис. 1. На рисунке хорошо видно, что экспрессия *BRCA1* сильно варьирует.

Основываясь на том, что при изучении гена *BRCA1* важным является учет схемы неoadъювантной химиотерапии, мы оценили связь начального уровня экспрессии исследуемого гена в зависимости от эффекта НХТ в общей группе больных, а также при разных схемах химиотерапии (рис. 1).

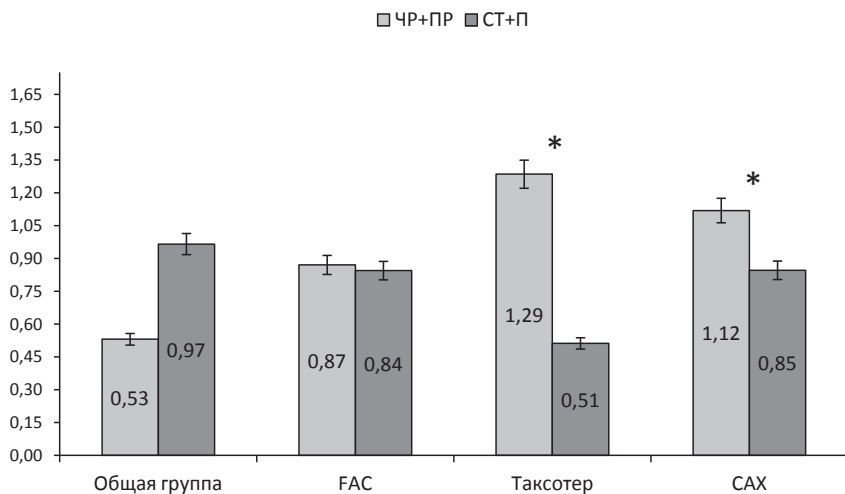


Рис. 1. Связь начального уровня экспрессии гена *BRCA1* в опухоли молочной железы с эффектом НХТ в общей группе больных и при разных схемах.

По оси ординат расположен уровень экспрессии гена *BRCA1*; ЧР+ПР Частичная+Полная регрессия+, СТ+П Стабилизация+Прогрессирование

Оценка связи экспрессии исследуемого гена с эффектом НХТ показала, что статистически достоверные различия между группой с наличием объективного ответа на НХТ и без такового характерны для группы больных со схемой CAH ( $p=0,04$ ) и для пациентов пролеченных таксотером в монорежиме ( $p=0,01$ ), (Рисунок 1). В обоих случаях уровень экспрессии исследуемого гена выше в группе пациентов с наличием объективного ответа на химиотерапию.

Далее были оценены отдаленные результаты лечения пациентов в зависимости от уровня экспрессии гена *BRCA1*. Установлено, что наличие гипоэкспрессии *BRCA1* (уровень менее 1) в опухолевой ткани после НХТ

является благоприятным прогностическим фактором и сопряжен с высокими показателями безметастатической выживаемости ( $p=0,0002$ ) (рис. 2).

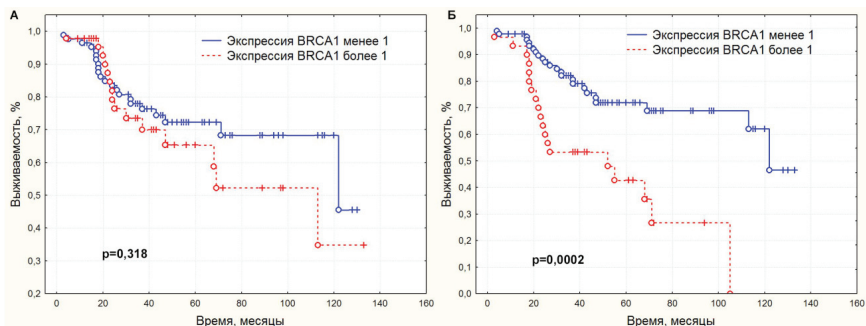


Рис. 2. Безметастатическая выживаемость больных РМЖ в зависимости от уровня экспрессии в опухоли до (А) и после НХТ (Б) гена BRCA1

## Выводы

Таким образом, в результате проведенного исследования была показана связь экспрессии гена *BRCA1* в опухоли молочной железы с эффективностью неoadъювантной химиотерапии и прогнозом заболевания. На основании полученных данных можно полагать, что экспрессия гена *BRCA1* может также являться маркером эффективности неoadъювантной химиотерапии (в частности таксотером), но это требует дальнейшего изучения.

## Литература

1. Litviakov N. V., Tsyganov M. M., Ibragimova M. K., Cherdyntseva N. V., Kzhyshkowska J., Slonimskaya Y. M., Kazantseva P. V., Choinzonov E. L. Deletions of multidrug resistance gene loci in breast cancer leads to the down-regulation of its expression and predict tumor response to neoadjuvant chemotherapy // *Oncotarget*. 2016. V. 7, №. 7. P. 7829–7841.
2. Литвяков Н. В., Чердынцева Н. В., Цыганов М. М., Денисов Е. В., Мерзлякова М. К., Гарбуков Е. Ю., Вторушин С. В., Завьялова М. В., Слонимская Е. М. Ассоциация генетического полиморфизма с изменением экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости в опухоли молочной железы в процессе неoadъювантной химиотерапии // *Медицинская генетика*. 2011. Т. 10, №. 10 (112). С. 37–43.

**ТРАНСКРИПЦИЯ И РЕПЛИКАЦИЯ КАК ВЕРОЯТНЫЙ  
ИСТОЧНИК НЕСТАБИЛЬНОСТИ ТАНДЕМНЫХ ПОВТОРОВ  
В КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ ЧЕЛОВЕКА \***

TRANSCRIPTION AND REPLICATION AS A POSSIBLE SOURCE  
OF TANDEMIC REPEAT INSTABILITY IN HUMAN CELL LINES

И. В. Грищенко, Я. В. Пурвиньш

*ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии  
«Вектор» Роспотребнадзора*

I. V. Grishchenko, Y. V. Purvinsh

*SRC VB "Vector" Rospotrebnadzor, Russia*

E-mail: grischenko\_iv@vector.nsc.ru

**Аннотация**

Экспансия тандемных повторов является динамической мутацией, приводящей к появлению тяжелых и неизлечимых генетических заболеваний человека (синдрома ломкой X хромосомы, болезни Хантингтона, миотонической дистрофии и др.). Механизм развития данной мутации до сих пор неизвестен. Данная работа направлена на установления причин появления экспансии

**Abstract**

The expansion of tandem repeats in DNA is a dynamic mutation leading to the development of severe and incurable human genetic disorders (i.e. fragile X syndrome, Huntington's disease, myotonic dystrophy). The mechanism of this mutation is still unknown. This work is aimed at establishing the causes of the expansion

The expansion of repeats is a type of mutation, which is an increase of the repeats number in the hundreds of units. This phenomenon leads to a certain human genetic diseases, such as Huntington's disease, fragile X syndrome. More than 30 diseases are caused by expansions of repeats dispersed throughout the human genome. Fragile X syndrome is the most common heritable intellectual disability associated with the repeat instability. It is caused by the expansion of (CGG)<sub>n</sub> repeat in the promoter region of the gene FMR1. The number of repeats

---

© И. В. Грищенко, Я. В. Пурвиньш, 2019

\* Исследования выполнены при поддержке гранта РФФИ 18-34-00336.



in the normal ranges is from 5 to 54 units. With the repeat expansion in the range of 55 to 200 triplets, the allele of the FMR1 gene is called premutation. Fragile X syndrome develops when the number of repeated triplets becomes over 200.

Today the cause of this mutation is unknown. According to theory the expansion is due to the formation of alternative stable secondary DNA structures. At sites with these structures there is a failure of the repair and replication systems, which leads to an increase the size of the repeat. A feature of the FMR1 gene promoter region is coding strand contains (CGG) $n$  repeat, and the matrix strand contains CCG triplets. Thus, on the coding strand increased repeat forms a G-quadruplex, and the ones on matrix strand forms an i-motif. Since expansion take place in non-dividing cells like oocytes or neurons it can be assumed an expansion mechanism involves aberrant DNA repair, particularly transcription-coupled repair. Moreover, in the premutant alleles of the FMR1 gene which rapidly accumulating the repeated units a dramatically increasing of the transcription level were observed. These findings indicate the possible involvement of active transcription in the of (CGG) $n$  repeats expansion mechanism.

The project aims to investigate (CGG) $n$  repeat instability associated with the fragile X syndrome during transcription in human tissue culture. Work was carried out on HEK293A and HEK293T culture cells. Recombinant plasmids with inducible promoter TRE containing the premutant and normal alleles downstream of TRE and SV40 origin were constructed. Further lipofection of cells were carried out. In this study we investigated the effect of active transcription and replication on the (CGG) $n$  repeat length in the different cell lines and plasmids. Large T antigen expressed in HEK293T cells allows plasmids to replicate. Therefore in this cell lines plasmid with exogenous repeat can be replicated and transcribed, but in HEK293A plasmid can be only transcribed. In this case two processes of DNA metabolism can effect on repeat instability. Influence of these processes to repeat expansion is discussed.

**МЕТИЛИРОВАНИЕ ГЕНА МИКРОРНК *MIR127*  
В КЛЕТКАХ СОННЫХ АРТЕРИЙ  
И КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С АТЕРОСКЛЕРОЗОМ**

METHYLATION OF *MIR127* GENE IN CAROTID ARTERY  
AND BLOOD CELLS FROM PATIENTS WITH ATHEROSCLEROSIS

Т. Д. Дампилова<sup>1</sup>, Д. В. Шарыш<sup>2</sup>, А. В. Марков<sup>2</sup>, Ю. А. Королева<sup>2</sup>,  
А. А. Слепцов<sup>2</sup>, А. А. Зарубин<sup>2</sup>, М. В. Голубенко<sup>2,3</sup>, Н. П. Бабушкина<sup>2</sup>,  
Н. Р. Валиахметов<sup>2</sup>, А. Н. Казанцев<sup>3</sup>, Н. Н. Бурков<sup>3</sup>, О. Л. Барбараш<sup>3</sup>,  
В. П. Пузырев<sup>1,2</sup>, М. С. Назаренко<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России

<sup>2</sup> Томский НИМЦ, НИИ медицинской генетики

<sup>3</sup> ФГБНУ НИИ Комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний

T. D. Dampilova<sup>1</sup>, D. V. Sharish<sup>2</sup>, A. V. Markov<sup>2</sup>, I. A. Koroleva<sup>2</sup>,  
A. A. Sleptcov<sup>2</sup>, Zarubin A. A.<sup>2</sup>, M. V. Golubenko<sup>2,3</sup>, N. P. Babushkina<sup>2</sup>,  
N. R. Valiahmetov<sup>2</sup>, A. N. Kazantsev<sup>3</sup>, N. N. Burkov<sup>3</sup>, O. L. Barbarash<sup>3</sup>,  
V. P. Puzyrev<sup>1,2</sup>, M. S. Nazarenko<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Siberian State Medical University, Russia

<sup>2</sup> Tomsk NRMС, Research Institute of Medical Genetics, Russia

<sup>3</sup> Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases

E-mail: idamtanya@gmail.com

**Аннотация**

В работе изучен уровень метилирования гена *MIR127* в клетках сонных артерий и лейкоцитах крови человека при атеросклерозе. Выявлено гиперметилование гена *MIR127* как в атеросклеротических бляшках и лейкоцитах крови пациентов с атеросклерозом, так и в лейкоцитах крови относительно здоровых индивидов.

**Abstract**

We examined the level of DNA methylation within *MIR127* gene in carotid artery cells and human blood leukocytes in atherosclerosis. Hypermethylation of *MIR127* gene was

detected both in atherosclerotic plaques and blood leukocytes of patients with atherosclerosis, and in blood leukocytes of relatively healthy individuals.

## Введение

МикроРНК являются важными молекулами, регулирующими внутриклеточные процессы, межклеточную коммуникацию и принимают участие в патологических процессах при развитии атеросклероза [1]. Повышение экспрессии *miR-127 в атеросклеротических бляшках (АБ) сонных артерий* было ассоциировано с нестабильностью и разрывами покрышки бляшки [2]. С другой стороны, гипометилирование в импринтированном локусе 14q32, содержащем *MIR127 и другие гены микроРНК, наблюдалось в АБ бедренных артерий по сравнению с интактными артериями* [3]. Так как экспрессия генов микроРНК регулируется, в том числе, метилированием ДНК [4], аберрантные паттерны метилирования гена *MIR127* могут быть связаны с развитием и прогрессией атеросклероза.

## Цель исследования

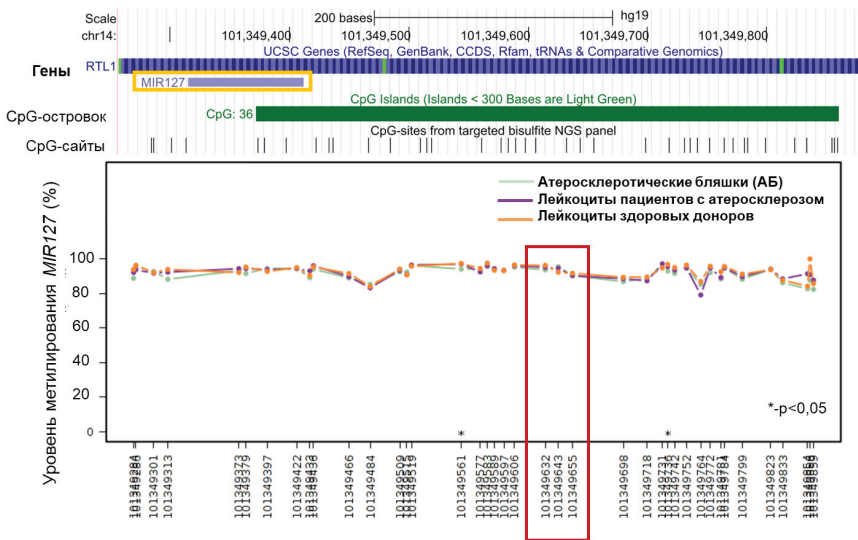
Изучение уровней метилирования CpG-сайтов гена микроРНК *MIR127* в клетках сонных артерий и лейкоцитах крови пациентов с клинически выраженным атеросклерозом, а также в лейкоцитах крови здоровых индивидов.

Материалы и методы: сформирована выборка пациентов с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий (n=52), от которых получены образцы АБ и лейкоцитов крови (ЛК), и контрольная группа ЛК от относительно здоровых индивидов сравнимого возраста (n=48), не имеющих клинических проявлений атеросклероза. Образцы АБ были разделены на три группы: для гистологического исследования, для анализа метилирования ДНК и для лазерной микродиссекции с последующим изучением гладкомышечных клеток (ГМК). Гистологические микропрепараты окрашены гематоксилин-эозином, АБ классифицированы по стадиям (типам) развития согласно American Heart Association. Уровень метилирования CpG-сайтов *MIR127* (chr14:101349258-101349884 согласно сборке генома GRCh37/hg19) был определен методом высокопроизводительного таргетного бисульфитного секвенирования (NGS) на приборе MiSeq (Illumina) и методом бисульфитного пиросеквенирования на приборе PyroMark Q24 (Qiagen). Выравнивание прочтений произведено с помощью программы BWA-Meth, экстракция уровней метилирования CpG-сайтов — с помощью MethylDackel. Изоляция гладкомышечных клеток (ГМК; n=2) проводилась с помощью лазерной микродиссекции на приборе PALM MicroBeam (Carl

Zeiss) из иммуногистохимических микропрепаратов, окрашенных антителами к альфа-актину гладкомышечных. Из полученных клеток выделена и конвертирована ДНК с помощью набора EZ DNA Methylation-Direct Kit (Zymo Research), проведена полногеномная амплификация с помощью набора EpiTect Whole Bisulfite Kit (Qiagen). Статистический анализ данных был выполнен в среде R с помощью программных пакетов Bioconductor (methylKit, limma).

## Результаты

С помощью метода таргетного бисульфитного NGS определен высокий (более 80 %) уровень метилирования CpG-сайтов, локализованных в гене *MIR127* и его промоторе, как в АБ и ЛК пациентов, так и в клетках крови относительно здоровых лиц (см. рисунок).



Профили метилирования CpG-сайтов в исследуемом регионе для гена *MIR127*.

Красной рамкой отмечены CpG-сайты, проанализированные с помощью бисульфитного пиросеквенирования

С использованием метода бисульфитного пиросеквенирования был подтвержден повышенный уровень метилирования трех сайтов в CpG-островке гена *MIR127* (см. таблицу).

**Уровни метилирования промоторов генов *MIR127*  
в анализируемых тканях**

CpG-сайт	Геномные координаты	Средний уровень метилирования, %			
		ЛКЗ	ЛКБ	АБ	ГМК
CpG1	chr14:101349655	87,3 (85,9–89,1)	87,7 (86,7–89,6)	87,0 (85,7–88,0)	86,7; 96,4
CpG2	chr14:101349643	87,5 (86,1–88,6)	88,3 (87,8–89,2)	88,5 (87,2–89,0)	58,7; 91,4
CpG3	chr14:101349632	93,7 (92,6–94,6)	93,6 (92,9–93,9)	92,9 (93,4–94,4)	81,0; 98,0
Средний уровень		89,5 (88,4–90,3)	90,0 (89,0–90,6)	89,2 (88,6–90,2)	75,5; 95,3

Примечание: результаты представлены в виде  $Me(Q_1, Q_3)$ , где  $Me$  — медиана,  $Q_{1-3}$  — 1-й и 3-й квартили. Для ГМК представлены наблюдения по двум образцам. Жирным шрифтом выделены статистически значимые различия между группами сравнения.

При сравнении с данными гистологического анализа было отмечено небольшое, но статистически значимое снижение уровня метилирования CpG3 (chr14:101349632) промотора *MIR127* в образцах АБ при наличии реканализации (91,7 % (90,3–92,0) по сравнению с отсутствием данного признака (93 % (92,5–93,6));  $p=0,01$ ). Аналогичная картина наблюдалась в отношении метилирования CpG1 (chr14:101349655) в АБ при наличии кальцинации (85,8 % (85,1–87,3)) против 87,8 % (86,9–88,3) в отсутствии данного признака нестабильности ( $p=0,04$ ), что согласуется с ранее полученными данными [4].

Анализ а-SMA+-гладкомышечных клеток, полученных из АБ, выявил высокий (около 85 %) уровень метилирования в образцах АБ. При этом в нестабильной АБ (VI тип) данный показатель был на 10 % меньше, чем в образце уязвимой АБ (V тип).

Заключение: CpG-сайты в области гена *MIR127* имеют высокий уровень метилирования с низкой вариабельностью в клетках АБ сонных артерий и ЛК пациентов с атеросклерозом, а также ЛК относительно здоровых лиц. Метилирование данного гена, по-видимому, не участвует в регуляции экспрессии микроРНК miR-127 в клетках АБ сонных артерий.

### Литература

1. Feinberg M. W., Moore K. J. MicroRNA regulation of atherosclerosis //Circulation research. 2016. V. 118. №. 4. P. 703–720.

2. Cipollone F. et al. A unique microRNA signature associated with plaque instability in humans //Stroke. 2011. V. 42. №. 9. P. 2556–2563.

3. Aavik E. et al. Global DNA methylation analysis of human atherosclerotic plaques reveals extensive genomic hypomethylation and reactivation at imprinted locus 14q32 involving induction of a miRNA cluster //European heart journal. 2014. V. 36. № 16. P. 993–1000.

4. Morales S., Monzo M., Navarro A. Epigenetic regulation mechanisms of microRNA expression //Biomolecular concepts. 2017. V. 8. №. 5–6. P. 203–212.

**ВЛИЯНИЕ АНАФИЛАТОКСИНА С3А НА  
ПОЛЯРИЗАЦИЮ МАКРОФАГОВ ПО ФЕНОТИПАМ  
M1 И M2, ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ ИЗ МОНОЦИТОВ  
ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА \***

THE INFLUENCE OF C3A ANAPHYLATOXIN ON POLARIZATION  
OF M1 AND M2 MACROPHAGES, DIFFERENTIATED FROM HUMAN  
PERIPHERAL BLOOD MONOCYTES

К. В. Данько, Е. В. Некрасова, В. С. Шавва,  
Д. А. Могиленко, И. В. Кудрявцев, С. В. Орлов

*ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»,  
Санкт-Петербург, Россия*

K. V. Danko, E. V. Nekrasova, V. S. Shavva,  
D. A. Mogilenko, I. V. Kudriavtsev, S. V. Orlov

*Institute of Experimental Medicine, Department of Biochemistry,  
Saint-Petersburg, Russia*

e-mail: danko\_katerina@mail.ru

**Аннотация**

Макрофаги представляют собой гетерогенную популяцию клеток, чьи функции зависят от микроокружения. В общем случае выделяют два основных фенотипа макрофагов: про-воспалительные M1 и анти-воспалительные M2. Поляризация по типу M1 индуцируются интерфероном гамма (IFN $\gamma$ ) и/или LPS, а по типу M2 — интерлейкином-4 (IL-4). Однако в нашем исследовании мы показали, что дифференцировка моноцитов, выделенных из периферической крови человека, в среде, содержащей анафилатоксин C3a, приводит к появлению нового фенотипа — C3a-макрофаги. Также было показано, что C3a блокирует поляризацию макрофагов M2 и снижает ответ макрофагов на LPS. Таким образом, данная работа демонстрирует новую роль системы комплемента и участие ее компонента C3a в поляризации макрофагов.

---

© К. В. Данько, Е. В. Некрасова, В. С. Шавва, Д. А. Могиленко, И. В. Кудрявцев, С. В. Орлов, 2019

\* Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (проект № 17-15-0136)

**Abstract**

Macrophages are heterogeneous population of immune cells which roles and functions depend on micro-environment. Generally, there are two common phenotypes of macrophages: 1) pro-inflammatory M1 polarized by IFN $\gamma$  and/or lipopolysaccharide (LPS) and 2) anti-inflammatory M2 polarized by IL-4. Here, we showed that C3a anaphylatoxin influences macrophage differentiation and polarization. Differentiation of isolated from human peripheral blood monocytes in the presence of C3a leads to novel phenotype formation of macrophages called C3a-macrophages. It was shown that C3a interferes with M2 macrophage polarization and decreases the macrophage response to LPS. This research presents a novel role of complement system and the involvement of C3a in macrophage polarization.

Атеросклероз является одной из главных причин развития сердечно-сосудистых заболеваний, смертность от которых по данным ВОЗ ежегодно достигает 17 млн человек. Это хроническое воспалительное заболевание, характеризующееся появлением атеросклеротических бляшек в стенке кровеносных сосудов, что приводит к сужению просвета и снижению эластичности сосудистой стенки. Разрыв бляшки грозит тромбозом и может привести к инсульту или инфаркту миокарда.

Макрофаги играют ключевую роль в формировании бляшек, так как при поглощении модифицированных липопротеинов низкой плотности теряют способность к миграции и трансформируются в пенные клетки. Эти клетки секретируют про-воспалительные цитокины и стимулируют дальнейший рост бляшки. Известно, что популяция макрофагов атеросклеротических бляшек гетерогенна: присутствуют M1, M2 макрофаги, а также ряд переходных фенотипов, что в общем определяется микроокружением. Так, существуют доказательства, что в атерогенезе участвует система комплемента, играющая центральную роль в системе врождённого иммунитета. Целью данной работы было изучение влияния компонента системы комплемента — анафилатоксина C3a — на поляризацию макрофагов.

Работа проводилась на моноцитах, выделенных из периферической крови человека путем центрифугирования в градиенте фикола. Активацию макрофагов по классическому пути (M1 макрофаги) производили путем добавления IFN $\gamma$  и липополисахарида (LPS) за 24 часа до окончания эксперимента. Для активации по альтернативному пути (M2 макрофаги) добавляли IL-4 на 1 и на 3 сутки дифференцировки. C3a добавляли в среду к M1 и M2 макрофагам на 1 и на 3 сутки дифференцировки для оценки его влияния на поляризацию. Активацию непосредственно C3a-макрофагов индуцировали добавлением C3a на 1 и 3 сутки. К «острым» C3a-макрофагам C3a добавляли за 24 часа до конца инкубации.



Методом ПЦР в реальном времени мы показали, что в присутствии в среде С3а, в М2 клетках экспрессия маркерных генов *CD206*, *CCL22*, *IL1Ra* и *PPAR $\gamma$*  снижается на уровне мРНК по сравнению с контрольными М2 макрофагами. В то же время повышается экспрессия генов *TNF $\alpha$*  и *IL-6*, что не характерно для М2 активированных клеток. В случае покоящихся макрофагов, активированных *LPS* и дифференцированных в присутствии *С3а*, обнаружено уменьшение экспрессии гена *TLR4*. Однако такой эффект не наблюдался в клетках М1, активированных *IFN $\gamma$*  или *IFN $\gamma$ +LPS*.

Анализ экспрессии на уровне белков осуществлялся с помощью вестерн-блота и проточной цитофлуориметрии. По результатам вестерн-блота содержание белков *CD206* в М2 макрофагах, дифференцированных в присутствии *С3а*, меньше, чем в контрольных макрофагах. Данные проточной цитометрии также показали снижение уровня поверхностных маркеров М2 макрофагов *CD206* и *CD36*.

Ранее в нашей лаборатории было установлено, что белок Аро А1 синтезируется в моноцитах и макрофагах человека. Измерение количества Аро А1 с помощью проточной цитометрии проводили на активированных М1, М2, *С3а*-макрофагах. Статистически значимых различий по уровню Аро А1 в М1 и М2 по сравнению с контрольными покоящимися макрофагами обнаружено не было. Однако показано, что уровень Аро А1 повышается в *С3а*-макрофагах. С целью выяснить, является ли данный эффект время-зависимым, инкубацию с *С3а* проводили в течение 5 суток (*С3а*-макрофаги) и 1 суток («острые» *С3а*-макрофаги). Измерение показало, что увеличение уровня Аро А1 в *С3а*-макрофагах носит время-зависимый характер.

Таким образом, *С3а* анафилактиксин подавляет поляризацию макрофагов по типу М2, о чем свидетельствует снижение экспрессии маркеров данного фенотипа. Однако *С3а* не оказывает значительного влияния на поляризацию М1. В то же время экспрессия гена *TLR4* снижается в покоящихся макрофагах, стимулированных *LPS*, при инкубации в среде с *С3а*. Исследование также показало, что уровень Аро А1 на поверхности *С3а*-макрофагов достоверно выше, чем на покоящихся макрофагах, при этом количество Аро А1 прямо пропорционально времени инкубации макрофагов в среде, содержащей *С3а*.

## Литература

1. Sica, A., Invernizzi, P., & Mantovani, A. (2014). Macrophage plasticity and polarization in liver homeostasis and pathology. *Hepatology* (Baltimore, Md), 59(5), 2034–2042.

2. Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaeili, S.A., Mardani, Bita Seifi, Asadollah Mohammadi, Jalil T. Afshari, Amirhossein Sahebkar (2018). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of Cellular Physiology*, 233(9), 6425–6440. doi:10.1002/jcp.26429
3. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews Immunology*. 2003;3(1):23–35.
4. Chawla, A., Nguyen, K. D., and Goh, Y. P., Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2011.
5. Mogilenko DA, Orlov SV, Trulioff AS, Ivanov AV, Nagumanov VK, Kudriavtsev IV, Shavva VS, Tanyanskiy DA, Perevozchikov AP (2012) Endogenous apolipoprotein A-I stabilizes ATP-binding cassette transporter A1 and modulates toll-like receptor 4 signaling in human macrophages. *FASEB J* 26:2019–2030.
6. Adam Zmysłowski, Arkadiusz Szterk. Current knowledge on the mechanism of atherosclerosis and pro-atherosclerotic properties of oxysterols. *Lipids in Health and Disease* (2017) 16:188.
7. Shashkin, P., Dragulev, B., & Ley, K. (2005). Macrophage Differentiation to Foam Cells. *Current Pharmaceutical Design*, 11(23), 3061–3072.
8. Speidl, W. S., Kastl, S. P., Huber, K., & Wojta, J. (2011). Complement in atherosclerosis: friend or foe? *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 9(3), 428–440.

## ПЕРВИЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ОПУХОЛЬ-АДРЕСУЮЩЕЙ ТЕРАПИИ ГЛИОМ\*

PRIMARY HUMAN GLIOMA CELL CULTURES AS A MODEL  
FOR TUMOR-TARGETED THERAPY

М. Д. Дмитриева<sup>1,2</sup>, М. А. Дымова<sup>1</sup>, А. А. Войтова<sup>1</sup>,  
А. А. Нуштаева<sup>1</sup>, О. А. Коваль<sup>1,2</sup>, С. В. Мишинов<sup>3</sup>, Е. В. Кулигина<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН*

<sup>2</sup> *Новосибирский государственный университет*

<sup>3</sup> *ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт  
травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна»*

M. D. Dmitrieva<sup>1,2</sup>, M. A. Dymova<sup>1</sup>, A. A. Voitova<sup>1</sup>, A. A. Nushtaeva<sup>1</sup>,  
O. A. Koval<sup>1,2</sup>, S. V. Mishinov<sup>3</sup>, E. V. Kuligina<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *ICBFM*

<sup>2</sup> *NSU*

<sup>3</sup> *NIITO*

### Аннотация

Опухоли головного мозга являются наиболее трудноизлечимыми типами онкологических заболеваний. Стандартные методы лечения и применяемые лекарственные препараты обладают ограниченной эффективностью, что обусловлено их недостаточной специфичностью. Таргетная терапия, основанная на применении опухоль-адресованных лигандов, обеспечивающих специфическое воздействие на опухоль, является одним из наиболее перспективных путей решения данной проблемы. Технология фагового дисплея позволяет отбирать тканеспецифические, в том числе опухоль-специфические молекулы, в частности опухоль-адресующие пептиды. Отобранные пептиды, обладающие высокой тропностью к клеткам опухоли, являются таргетными агентами и могут быть использованы для терапевтических и диагностических целей.

Целью данной работы является получение из фаговых пептидных библиотек пептидов, специфичных к клеткам глиобластомы человека U87 MG, и оценка тропности отобранных пептидов к клеткам первичных культур глиом человека.

© М. Д. Дмитриева, М. А. Дымова, А. А. Войтова, А. А. Нуштаева, О. А. Коваль, С. В. Мишинов, Е. В. Кулигина, 2019

\* Данная работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (Грант № 19-44-02006).

**Abstract**

Brain tumors are among the most incurable malignant neoplasms. Standard therapeutic treatment has low effectiveness due to its nonspecificity. One of the most promising way to solve this problem is tumor-targeted therapy based on usage of different tumor specific ligands providing direct impact on tumor tissue. Phage display technology allows to select tissue- or even organ-specific molecules, in particular tumor-specific peptides. Selected peptides with high affinity to tumor cells are considered as target agents for therapeutic and diagnostic needs.

The purpose of the present work is the selection of peptides, specific to U87 MG glioblastoma cells, from phage peptide libraries and the evaluation of displayed peptides affinity for human glioma primary culture cells.

Одним из самых трудноизлечимых типов злокачественных новообразований являются опухоли головного мозга, 81 % которых составляют глиомы. Стандартные методы лечения глиом обладают ограниченной эффективностью, увеличивающей продолжительность жизни пациентов в среднем на один год. Низкая эффективность применяемой терапии обусловлена инфильтративным характером роста опухоли, расположением в функционально значимых областях головного мозга, а также неспецифичностью применяемых методов лечения. Одним из возможных путей решения данной проблемы является таргетная терапия (ТТ), основанная на применении препаратов, специфически воздействующих на конкретные типы опухолей, что позволяет повысить эффективность лечения и минимизировать токсические эффекты в отношении здоровых тканей организма. Развитию ТТ способствует активное исследование молекулярного профиля опухолевых клеток, и все чаще в онкологических исследованиях в качестве модели опухоли *in vitro* выступают первичные культуры опухолевых клеток, полученные непосредственно из образца опухоли пациента. Наиболее точно воспроизводя молекулярный и генетический профиль опухоли, а также физиологию опухолевых клеток *in vivo*, первичные культуры позволяют прогнозировать ответ опухоли на терапию и подбирать комбинированное лечение для конкретного пациента. В настоящее время в качестве перспективных опухоль-адресующих агентов все чаще рассматривают короткие пептиды. Одним из способов получения опухоль-адресующих пептидов является скрининг комбинаторных фаговых пептидных библиотек, который проводят в условиях *in vitro* на культурах опухолевых клеток и *in vivo* на опухолевых моделях. Основными преимуществами пептидов являются высокий коэффициент проникновения в опухоль, низкая иммуногенность, а также высокая аффинность к клеткам-мишеням, что позволяет использовать такие пептиды в качестве средств доставки различных терапевтических препаратов.

Первичные культуры клеток глиом были получены из образцов опухолей пациентов Федерального центра нейрохирургии, г. Новосибирск. Для получения первичных культур клеток использовали метод механической дезагрегации ткани опухоли. Были получены первичные клеточные культуры астроцитомы AS2 и глиобластом MG1, MG2, MG3 и MG4. Проведена оценка морфологии клеток всех полученных культур, а также характеристика клеток по уровню таких молекулярных маркеров как GFAP, Ki-67, CD133 и CD44. Показано, что уровень GFAP в клетках первичных культур глиом снижается в ряду MG1, MG3>MG4, AS2>AS1>>MG2. Доля CD133-положительных клеток в образцах всех исследованных культур достоверно не детектировалась, в то время как доля CD44-положительных клеток варьировала от 27,3 % до 32,9 %.

При проведении исследований скрининг фаговых пептидных библиотек Ph.D.-12 и Ph.D.-7 был проведен на культуре клеток мультиформной глиобластомы человека U-87 MG *in vitro* и на опухоли U-87 MG в модели ксенографтов *in vivo*, соответственно. В результате отбора в системе *in vitro* был получен пептид SWTFGVQFALQH (26) (частота встречаемости 24,3 %); в системе *in vivo* было отобрано 2 пептида — HPSSGSA (92) и PVS NKMS (83) (частоты встречаемости 25,9 % и 22,2 %, соответственно).

Для оценки специфичности связывания бактериофагов, экспонирующих отобранные опухоль-адресующие пептиды, с клетками первичных культур глиом были выбраны культуры разной степени злокачественности: астроцитомы AS2 (3 класс злокачественности по классификации ВОЗ) и глиобластомы MG1 (4 класс злокачественности). Анализ специфичности связывания проводили методами флуоресцентной и конфокальной микроскопии. Методом флуоресцентной микроскопии было показано эффективное специфическое связывание бактериофагов, экспонирующих отобранные опухоль-адресующие пептиды, с клетками астроцитомы AS2 и глиобластомы MG1. Существенных различий в уровне связывания с клетками бактериофагов, экспонирующих отобранные опухоль-адресующие пептиды, обнаружено не было. При этом, исходя из данных конфокальной микроскопии, пептид SWTFGVQFALQH (26), обеспечивал интернализацию фаговых частиц в клетки астроцитомы AS2, но не в клетки глиобластомы MG1. Опухоль-адресующие пептиды HPSSGSA (92) и PVS NKMS (83) обеспечивали интернализацию бактериофагов как в клетки астроцитомы AS2, так и в клетки глиобластомы MG1.

Таким образом, опухоль-адресующие пептиды, полученные из фаговых пептидных библиотек, могут быть использованы для адресной доставки как диагностических (пептиды 26, 83 и 92), так и терапевтических (пептиды 83 и 92) молекул к клеткам опухолей головного мозга человека.

**ВКЛАД ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ БЕЛКОВ АКТ (P473) И ЦИКЛИНА D1 В МЕХАНИЗМЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АДЬЮВАНТНОЙ ГОРМОНОТЕРАПИИ ТАМОКСИФЕНОМ У БОЛЬНЫХ ЭСТРОГЕН-ПОЗИТИВНЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ \***

IMPACT OF INTRACELLULAR PROTEINS AKT (P473) AND CYCLIN D1 ON THE TAMOXIFEN RESISTANCE IN ESTROGEN-POSITIVE BREAST CANCER PATIENTS

Т. А. Дронова<sup>1,2</sup>, Н. Н. Бабышкина<sup>1,2</sup>, С. В. Паталяк<sup>1</sup>, Н. В. Чердынцева<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>НИИ онкологии Томского НИМЦ, Томск, Россия

<sup>2</sup>НИ Томский государственный университет, Томск, Россия

T. A. Dronova<sup>1,2</sup>, N. N. Babyshkina<sup>1,2</sup>, S. V. Patalyak<sup>1</sup>, N. V. Cherdyntseva<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Cancer Research Institute,

Tomsk National Research Medical Center, Tomsk, Russia

<sup>2</sup>National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia

E-mail: tanyadronova@mail.ru

**Аннотация**

В настоящее время поиск дополнительных молекулярно-генетических маркеров эффективности адьювантной гормонотерапии является важной клинической задачей. Целью исследования явилось изучение взаимосвязи экспрессии mRNA и белковых продуктов генов *AKT1*, *CCND1*, а также их функционально значимых полиморфных локусов *AKT1* (rs1130233) и *CCND1* (rs678653) с прогнозом и эффективностью лечения тамоксифеном у больных эстроген-позитивным раком молочной железы (РМЖ). В ходе работы выявлено, что наиболее информативными маркерами, сопряженными с резистентностью к проводимой терапии могут выступать белки Akt(p473) и циклин D1.

**Abstract**

The search for additional molecular markers of adjuvant hormone therapy efficacy is an important clinical challenge. The aim of the study was to examine the relationship

---

© Т. А. Дронова, Н. Н. Бабышкина, С. В. Паталяк, Н. В. Чердынцева, 2019

\* Исследования выполнены при поддержке гранта РФФИ № 17-29-06037 офи\_м «Геномные механизмы регуляции опухолевой прогрессии рака молочной железы в условиях лекарственной терапии».

between the protein and gene expression of *AKT1*, *CCND1* as well as their polymorphisms rs1130233 and rs678653 on the tamoxifen resistance and prognosis in estrogen-positive breast cancer patients. Our data suggest that Akt (p473) and cyclin D1 protein expression level can be potential markers of tamoxifen resistance.

### Актуальность

На сегодняшний день выявление дополнительных прогностических параметров, позволяющих выяснить причины различного поведения опухолей в ответ на проводимую гормональную терапию тамоксифеном, по-прежнему остается актуальной задачей. В качестве одного из потенциальных механизмов формирования лекарственной резистентности рассматривается комплексное взаимодействие между рецепторами эстрогенов и центральными сигнальными каскадами, к которым относится PI3K/Akt/mTOR-сигнальный путь. Ключевыми компонентами PI3K/Akt/mTOR каскада являются фосфорилированная протеинкиназа В — Akt (p473) и циклин D1, активация которых сопряжена с негативным прогнозом течения рака молочной железы. Тем не менее, системный подход к оценке этих факторов в развитии устойчивости к гормональной терапии отсутствует.

**Цель:** оценить связь генной и белковой экспрессии внутриклеточных белков Akt(p473) и циклина D1, а также полиморфных вариантов их генов *AKT1* (rs1130233) и *CCND1* (rs678653) с прогнозом и эффективностью адъювантной гормонотерапии тамоксифеном у больных с эстроген-позитивным РМЖ.

### Материалы и методы

В исследование включена 141 пациентка с впервые диагностированным эстроген-позитивным РМЖ. Все больные проходили лечение в отделении общей онкологии НИИ онкологии Томского НИМЦ с 2002 по 2016гг. В качестве адъювантной гормонотерапии пациентки принимали тамоксифен в течение 5 лет (20мг\сутки). Эффективность гормонотерапии оценивалась на основе отдаленных результатов лечения, согласно которым было сформировано две группы исследования. Первая — тамоксифен-чувствительная (больные без признаков прогрессирования на фоне терапии тамоксифеном), вторая — тамоксифен-резистентная (пациентки, имеющие отдаленные метастазы, либо рецидив РМЖ на фоне приема тамоксифена). Уровень экспрессии генов *AKT1*, *CCND1* и их полиморфные варианты *AKT1* (rs1130233) и *CCND1* (rs678653) изучены с помощью ПЦР в режиме реального времени. Уровень экспрессии белков Akt(p473) и циклина D1 оценен иммуногистохимически. Безрецидивная выживаемость проанализирована с помощью

кривых Каплана — Майера и теста логарифма рангов. Для анализа наличия или отсутствия связи между исследуемыми маркерами использовали корреляционный анализ Спирмена. Статистическую обработку проводили с помощью программы “STATISTICA 7.0”. Обсуждались результаты с достоверностью различий при  $p < 0,05$ .

### Результаты

Результаты генотипирования исследуемых полиморфных локусов генов *AKT1* (rs1130233) и *CCND1* (rs678653) в зависимости от эффективности гормональной терапии не выявили статистически значимых различий в исследуемых группах ( $p > 0,05$ ). Выявлена тенденция к увеличению уровня генной экспрессии *AKT1* в тамоксифен-чувствительной группе больных по сравнению с тамоксифен-резистентной группой ( $5,29 \pm 2,31$  и  $0,79 \pm 0,36$  соответственно;  $p = 0,089$ ). Изучение особенностей экспрессии внутриклеточных белков Akt(p473) и циклина D1 в опухолевой ткани показало, что риск развития прогрессирования заболевания на фоне проведения гормонотерапии достоверно выше среди пациенток с позитивной экспрессией Akt(p473) ( $p = 0,031$ ). Кроме того, выявлена ассоциация высокого уровня экспрессии циклина D1 с резистентностью к тамоксифену, однако значения не достигали статистической значимости ( $p = 0,059$ ).

Для оценки взаимосвязи белковой и генной экспрессии, а также полиморфных локусов исследуемых факторов с эффективностью гормональной терапии у больных раком молочной железы использован корреляционный анализ Спирмена. Установлена положительная корреляционная зависимость между уровнем экспрессии генов *CCND1* и *AKT1* ( $r = 0,258$ ;  $p = 0,047$ ).

Анализ безрецидивной выживаемости у больных эстроген-позитивным раком молочной железы показал, что высокий уровень экспрессии внутриклеточного белка циклина D1 сопряжен с низкими показателями выживаемости ( $\log \text{rank } p = 0,014$ ).

### Выводы

Высокий уровень экспрессии ключевых компонентов PI3K/Akt/mTOR каскада белков Akt(p473) и циклина D1 сопряжен с резистентностью к тамоксифену и неблагоприятным прогнозом у больных с эстроген-позитивным РМЖ.



**ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ЭКСПРЕССИИ ЦИТОКИНОВ МОЗГА  
КРЫС К ВВЕДЕНИЮ ДЕКСАМЕТАЗОНА  
В РАННЕМ ОНТОГЕНЕЗЕ \***

SENSITIVITY OF CYTOKINE EXPRESSION TO DEXAMETHASONE  
TREATMENT IN THE NEONATAL RAT BRAIN

К. В. Егорова, Е. В. Сухарева, Т. С. Калинина

*Федеральный исследовательский центр  
Институт цитологии и генетики СО РАН  
Новосибирский государственный  
научно-исследовательский университет*

K. V. Egorova, E. V. Sukhareva, T. S. Kalinina

*Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia  
Novosibirsk State University, Russia*

**Аннотация**

В работе определена динамика изменения уровней мРНК про- и противовоспалительных цитокинов в неонатальном мозге крыс при введении терапевтической дозы синтетического глюкокортикоида — дексаметазона.

**Abstract**

The dynamics of the pro- and anti-inflammatory cytokines mRNA levels in the neonatal rat brain after the administration of a therapeutic dose of a synthetic glucocorticoid — dexamethasone was determined.

Неблагоприятные условия протекания раннего онтогенеза, прежде всего связанные со стрессом, приводят к выраженным отклонениям психофизиологического статуса головного мозга во взрослом состоянии, вплоть до развития нейропатологий, включая болезнь Альцгеймера, Паркинсона, шизофрению и аутизм. Как становится понятным в последнее время, важную роль в программировании гормонами стресса, глюкокортикоидами, нейрохимического профиля взрослого мозга, могут иметь нарушения нейроиммунных взаимодействий в перинатальном развивающемся мозге. Доказательством

---

© К. В. Егорова, Е. В. Сухарева, Т. С. Калинина, 2019

\* Исследование выполнено при поддержке РФФИ 19-015-00525.

таких влияний являются данные о перманентном изменении стресс-реактивности, восприимчивости к инфекциям, а также росту склонности к нейрорепсихиатрическим патологиям после стимуляции микроглии в раннем онтогенезе (Bilbo et al., 2012; 2018; Walker, Spencer, 2018).

С целью выяснения влияния гормонов стресса, глюкокортикоидов, на уровни мРНК цитокинов, уровень которых считается недостаточным для развития иммунного ответа в перинатальный период развития, в работе определяли экспрессию генов про-воспалительных цитокинов: интерлейкина-1 бета (*IL1b*), интерлейкина 6 (*IL6*), фактора некроза опухоли-альфа (*TNFa*) и анти-воспалительных: интерлейкина 4 (*IL4*), интерлейкина 10 (*IL10*) и трансформирующего ростового фактора бета (*TGFb*). Синтетический глюкокортикоид дексаметазон в дозе 0,2 мг/кг вводили подкожно крысам линии Вистар на 3 сутки жизни. Контролем служили крысята тех же пометов без воздействия и получавшие инъекцию физиологического раствора. Уровни экспрессии генов анализировали методом ПЦР в реальном времени с использованием наборов Taq-man Expression Assay® через 30–60–120–240–360 минут после введения гормона в образцах стволовой части мозга крысят. Уровни экспрессии определяли по методу  $\Delta\Delta C_t$  относительно экспрессии гена домашнего хозяйства — бета-актина.

Установлено, что уже на 3-й день жизни крысят уровни мРНК про-воспалительных генов — *IL1b* и *TNFa* реагировали достоверным изменением своей экспрессии через час после гормонального воздействия. Для *IL1b* влияние гормона  $F(1, 87)=61.7$ ,  $p<0.001$ ; влияние времени  $F(5, 87)=5.27$ ,  $p<0.001$ ; взаимодействие факторов  $F(5, 87)=7.8$ ,  $p<0.001$ ; для *TNFa* влияние гормона  $F(1, 80)=38.73$ ,  $p<0.001$ ; влияние времени  $F(5, 87)=2.27$ ,  $p<0.002$ ; взаимодействие факторов  $F(5, 87)=4.97$ ,  $p<0.001$ . Достоверное изменение уровней мРНК противовоспалительных цитокинов развивалось лишь к 4 часу после введения дексаметазона: для *IL10* влияние гормона  $F(1, 69)=7.52$ ,  $p<0.01$  и для *TGFb*  $F(1, 80)=5.01$ ,  $p<0.03$ , соответственно.

Направление изменения экспрессии исследуемых генов цитокинов свидетельствует о возможном ослаблении развития нейроиммунных взаимодействий в критический период развития мозга, что, в совокупности с обнаруженным нами ранее усилением апоптоза нейронов неонатального мозга под действием дексаметазона (Lanshakov et al., 2016), способно привести к нарушению морфофункциональной структуры формирующегося мозга и явиться причиной долговременного изменения его функционирования.

### Литература

1. Bilbo S. D., Smith S. H., Schwarz J. M. A lifespan approach to neuroinflammatory and cognitive disorders: a critical role for glia // *Neuroimmune Pharmacology*. 2012. Vol. 7. P. 24–41.
2. Bilbo S. D., Block C. L., Bolton J. L., Hanamsagar R., Tran P. K. Beyond infection Maternal immune activation by environmental factors, microglial development, and relevance for autism spectrum disorders // *Experimental Neurology*. 2018. Vol. 299. P. 241–251.
3. Lanshakov D. A., Sukhareva E. V., Kalinina T. S., Dygalo N. N. Dexamethasone-induced acute excitotoxic cell death in the developing brain // *Neurobiology of Disease*. 2016. Vol. 91. P. 1–9.
4. Walker D. J., Spencer K. A. Glucocorticoid programming of neuroimmune function // *General and Comparative Endocrinology*. 2018. Vol. 256. P 80–88.

**ЭФФЕКТЫ ЦЕНТРАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ДОФАМИНОВОГО  
НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА (CDNF)  
НА ПОВЕДЕНИЕ И ЭКСПРЕССИЮ КЛЮЧЕВЫХ ГЕНОВ  
СЕРОТОНИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ  
МОЗГА МЫШЕЙ C57BL/6J\***

EFFECT OF CEREBRAL DOPAMINE NEUROTROPHIC FACTOR (CDNF)  
ON THE BEHAVIOR AND EXPRESSION OF THE KEY GENES  
OF THE BRAIN SEROTONIN SYSTEM IN C57BL/6J MICE

Д. В. Еремин, Н. В. Хоцкин, Т. В. Ильчибаева, А. С. Цыбко

*Институт цитологии и генетики СО РАН*

D. V. Eremin, N. V. Khotskin, T. V. Ilchibaeva, A. S. Tsybko

*The Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Russia*

**Аннотация**

Эффекты дофаминавого нейтрофического фактора мозга (CDNF) не ограничиваются восстановлением и поддержанием поврежденных дофаминергических нейронов. В данной работе показано, что CDFN оказывает влияние на поведение, а также на серотонинергическую систему мозга мышей.

**Abstract**

The effects of dopamine neurotrophic brain factor (CDNF) are not limited by repairing and maintaining of damaged dopaminergic neurons. In present study, it was shown the influence of CDFN on the behavior as well as serotonergic system of the brain of mice.

CDNF открыт сравнительно недавно, и его участие в регуляции поведения по-прежнему плохо изучено. Совершенно неизвестно оказывает ли CDFN какой-либо эффект на 5-HT систему мозга.

Целью данного исследования было изучение поведения, когнитивных способностей и экспрессии ключевых генов серотонинергической системы мозга у мышей C57Bl6/J после введения рекомбинантного человеческого CDFN (10 µg i.c.v.). Двигательная активность, потребление воды и пищи, время сна и бодрствования оценивались автоматически в условиях домаш-

ней клетки с помощью установки PhenoMaster. Обучение и память изучались с помощью теста OperantWall. Экспрессию генов кодирующих триптофангидроксилазу 2 (*Tph2*), рецепторы серотонина 1a, 2a, 3 и 7 подтипов (*Htr1a*, *Htr2a*, *Htr3*, *Htr7*), транспортер серотонина (*Slc6a4*) и моноаминоксидаза а (*Maoa*) определяли методом количественного ОТ-ПЦР в реальном времени в среднем мозге, гиппокампе и фронтальной коре.

Нами обнаружено, что скорость передвижения значительно повышается в течение первых трех дней у мышей, получивших инъекцию CDNF. Мы наблюдали, что потребление пищи в первый день у этих животных ниже. Однако, на второй день показано, наоборот, повышенное потребление пищи; позже данный показатель стабилизировался. Похожие паттерны наблюдались и в потреблении воды. У животных были выявлены сдвиги в циклах сна/бодрствования, проявляющиеся в более продолжительном сне в темную фазу в течение первых трех дней после инъекции CDNF. OperantWall тест показал, что мыши, получившие CDNF, справлялись с заданием быстрее, чем контрольные животные.

Уменьшение уровня экспрессии генов *Tph2* и *Htr2a* показано в среднем мозге и гиппокампе, соответственно, у экспериментальной группы животных.

Таким образом, показано, что введение рекомбинантного белка CDNF может влиять на поведение и серотонинергическую систему мозга

**КАТАЛИТИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА С НУКЛЕАЗНЫМИ  
АКТИВНОСТЯМИ КАК МАРКЕР НАРУШЕНИЙ  
В ИММУННОЙ СИСТЕМЕ БОЛЬНЫХ ШИЗОФРЕНИЕЙ\***

CATALYTIC ANTIBODIES WITH NUCLEASE ACTIVITIES  
AS A MARKER OF IMPAIRMENT IN THE IMMUNE SYSTEM  
OF PATIENTS WITH SCHIZOPHRENIA

Е. А. Ермаков, В. Н. Бунева, Г. А. Невинский

*ФГАОУВО Новосибирский национальный исследовательский  
государственный университет, Новосибирск  
ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины  
СО РАН, Новосибирск*

E. A. Ermakov, V. N. Buneva, G. A. Nevinsky

*Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia  
Institute of Chemical Biology  
and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia*

E-mail: evgeny\_ermakov@mail.ru

**Аннотация**

В настоящее время обнаруживается все больше доказательств важной роли иммунных нарушений в этиопатогенезе шизофрении. В данной работе показано, что поликлональные IgG из сыворотки крови больных шизофренией обладают нуклеазной активностью и способны гидролизовать ДНК и РНК, в том числе и микроРНК. Полученные данные создают основу для разработки критериев стратификации больных шизофренией на основе иммунных биомаркеров.

**Annotation**

There is a growing body of evidence of important role of immune impairment in the etiopathogenesis of schizophrenia. In this work, it was shown that polyclonal IgG from the blood serum of patients with schizophrenia possesses nuclease activity and are able to hydrolyze DNA and RNA including miRNAs. These findings provide the basis for developing criteria for segregation of patients with schizophrenia based on immune biomarkers.

Шизофрения, как известно, связана с дисбалансом в нейротрансмиттерных системах головного мозга. Однако патологические процессы, приводящие к этому, до сих пор остаются малоизученными. Накапливается все больше данных о важной роли иммунных механизмов в патогенезе шизофрении [1]. Современные данные указывают на наличие различных иммунологических нарушений, затрагивающих как врожденный, так приобретенный иммунитет при шизофрении [2]. В регуляции иммунных процессов участвуют различные микроРНК. Эти короткие некодирующие молекулы РНК регулируют экспрессию генов путем РНК-интерференции. При шизофрении обнаружена дисрегуляция экспрессии различных микроРНК, в том числе и регулирующих экспрессию генов иммунной системы [3]. Ранее в работах нашей лаборатории показано, что иммунологические нарушения приводят к образованию каталитических антител, гидролизующих различные антигены, в том числе нуклеиновые кислоты [4]. В данной работе изучены нуклеазные активности поликлональных антител при шизофрении.

На первом этапе исследования в сыворотке крови больных шизофренией методом ELISA исследован титр антител к нативной и денатурированной ДНК. Показано значимое ( $p < 0,05$ ) увеличение титра антител к ДНК у больных шизофренией, однако в целом, титр АТ к ДНК соответствовал референсным значениям. На следующем этапе из сыворотки крови методом аффинной хроматографии выделены препараты поликлональных IgG. Для доказательства их гомогенности использовался SDS-PAGE и MALDI-TOF MS. По результатам MALDI-TOF MS продемонстрирована гомогенность исследуемых препаратов IgG, а также обнаружены легкие цепи IgG с уменьшенной молекулярной массой (17,3 кДа), такие же, как и при системной красной волчанке. Эти данные могут указывать на наличие нарушений процесса синтеза антител плазматическими клетками, а также процесса созревания В-клеток при шизофрении.

В дальнейшем изучена нуклеазная активность поликлональных препаратов IgG при шизофрении. Для регистрации каталитической активности IgG использовали спектрофотометрические методы, а также электрофорез в агарозном и полиакриламидном геле. Используя модельные субстраты (ДНК-плазида pBluescript, cCMP, polyC, polyA, дрожжевая РНК) для нуклеаз, показали, что препараты IgG обладают ДНК- и РНК-гидролизующими активностями. При помощи общепринятых жестких критериев доказано, что каталитическую активность проявляют непосредственно антитела. Особенно интересна обнаруженная способность каталитических антител гидролизовать нейроспецифические микроРНК (miR-137, miR-9-5p, miR-219a-2-3p, miR-219a-5p). МикроРНК-гидролизующую активность антител изучали с использованием флуоресцентно-меченых микроРНК, а ре-

зультаты регистрировали на лазерном сканере Turphoon FLA 9500. Оказалось, что все препараты IgG больных шизофренией обладают микроРНК-гидролизующей активностью, в то время как IgG здоровых доноров проявляли слабую активность. Некоторые препараты IgG проявляли сиквенс-специфичность, но, в целом, каталитические антитела более специфичны к вторичной структуре молекулы микроРНК. По результатам моделирования сайтов гидролиза на 2D и 3D структурах молекулы микроРНК, установлено, что основные участки расщепления расположены в петлях микроРНК или двупочечных участках молекулы. Важно отметить, что уровень гидролиза микроРНК антителами больных шизофренией коррелировал с клиническими параметрами заболевания. Показана отрицательная корреляция уровня гидролиза микроРНК с длительностью заболевания, а также положительная корреляция уровня активности IgG с баллами по подшкале общих симптомов и суммарным значением по шкале PANSS.

Полученные данные дополняют имеющиеся данные об иммунологических нарушениях и создают базу для разработки критериев стратификации больных шизофренией на основе иммунологических маркеров. Каталитические IgG могут являться перспективными биомаркерами, хотя их использование с этой целью имеет ряд ограничений, связанных со сложностью выделения и анализа. В целом, обнаруженная нуклеазная активность каталитических антител, с одной стороны, может играть защитную роль, поскольку удаление нуклеиновых кислот из кровотока снижает активацию TLR, минимизирует иммунный ответ и воспаление. С другой стороны, каталитические антитела могут влиять на экспрессию микроРНК в крови. Известно, что микроРНК в кровотоке находятся преимущественно в составе экзосом и комплексов с белками. Антитела могут ускорять удаление из кровотока транспортных форм микроРНК, тем самым приводя к дисбалансу в экспрессии микроРНК. Однако эта гипотеза требует дальнейшего изучения и доказательств.

## Литература

1. Pape K., Tamouza R., Leboyer M., Zipp F. Immunoneuropsychiatry novel perspectives on brain disorders // *Nature Reviews Neurology*. 2019. P. 1.
2. Müller N. Inflammation in schizophrenia: pathogenetic aspects and therapeutic considerations // *Schizophrenia bulletin*. 2018. V. 44. №. 5. P. 973–982.
3. Beveridge N. J., Cairns M. J. MicroRNA dysregulation in schizophrenia // *Neurobiology of disease*. 2012. V. 46. №. 2. P. 263–271.
4. Nevinsky G. A., Buneva V. N. Human catalytic RNA- and DNA-hydrolyzing antibodies // *Journal of immunological methods*. 2002. V. 269. №. 1–2. P. 235–249.



**АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ АНАЛОГА КОЛЬЦЕВОЙ РНК SIN3A  
В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА \***ANALYSIS OF CIRCULAR RNA SIN3A ANALOG EXPRESSION  
IN HUMAN CELLS

М. А. Журавина, А. В. Савельева, А. А. Нуштаева,  
А. А. Немудрая, Ю. А. Филиппова, Г. А. Степанов, Д. В. Семенов

*ФГБУН Институт химической биологии  
и фундаментальной медицины СО РАН*

M. A. Zhuravina, A. V. Savelyeva, A. A. Nushtaeva,  
A. A. Nemudraya, J. A. Filippova, G. A. Stepanov, D. V. Semenov

*IHBFM SB RAS, Russia*

E-mail: semenov@niboch.nsc.ru

**Аннотация**

Транскрипционный фактор SIN3A участвует в регуляции жизнеспособности и миграции клеток человека. При трансфекции клеток MCF-7, A549 и HEK-293 вектором pcDNA-SIN3A происходит экспрессия аналога кольцевой РНК *SIN3A* в этих клетках, что приводит к снижению жизнеспособности клеток MCF-7 и HEK-293 и миграции клеток A549 в культуре.

**Abstract**

The transcription factor SIN3A is involved in the regulation of human cell viability and migration. Transfection of MCF-7, A549, and HEK-293 cells with pcDNA-SIN3A vector results in the expression of the SIN3A circular RNA analog in these cells, which leads to a decrease of MCF-7 and HEK-293 cells viability and A549 cells migration in culture.

Кольцевые РНК (кцРНК) — это полирибонуклеотиды, имеющие замкнутую структуру сахара-фосфатного остова. КцРНК образуются в результате обратного сплайсинга, регулируемого обращенными повторами и РНК-связывающими белками. Для индивидуальных кцРНК обнаружены такие био-

---

© М. А. Журавина, А. В. Савельева, А. А. Нуштаева, А. А. Немудрая, Ю. А. Филиппова, Г. А. Степанов, Д. В. Семенов, 2019

\* Работа поддержана проектом базового бюджетного финансирования ПФНИ ГАН 2013-2020 № АААА-А17-117020210024-8.

логические функции, как связывание микроРНК и регуляция уровня трансляции [1]. Известно, что уровень биосинтеза кцРНК может изменяться при развитии онкологических заболеваний человека. Найдены механизмы, за счет которых кцРНК участвуют в таких процессах, как онкотрансформация клеток и метастазирование. Таким образом, кцРНК являются перспективными объектами для разработки новых подходов диагностики и терапии социально значимых заболеваний человека [2].

Транскрипционный фактор SIN3A является ключевым звеном белкового комплекса, регулирующего экспрессию генов за счет изменения степени компактизации хроматина. Экспрессия гена *SIN3A* понижается при развитии онкологических заболеваний человека. Снижение экспрессии гена *SIN3A* способствует миграции клеток аденокарциномы легкого человека A549 в культуре. Повышение экспрессии гена *SIN3A* снижает жизнеспособность клеток A549 [3]. Несмотря на то, что накоплено достаточно данных о биологических функциях транскрипционного фактора SIN3A, биологические функции кцРНК *SIN3A* не установлены.

Одним из основных подходов к изучению биологических функций РНК является анализ влияния экспрессии их аналогов на активацию или подавление ключевых процессов в клетках [4]. Для этого в данной работе использован плазмидный вектор pсDNA-SIN3A, структура которого содержит экзон кцРНК *SIN3A*, фланкированные протяженными обращенными повторами интронов гена *Laccase2*. Данные повторы были выбраны, так как они способствуют образованию кцРНК *Laccase2* в клетках головного мозга *Drosophila melanogaster* [4].

Проведена трансфекция вектором pсDNA-SIN3A клеток аденокарциномы легкого A549, аденокарциномы молочной железы MCF-7 и эпителиоцитов почки человека НЕК-293. Установлено, что трансфекция вектором pсDNA-SIN3A приводит к экспрессии аналога кцРНК *SIN3A* в клетках исследованных линий. Определена первичная структура экспрессируемых аналогов кцРНК (рис. 1).

Для того, чтобы подтвердить, что экспрессируемые аналоги кцРНК *SIN3A* имеют замкнутую структуру сахаро-фосфатного остова, был проведен гидролиз РНКзой R суммарной РНК клеток A549, MCF-7 и НЕК-293. Рибонуклеаза R обладает 3'-5'-экзорибонуклеазной активностью и гидролизует линейные транскрипты. Аналоги кцРНК *SIN3A* были устойчивы к гидролизу РНКзой R (рис. 2).

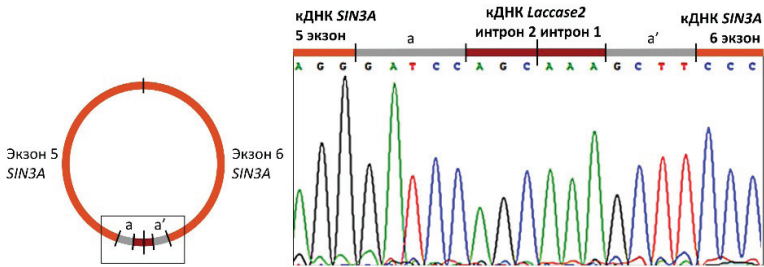


Рис. 1. Фрагмент нуклеотидной последовательности аналога кцРНК *SIN3A*. Представленный фрагмент содержит последовательности, соответствующие интронам пре-мРНК *Laccase2* и транскрипту полилинкера вектора *pcDNA-SIN3A* (a, a').

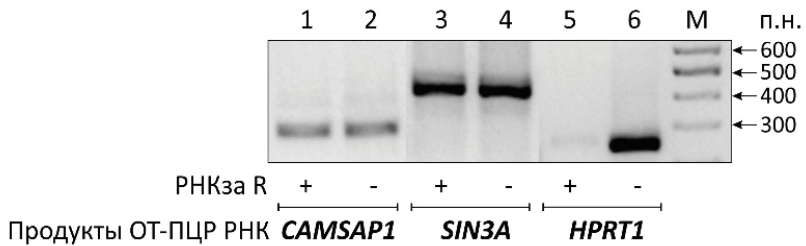


Рис. 2. Электрофорез продуктов ОТ-ПЦР кцРНК *CAMSAP1*, *SIN3A* и линейной РНК *HPRT1* клеток, гидролизованных РНКазой R (РНКза R+) (1,3,5) и контрольных РНК клеток (РНК за R-) (2,4,6). М — маркер молекулярной массы ДНК

С помощью МТТ-теста установлено, что экспрессия аналога кцРНК *SIN3A* снижает жизнеспособность клеток MCF-7 и HEK-293 в культуре. Транфекция вектором *pcDNA-Laccase2*, структура которого содержит только обращенные повторы интронов пре-мРНК *Laccase2*, также достоверно снижает МТТ-индекс клеток MCF-7, HEK-293 (рис. 3, а) и A549 (данные не представлены). С помощью метода зарастания царапины (scratch assay) установлено, что трансфекция клеток A549 векторами *pcDNA-SIN3A* и *pcDNA-Laccase2* подавляет миграцию клеток в культуре (рис. 3, б).

Для того, чтобы описать молекулярные механизмы, которые лежат в основе изменения жизнеспособности и миграции клеток человека в культуре

был проведен ОТ-ПЦР-анализ уровней индикаторных мРНК в режиме реального времени. В качестве индикаторных были выбраны мРНК, уровень которых регулируется транскрипционным фактором SIN3A. Установлено, что экспрессия аналога кцРНК *SIN3A* приводит к понижению уровня мРНК *SIN3A* в клетках MCF-7; понижению уровня мРНК *MYC* и *MDM2* в клетках A549; повышению уровня мРНК *SIN3A*, *MDM2* и *STAT3* и понижению уровня мРНК *MYC* в клетках HEK-293 (данные не представлены).

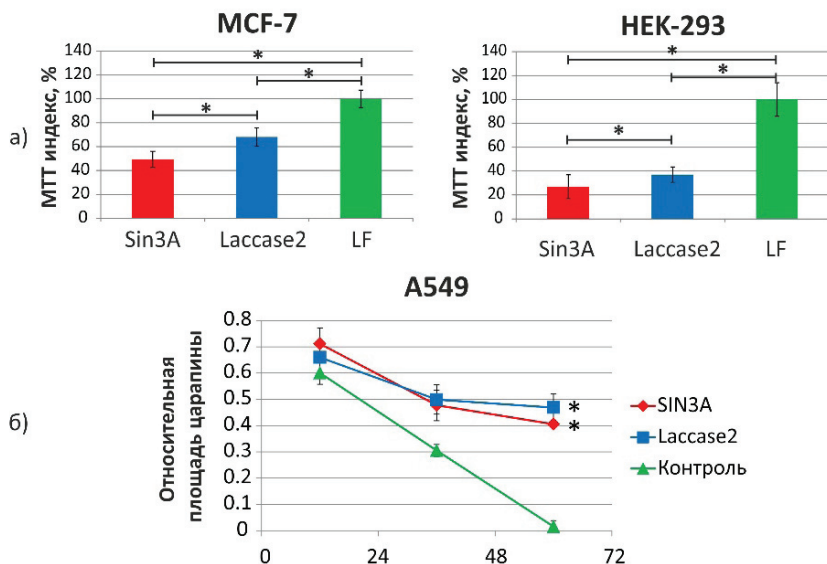


Рис. 3. Анализ влияния экспрессии аналога кцРНК *SIN3A* на жизнеспособность клеток MCF-7 и HEK-293 и миграцию клеток A549: а) — МТТ индекс клеток MCF-7 и HEK-293, трансфицированных векторами рсDNA3.1-SIN3A (SIN3A), рсDNA3.1-Laccase2 (Laccase2) и инкубированных в среде с липофектамином (LF); б) — график зависимости относительной площади царапины, рассчитанной с помощью программы TScratch, от времени инкубации ( $p_{cr} < 0.05$ ).

Полученные данные позволяют заключить, что экспрессия аналога кцРНК *SIN3A* может способствовать снижению метаболической активности и пролиферации клеток A549 и HEK-293 в культуре за счет снижения экспрессии гена *MYC*. Также экспрессия аналога может активировать апоптоз за счет стимуляции интерферонового ответа, в котором участвует сигнальный белок *STAT3*.

### Литература

- 1) Cortes-Lopez M., Miura P. Emerging Functions of Circular RNAs // The Yale journal of biology and medicine. 2016. V. 89 № 4. С. 527–537.
- 2) Zhang Z., Xie Q., He D., Ling Y., Li Y., Li J., Zhang H. Circular RNA: new star, new hope in cancer // BMC Cancer. 2018. V. 18. №. 834. С. 1–10.
- 3) Das T. K., Sangodkar J., Negre N., Narla G., Cagan R. L. Sin3a acts through a multi-gene module to regulate invasion in Drosophila and human tumors // Oncogene. 2013. V. 32. №. 26. С. 3184–3197.
- 4) Kramer M. C., Liang D., Tatomer D. C., Gold B., March Z. M., Cherry S., Wilusz J. E. Combinatorial control of Drosophila circular RNA expression by intronic repeats, hnRNPs, and SR proteins // Genes and Development. 2015. V. 29. № 20. С. 2168–2182.

**ИЗУЧЕНИЕ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ШТАММОВ  
*LISTERIA MONOCYTOGENES*, ПРИНАДЛЕЖАЩИХ К РАЗНЫМ  
КЛОНАЛЬНЫМ КОМПЛЕКСАМ И ЦИРКУЛИРОВАВШИХ  
НА ТЕРРИТОРИИ СССР И РФ В ПЕРИОД С 1947 ПО 2008 ГОД**

ANTIBIOTIC RESISTANCE OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* STRAINS  
BELONGING TO DIFFERENT CLONAL COMPLEXES  
AND CIRCULATING IN THE USSR AND THE RUSSIAN FEDERATION  
FROM 1947 TO 2008

П. А. Журилов<sup>1</sup>, Е. К. Псарева<sup>1</sup>, Е. А. Лискова<sup>1</sup>, И. Ю. Егорова<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Нижегородский научно-исследовательский ветеринарный институт —  
филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр  
вирусологии и микробиологии»

<sup>2</sup> ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр  
вирусологии и микробиологии»

P.A. Zhurilov<sup>1</sup>, E. K. Psareva<sup>1</sup>, E. A. Liskova<sup>1</sup>, I. Y. Egorova<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Nizhny Novgorod Research Veterinary Institute — Branch of Federal Research  
Center for Virology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia

<sup>2</sup> Branch of Federal Research Center for Virology and Microbiology,  
Volginsky, Russia

E-mail: Zhurilov95@bk.ru

**Аннотация**

При молекулярно-генетических исследованиях 46 штаммов *L. monocytogenes* по схеме мультилокусного сиквенс-типирования (MLST) определили принадлежность каждого штамма к тому или иному клональному комплексу (база данных Institute Pasteur). Так, к клональному комплексу CC7 принадлежало 59 % изучаемых штаммов листерий, комплексу CC124 11 % штаммов и комплексу CC177 9 % штаммов, соответственно. Остальные штаммы распределились по 8 различным клональным комплексам. В ходе работы также была определена антибиотикорезистентность изолятов *L. monocytogenes* к 7 группам антибиотических препаратов. Установлено, что 95.65 % изученных штаммов обладали природной устойчивостью к полимиксину Б, 31 % штаммов были резистентны к пенициллину, 16 % — к ампициллину. Единичную устойчивость у штаммов отмечали к тетрациклину, левомицетину и тилозину. Значительная часть

штаммов, принадлежащих к клональному комплексу CC7, характеризовалась устойчивостью к нескольким антибиотическим препаратам, таким как бензилпенициллин 18,5%, энрофлоксацин 14.81%, ампициллин 22%, тетрациклин 3.7%, тилозин 3.7%.

### Abstract

In molecular genetic studies of 46 strains of *L. monocytogenes* according to the scheme of multilocus sequence typing (MLST) determined the affiliation of each strain to a particular clonal complex (database Institute Pasteur). So, to clonal complex CC7 owned 59% of the studied strains of *Listeria*, complex CC124 11% of the strains and the complex CC177 9% of strains, respectively. The remaining strains were distributed over 8 different clonal complexes. The work also determined the antibiotic resistance of *L. monocytogenes* isolates to 7 groups of antibiotic drugs. It was found that 95.65% of the studied strains had natural resistance to polymyxin B, 31% of strains were resistant to penicillin, 16% — to ampicillin. The unit resistance of strains was observed to tetracycline, chloramphenicol and tylosin. A significant part of the strains belonging to clonal complex CC7, was characterized by resistance to multiple antibiotic drugs, such as benzylpenicillin of 18.5%, enrofloxacin 14.81%, ampicillin 22%, tetracycline 3.7%, tylosin 3.7%.

Проблема формирования лекарственной устойчивости характерна практически для всех известных бактериальных патогенов, в т.ч. и возбудителей пищевых инфекций человека и животных. Вспышки инфекций, которые вызваны *L. monocytogenes* регистрируют ежегодно. Так, 9 января 2018 года в ЮАР было зарегистрировано и лабораторно подтверждено 727 случаев заболевания среди людей, из которых 61 — завершился летальным исходом. 17 августа 2019 в Испании зарегистрирована вспышка листериоза, в которой пострадало 40 человек.

Появление в природе штаммов, обладающих антибиотикорезистентностью и измененными биологическими свойствами, способствует повышению смертности среди заболевших из-за постановки ложного диагноза и назначения неадекватного лечения. В связи с этим изучение и решение данной проблемы является одним из ведущих направлений здравоохранения и ветеринарии.

В ФГБНУ ФИЦВиМ функционирует «Государственная коллекция микроорганизмов, вызывающих опасные, особо опасные, в том числе зооантропонозные и не встречающиеся на территории страны болезни животных», в фондах которых осуществляется хранение свыше 600 штаммов листерий, преимущественно патогенные штаммы *L. monocytogenes*. Уникальность данной коллекции заключается в том, что сбор штаммов в нее осуществлялся с 1947 по 2013 годы, что в свою очередь позволяет изучать формирование лекарственной устойчивости у данного патогена в период до и после массового использования антибактериальных препаратов.

Таким образом, целью нашей работы было изучить антибиотикорезистентность штаммов *L. monocytogenes*, циркулировавших на территории бывшего СССР и РФ в период с 1947 по 2008 г.г. и принадлежащих к различным клональным комплексам.

В нашем исследовании мы изучили 46 штаммов *L. monocytogenes*, выделенных из различных источников: мелкого рогатого скота (22 %), крупного рогатого скота (20 %), человека (2 %). По географическому признаку штаммы определились в три основные группы: Центрального федерального округа РФ (33 %), восточной Европы (17 %) и Азии (13 %). Большая часть изучаемых штаммов (89 %) была выделена в период с 1950 по 1980 годы.

Первым этапом работы являлось определение клональной структуры популяции, для этого изоляты были охарактеризованы по схеме MLST, которая определяет принадлежность каждого штамма к тому или иному клональному комплексу (база данных Institute Pasteur). По результатам исследования к клональному комплексу CC7 принадлежало 59 % изучаемых штаммов листерий, комплексу CC124 11 % штаммов и комплексу CC177 9 % штаммов, соответственно. Остальные штаммы распределились по 8 различным клональным комплексам CC 18,101,1,18,81,21,89,307.

Далее проводили определение чувствительности штаммов *L. monocytogenes* к 10 антибактериальным препаратам с помощью диско-диффузионного метода, с использованием Набора индикаторных дисков для ветеринарных лабораторий производства ООО «НИЦФ» (г. Санкт-Петербург). В экспериментах использовали антибиотики из 7 групп: хлорамфениколы (левомецетин), фторхинолоны (энрофлоксацин), пенициллины (ампициллин, бензилпенициллин), аминогликозиды (стрептомицин, неомицин, канамицин), тетрациклины (тетрациклин), макролиды (тилозин), полимиксины (полимиксин В). Установлено, что 44 из 46 (95.65 %) изученных штаммов обладали природной устойчивостью к полимиксину Б, 14 (31 %) штаммов были резистентны к пенициллину, 7 (16 %) — к ампициллину. Единичную устойчивость у штаммов отмечали к тетрациклину, левомецетину и тилозину. У 4-х (9 %) штаммов наблюдали формирование устойчивости к энрофлоксацину.

На следующем этапе для нас представляло интерес изучение зависимости формирования лекарственной устойчивости у штаммов и их принадлежности к различным генетическим клональным комплексам (см. таблицу).



**Формирование природной устойчивости у штаммов *L. monocytogenes*,  
принадлежащих к различным клональным комплексам**

АПБ	Хлорам- фениколы	Фторхи- налоны	Пеницил- лины		Аминог- ликозиды			Тетра- циклины	Макроли- ды	Полимик- сины
			Амп*	Бен	Стр*	Нео*	Кан*			
СС	Лев*	Энр*	Амп*	Бен	Стр*	Нео*	Кан*	Тет*	Тил*	Пол*
СС7 (n=27)	0 %	14.81 %	22 %	18.5 %	0 %	0 %	0 %	3.7 %	3.7 %	Имеют природную устойчи- вость 95.65 %
СС124 (n=5)	0 %	0 %	0 %	20 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	
СС177 (n=4)	0 %	0 %	25 %	50 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	
СС18 (n=2)	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	
СС101 (n=2)	0 %	0 %	0 %	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	
СС1 (n=1)	0 %	0 %	0 %	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	
СС19 (n=1)	0 %	0 %	0 %	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	
СС81 (n=1)	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	
СС21(n=1)	0 %	0 %	0 %	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	
СС89 (n=1)	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	
СС307 (n=1)	100 %	0 %	0 %	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	

\* — бензилпенициллин(Бен), энрофлоксацин(Энр), ампициллин(Амп), тетрациклин(Тет), левомицетин(Лев), канамицин(Кан), тилозин(Тил), стрептомицин(Стр), полимиксин Б(Пол), неомицин (Нео).

В результате проведенного анализа было установлено, что среди штаммов, принадлежащих к клональному комплексу СС7 (59 %) выявлена устойчивость к нескольким антибиотическим препаратам, таким как бензилпенициллин (18.5 %), энрофлоксацин (14.81 %), ампициллин (22 %), тетрациклин (3.7 %), тилозин (3.7 %). Устойчивость к бензилпенициллину (31 %) была характерна для штаммов, принадлежащих практически ко всем клональным комплексам. Определенный интерес представляет выявление у некоторых штаммов резистентности к энрофлоксацину и тилозину, которые не применяли в период выделения штаммов.

**ИЗМЕНЕНИЕ ОНКОЛИТИЧЕСКОЙ  
АКТИВНОСТИ ВИРУСА СЕНДАЙ ПРИ АДАПТАЦИИ  
К РАЗНЫМ СИСТЕМАМ РЕПЛИКАЦИИ\***

CHANGES IN ONCOLYTIC ACTIVITY OF SENDAI VIRUS AFTER  
ADAPTATION TO DIFFERENT REPLICATION SYSTEMS

С. С. Зайнутдинов, Г. Ф. Сиволобова, А. А. Гражданцева, Г. В. Кочнева

*ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Россия*

S. S. Zainutdinov, G. F. Sivolobova, A. A. Grazhdantseva, G. V. Kochneva

*SRC VB "Vector", Koltsovo, Russia*

**Аннотация**

Репликация штамма Moscow вируса Сендай в культурах клеток 4647 и 293 приводит к накоплению адаптивных мутаций, которые снижают онколитическую активность вируса в отношении клеток меланомы и глиобластомы. Наибольшей стабильностью и онколитической активностью обладает геновариант вируса, полученный в куриных эмбрионах.

**Abstract**

Replication of the Moscow strain of Sendai virus in cell cultures 4647 and 293 leads to the accumulation of adaptive mutations that reduce the oncolytic activity of the virus against melanoma and glioblastoma cells. The genovariant of the virus obtained in chicken embryos has the highest stability and oncolytic activity.

Вирус Сендай обладает природными противоопухолевыми и иммуностимулирующими свойствами за счёт повышенного сродства к клеткам многих видов опухолей. Он является лучшим на сегодняшний день природным индуктором интерферона, что также вносит свой вклад в его противоопухолевую активность [1]. Мы работаем с российским штаммом Moscow вируса Сендай [2], противоопухолевые свойства которого в 1990-х гг. тестировались на добровольцах со злокачественными заболеваниями 3 и 4 стадии, у некоторых из них наблюдалась длительная ремиссия [1].

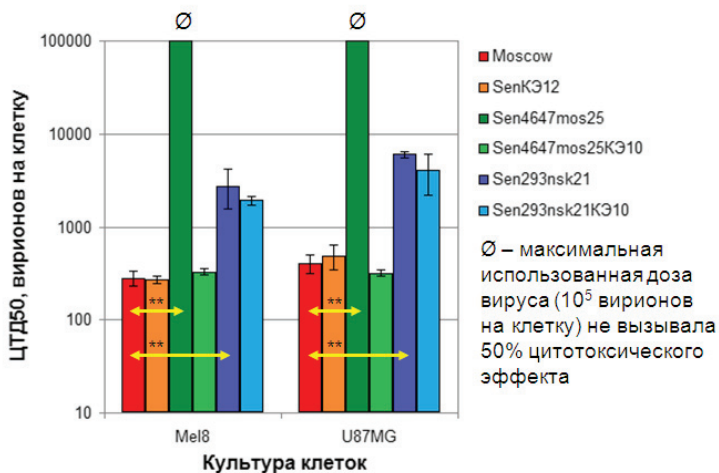
Высококчувствительной системой для репликации вируса Сендай является аллантаоисная полость куриных эмбрионов. Мы показали, что геновариант штамма Moscow, прошедший около 50 пассажей на куриных эмбрионах, сохраняет стабильность структуры и высокую онколитическую активность *in vitro* в отношении клеток меланомы (Mel8) и глиобластомы человека (U87MG). Онколитическую активность измеряли в ХТТ-тесте путём расчёта 50 % цитотоксической дозы (ЦТД<sub>50</sub>), выраженной в числе вирионов на клетку. Первичная нуклеотидная последовательность этого геноварианта депонирована в базу данных «GenBank» под номером KP717417.1.

Однако для препаратов, полученных в системе куриных эмбрионов, могут существовать проблемы стандартизации и аллергенности за счёт наличия куриного белка. Их решением могла бы явиться адаптация вируса к культуре клеток. Мы использовали культуры клеток 4647 (клетки почки африканской зелёной мартышки) и 293 (клетки почки эмбриона человека), которые аттестованы для производства вакцин в России. Оказалось, что при репродукции штамма Moscow вируса Сендай в данных культурах клеток происходит накопление адаптивных мутаций, главным образом в поверхностных белках вируса, что изменяет его клеточный тропизм и снижает онколитические свойства. Геноварианты штамма Moscow, прошедшего более 20 пассажей на клетках 4647 и 293, существенно отличались между собой по спектру адаптивных мутаций, а также от исходного геноварианта вируса [3].

С целью проверки стабильности изменения онколитических свойств и их связи с мутационной изменчивостью вируса оба культуральных варианта штамма Moscow были подвергнуты возвратному пассированию на куриных эмбрионах в течение 10 пассажей. Секвенирование геномов возвратно пассированных вариантов показало, что спектр мутаций при адаптации вируса к клеткам 4647 является нестабильным и частично возвращается к исходному геноварианту в процессе репликации в куриных эмбрионах. При этом также происходит восстановление онколитических свойств вируса. Однако мутации, приобретаемые вирусом при адаптации к клеткам 293, не исчезают в процессе возвратной репликации в куриных эмбрионах, и не происходит восстановления онколитических свойств. Исходный вариант штамма Moscow не приобрёл мутаций при пассировании на куриных эмбрионах.

Таким образом, выбор системы репликации имеет большое значение для сохранения стабильности генома вируса Сендай и для реализации его онколитического потенциала. Кроме того, возникает необходимость фиксации структуры геноварианта вируса с высокой противоопухолевой активностью путём клонирования его полноразмерной последовательности методами обратной генетики и последующего оживления в релевантной системе репликации. Фиксация структуры генома штамма Moscow вируса Сендай с вы-

сокой онколитической активностью является базисом дальнейшей работы по созданию на его основе отечественных противоопухолевых препаратов.



Сравнительная цитотоксическая активность штаммов вируса Сендай на культурах опухолевых клеток человека Mel8 и U87MG. На оси ординат представлены значения ЦТД<sub>50</sub>, выраженные в числе вирионов Сендай на опухолевую клетку. Число вирионов (физический титр) определяли электронно-микроскопическим анализом (негативное контрастирование). Ø — максимально использованная доза вируса (10<sup>5</sup> вирионов на клетку) не вызвала 50% цитотоксического эффекта

## Литература

1. Matveeva O. V., Guo Z. S., Senin V. M., Senina A. V., Shabalina S. A., Chumakov P. M. Oncolysis by paramyxoviruses: preclinical and clinical studies. *Molecular Therapy Oncolytics* (2015) 2, 150017; doi:10.1038/mto.2015.17.
2. Sergei S. Zainutdinov, Artem Y. Tikunov, Olga V. Matveeva, Sergei V. Netesov, Galina V. Kochneva. Complete Genome Sequence of the Oncolytic Sendai virus Strain Moscow // *Genome Announcements*. 2016. Vol. 4. N 4. e00818-16.
3. Зайнутдинов С. С., Гражданцева А. А., Кочетков Д. В., Чумаков П. М., Нетёсов С. В., Матвеева О. В., Кочнева Г. В. Изменение онколитической активности вируса Сендай при адаптации к культурам клеток // *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2017. № 4. С. 156–160.

**МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ АНТИОКСИДАНТ  
SKQ1 ПРЕПЯТСТВУЕТ РАЗВИТИЮ  
НЕОПЛАЗИИ ЖЕЛЧНЫХ ПРОТОКОВ\***

MITOCHONDRIAL ANTIOXIDANT SKQ1 PREVENTS  
THE DEVELOPMENT OF BILE DUCT NEOPLASIA

О. Г. Запарина, А. В. Ковнер

*Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия*

O. G. Zaparina, A. V. Kovner

*Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia*

E-mail: zp.oksana.93@gmail.com

**Аннотация**

Описторхоз, вызываемый паразитированием кошачьей двуустки *Opisthorchis felineus* в гепатобилиарной системе рыбоядных млекопитающих широко распространен на территории Западной Сибири. Это заболевание сопровождается различными повреждениями в печени, включая преанцеровгенные изменения эпителия желчных протоков. Существует гипотеза, что возникновение этих изменений опосредует экскреторно-секреторный продукт гельминтов, за счет своих прооксидативных и генотоксичных свойств.

Для того, чтобы изучить возможную роль окислительного стресса в патогенезе описторхоза, мы оценили накопление окислительных повреждений у инфицированных хомячков через 1–18 месяцев после заражения и влияние митохондриального антиоксиданта SKQ1 на состояние гепатобилиарной системы хомячков через 1 и 3 месяца инфекции.

Было показано, что окислительные повреждения накапливаются в зависимости от срока инфекции. Митохондриальный антиоксидант SKQ1 снижал степень воспаления, накопление окислительных повреждений, преанцеровгенные изменения и улучшал морфофункциональное состояние печени.

**Abstract**

Opisthorchiasis caused by liver fluke *Opisthorchis felineus* in the hepatobiliary system of fish-eating mammals is widespread in Western Siberia. This disease is accompanied by

---

© О. Г. Запарина, А. В. Ковнер, 2019

\* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (19-34-90060) и Бюджетного проекта ИЦиГ СО РАН (0259-2019-0010).

different lesions in the liver, including precarcinogenic changes in the epithelium of the bile ducts. It is assumed that the occurrence of these changes mediates the excretory-secretory product of helminths, due to its prooxidative and genotoxic properties.

To study the possible role of oxidative stress in the pathogenesis of opisthorchiasis, we assessed the accumulation of oxidative lesions in infected hamsters 1–18 months after infection and the effect of the mitochondrial antioxidant SKQ1 on the state of the hamsters hepatobiliary system after 1 and 3 months of infection.

We showed that oxidative lesions accumulates on time-dependent manner. Mitochondrial antioxidant SKQ1 reduced inflammation, the accumulation of oxidative lesions, precancerogenic changes and improved the morphological and functional state of the liver.

Одним из эпидемиологически значимых представителей трематод семейства Opisthocoeliidae является *Opisthorchis felineus*, широко распространенный на территории Западной Сибири, где по разным данным заражено от 10 до 45 % населения сельских регионов. *Opisthorchis felineus* паразитирует в гепатобилиарной системе рыбоядных млекопитающих и вызывает описторхоз, который сопровождается формированием очагов хронического воспаления в печени, развитием перидуктального фиброза, неоплазией клеток эпителия желчных протоков. Механизмы возникающих при описторхозе патологических изменений на данный момент изучены слабо. Существует гипотеза, что паразит-специфические оксистеролы, содержащиеся в экскреторно-секреторном продукте гельминтов, способны вызывать в клетках эпителия окислительные повреждения в ДНК, которые приводят к мутациям в процессе ее репликации. В результате накопления мутаций происходит дисплазия и неоплазия клеток эпителия желчных протоков, которые являются преканцерогенными изменениями и ведут к злокачественной трансформации.

Для того, чтобы оценить возможную роль окислительного стресса в патогенезе описторхоза, было оценено накопление маркеров окислительного стресса на экспериментальной модели описторхоза с использованием золотистых хомячков *M. auratus* через 1–18 месяцев после заражения. Кроме того, было оценено воздействие митохондриального антиоксиданта SKQ1 (10-(6'-Plastoquinonyl) decyltriphenylphosphonium) на состояние гепатобилиарной системы. С помощью иммуногистохимического и иммуноферментного анализов было выявлено, что маркеры перекисного окисления липидов в печени (малоновый диальдегид и 4-гидроксиноненаль, рис. 2.), окислительные повреждения ДНК (рис. 1) накапливаются в зависимости от времени течения инфекции.

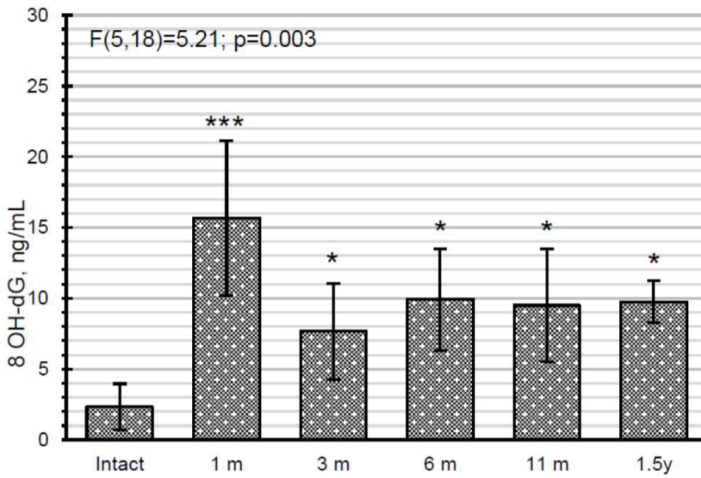


Рис. 1. Накопление 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина (8-OHdG) в моче хомяков на разных сроках инфицирования

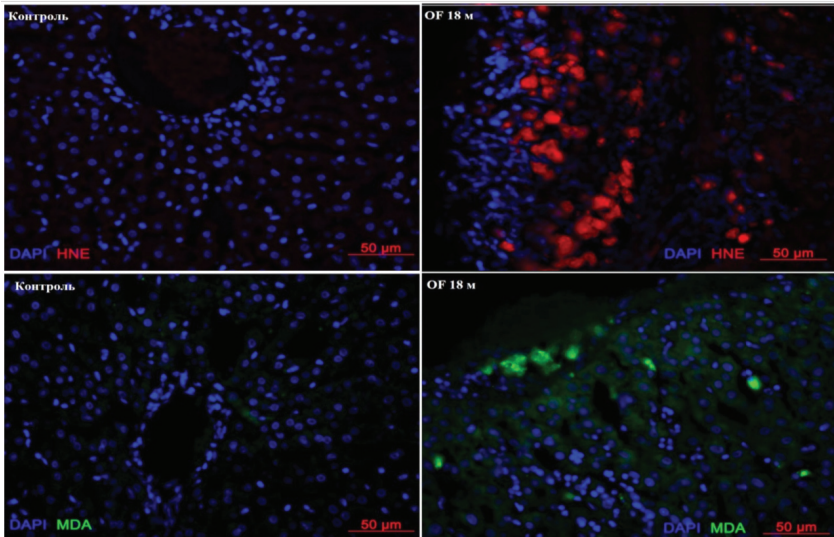


Рис. 2. Накопление маркеров перекисного окисления липидов HNE (4-гидрокси-2-Ноненаль — красный цвет сигнала) и MDA (малоновый диальдегид-зеленый цвет сигнала) в печени зараженных хомяков через 1 и 18 месяцев

У животных, получавших митохондриальный антиоксидант SKQ1, накопление маркеров перекисного окисления липидов в печени было значительно снижено, что свидетельствует об уменьшении степени проявления окислительного стресса в тканях. Более того, с помощью полуколичественного гистологического анализа по двум срезам было показано, что печени SKQ1 снижал степень патологических изменений в структуре печени, в частности снижалась степень воспаления, наблюдалось снижение гиперплазии, неоплазии эпителия холангиоцитов. Положительное влияние антиоксиданта на структурно-функциональное состояние печени подтвердилось с помощью биохимического анализа сыворотки крови. С помощью стандартного метода ПЦР с детекцией в режиме реального времени были оценены уровни мРНК генов ферментов, участвующих в развитии воспалительного ответа и фиброгенеза, которые снижались под действием SKQ1 у зараженных животных.

Таким образом, активные формы кислорода играют значимую роль в патогенезе описторхоза, вызванного *Opisthorchis felineus*. В ходе исследования был установлен гепатопротекторный эффект антиоксиданта SKQ1, выражающийся снижением преканцерогенных изменений эпителия желчных протоков. Митохондриально-направленный антиоксидант SKQ1 оказывает положительный эффект за счет снижения окислительного стресса, следовательно, это соединение может быть использовано в комплексной терапии при лечении описторхоза.



**СТРОМАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ  
PGRMC1 И GALECTIN-1 ЭНДОМЕТРИОИДНОЙ  
АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЭНДОМЕТРИЯ  
ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ**

STROMAL EXPRESSION OF PGRMC1 AND GALECTIN-1  
BY ENDOMETRIOID ENDOMETRIAL ADENOCARCINOMA  
UNDER THE INFLUENCE OF IONIZING RADIATION

Д. А. Зиновкин

*УО «Гомельский государственный медицинский университет»*

D. A. Zinovkin

*EE «Gomel State Medical University»*

E-mail: zinovkin2012@gmail.com

**Аннотация**

PGRMC1 и Galectin-1 являются маркерами прогрессии многих злокачественных опухолей. Однако изменение их экспрессии в результате воздействия гамма излучения на эндометриоидную аденокарциному эндометрия еще не определялось. Были выявлены статистически значимые различия ( $p < 0,001$ ) в экспрессии PGRMC1 и Galectin-1 как в строме, так и в паренхиме эндометриоидной аденокарциномы тела матки.

**Abstract**

PGRMC1 and Galectin-1 are markers of progression for many malignant tumors. However, changes in their expression as a result of gamma radiation exposure to endometrioid endometrial adenocarcinoma have not been determined yet. Statistically significant differences ( $p < 0.001$ ) were determined in the expression of PGRMC1 and Galectin-1 in stroma and parenchyma of endometrioid adenocarcinoma of the corpus uteri.

Эндометриоидная аденокарцинома эндометрия — это наиболее распространенный гистологический тип рака тела матки, который встречается в 75–90 % всех случаев злокачественных новообразований данной локализации. PGRMC1 в злокачественных новообразованиях влияет на значимые молекулярно-биологические процессы, такие как: эпителиально-мезенхималь-

ный переход, устойчивость опухоли к клеточной гибели. Galectin-1 в свою очередь играет важную роль во внутриклеточных сигналах и межклеточных взаимодействиях опухолевого микроокружения. На сегодняшний день модуляция опухолевого микроокружения ионизирующим излучением открывает новые перспективы в изучении биологии рака. Целью данного исследования было выявление особенностей экспрессии PGRMC1 и Galectin-1 опухолевого микроокружения эндометриоидной аденокарциномы тела матки подвергнувшегося воздействию предоперационному гамма-облучению в дозе 13,5 Гр. В данном исследовании использовался архивный гистологический материал 80 случаев. В группу пациенток с лучевой терапией вошло 42 человек, в группу без лучевой терапии — 38. Иммуногистохимическое окрашивание производилось по стандартной методике, визуализация антител производилась с использованием DAB, контр-окрашивание производилось гематоксилином Майера. Измерения производились в 10 неперекрывающихся полях зрения при увеличении  $\times 400$ . Экспрессия оценивалась отдельно в строме и в паренхиме. Сравнение групп по представленным параметрам проводили с использованием теста Манна — Уитни. Корреляционные взаимосвязи выявляли между представленными молекулярно-биологическими маркерами и клиническими характеристиками с использованием теста Спирмена ( $r$ ). Статистически значимыми различия принимали при  $p < 0,05$ .

В группе пациенток прошедших гамма-лучевую терапию медиана экспрессии PGRMC1 в строме ЭА — 33,9% (23,5–44,7%), в группе без лучевой терапии — 56,4% (45,5–67,5%). При сравнении экспрессии данного показателя в группах с облучением и без облучения выявлялись статистически значимые различия ( $p < 0,001$ ). Медиана экспрессии Galectin-1 в строме была 55,6% (45,0–67,9%), в группе без облучения — 75,6% (58,7–78,7%), при сравнении групп отмечались статистически значимые различия ( $p < 0,01$ ).

В группе облучённых лиц определялись корреляции между стромальной экспрессией Galectin-1 и безрецидивной выживаемостью ( $p < 0,001$ ;  $r = 0,539$ ).

В группе сравнения экспрессия Galectin-1 стромальным компонентом так же коррелировала с общей ( $p < 0,001$ ;  $r = 0,693$ ) и безрецидивной выживаемостью ( $p < 0,001$ ;  $r = 0,641$ ).

## Заключение

Полученные данные указывают модуляцию опухолевого микроокружения гамма облучением и снижением экспрессии стромой PGRMC1 и Galectin-1, что оказывает влияние на общую и безрецидивную выживаемость.

**ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИАЦИИ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ  
ПОЛИМОРФИЗМОВ RS61999948, RS7172586  
С ВНЕЗАПНОЙ СЕРДЕЧНОЙ СМЕРТЬЮ \***

THE ASSOCIATION OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS  
RS61999948, RS7172586 WITH SUDDEN CARDIAC DEATH

А. А. Иванова<sup>1</sup>, В. Н. Максимов<sup>1</sup>, С. К. Малютина<sup>1</sup>,  
В. П. Новоселов<sup>2</sup>, М. И. Воевода<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт терапии и профилактической  
медицины — филиал Федерального государственного бюджетного  
научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт  
цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

<sup>2</sup> ГБУЗ НСО «Новосибирское областное клиническое бюро судебно-  
медицинской экспертизы»

A. A. Ivanova<sup>1</sup>, V. N. Maksimov<sup>1</sup>, S. K. Malutina<sup>1</sup>,  
V. P. Novoselov<sup>2</sup>, M. I. Voevoda<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Research Institute of Internal and Preventive Medicine —  
Branch of the Institute of Cytology and Genetic,  
Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Russia*

<sup>2</sup> *Novosibirsk Regional Office of Forensic Medical Examination, Russia*

E-mail: ivanova\_a\_a@mail.ru

**Аннотация**

Однонуклеотидные полиморфизмы rs61999948 и rs7172586 выявлены в собственном полногеномном ассоциативном исследовании как возможные новые молекулярно-генетические маркеры внезапной сердечной смерти. По результатам верифицирующего исследования подтверждена ассоциация с внезапной сердечной смертью однонуклеотидного полиморфизма rs61999948, ассоциация однонуклеотидного полиморфизма rs7172586 с внезапной сердечной смертью не подтверждена.

© А. А. Иванова, В. Н. Максимов, С. К. Малютина, В. П. Новоселов, М. И. Воевода, 2019

\* Исследования выполнены при поддержке стипендии Президента Российской Федерации для молодых ученых и аспирантов, осуществляющих перспективные научные исследования и разработки по приоритетным направлениям модернизации российской экономики.

### Abstract

Single nucleotide polymorphisms rs61999948 and rs7172586 were identified in the genome-wide association study as possible new molecular genetic markers of sudden cardiac death. According to the results of verificatory study, the association of rs61999948 with sudden cardiac death was confirmed; the association of rs7172586 with sudden cardiac death was not confirmed.

По результатам собственного полногеномного ассоциативного исследования (Genome-Wide Association Study, GWAS) был получен список возможных новых молекулярно-генетических маркеров внезапной сердечной смерти (ВСС) [1]. Для верификации полученных данных из списка были выбраны однонуклеотидные полиморфизмы rs7172586 и rs61999948, локализованные на 15 хромосоме. Полиморфизм rs7172586 принадлежит гену *CYFIP1* (cytoplasmic FMR1 interacting protein 1, 15q11.2), тогда как rs61999948 относится к межгенному пространству 15 хромосомы.

### Материалы и методы

Дизайн верифицирующего исследования построен по принципу «случай-контроль». Группа ВСС сформирована с использованием критериев ВСС Европейского общества кардиологов из банка ДНК внезапно умерших жителей Октябрьского района города Новосибирска, судебно-медицинское исследование которых было проведено на базе ГБУЗ НСО «Новосибирское областное клиническое бюро судебно-медицинской экспертизы» ( $n=437$ , средний возраст —  $53,1\pm 9,0$  лет, доля мужчины —  $73,5\%$ , женщины —  $26,5\%$ ). Контрольная группа ( $n=405$ , средний возраст  $53,2\pm 9,2$  года, мужчины —  $70,0\%$ , женщины —  $30,0\%$ ) подобрана по полу и возрасту к группе ВСС из банка ДНК участников проектов Multinational MONItoring of trends and determinants in Cardiovascular disease (MONICA) и Health, Alcohol and Psychosocial factors In Eastern Europe (НАPIEE). ДНК выделена методом фенол-хлороформной экстракции из ткани миокарда в группе ВСС и венозной крови в контрольной группе. Генотипирование выполнено методом полимеразной цепной реакции с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. Полученные результаты статистически обработаны с помощью пакета программ SPSS 16.0 с использованием критерия хи-квадрат по Пирсону, точного двустороннего критерия Фишера с поправкой Йетса на непрерывность. В качестве уровня значимости использовали  $p<0,05$ .

### Результаты

Наблюдаемые частоты генотипов однонуклеотидных полиморфизмов rs7172586 и rs61999948 в контрольной группе соответствуют ожидаемым

согласно равновесию Харди — Вайнберга ( $\chi^2 = 1,4; 2,9$ , соответственно). Не обнаружено статистически значимых различий по частотам генотипов и аллелей rs7172586 между группой ВСС и контрольной группой ( $p > 0,05$ ), в том числе при разделении групп по полу и возрасту. Доля мужчин носителей генотипа ТТ rs61999948 в группе ВСС (6,3 %) статистически значимо меньше, чем доля мужчин носителей генотипа ТТ в группе контроля (12,3 %) (ОШ=0,48, 95 %ДИ 0,26–0,89,  $p=0,04$ ). Полученная значимость сохраняется в группе лиц младше 50 лет ( $p=0,004$ ), в группе мужчин младше 50 лет ( $p=0,001$ ). Для лиц младше 50 лет доля носителей генотипа СС rs61999948 статистически значимо больше в группе ВСС (59,0 %) по сравнению с контрольной группой (40,3 %) (ОШ=2,13, 95 %ДИ 1,31–3,47,  $p=0,001$ ). Выявленная ассоциация генотипа СС с ВСС сохраняется и в группе мужчин младше 50 лет ( $p < 0,0001$ ).

### **Выводы**

По результатам верифицирующего исследования «случай-контроль» не подтверждена ассоциация однонуклеотидного полиморфизма rs7172586 с внезапной сердечной смертью. Для мужчин младше 50 лет генотип ТТ однонуклеотидного полиморфизма rs61999948 ассоциирован с протективным эффектом в отношении внезапной сердечной смерти, генотип СС rs61999948 ассоциирован с повышенным риском внезапной сердечной смерти.

### **Литература**

1. Бабенко В. Н., Максимов В. Н., Кулакова Е. В., Сафронова Н. С., Воевода М. И., Рогаев Е. И. Полногеномный анализ пулированных выборок ДНК когорт человека. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2014;18(4–2):847–855.

**ПОИСК ПОТЕНЦИАЛЬНО ПАТОГЕННЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ  
ВАРИАНТОВ У ПАЦИЕНТОВ С ВРОЖДЕННОЙ ГЛАУКОМОЙ:  
ПЕРВИЧНЫЕ ДАННЫЕ ИНТЕРПРЕТАЦИИ  
ДВУХ КЛИНИЧЕСКИХ СЛУЧАЕВ\***

THE SEARCHING OF RARE PATHOGENIC AND POTENTIALLY  
PATHOGENIC VARIANTS IN PATIENTS WITH CONGENITAL  
GLAUCOMA: PRIMARY INTERPRETATION DATA  
OF TWO CLINICAL CASES

Д. Е. Иваношук<sup>1,2</sup>, Э. С. Валеев<sup>1</sup>, П. С. Белокопытова<sup>1</sup>,  
О. В. Фенькова<sup>3</sup>, С. В. Михайлова<sup>1</sup>, Е. В. Шахтшнейдер<sup>1,2</sup>,  
В. С. Фишман<sup>1</sup>, А. Ж. Фурсова<sup>3</sup>, М. И. Воевода<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики  
Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт терапии и профилактической  
медицины — филиал Федерального государственного бюджетного  
научного учреждения «ФИЦ ИЦиГ СОРАН», Новосибирск, Россия

<sup>3</sup>Государственное бюджетное учреждение здравоохранения  
Новосибирской области «Государственная Новосибирская областная  
клиническая больница», Новосибирск, Россия

D. E. Ivanoshchuk<sup>1,2</sup>, E. S. Valeev<sup>1</sup>, P. S. Belokopitova<sup>1</sup>,  
O. V. Fenkova<sup>3</sup>, S. V. Mikhailova<sup>1</sup>, E. V. Shakhtshneider<sup>1,2</sup>,  
V. S. Fishman<sup>1</sup>, A. Z. Fursova<sup>3</sup>, M. I. Voevoda<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Federal Research Center Institute of Cytology  
and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup>Research Institute of Internal and Preventive Medicine —  
Branch of Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia

<sup>3</sup>Novosibirsk State Regional Clinical Hospital, Novosibirsk, Russia

---

© Д. Е. Иваношук, Э. С. Валеев, П. С. Белокопытова, О. В. Фенькова, С. В. Михайлова, Е. В. Шахтшнейдер, В. С. Фишман, А. Ж. Фурсова, М. И. Воевода, 2019

\* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №18-315-00297 и ГЗ №0259-2019-0009.

### Аннотация

Первичная врожденная глаукома (ПВГ) является тяжелым нейродегенеративным заболеванием глаза, которое может приводить к слепоте. Специфические мутации гена *CYP1B1* ассоциированы с аутосомно-рецессивной формой ПВГ и обуславливают до 20 % спорадических случаев. Определен ряд других генов (*MYOC*, *WDR36*, *OPTN*, *LTBP2* и *TEK*), которые также ассоциированы с ПВГ, но патогенные мутации в них встречаются реже. У большинства пациентов причина развития заболевания остается невыясненной. В семьях пациентов с подозрением на ПВГ целесообразно проводить скрининг по поиску мутаций для идентификации причины развития заболевания, точности постановки диагноза и прогнозирования риска рождения детей с ПВГ. Таким образом, целью данной работы являлся поиск алгоритма выявления редких молекулярно-генетических маркеров ПВГ у *CYP1B1*-негативных лиц с этим заболеванием. В работе представлены первичные данные анализа двух неродственных пациентов с ПВГ.

### Abstract

Primary congenital glaucoma (PCG) is a severe neurodegenerative eye disease that can lead to blindness. Specific mutations of *CYP1B1* gene are associated with autosomal recessive form of PCG and account for up to 20 % of sporadic cases. A number of other genes were determined (*MYOC*, *WDR36*, *OPTN*, *LTBP2*, and *TEK*) which are also associated with PCG in rare cases. In most patients, a cause of the disease remain unknown. In families of patient's with suspected PCG, it is advisable to perform a screening for mutations to identify the cause of the disease, establishing diagnosis and prediction the risk of giving birth to sick children in the family. The aim of this study was search for an algorithm for identifying rare molecular genetic markers of PCG in *CYP1B1*-negative individuals with this disease. In this research presents the primary analysis data of two unrelated patients with PCG.

Первичная врожденная глаукома (ПВГ) является тяжелым нейродегенеративным заболеванием глаза, которое может приводить к слепоте. Специфические мутации гена *CYP1B1* ассоциированы с аутосомно-рецессивной формой ПВГ, они обуславливают до 50 % семейных и до 20 % спорадических случаев этого заболевания. Определен ряд других генов (*MYOC*, *WDR36*, *OPTN*, *LTBP2* и *TEK*), которые также ассоциированы с ПВГ, но в более редких случаях. У остальных пациентов причина развития заболевания остается невыясненной. Метод секвенирования по Сэнгеру целесообразно использовать для изучения геномных участков до 1000 п.н., в частности, оправдан при скрининге патогенных вариантов в гене *CYP1B1*. Однако, если пациенты не являются носителями мутаций в гене *CYP1B1*, дальнейшее секвенирование по Сэнгеру известных генов малоэффективно и экономически невыгодно. Технология полноэкзомного секвенирования является перспективным методом идентификации новых маркеров фенотипических

признаков, поэтому для поиска причин возникновения ПВГ целесообразно проводить скрининг мутаций в гене *CYP11B1*, а у *CYP11B1*-негативных пациентов применять метод полноэкзомного секвенирования в семьях пациентов с ПВГ. Таким образом, целью данной работы являлся поиск алгоритма выявления редких молекулярно-генетических маркеров ПВГ у *CYP11B1*-негативных лиц с этим заболеванием. В работе представлены первичные данные анализа двух неродственных пациентов с ПВГ.

Нами были обследованы два неродственных *CYP11B1*-негативных пациента с ПВГ. Исследование одобрено Этическим комитетом ГБУЗ НСО «Государственная Новосибирская областная клиническая больница» и получено письменное информированное согласие на участие в данном исследовании от родителей пробандов. Пробанд P1 — женского пола 12 лет. И пробанд P2 — мужского пола 10 лет. В обоих случаях заболевание манифестировало на 1-ом году жизни с последующим неоднократным хирургическим вмешательством. Согласно анализу семейной истории, заболевание в обоих случаях наследовалось по аутосомно-рецессивному типу. У пробанда P2, помимо ПВГ, наблюдалась дисциркуляторная энцефалопатия, эпилепсия и олигофрения. Для них было проведено полноэкзомное секвенирование. Поскольку ПВГ является редким заболеванием и генетические аспекты ее возникновения ещё не до конца изучены, поиск новых генетических вариантов, был проведён среди аннотированных генов с известной функцией и на участках генома, для которых ранее была показана клиническая значимость. Нами выбран вариант обогащения и приготовления библиотек с помощью панели The SeqCap® EZ MedExome (Roche, Швейцария), которая представляет из себя сбалансированный и оптимизированный полный экзом человека. Анализ данных секвенирования включал картирование данных на геном человека версии GRCh37 с помощью программы BWA (Burrow — Wheeler Alignment tool. ПЦР-дубликаты были удалены с помощью PICARD tool. Выявление однонуклеотидных вариантов (SNV) и инсерций-делеций было проведено с использованием набора утилит SAMtools. Варианты были отсортированы при условиях глубины чтения >50 и качества картирования не ниже Q30'. Аннотация полученных вариантов производилась с помощью программы VEP с использованием базы данных GNOMAD. Варианты несинонимичных замен и инсерций/делеций с частотой встречаемости менее 1 % были отфильтрованы для последующего анализа. Полученные данные были аннотированы с использованием баз данных ClinVar и HGMD. При анализе также учитывались данные тестирования *in silico* с помощью программ SIFT (<http://provean.jevl.org/index.php>), Polyphen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) and Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org>).



Нами не было обнаружено гомозиготных вариантов в известных генах *MYOC*, *WDR36*, *OPTN*, *LTBP2* и ТЕК, ассоциированных с ПВГ. Однако оба пробанда оказались компаунд-гетерозиготами по редким потенциально патогенным однонуклеотидным вариантам (см. таблицу). При первичном скрининге генов у одного из пробандов P1 с не отягощенной семейной историей по глаукоме идентифицирована ранее описанная редкая замена Pro432Leu (rs137854861) в гене *LTBP2* в гетерозиготном варианте. Носительство обнаруженного варианта фенотипически вариабельно (первичная открытоугольная глаукома и псевдоэкзофалиативная глаукома) и наследуется с неполной пенетрантностью [Jelodari-Mamaghani, 2013], поэтому у данного пробанда был проведен дальнейший анализ функционально значимых вариантов. Результаты анализа данных экзона представлены в таблице.

Среди кандидатов были выявлены две замены в гене *DOCK6*, вероятно имеющие функционально-значимый эффект. Известно, что мутации в этом гене ассоциированы с развитием синдрома Адамса — Оливера, проявляющегося в аномалиях развития мозга и глаза, и умственной отсталости [Sukalo M et al., 2015]. Вероятно, добавочные эффекты этого гена могут усиливать фенотипические проявления ПВГ при наличии уже имеющейся мутации.

### Генетические варианты, предположительно ассоциированные с ПВГ

Пробанд	Ген	Номер референсной последовательности	Генетический вариант	Генотип	MAF GnomAD	SIFT	PolyPhen	Mutation Taster
P1	DOCK6	NM_020812	c.1289G>A Arg430His rs143655255	гетерозигота	0.0028	Damaging	probably_damaging	Disease causing
			c.3913C>T R1305C rs112911897	гетерозигота	0.0085	Damaging	Probably_damaging	Disease causing
P2	MYH7B	NM_020884	c.5492T>A: Met1831Lys rs957839462	гетерозигота	0.00003	Damaging	Probably_damaging	Disease causing
			c.5506G>C: Glu1836Gln rs755761316	гетерозигота	0.00001	Damaging	Possibly_damaging	Disease causing

Оба обнаруженных варианта гена *МУН7В* у пробанда P2 локализируются в coiled coil домене белка миозина и ранее не были ассоциированы с заболеваниями. Описан семейный случай сегрегации мутаций *МУН7В* с глухотой, сочетающийся с мегалокорнеа и развитием вторичной глаукомы. Трое сиблингов являлись компаунд гетерозиготами по мутациям (Arg1693Gln и Asp557Asn) [R. R. Haraksingh et al., 2014]. Одна из описанных мутаций Arg1693Gln локализована в coiled coil домене гена *МУН7В*. Вероятно, различная локализация мутаций гена *МУН7В* и их сочетание могут обуславливать различные фенотипические проявления.

Таким образом, в данном исследовании представлены первичные результаты анализа данных полноэкзомного секвенирования, проведённого для идентификации новых вариантов генов, вероятно вовлечённых в развитие ПВГ. Показана целесообразность данного подхода к поиску генетических причин формирования этого заболевания.

### Литература

1. Jelodari-Mamaghani S., Haji-Seyed-Javadi R., Suri F., et al. Contribution of the latent transforming growth factor- $\beta$  binding protein 2 gene to etiology of primary open angle glaucoma and pseudoexfoliation syndrome. *Mol. Vis.* 2013. 19, 333–347
2. Haraksingh RR, Jahanbani F, Rodriguez, Paris J, Gelernter J, Nadeau KC, Oghalai JS, Schrijver I, Snyder MP. Exome sequencing and genome — wide copy number variant mapping reveal novel associations with sensorineural hereditary hearing loss. *BMC Genomics.* 2014. 15:1155.
3. M. Sukalo, F. Tilsen, H. Kayserili, et al. DOCK6 mutations are responsible for a distinct autosomal-recessive variant of Adams-Oliver syndrome associated with brain and eye anomalies *Hum. Mutat.* 2015. 36. P. 593–598.

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОКОНЦЕНТРАЦИОННЫХ СИСТЕМ  
ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭНДОГЕННЫХ  
БИОМАРКЕРОВ В ВЫДЫХАЕМОМ ВОЗДУХЕ**

**THE USE OF MICROCONCENTRATION SYSTEMS  
FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION  
OF ENDOGENOUS BIOMARKERS IN EXHALED AIR \***

А. Э. Игитхянян, Д. Д. Карапетян

*ФГАОУВО Самарский национальный исследовательский университет  
им. акад. С. П. Королёва*

A. E. Igitkhanyan, D. D. Karapetyan

*Samara University, Russia*

E-mail: [asyaigitkhanyan@icloud.com](mailto:asyaigitkhanyan@icloud.com)

**Аннотация**

В настоящее время известно, что в выдыхаемом человеком воздухе содержатся порядка трех тысяч летучих органических соединений, являющихся продуктами физиологических и биохимических процессов в организме. Многие из них являются биомаркерами функциональных нарушений здоровья человека, около 20 из них используются в качестве биомаркеров некоторых заболеваний. В число селективных соединений входит ацетон, который образуется в результате окисления жиров. Его повышенное содержание в выдыхаемом воздухе сигнализирует об избыточном уровне глюкозы в крови, что позволяет использовать ацетон в качестве биомаркера сахарного диабета. Но поскольку ацетон в выдыхаемом воздухе находится на уровне микропримесей, возникает необходимость предварительного концентрирования пробы.

**Abstract**

Today it is known that in the air exhaled by a person contains about three thousand volatile organic compounds, which are products of physiological and biochemical processes in the body. Many of them are biomarkers of functional disorders of human health, about 20 of them are used as biomarkers of certain diseases. Selective compounds include acetone, which is formed by the oxidation of fats. Its increased content in exhaled air indicates an excess level of glucose in the blood, which allows the use of acetone as a biomarker of

diabetes mellitus. But since acetone in exhaled air is at the level of microimpurities, there is a need for preliminary concentration of the sample.

Выдыхаемый воздух представляет собой смесь азота, кислорода, двуокиси углерода, инертных газов, водяного пара и следов летучих органических соединений. С помощью современных методов исследования можно выделить несколько сотен веществ в образце выдыхаемого воздуха. Некоторые из этих соединений продемонстрировали свою ценность в качестве биомаркеров при различных болезнях. Например, на сегодняшний день известны различные исследования клинической значимости выдыхаемого ацетона, в которых была отмечена его достоверная связь с уровнем глюкозы в крови.

Повышенное содержание глюкозы в крови приводит к серьезным медицинским осложнениям, таким как, метаболические нарушения, слепота, почечная недостаточность, болезни сердца. Не исключены также ампутации конечностей и преждевременная смерть.

Использование биомаркеров в медицине для диагностики различных заболеваний является актуальной задачей, в особенности, необходимость такого метода появляется во время сложных медицинских операций, в педиатрии, при плановых медицинских осмотрах. Кроме того, такой метод позволяет распознавать патологию на той стадии, когда другие методы неинформативны, малочувствительны и неэффективны.

Однако, концентрации летучих органических соединений в выдыхаемом воздухе, в том числе и ацетона, слишком малы для количественного определения. Поэтому для уменьшения погрешностей измерения возникает необходимость предварительного концентрирования пробы.

В рамках настоящей работы были изготовлены аналитические микроконцентрационные системы, представляющие собой инъекционные иглы внутренним диаметром 0,5 мм, длиной 40 мм, заполненные сорбентом. Для предотвращения загрязнения сорбента артефактами из окружающей среды, системы с двух сторон закрывались заглушками из термостойкого полимера или скрученной металлической проволокой. Заполнение игл осуществлялось механическим способом, качество набивки контролировалось гравиметрическим методом, путем взвешивания систем на аналитических весах до заполнения и после заполнения сорбентом.

В данной работе в качестве сорбентов были использованы следующие вещества:

1. полимерный сорбент Порапак-Q;
2. сорбент Chromaton N-AW, модифицированный хлоридом кальция;
3. сорбент Chromaton N-AW, модифицированный хлоридом кобальта.

Ацетон в рамках данной работы использован в качестве целевого компонента. Насыщение системы целевым компонентом производилось согласно схеме, представленной на рисунке.

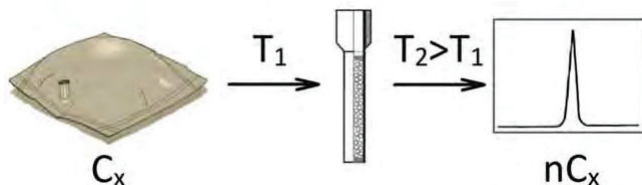


Схема концентрирования:  $T_1$  — температура при концентрировании;  $T_2$  — температура десорбции;  $C_x$  — концентрация аналита в модельной газовой смеси;  $nC_x$  — концентрация аналита после концентрирования

Путем динамической сорбции при комнатной температуре пропускается поток газовой смеси объёмом 20 мл через колонку, заполненную сорбентом. Аналит таким способом равномерно распределяется по объёму всей системы. Далее при более высокой температуре (150 °С) проводится термодесорбция и по выходному сигналу определяется количество десорбированного вещества.

В результате оценки коэффициентов концентрирования показано, что наибольшим коэффициентом концентрирования обладает Порапак-Q ( $K_{\text{конц}} = 43 \pm 4$ ), что соответствует теоретически рассчитанному коэффициенту концентрирования.

Кроме того, в результате сравнительной оценки сорбционных систем на основе Chromaton N-AW, модифицированного растворами неорганических солей (хлоридом кальция и хлоридом кобальта) с универсальным сорбентом Порапак-Q было установлено, что для концентрирования ацетона, находящегося в выдыхаемом воздухе, целесообразно использовать как Порапак-Q, так и Chromaton N-AW, модифицированный хлоридом кальция. Причем при использовании сорбента Chromaton N-AW, модифицированного хлоридом кальция получены результаты с меньшей погрешностью. К достоинствам данного сорбента можно отнести меньшую стоимость по сравнению с сорбентом Порапак-Q.

**МЕТИЛИРОВАНИЕ РЕТРОТРАНСПОЗОНА LINE-1  
В КЛЕТКАХ СОННЫХ АРТЕРИЙ  
И КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С АТЕРОСКЛЕРОЗОМ**

METHYLATION OF RETROTRANSPOSON LINE-1 IN CAROTID ARTERY  
CELLS AND BLOOD CELLS IN PATIENTS WITH ATHEROSCLEROSIS

А. Е. Кебекбаева<sup>1</sup>, Д. В. Шарыш<sup>2</sup>, А. В. Марков<sup>2</sup>,  
А. А. Слепцов<sup>2</sup>, А. Н. Казанцев<sup>3</sup>, Н. Н. Бурков<sup>3</sup>,  
О. Л. Барбараш<sup>3</sup>, В. П. Пузырев<sup>1,2</sup>, М. С. Назаренко<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> *ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России*

<sup>2</sup> *Томский НИМЦ, НИИ медицинской генетики*

<sup>3</sup> *ФГБНУ НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний*

A. E. Kebekbayeva<sup>1</sup>, D. V. Sharysh<sup>2</sup>, A. V. Markov<sup>2</sup>,  
A. A. Sleptcov<sup>2</sup>, A. N. Kazantsev<sup>3</sup>, N. N. Burkov<sup>3</sup>,  
O. L. Barbarash<sup>3</sup>, V. P. Puzyrev<sup>1,2</sup>, M. S. Nazarenko<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> *Siberian State Medical University*

<sup>2</sup> *Tomsk NRMC, Research Institute of Medical Genetics*

<sup>3</sup> *Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases*

**Аннотация**

В исследовании проанализирован уровень метилирования ретротранспозона LINE-1 в клетках атеросклеротических бляшек сонных артерий и лейкоцитах периферической крови пациентов с клинически выраженным атеросклерозом. Выявлен сниженный уровень метилирования LINE-1 в атеросклеротических бляшках по сравнению с лейкоцитами крови пациентов, а также при наличии гистологических признаков нестабильности бляшки.

**Abstract**

In the study, methylation level of retrotransposon LINE-1 was analyzed in carotid plaque cells and white blood cells. A reduced level of LINE-1 methylation was revealed in atherosclerotic plaques compared with white blood cells and was associated with the presence of histological markers of plaque instability.

## **Введение**

Ретротранспозон LINE-1 — наиболее распространённый в геноме человека мобильный генетический элемент. Экспрессия генетических мобильных элементов регулируется с помощью некоторых белковых факторов (TREX1, RB1 и FOXA1) и метилирования ДНК [1]. Аберрации в метилировании геномной ДНК и LINE-1 могут сопровождаться реактивацией различных наборов неактивных генов или нарушением работы нормально функционирующих элементов генома. При этом остается неясным, отражает ли уровень метилирования LINE-1 тяжесть атеросклеротического поражения и в каких клетках наиболее активно происходит деметилирование этого ретротранспозона.

## **Цель исследования**

Изучение уровня метилирования ретротранспозона LINE-1 в клетках сонных артерий и лейкоцитах крови пациентов с клинически выраженным атеросклерозом.

## **Материалы и методы**

Для исследования была сформирована выборка пациентов с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий (N=98). В результате каротидной эндартерэктомии от больных получены образцы атеросклеротических бляшек (АБ) и лейкоцитов крови (ЛК). Образцы АБ были разделены на три равнопредставленные части: для гистологического исследования, анализа метилирования ДНК и для лазерной микродиссекции с последующим изучением отдельных типов клеток.

Приготовление гистологических препаратов проведено по стандартному протоколу с окраской гематоксилином-эозином.

Для анализа уровня метилирования производилось выделение ДНК из АБ и ЛК методом фенол-хлороформной экстракции, после чего осуществлялась ее бисульфитная конверсия и амплификация области в промоторе LINE-1 [PyroMark Q24 CpG LINE-1 cat. 970012, Qiagen]. Оценка уровня метилирования CpG-сайтов в позициях 318, 321, 327 последовательности X58075 (GenBank) (обозначены как CpG1, CpG2 и CpG3, соответственно) LINE-1 производилось с помощью бисульфитного пиросеквенирования на приборе PyroMark Q24 (Qiagen).

Изоляция гладкомышечных клеток (ГМК) (N=6) и макрофагов (МФ) (N=2) проводилась с помощью лазерной микродиссекции на приборе PALM MicroBeam (Carl Zeiss) из иммуногистохимических микропрепаратов. Для определения типа клеток выполнено иммуноокрашивание аль-

фа-актина гладкомышечных клеток и белка CD68 макрофагов. Выделение и бисульфитная конверсия ДНК из диссектированных клеток проведены набором EZ DNA Methylation-Direct Kit (Zymo Research). Для повышения концентрации бисульфит-модифицированной ДНК, выделенной из клеток, была выполнена полногеномная амплификация с помощью набора EpiTest Whole Bisulfite Kit (Qiagen). Сравнение исследуемых групп проводилось с помощью критерия Манна — Уитни и пакета программ Microsoft Excel 2016 (Microsoft) и PSPP (v1.2.0, Free Software Foundation).

## Результаты

У пациентов с клиническими проявлениями атеросклероза было выявлено, что уровень метилирования LINE-1 в клетках АБ статистически значимо ниже на 3 % данного показателя в ЛК ( $p < 0,05$ ), что согласуется с ранее опубликованными данными [1]. Снижение уровня метилирования CpG-сайтов LINE-1 на 2–3 % обнаружено в АБ и ЛК при реканализации, в ЛК при наличии повреждений (эрозии) покрышки и в АБ при кальцинации (рис. 1).

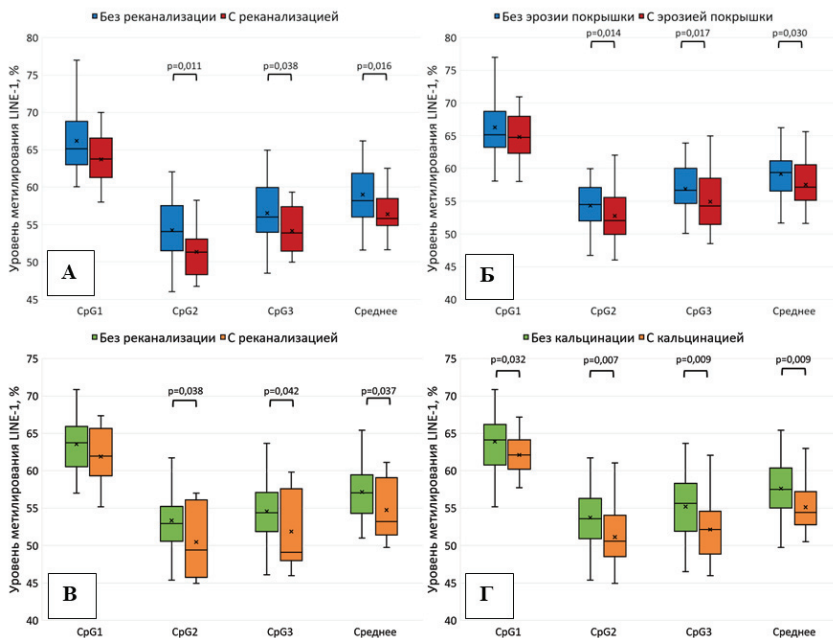


Рис. 1. Уровень метилирования LINE-1 в ЛК (А, Б) и АБ (В, Г) при реканализации, кальцинации, наличии повреждений покрышки (эрозии)



В среднем, уровень метилирования анализируемого региона LINE-1 выше в гладкомышечных клетках и макрофагах атеросклеротических бляшек, чем в цельных образцах. Уровни метилирования сайтов CpG1 и CpG3 ретротранспозона LINE-1 в гладкомышечных клетках и макрофагах были значительно выше аналогичных показателей в цельных тканях АБ и ЛК тех же пациентов. Однако уровень метилирования CpG2 анализируемого региона в CD68+ макрофагах был ниже по сравнению с АБ и ЛК (рис. 2).

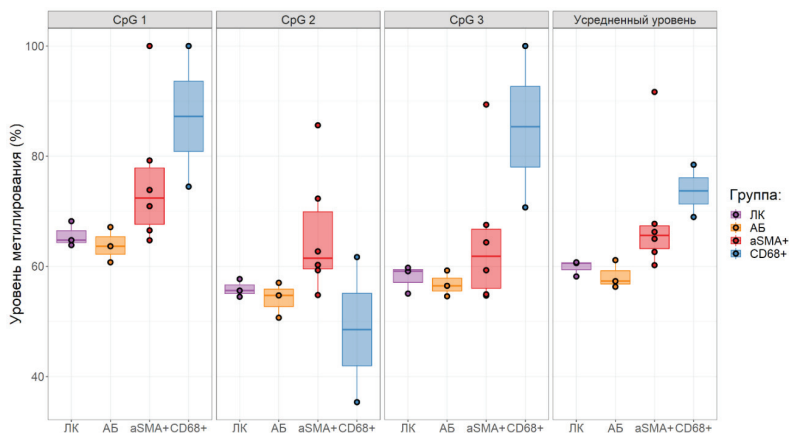


Рис. 2. Уровни метилирования CpG-сайтов LINE-1 в лейкоцитах крови (ЛК), атеросклеротических бляшках (АБ), а также гладкомышечных клетках (aSMA+) и макрофагах (CD68+) бляшек

## Выводы

При наличии гистологических признаков повреждения атеросклеротической бляшки наблюдается снижение метилирования LINE-1 в бляшках и лейкоцитах крови. В выделенных из атеросклеротических бляшек гладкомышечных клетках и макрофагах уровень метилирования анализируемого региона выше, чем в цельных образцах. Таким образом, метилирование LINE-1 может являться перспективным эпигенетическим маркером тяжести течения атеросклероза.

## Литература

1. Марков А. В., Серебрякова В. В., Назаренко М. С., Голубенко М. В., Барбараш О. Л., Пузырев В. П. Оценка общего уровня метилирования ДНК по метилированию ретротранспозона LINE-1 при атеросклерозе у человека // Медицинская генетика. 2018. Т. 17. № 3. С. 13–17.

**ЭКСПРЕССИЯ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ,  
РЕГУЛИРУЮЩИХ НЕЙРОГЕНЕЗ, В СЕТЧАТКЕ  
ПРЕЖДЕВРЕМЕННО-СТАРЕЮЩИХ КРЫС OXYS\***

EXPRESSION OF TRANSCRIPTION FACTORS  
REGULATING NEUROGENESIS IN RETINA  
OF SENESCENCE-ACCELERATED OXYS RATS

О. С. Кожевникова, Д. В. Телегина

*ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия*

O. S. Kozhevnikova, D. V. Telegina

*Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia*

**Аннотация**

Сетчатка млекопитающих во взрослом состоянии почти не способна к нейрогенезу *de novo*. В связи с этим заложенные в период её созревания и формирования структурно-функциональные особенности могут иметь отдаленные эффекты в онтогенезе. Целью этого исследования было проанализировать изменение экспрессии транскрипционных факторов, регулирующих нейрогенез, в сетчатке преждевременно стареющих крыс OXYS и Вистар (контроль) на основании анализа результатов исследования транскриптома сетчатки (данных RNA-seq).

**Abstract**

*De novo* neurogenesis in the adult mammalian retina very limited. Thereby the structural and functional features formed during the period of its maturation and formation can have long-term effects on the further ontogenesis of the tissue. The aim of this research is to study the alterations of transcription factors regulating neurogenesis based on the analysis of the transcriptome data (RNA-seq data) of the senescence-accelerated OXYS and Wistar rat's retina.

Нейрогенез в центральной и периферической нервной системе включает в себя три основных этапа: 1) формирование нейронов из нейрональных клеток-предшественников; 2) миграцию постмитотических нейронов из пролиферативных зон к месту локализации; 3) дифференциацию и приобретение молекулярных и морфологических особенностей (Engerer et al., 2017).

---

© О. С. Кожевникова, Д. В. Телегина, 2019

\* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-315-00216.

Все эти этапы имеют сложную регуляцию через транскрипционные факторы (ТФ), которые, действуя в соответствии с генетической программой и/или в ответ на внешние воздействия, инициируют или подавляют транскрипцию определенных генов, что влечет за собой изменения в клеточной морфологии, клеточной дифференцировке, морфогенезе, органогенезе и т. д. В результате взаимодействия тех или иных комбинаций ТФ происходит формирование различных типов нейронов сетчатки и одного типа глии из полипотентных предшественников (рис. 1). В сетчатке грызунов нейрогенез идет двумя волнами: во время эмбриогенеза, начиная с 10 дня (E10), формируются ганглионарные нейроны, горизонтальные клетки, некоторые амакриновые и фоторецепторные нейроны (в основном колбочки). В период раннего постнатального развития (P0-P7) продуцируются биполярные нейроны, клетки Мюллера, часть амакриновых и фоторецепторных нейронов (преимущественно палочки) (Серко, 2015).

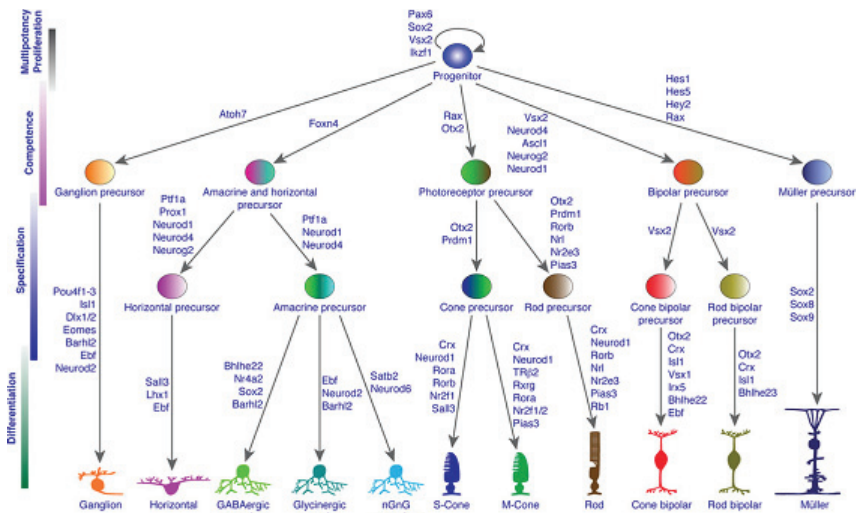


Рис. 1. Обобщенная схема известных транскрипционных факторов транскрипции и кофакторы, участвующих в мультипотентности, компетентности предшественников сетчатки, а также в спецификации и дифференциации различных типов клеток сетчатки (из обзора Xiang et al., 2013)

Важной особенностью сетчатки млекопитающих является то, что, в отличие от птиц и амфибий, которые могут регенерировать фоторецепторы, сетчатка млекопитающих во взрослом состоянии почти не способна к нейрогенезу de novo и имеет ограниченную регенеративную способность (Хиа

and Ahmad, 2016). В связи с этим заложенные в период созревания и формирования сетчатки структурно-функциональные особенности могут иметь отдаленные эффекты в онтогенезе, в том числе — повышать предрасположенность к ассоциированным со старением заболеваниям, таким как возрастная макулярная дегенерация (ВМД), усиливая чувствительность сетчатки к таким их универсальным триггерам, как воспаление и окислительный стресс.

Линия крыс OXYS, созданная в ИЦиГ СО РАН является уникальной моделью преждевременного старения, одним из проявлений которого становится раннее развитие ретинопатии, по клиническим и морфологическим проявлениям аналогичная ВМД у людей.

Целью работы явилось исследование изменения экспрессии транскрипционных факторов, регулирующих развитие сетчатки, у преждевременно-стареющих крыс OXYS и Вистар (контроль) в возрасте 20 дней, в период окончания постнатального созревания сетчатки у крыс.

В исследовании использовались полученные ранее данные массового параллельного секвенирования сетчатки крыс Вистар и OXYS в возрасте 20 дней (Telegina et al., 2015). Для оценки количества картированных прочтений (ридов) и анализа дифференциальной экспрессии был использован программный пакет HTSeq/DESeq. При заданной глубине секвенирования (40 млн. ридов длиной 50 нуклеотидов) установлено, что в сетчатке крыс OXYS и Вистар экспрессируется 64 транскрипционных фактора нейрогенеза, с числом прочтений больше 10. Наибольшее число прочтений было у гена *Crx* (более 11 000 ридов), а наименьшее — у генов *Ebf2*, *Mash1* и *Ascl1* (менее 17 ридов).

При заданной глубине прочтения обнаружено изменение экспрессии 9 генов у крыс OXYS по сравнению с крысами Вистар, из которых гены *Vsx2* и *Sox2*, имели повышенный уровень мРНК, а гены *Rb1*, *Ikzf1*, *Ascl1*, *Hes1*, *Pias3*, *Sall3* и *Barhl2* — пониженный ( $pval < 0.05$ ). Продукты этих генов участвуют в формировании клеток Мюллера (*Sox2*, *Hes1*), биполярных нейронов (*Ascl1* и *Vsx2*), фоторецепторных нейронов типа «палочек» (*Pias3*, *Rb1*), ГАМКергических и глутаматэргических амакриновых клеток (*Sox2*, *Barhl2*), горизонтальных (*Sall3*) и ганглионарных нейронов (*Barhl2*).

Наибольшие изменения экспрессии обнаружены для гена *Vsx2* ( $\text{Log}_2 \text{FoldChage} = 0.35$ ,  $\text{padj} < 0.05$ ), регулирующего спецификацию биполярных нейронов. Важно отметить, что изменена экспрессия транскрипционных факторов *Barhl2*, *Sall3*, *Sox2*, *Pias3* и *Rb1*, участвующих в дифференциации большинства типов нейронов сетчатки и клеток Мюллера (рис. 2).

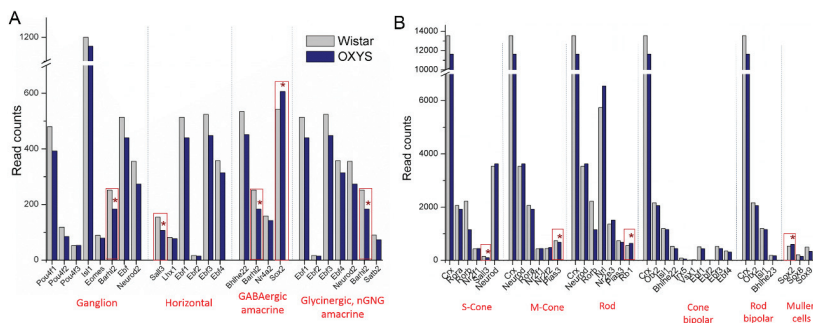


Рис. 2. Экспрессия транскрипционных факторов в сетчатке крыс OXYS и Вистар, участвующих в дифференциации различных типов клеток: А — ганглионарных, горизонтальных и амакриновых нейронов; В — колбочек, палочек, биполярных нейронов и клеток Мюллера. \* — межлинейные различия  $p$ вал  $< 0.05$

Таким образом, обнаруженные изменения экспрессии транскрипционных факторов, регулирующих нейрогенез сетчатки, у крыс OXYS по сравнению с крысами Вистар могут указывать на возможную задержку формирования нейронов сетчатки.

## Литература

- Engerer P. et al. Uncoupling of neurogenesis and differentiation during retinal development // The EMBO journal. 2017. С. e201694230.
- Cepko C. L. The determination of rod and cone photoreceptor fate // Annual Review of Vision Science. 2015. Т. 1. С. 211–234.
- Xia X., Ahmad I. Unlocking the neurogenic potential of mammalian müller glia // International journal of stem cells. 2016. Т. 9. №. 2. С. 169.
- Xiang M. Intrinsic control of mammalian retinogenesis // Cellular and molecular life sciences. 2013. Т. 70. №. 14. С. 2519–2532.
- Telegina D. V. et al. Identification of functional networks associated with cell death in the retina of OXYS rats during the development of retinopathy // Cell Cycle. 2015. V. 14.

**УДАЛЕНИЕ 3'UTR МРНК ORB2 ПРИВОДИТ К ИЗМЕНЕНИЮ  
УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ И ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ  
КОДИРУЕМОГО БЕЛКА В НЕЙРОНАХ  
ГОЛОВНОГО МОЗГА DROSOPHILA MELANOGASTER \***

3'UTR DELETION OF ORB2 MRNA RESULTLS IN CHANGING  
OF EXPRESSION LEVEL AND INTRACELLULAR LOCALISTION  
OF THIS PROTEIN IN DROSOPHILA MELANOGASTER NEUORNS  
IN CENTRAL BRAIN

Е. Н. Козлов, М. В. Жукова, Р. А. Гильмутдинов, Ю. В. Шидловский

*ФГБУН Институт биологии гена РАН*

E. N. Kozlov, M. V. Zhukova, R. A. Gilmutdinov, Y. V. Shidlovskii

*Institute of gene biology RAS, Russia*

E-mail: ugin.sfu@gmail.com

**Аннотация**

СРЕВ белки, представителем семейства которых является белок дрозофилы Orb2, участвуют в регуляции трансляции, взаимодействуя с регуляторными СРЕ-последовательностями в 3'UTR мРНК. В собственной мРНК Orb2 также присутствуют СРЕ-элементы, что указывает на возможное наличие механизмов авторегуляции экспрессии. Удаление 3'UTR Orb2 приводит к снижению экспрессии белка и изменению внутриклеточного распределения в зрелых нейронах головного мозга дрозофилы. Происходит снижение концентрации Orb2 в зоне синаптических контактов при сохранении локализации в соме нервных клеток. Полученные данные позволяют предположить наличие авторегуляции экспрессии Orb2 и важность этого процесса для внутриклеточной локализации в нейронах головного мозга взрослого насекомого.

**Abstract**

Drosophila Orb2 protein belongs to СРЕВ proteins family. These proteins take part in regulation of translation through interaction with special СРЕ-sequences

© Е. Н. Козлов, М. В. Жукова, Р. А. Гильмутдинов, Ю. В. Шидловский, 2019

\* Исследования выполнены при поддержке гранта РФФ 18-74-10051.

which located in 3'UTR of mRNA. Orb2 mRNA also contain CPE sequences and it point to presumably autoregulation processes in Orb2 expression. 3'UTR deletion leads to decrease in protein level and its intracellular distribution in mature neurons of adult drosophila brain. Orb2 protein level is decreased in synaptic contacts zone but its localization in cell soma is saved. Obtained results give us an opportunity to assume a functioning of autoregulation processes in Orb2 expression and its importance for intracellular localization in drosophila neurons.

Регуляция экспрессии генов осуществляется на многих уровнях, одним из которых является активация трансляции путем цитоплазматического полиаденилирования. Важную роль в этом процессе играют СРЕВ белки, распознающие в 3' нетранслируемой области мРНК СРЕ-последовательности, связываясь с которыми они способны привлекать дополнительные факторы полиаденилирования, что приводит к активации трансляции. В зависимости от модификаций (как правило, это фосфорилирование ферментами протеинкиназами) СРЕВ белки могут выступать как в качестве активаторов, так и репрессоров трансляции.

Особую роль СРЕВ белки играют в функционировании специализированных клеток с высокой степенью полярности, например, в нейронах, участвуя в локальной трансляции депонированных мРНК. У дрозофилы известно два представителя белков семейства СРЕВ — Orb и Orb2. Экспрессия Orb ограничена клетками половой линии, в то время как Orb2 экспрессируется в соматических тканях — мышечной и нервной. Для Orb установлено наличие процессов авторегуляции экспрессии, с помощью которой активация трансляции мРНК происходит на определенном этапе оогенеза. Для Orb2 этот вопрос пока не изучен, однако наличие СРЕ последовательностей в его мРНК позволяет предположить участие авторегуляции и в экспрессии Orb2.

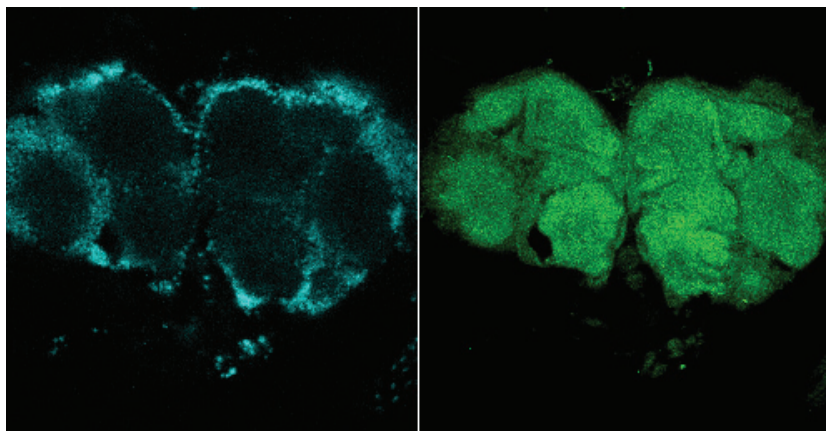
Для проверки данного предположения с помощью системы редактирования генома CRISPR/Cas9 (линия мух, в которой экспрессируется Cas9, использованная для микроинъекций в эмбрионы, — 51324, Bloomington stock center) был удален 3'UTR мРНК Orb2. Далее белковые экстракты из голов мух, гомозиготных по данной мутации, были использованы для постановки полуколичественного Вестерн блота (первичные антитела — 4G8, разведение 1:50, вторичные антитела — anti-mouse HRP conjugated, разведение 1:300). Нормализацию уровня экспрессии Orb2 проводили по тотальному белку с помощью системы Stain-free gel (Biorad). В качестве контроля использовали линию мух 51324. Также были приготовлены препараты головного мозга взрослых мух и гомозигот по делеции 3'UTR с последу-

ющей окраской антителами к Orb2 (2D11, разведение 1:100, вторичные антитела мышиные, конъюгированы с флуоресцентным красителем Alexa 488, разведение 1:1500). В работе использовались антитела производства Developmental study Hybridoma bank.

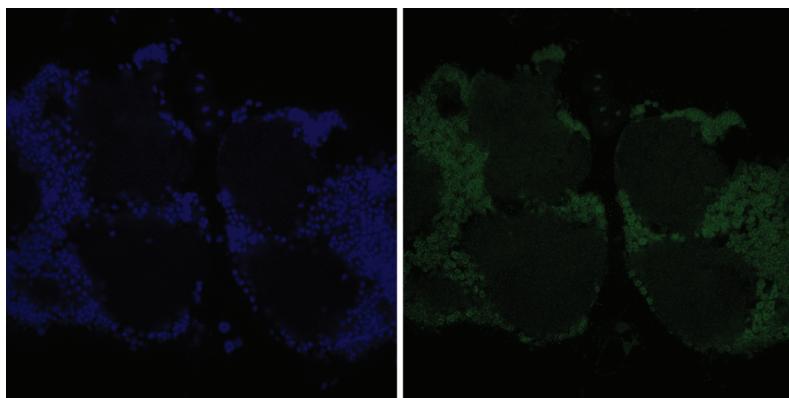
Результаты анализа полуколичественного Вестерн блота показали снижение содержания белка Orb2 в  $2,8 \pm 0,21$  раза (пять биологических повторностей,  $P \leq 0,05$ ) по сравнению с контролем. Мы предполагаем, что данное снижение является результатом нарушения процесса авторегуляции: потеря СРЕ-последовательностей приводит к невозможности поддержания экспрессии Orb2 на уровне дикого типа за счет активности собственно белка Orb2. Однако не стоит исключать возможность влияния делеции на стабильность мРНК, что может приводить к снижению экспрессии белка. Данный вопрос является предметом дальнейших исследований. Иммуноокрашивание мозга взрослых мух показало, что у дикого типа окраска Orb2 представлена широко в различных отделах мозга, белок детектируется как в соме клеток, так и нейрональных отростках (рис. 1), что соотносится с литературными данными. При анализе гомозигот по изучаемой делеции было обнаружено, что белок Orb2 практически исчезает из зоны синаптических контактов, сигнал детектируется практически только в соме клеток (рис. 2). Мы предполагаем, что данное изменение во внутриклеточной локализации обусловлено тем, что со своей собственной мРНК не связывается белок Orb2, который может участвовать в транспорте мРНК в нейронах, что было показано на примере других представителей семейства СРЕВ белков. Тем не менее, не стоит исключать возможность присутствия в 3'UTR неизвестных ранее регуляторных последовательностей, отвечающих за внутриклеточный транспорт мРНК. В продолжении работы мы изучим данный вопрос более подробно.

Таким образом, в данной работе было показано, что удаление 3'UTR мРНК, кодирующей белок Orb2, приводит к изменению его экспрессии и внутриклеточной локализации. Известно, что изучаемый белок участвует в формировании долговременной памяти, который опосредован образованием олигомерных комплексов двух изоформ белка — Orb2A/Orb2B. В данном процессе принимают участие Q-домены Orb2, которые не обладают РНК-связывающей активностью. Наши результаты позволяют предположить более широкую роль Orb2 в функционировании нервной системы дрозофилы, а именно участие во внутриклеточном транспорте целевых мРНК и различную степень активности в зависимости от занимаемого клеточного компартмента, что вносит вклад в синаптическую пластичность в рамках долговременных процессов нервной деятельности.





*Рис. 1.* Окраска мозга антителами к Orb2 дрозофилы, дикий тип: слева — окраска ядер по DAPI, справа — окраска антителами



*Рис. 2.* Окраска мозга антителами к Orb2 дрозофилы, делеция 3'UTR: слева — окраска ядер по DAPI, справа — окраска антителами

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ НЕКАНОНИЧЕСКИХ ФУНКЦИЙ РИБОСОМНОГО БЕЛКА eL29 ЧЕЛОВЕКА В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ\*

IDENTIFICATION OF HUMAN RIBOSOMAL PROTEIN eL29 FUNCTIONS  
IN THE REGULATION OF GENE EXPRESSION

А. В. Колобова<sup>1,2</sup>, А. В. Гопаненко<sup>1</sup>, А. А. Малыгин<sup>1,2</sup>,  
А. Е. Тупикин<sup>1</sup>, М. Р. Кабилов<sup>1</sup>, Г. Г. Карпова<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Институт химической биологии  
и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*  
<sup>2</sup> *Новосибирский государственный университет, Новосибирск*

A. V. Kolobova<sup>1,2</sup>, A. V. Gopanenko<sup>1</sup>, A. A. Malygin<sup>1,2</sup>,  
A. E. Tupikin<sup>1</sup>, M. R. Kabilov<sup>1</sup>, G. G. Karpova<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of  
the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk*

<sup>2</sup> *Department of Molecular Biology, Novosibirsk State University, Novosibirsk*

E-mail: alyona\_kolobova@rambler.ru

### Аннотация

Данная работа посвящена изучению влияния вне ribосомных (неканонических) активностей ribосомного белка eL29 человека, которые могут быть задействованы в регуляции экспрессии некоторых генов. С использованием методов ribосомного профайлинга и количественной ПЦР нами было показано, что снижение содержания ribосомного белка eL29 в клетках HEK293T приводит к изменению экспрессии на уровне трансляции генов *CLIC4*, *TFAM*, *CHCHD3*, *G3BP1*, что может свидетельствовать о вовлечении ribосомного белка eL29 в регуляцию экспрессии этих генов на уровне трансляции.

### Abstract

This research is focused on identification of extraribosomal (non-canonical) activities of human ribosomal protein eL29, which could participate in regulation of several genes

---

© А. В. Колобова, А. В. Гопаненко, А. А. Малыгин, А. Е. Тупикин, М. Р. Кабилов, Г. Г. Карпова, 2019

\* Работа поддержана грантом РФФИ 18-34-00096 и частично ПФНИ ГАН на 2017–2020 гг. (базовый проект № VI.57.1.2, 0309-2016-0001).

expression. Using the methods of ribosomal profiling and qPCR, we have shown that decrease in the level of this protein in HEK293T cells leads to changes in the expression of *CLIC4*, *TFAM*, *CHCHD3*, *G3BP1* at the translation level. The data obtained suggest that the eL29 protein is involved in the control of gene expression at the translation level.

Рибосомный белок eL29 человека — это структурный компонент 60S субчастицы рибосомы с молекулярной массой 18 кДа. N-концевая часть этого белка погружена в рибосому, а неструктурированная C-концевая часть свободно располагается на ее поверхности. В отличие от многих рибосомных белков данный белок не является критически необходимым для процессов трансляции. Кроме того, известно, рибосомный белок eL29 обладает некоторыми внерибосомными активностями. Например, установлено, что eL29 экспонирован на поверхности клеточных мембран и связывается с гепарином [1].

Ранее, на мышцах, нокаутных по гену *Rpl29*, кодирующему рибосомный белок eL29, было показано, что хотя животные и жизнеспособны, у них наблюдаются многочисленные серьезные нарушения в эмбриональном и постэмбриональном развитии. Нокаутные мыши отличались от здоровых меньшим размером, повышенной хрупкостью костей, гиперцементозом зубов, пониженной фертильностью и другими отклонениями [2]. Исходя из этих данных можно предположить, что рибосомный белок eL29 имеет неканонические функции, которые связаны с регуляцией экспрессии специфических генов на уровне трансляции.

С применением методов рибосомного профайлинга и количественной ПЦР мы показали, что снижение содержания рибосомного белка eL29 в клетках HEK293T приводит к изменению экспрессии на уровне трансляции ряда генов, в частности к снижению уровня транслируемых мРНК для генов *CLIC4*, *TFAM*, *CHCHD3*, *G3BP1*. Эти изменения не оказывают существенного влияния на общую трансляционную активность клеток.

Полученные данные указывают на участие рибосомного белка eL29 в регуляции экспрессии генов на уровне трансляции, вероятно, через взаимодействие с регуляторными элементами в их мРНК.

## Литература

1. D'Souza, S. Yang, W., Marchetti, D. /HIP RPL29 Antagonizes VEGF and FGF2 Stimulated Angiogenesis by Interfering With HS-Dependent Responses // Journal of Cellular Biochemistry, 2008, V. 105, N 5, P. 1183–1193.

2. Oristian, D.S., Sloofman, L.G., Zhou, X. et al. Ribosomal protein L29/HIP deficiency delays osteogenesis and increases fragility of adult bone in mice // Mater. Sci., 2010, V. 27, N 1, P. 28–35.

## ВЛИЯНИЕ ЭКТОПИЧЕСКОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА PDX1 НА ПРОЛИФЕРАТИВНЫЙ И МИГРАЦИОННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ КЛЕТОК РАКА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ\*

EFFECT OF PDX1 OVEREXPRESSION ON THE PROLIFERATIVE  
AND MIGRATION POTENTIAL OF PANCREATIC CANCER CELLS

Л. Г. Кондратьева, И. П. Чернов

*Институт биоорганической химии  
им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, Москва, Россия*

L. G. Kondratyeva, I. P. Chernov

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia*

E-mail: liakondratyeva@yandex.ru

### Аннотация

Метастазирование является основной причиной смертности у онкологических больных и часто встречается на ранней стадии развития рака. Протоковая аденокарцинома поджелудочной железы (ПАПЖ) является типичным примером, где раннее метастазирование является основной причиной смертности. ПАПЖ представляет серьезную проблему для терапии из-за сочетания обычно поздней диагностики, агрессивного клинического течения и плохой реакции на химио- и лучевую терапию. Это делает проблему терапии ПАПЖ чрезвычайно актуальной. В данной работе проведено *in vitro* исследование влияния экспрессии гена ключевого фактора развития поджелудочной железы PDX1 на пролиферацию и подвижность клеток линий рака поджелудочной железы.

### Abstract

Metastasis is the main cause of death in cancer patients and often occurs at an early stage of cancer. Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is a typical example where early metastasis is the leading cause of death. PDAC is a serious problem for therapy due to a combination of usually late diagnosis, aggressive clinical course and a poor reaction to chemotherapy and radiation therapy. This makes the problem of PDAC therapy extremely urgent. The current study presents an *in vitro* study of the expression of PDX1, a key factor of pancreatic development, influence on the proliferation and mobility of pancreatic cancer cells.

---

© Л. Г. Кондратьева, И. П. Чернов, 2019

\* Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 19-15-00317).

Протоковая аденокарцинома поджелудочной железы (ПАПЖ) является одним из наиболее трудно поддающихся лечению видов опухолевых заболеваний. ПАПЖ находится на пути к тому, чтобы перейти с четвертого на второе место в мире к 2030 году среди причин смертности от рака. Частота возникновения и смертность от рака поджелудочной железы почти одинаковы из-за сочетания обычно поздней диагностики, агрессивного клинического течения и плохой эффективности химио- и лучевой терапии [1]. Ранняя резекция первичной опухоли без обнаруживаемых метастазов предотвращает дальнейший рост опухоли и, следовательно, дальнейшее распространение опухоли и увеличивает выживаемость. К сожалению, даже радикальная хирургия не предотвращает развитие потенциальных метастазов из ранее распространенных раковых клеток [2].

Метастазирование представляет собой сложный процесс, большинство видов рака обладают присущими ему особенностями метастазирования и точные события распространения раковых клеток с первичного участка их миграция и последующее внедрение в отдаленные участки организма неизвестны. Очевидно, что это сложная серия событий, на которые влияют как внутриклеточный процесс мутирования, многочисленные взаимодействия между злокачественными и стромальными клетками, так и внешние сигналы от внеклеточного матрикса. К таким изменениям клеток относятся, в частности, активация в клетках миграционных механизмов и появление у них свойств стволовых клеток, позволяющих выживать и пролиферировать на новом месте [3].

Известно, что при канцерогенезе многих видов рака, в том числе при ПАПЖ, происходит изменение экспрессии ключевых генов, определяющих дифференцированное состояние клеток. В случае ПАПЖ такими генами являются *PTF1a*, *SOX9*, *GATA4*, *HNF1b* и *PDX1* [4]. Восстановление функциональности этих генов в клетках ПАПЖ потенциально может оказывать противораковое действие.

В данной работе исследовали влияние экспрессии гена ключевого фактора развития поджелудочной железы *PDX1* на пролиферацию и подвижность клеток линий рака поджелудочной железы *PANC1*, *VxPC3*, *MIA PaCa-2*, *Colo375* и *Sarpan-2*. Клетки соответствующих линий заражали лентивирусными частицами, несущими вектор, содержащий ген устойчивости к пурамицину и кодирующую часть гена *PDX1* под контролем промотора гена *PCNA* человека (Рис.1 А) или вектор несущий только ген устойчивости. После заражения вирусными частицами и последующей селекции в среде с пурамицином были получены культуры этих клеток, эктопически экспрессирующие *PDX1* и контрольные клетки, трансдуцированные лентивирусом, не содержащим ген *PDX1*. Анализ уровня экспрессии гена и синтеза белка *PDX1* в исследованных клеточных культурах проводили с помощью количе-

ственного ОТ-ПЦР в реальном времени и вестернблоттинга со специфическими к PDX1 антителами (рис. 1 Б и В).

Для выявления возможного влияния эктопической экспрессии PDX1 в клеточных культурах линий ПАПЖ на скорость их роста мы исследовали кинетику роста этих культур *in vitro* при помощи MTS-теста. На Рис. 2А приведены результаты определения относительного прироста PDX1-экспрессирующих клеток и контрольных культур клеток рака поджелудочной железы. Полученные данные показывают, что экспрессия гена PDX1 увеличивает скорость роста клеток линии PANC-1 в 1,7 раз, ВхРС-3 — в 2,3 раза, Colo357 в — 1,6 раз, MIA PaCa2 в — 1,4 раза к седьмому дню культивации. На скорость роста клеток линии Саран-2 экспрессия PDX1 не повлияла.

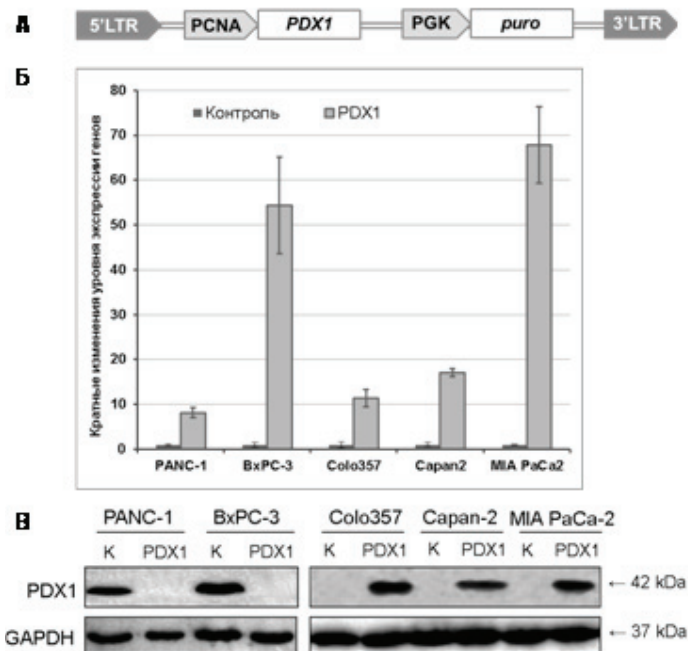
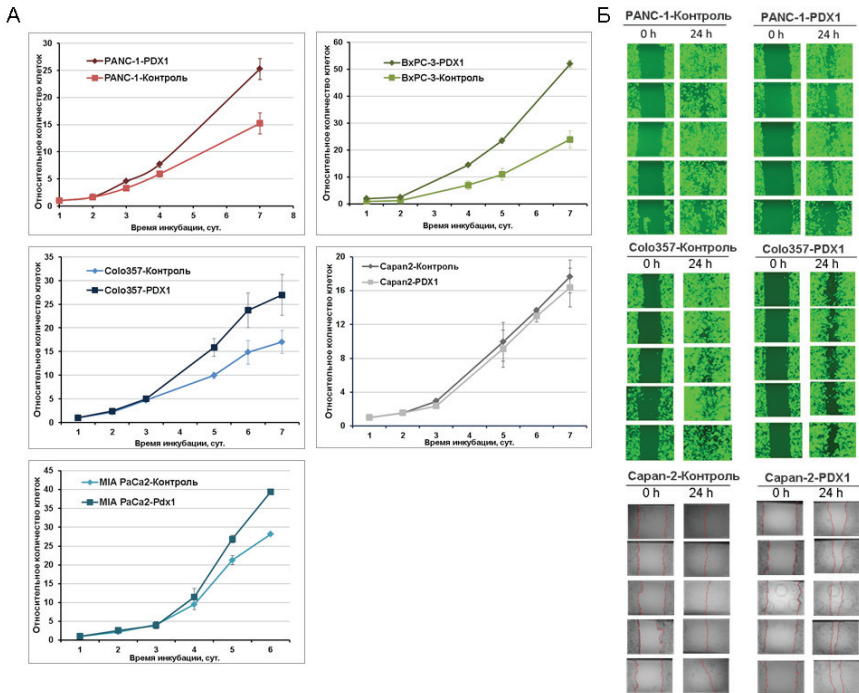


Рис. 1. А. Схема лентивирусной конструкции, используемой для получения культур клеток рака поджелудочной железы, эктопически экспрессирующих PDX1. Б. Кратные изменения уровней экспрессия гена PDX1 в полученных клетках относительно контрольных клеток. Данные представлены как среднее  $\pm$  S.D. по 3–5 независимым экспериментам. В. Вестерн-блот анализ уровней синтеза белка PDX1 в клетках линий рака поджелудочной железы, экспрессирующих PDX1 и контрольных. Уровни синтеза белка GAPDH использовали для контроля общего количества белка, нанесенного на дорожки

Влияние фактора PDX1 на миграцию оценивали на модели механического повреждения или «раневой поверхности» монослойных культур контрольных и экспрессирующих PDX1 клеток в течение 24 часов. После нанесения царапины на монослой клеток области раны фотографировали. Спустя 24 часа наблюдали, как клетки мигрируют в область повреждения и заполняют пустую поверхность, и делали повторные снимки областей повреждения в тех же местах, для которых были получены микрофотографии сразу после нанесения царапины (рис. 2 Б). По сравнению с контрольными клетками «зарастание»



*Рис. 2. А. Кинетика роста PDX1-экспрессирующих культур линий клеток рака поджелудочной железы и соответствующих контрольных культур. Данные нормированы относительно значений оптической плотности культур в первый день эксперимента. Б. Оценка влияния экспрессии PDX1 на модели механического повреждения монослойных культур: области раны на монослое клеток PANC-1, Colo357 и Сарап-2, контрольных и экспрессирующих PDX1 сразу после нанесения царапины (0ч) и спустя 24 ч. Клетки линий PANC-1 и Colo357 предварительно флуоресцентно метили GFP и делали снимки во флуоресцентном канале. Для линии Сарап-2 анализ проводили в световом поле. Представлены по 5 выборочных фото из 3-5 независимых экспериментов*

раны клетками, экспрессирующими PDX1, было замедлено для линий PANC-1, Colo357 и Саран-2. Контрольные клетки линий ВхРС-3 и М1А РаСа-2 сами по себе не обладали способностью к миграции, поэтому для них такое сравнение не проводилось. Таким образом, было показано, что экспрессия PDX1 в клетках линий PANC-1, Colo357 и Саран-2 значительно снижала миграцию.

Про PDX1 известно, что он является контекстно-зависимым медиатором инициирования и прогрессирования ПАПЖ [5]. Белок PDX1 имеет решающее значение для развития рака и его блокирование может привести к более агрессивным опухолям. Необходимы дополнительные исследования для определения того, как PDX1 взаимодействует с различными корегуляторами, и модулирует критические аспекты формирования рака. Полученные в данной работе результаты открывают возможность генно-терапевтического использования доставки *PDX1* в ПАПЖ с пониженной или отсутствующей экспрессией этого гена, которые являются особенно агрессивными.

### Литература

1. Dugnani E, Sordi V, Pellegrini S, et al. Gene expression analysis of embryonic pancreas development master regulators and terminal cell fate markers in resected pancreatic cancer: A correlation with clinical outcome. *Pancreatology*. 2018. 18(8):945–953.
2. Ansari D, Friess H, Bauden M, Samnegard J, Andersson R. Pancreatic cancer: disease dynamics, tumor biology and the role of the microenvironment. *Oncotarget*. 9(5):6644–6651.
3. Чикина А. С., Александрова А. Ю. Метастазирование: клеточные механизмы и их регуляция. *Молекулярная Биология*. 2014. 48(2): 195–213.
4. Кондратьева Л. Г., Чернов И. П., Зиновьева М. В., Копанцев Е. П., Свердлов Е. Д. Экспрессия генов мастер-регуляторов эмбрионального развития в опухолях поджелудочной железы. *Доклады Академии Наук*. 2017. 475(1): 99–102.
5. Roy N., Takeuchi K. K., Ruggeri J. M., et al. PDX1 dynamically regulates pancreatic ductal adenocarcinoma initiation and maintenance. *Genes Dev*. Dec 15 2016;30(24):2669–2683.



**ИССЛЕДОВАНИЕ ЭМАЛЕВЫХ ПРИЗМ ПРИ ДИСПЛАЗИИ  
СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ В РАЗЛИЧНЫЕ ПЕРИОДЫ  
ПОСТНАТАЛЬНОГО ОНТОГЕНЕЗА МЕТОДОМ  
АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ**

RESEARCH OF ENAMEL PRISMS OF TEETH WITH DYSPLASIA  
OF CONNECTIVE TISSUE AT DIFFERENT PERIODS OF POSTNATAL  
ONTOGENESIS BY ATOMIC-POWER MICROSCOPY

А. С. Коршунов<sup>1</sup>, В. П. Конев<sup>1</sup>, В. Д. Вагнер<sup>2</sup>, К. Н. Курятников<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *ФГБОУ ВО «Омский государственный  
медицинский университет» Минздрава России*

<sup>2</sup> *ФГБУ Центральный научно-исследовательский институт  
стоматологии и ЧЛХ Минздрава России*

A. S. Korshunov<sup>1</sup>, V. P. Konev<sup>1</sup>, V. D. Vagner<sup>2</sup>, K. N. Kuryatnikov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Omsk State Medical University, Russia*

<sup>2</sup> *Central Research Institute of Dentistry and Maxillofacial Surgery, Russia*

E-mail: Andrey\_K\_180588@mail.ru

**Аннотация**

В работе представлены результаты исследования эмалевых призм ретинированных зубов 3.8 при дисплазии соединительной ткани и без нее в 15–20, 21–30, 31–40, 41–50, 51–60 лет методом атомно-силовой микроскопии. Установлено, что при дисплазии соединительной ткани во всех возрастных группах наблюдается картина незавершенного (диспластического) амелогенеза за счет выраженного полиморфизма эмалевых призм, низкой их упаковки и большим расстояниям между призмами, что приводит к прорезыванию зуба с некачественной эмалью.

**Abstract**

The paper presents the results of a study of enamel prisms of impacted teeth 3.8 with connective tissue dysplasia and without it at different age periods: 15–20, 21–30, 31–40, 41–50, 51–60, using atomic force microscopy. It has been established that with connective tissue dysplasia in all age groups, a picture of incomplete (dysplastic) amelogenesis is observed due to the expressed polymorphism of enamel prisms, their low-rate packing and large distances between prisms, which leads to the eruption of the tooth with poor-quality enamel.

## **Введение**

По современным представлениям становится очевидным, что эмаль зуба человека является высокоорганизованной, многофункциональной тканью со сложной ультраструктурной организацией, благодаря чему она в течение всей жизни изменяется и приспосабливается к неблагоприятным факторам внешней и внутренней среды (Nieminen, 2009; Wangetal., 2009). Известно, что эмалевые призмы в течение длительного пути развития и созревания видоизменяются, а их структура зависит от развития и созревания органического матрикса (Weiss et al., 2011; Cuisinier et al., 2012). Растущие эмалевые призмы уплотняются, на их поверхности уменьшается количество неровностей, выступов, форма становится аркообразной, многогранной (Fukumoto et al., 2014; А. С. Коршунов, 2017; В. Д. Вагнер, В. П. Конев, 2019).

## **Цель исследования**

Изучить структуру эмалевых призм в различные периоды постнатального онтогенеза при дисплазии соединительной ткани и без нее методом атомно-силовой микроскопии.

## **Материал и методы**

У 200 человек мужского пола при дисплазии соединительной ткани (ДСТ) в 15–20, 21–30, 31–40, 41–50, 51–60 лет удаляли по одному ретинированному 3.8 зубу по ортодонтическим показаниям. Готовили шлифы образцов эмали зубов по методике ОмГМУ (Патент РФ № 2458675 от 20.08.2012) под контролем глубины сошлифованной эмали стоматологическим глубиномером (Патент РФ № 187021 от 13.02.2019). Анализ АСМ-изображений выполняли в программе Image Analysis NT-VDT, при этом анализировали форму, упаковку расстояние между эмалевыми призмами. Математическая обработка данных проводилась с помощью статистического пакета Statistica 12.0 (StatSoftInc. USA).

## **Результаты**

Эмалевые призмы во всех возрастных группах без ДСТ правильно упорядочены, представлены аркообразной, многогранной 7-гранной формой. Наименьшая степень вариабельности наблюдалась в группах 41–50 лет (доля 7-гранных призм составляет 60 %), 51–60 лет (доля 7-гранных призм составляет 70 %). На долю 6-гранных призм в указанных группах приходится 35 % (41–50 лет — 40 %, 51–60 лет — 30 %), 5-гранные призмы не визуализируются. В группе 15–20 лет доля 7-гранных призм составляет 30 %, 6-гранных — 40 %, 5-гранных — 30 % (Рисунок 1). В группе 21–30 лет доля

7-гранных призм составляет 40 %, 6-гранных — 50 %, 5-гранных — 10 %. В группе 31–40 лет доля 7-гранных призм составляет — 60 %, 6-гранных — 35 %, 5-гранных — 5 %.

В группе с ДСТ эмалевые призмы имеют неправильную, слабо упорядоченную форму. В возрастных группах 15–20, 21–30 лет встречается пирамидальная форма эмалевых призм, после 30 лет она приобретает аркообразную форму (рис. 2). Наименьшую степень упорядоченности наблюдали в группах 15–20 лет (доля 5-гранных призм составляет 60 %). На долю 6-гранных призм в указанной группе приходится 30 % и 7-гранных призм 10 %. Аналогичную морфологическую картину встречали в группе 21–30 лет (доля 5-гранных призм — 50 %, 6-гранных призм — 40 %, 7-гранных — 10 %). После 30 лет в группе с ДСТ появляется упорядоченность и правильная ориентация эмалевых призм, где доля 7-гранных призм в группе 31–40 лет увеличивается до 40 %, в 41–50, 51–60 лет до 50–60 %, при уменьшении доли 5-гранных призм до минимальных значений в группе с ДСТ только в 51–60 лет до 20 %, в 31–40, 41–50 лет до 30 %.

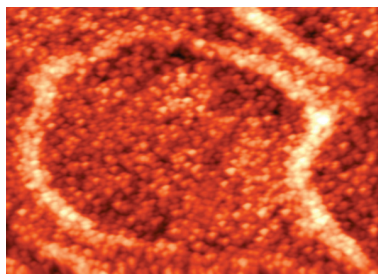


Рис. 1. Типичное строение эмалевой призмы без ДСТ в 15–20 лет (атомно-силовая микроскопия), ув.  $\times 100000$

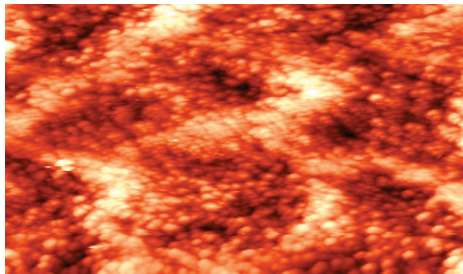


Рис. 2. Типичное строение эмалевой призмы с ДСТ в 15–20 лет (атомно-силовая микроскопия), ув.  $\times 100000$

С возрастом изменяется форма, упорядоченность и ориентация эмалевых призм. Упорядоченность и ориентация определяется не только плотностью упаковки, но и расстоянием между ними.

Плотность упаковки и расстояние между эмалевыми призмами являются важными показателями, указывающие на морфологическую зрелость эмали зубов и определяющие ее качественные показатели после прорезывания зуба. Наименьшие показатели расстояния между эмалевыми призмами в группе без ДСТ наблюдали в группах 41–50 лет ( $0,37 \pm 0,04$  нм) и 51–60 лет

( $0,32 \pm 0,01$  нм). В группах 15–20 лет ( $0,65 \pm 0,03$  нм), 21–30 лет ( $0,72 \pm 0,02$  нм), 31–40 лет ( $0,53 \pm 0,03$  нм) отмечаются высокие показатели, что указывает на значительное расстояние между ними. В группе с ДСТ имеются количественные изменения по данному показателю (в 15–20 лет  $1,24 \pm 0,39$  нм, 21–30 лет  $1,57 \pm 0,24$  нм, 31–40 лет —  $1,09 \pm 0,12$  нм, 41–50 лет —  $0,97 \pm 0,21$  нм, 51–60 лет —  $0,91 \pm 0,11$  нм). Несмотря на отличимые количественные изменения и большое расстояние в группе с ДСТ, они указывают на активный рост и развитие эмалевых призм, достоверно отличающиеся от нормальных возрастных значений группы без ДСТ.

Исследования другого не менее важного показателя, указывающего на зрелость эмалевых призм, является плотность их упаковки, имеющая свои возрастные характеристики. Наиболее постоянные и высокие показатели наблюдаются в группах без ДСТ в 41–50 лет с очень плотной упаковкой в  $6,23 \pm 0,21$  на срезе площадью 100 кв. мкм и 51–60 лет также с очень плотной упаковкой в  $6,54 \pm 0,22$  на срезе площадью 100 кв. мкм. Менее плотную упаковку эмалевых призм наблюдали в группах 31–40 лет ( $6,02 \pm 0,25$  на срезе площадью 100 кв. мкм), 21–30 лет ( $5,99 \pm 0,11$  на срезе площадью 100 кв. мкм), 15–20 лет ( $5,98 \pm 0,13$  на срезе площадью 100 кв. мкм) (средние значения плотности упаковки зрелой эмали  $6,23 \pm 0,14$  на срезе площадью 100 кв. мкм). В группе с ДСТ низкие цифровые интервалы указывают на недостаточную плотность упаковки эмалевых призм во всех группах с ДСТ (15–20 лет —  $3,32 \pm 0,12$  на срезе площадью 100 кв. мкм, 21–30 лет —  $3,57 \pm 0,21$  на срезе площадью 100 кв. мкм, 31–40 лет —  $4,02 \pm 0,16$  на срезе площадью 100 кв. мкм, 41–50 лет —  $3,77 \pm 0,31$  на срезе площадью 100 кв. мкм, 51–60 лет —  $3,62 \pm 0,19$  на срезе площадью 100 кв. мкм).

## Выводы

Морфологическая структура эмалевых призм в ретинированных зубах 3.8 при дисплазии соединительной ткани характеризуется выраженным полиморфизмом, низкой их упаковкой и большим расстоянием между призмами до 30 лет, после 30 лет хаотичный характер сохраняется, но структура становится более упорядоченной, что указывает на наличие незавершенного (диспластического) амелогенеза. Без дисплазии соединительной ткани структура упорядоченная, в 41–50 лет, 51–60 лет доминируют 7-гранные и отсутствуют 5-гранные эмалевые призмы.

## Литература

1. Вагнер В. Д., Конев В. П., Коршунов А. С. Изучение возрастных изменений минерального компонента и органического матрикса эмали зубов человека метода-

---

ми электронной и атомно-силовой микроскопии // Клиническая стоматология. 2019. Т. 91. № 3. С. 8–10.

2. Коршунов А. С., Конев В. П., Московский С. Н. [и др.] Взаимоотношение минерального и органического матрикса эмали ретинированных зубов при дисплазии соединительной ткани // Практическая медицина. 2017. № 7(108). С. 152–155.

**ВЫЯВЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНЫХ ЗАМЕН НА УЧАСТКЕ ГЕНА NS5A ВИРУСА ГЕПАТИТА С, СВЯЗАННЫХ С УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ЛЕКАРСТВЕННЫМ ПРЕПАРАТАМ ПРЯМОГО ДЕЙСТВИЯ**

**THE DETECTION OF AMINO ACID SUBSTITUTIONS ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO DIRECT ACTING ANTIVIRAL THERAPY IN NS5A GENE OF HEPACIVIRUS C**

А. И. Кузнецов, Е. В. Чуб, Е. И. Кривошеина

*ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора*

A. I. Kuznetsov, E. V. Chub, E. I. Krivosheina

*SRC VB "Vector" Rospotrebnadzor, Russia*

E-mail: alexkuzne.yan@yandex.ru

**Аннотация**

Появление определенных аминокислотных замен в тех генах вируса гепатита С, на подавление которых направлены противовирусные препараты прямого действия, может приводить к возникновению устойчивости вируса против лечения. В данной работе представлены результаты поиска аминокислотных замен по позициям, описанным в научной литературе, как ассоциированные с устойчивостью вируса гепатита С к противовирусным препаратам прямого действия на основе выборки образцов от пациентов Новосибирской области.

**Abstract**

The appearance of certain amino acid substitutions in those genes of hepacivirus C for which direct antiviral drugs are directed may lead to the emergence of the virus resistance against this kind of treatment. This study presents the results of the search for resistance-associated amino acid substitutions by described positions based on samples from patients in the Novosibirsk region.

**Введение**

Гепатит С — вирусное заболевание, часто характеризующееся постепенным бессимптомным развитием поражения клеток печени человека с высокой вероятностью хронизации инфекции после острой фазы. У лю-

дей, инфицированных вирусом гепатита С, при отсутствии своевременного лечения могут возникать тяжелые осложнения вплоть до цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы. На сегодняшний день разработаны эффективные меры борьбы с вирусом при помощи противовирусных препаратов прямого действия (ПППД), которые позволяют в 95–100 % случаев добиться устойчивого вирусологического ответа (УВО) после прохождения полного курса лечения. ВОЗ призывает использовать такие препараты в виде комбинированной терапии из двух или трех лекарственных средств, которые в сочетании подавляли бы одновременно несколько жизненно важных функций в репликативном цикле вируса. С каждым годом ПППД набирают популярность по всему миру, в том числе и среди граждан России. Однако, несмотря на достаточно высокую эффективность данных препаратов, иногда отмечаются и случаи неудачного лечения. Показано, что пациенты, не достигшие УВО после прохождения полного курса лечения оригинальными ПППД, были инфицированы устойчивыми популяциями вируса, слабо чувствительными к тому или иному препарату. Молекулярно-генетический анализ изолятов вируса от множества таких пациентов выявил, что устойчивые варианты имеют аминокислотные замены в одних и тех же позициях, а пространственное моделирование показало, что сами аминокислотные позиции пространственно располагаются в непосредственной близости друг от друга. Предположительно, возникновение таких устойчивых форм обусловлено неудачными попытками монотерапии, что в конечном итоге привело к их распространению. Эта проблема непосредственно актуальна для ВГС/ВИЧ-коинфицированных людей, у которых стадии развития поражения печени протекают значительно быстрее и тяжелее. Поэтому диагностика ВИЧ-инфицированных пациентов, как группы риска коинфекции — одна из приоритетных задач. Кроме того, многие люди, готовые пройти и без того дорогостоящее лечение препаратами прямого действия, заинтересованы в том, чтобы узнать будет ли лечение современными средствами достаточно эффективным.

Цель данной работы заключалась в поиске аминокислотных замен на участке гена NS5a, для которых показано влияние на возникновение устойчивости вируса гепатита С к лечению ПППД, в образцах, полученных от ВИЧ-инфицированных людей в Новосибирской области.

### **Материал и методы**

Для 19 образцов, полученных от ВИЧ-инфицированных пациентов в Новосибирской области в 2016 г., показавших положительные результа-

ты скрининг теста на вирус гепатита С, были установлены нуклеотидные последовательности фрагмента гена NS5a длиной 790 п.н. (6218–7008) методом секвенирования по Сэнгеру. Полученные нуклеотидные последовательности затем были транслированы *in silico* в аминокислотные последовательности. В исследованный участок гена вошло 9, описанных на сегодняшний день, позиций аминокислот (нумерация с начала гена: 24, 28, 30, 31, 32, 38, 58, 92, 93), замены в которых могут приводить к повышению устойчивости вируса к соответствующим лекарственным препаратам прямого действия. Участок подбирался таким образом, чтобы были учтены следующие требования: участок должен был содержать как можно больше интересующих позиций, замены должны быть многократно научно описаны.

### Результаты

В результате анализа нуклеотидных последовательностей 19 отобранных образцов было установлено, что 11 из них относились к субтипу 1b, а остальные 8 — к субтипу 3a вируса гепатита С. Для 3 исследованных образцов были получены только короткие прочтения (номера 12, 13, 15). В качестве прототипов, с которыми проводилось сравнение, были взяты последовательности «HCV\_1bCon1» (AJ238799.1) и «HCV\_3aS52» (GU814263.1) из базы данных GenBank. Суммарное количество аминокислотных замен, выявленных во всех 19 исследованных образцах, составило 199 случаев. В 3 образцах были найдены замены в искомым участках:

1) L28M (субтип 1b) — слабая устойчивость к Daclatasvir, Ombitasvir, Elbasvir;

2) Y93H (субтип 3a) — слабая устойчивость к Pibrentasvir, высокая устойчивость к Elbasviri Velpatasvir, высокая устойчивость к Daclatasvir, Ledipasvir, Ombitasvir;

3) R30Q, L31M (субтип 1b) — слабая устойчивость к Daclatasvir, Ombitasvir, Elbasvir, Velpatasvir.

Для двух образцов было выявлено только по одной замене, причем у одного образца мутация отличалась низкой степенью влияния на устойчивость вируса, а у другого — крайне высокой. Третий образец содержал сразу две мутации, которые по отдельности характеризуются слабым воздействием.



**Результат определения аминокислотных остатков в исследуемых  
позициях гена NS5a вируса гепатита С**

Номер образца	Субтип	Аминокислотный остаток (нумерация с начала гена NS5a)								
		24	28	30	31	32	38	58	92	93
1	1b	Q	L	R	L	P	S	P	A	Y
2	1b	Q	L	R	L	P	S	P	A	Y
3	1b	Q	L	R	L	P	S	P	A	Y
4	1b	Q	L	R	L	P	S	P	A	Y
5	1b	Q	L	R	L	P	S	P	A	Y
6	3a	S	M	A	L	P	S	P	E	Y
7	1b	Q	M	R	L	P	S	P	A	Y
8	1b	Q	L	R	L	P	S	P	A	Y
9	3a	S	M	A	L	P	S	P	E	Y
10	3a	S	M	A	L	P	S	P	E	H
11	1b	Q	L	R	L	P	S	P	A	Y
12	3a	–	–	–	–	–	–	P	E	Y
13	3a	–	–	–	–	–	–	P	E	Y
14	3a	S	M	A	L	P	S	P	E	Y
15	3a	–	–	–	–	–	–	–	E	Y
16	1b	Q	L	R	L	P	S	P	A	Y
17	1b	Q	L	R	L	P	S	P	A	Y
18	3a	S	M	A	L	P	S	P	E	Y
19	1b	Q	L	Q	M	P	S	P	A	Y

### **Выводы**

В Новосибирской области были обнаружены изоляты вируса гепатита С, имеющие аминокислотные замены, которые могут привести к снижению эффективности лечения пациентов препаратами прямого действия, направленными на ингибирование продукта гена NS5a. Из 19 проанализированных проб, 3 образца имели описанные замены, что составило 15,8% от всей выборки. Один образец содержал сразу две искомые замены. Люди, инфицированные вирусом с такими мутациями, при ошибочном подборе лекарственных препаратов рискуют пройти безуспешное дорогостоящее лечение.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАПУСКА КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ  
АКТИВИРОВАННОЙ МАЛОЙ ГТФАЗОЙ RAC1 ПРИ  
ТРАНСЛОКАЦИИ ЕЁ В ЯДРО ПОД ДЕЙСТВИЕМ СТАТИНОВ  
И БИСФОСФОНАТОВ**

GERANYLATION INHIBITORS SHOW SELECTIVE TOXICITY  
ON NF2-NULL CELLS, WHICH IS DRIVEN BY ACTIVATED  
RAC1 TRANCSLOCATION TO THE NUCLEUS

Ф. В. Куликов, Д. С. Степанова, Л. А. Браун,  
Д. С. Татаркова, Г. А. Завьялов, Н. Л. Шимановский

*ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский  
университет им. Н. И. Пирогова*

F. V. Kulikov, D. S. Stepanova, L. A. Braun,  
D. S. Tatarikova, G. A. Zavyalov, N. L. Shimanovskiy

*Pirogov Russian National Research Medical University (RNRMU), Russia*

E-mail: [phv.kulikov@gmail.com](mailto:phv.kulikov@gmail.com)

**Аннотация**

Продукт гена *NF2* мерлин до сих пор остается одним из наименее изученных онкосупрессоров. Открытый изначально в качестве структурного белка, он вскоре был также отнесен в класс белков-регуляторов множества пролиферативных каскадов, таких сигнальных путей как Рак и Рас, рецепторных тирозинкиназ, пути передачи сигнала mTog и многих других. До сих пор точные механизмы посредством которых мерлин участвует в регуляции этих путей остаются не до конца выясненными, и поэтому специфичной терапии нейрофиброматоза II типа пока что не разработано из-за обилия этих каскадов. В нашем исследовании мы направили своё внимание на патологическую активацию Rac1 в *Nf2*-дефицитных клетках и на новой цитотоксической функции этого активированного белка незаякоренного на мембране.

Наши исследования показали, что два зарегистрированных лекарственных вещества, симвагастин и золедронат, могут быть полезны в лечении НФ-2-зависимых шванномах.

Также мы показали новую цитотоксическую функцию незакрепленной на клеточной мембране активированной малой ГТФазы Rac1, которая может стать новой потенциальной терапевтической мишенью для лечения НФ-2.

### Abstract

The *NF2* gene product, Merlin, remains one of the least understood tumour suppressors so far. First discovered as a structural protein it soon turned out to be a regulator of multiple proliferation and migration cascades, such as Pak and Rac signaling, receptor tyrosine kinase signaling, mTor signaling and many others. Still, the exact mechanisms by which Merlin regulates these pathways remain mostly unclear, and targeted therapy of NF2 has not succeeded so far due to abundance and redundancy of such cascades. In our study we focus on the pathologic activation of Rac1 in the *Nf2*-deficient cells and a new cytotoxic function of this activated protein in the absence of membrane anchoring.

Our studies indicate that the two marketed agents, simvastatin and zoledronic acid, might be useful in treating NF-2-related schwannomas.

We also show a new cytotoxic function of activated Rac1 when this protein is detached from cell membrane, which provides a new potential therapeutic target for NF2.

### Материалы и методы

1. Культивирование клеточных линий MEF *Nf2<sup>lox/lox</sup>*, MEF *Nf2<sup>-/-</sup>*
2. Флуоресцентная микроскопия
3. Метод резонансного переноса энергии флуоресценции
4. Иммуноблоттинг
5. Трансфекция

### Результаты

Для того, чтобы доказать негативное воздействие низкомолекулярных соединений на *Nf2*-отрицательные клетки, был произведен скрининг с добавленной летальностью используя библиотеку низкомолекулярных биоактивных соединений на изогенетических *Nf2<sup>lox/lox</sup>* and *Nf2<sup>-/-</sup>* мышинных эмбриональных фибробластах для определения соединений которые специфично убивают *Nf2*-отрицательные клетки. Девять соединений показали достаточно выраженную цитотоксичность касательно *Nf2*-отрицательных клеток. Наиболее яркий эффект продемонстрировал ловастатин. Дальнейшее изучение выявило, что данный эффект ловастатина заключается в ингибировании геранилирования, а также вовлеченность геранилгераниолтрансферазы типа I в этот процесс. Эффект статинов и бисфосфонатов (золедроновой кислоты) был обусловлен нарушением геранилирования ГТТ типа I малой ГТФазы Rac1. Также мы показали, что Rac1, открепленный от мембраны под действием статинов и ингибиторов ГТТ типа I, транслоцируется в ядро в *Nf2*-отрицательных клетках и клетках дикого типа, но с помощью метода

---

резонансного переноса энергии флуоресценции было показано, что Rac1 активна только в  $Nf2$ -отрицательных клетках, но не в нормальных клетках.

### **Выводы**

1. Ловастатин и другие статины, так же как и золедроновая кислота, продемонстрировали селективную токсичность против  $Nf2$ -отрицательных клеток.
2. Эта токсичность обусловлена истощением клеточных запасов геранилгераниола, тем самым приводя к нарушению заякоривания Rac1 на мембране.
3. После открепления от мембраны Rac1 транслоцируется в ядро.
4. Патологически активированная Rac1 запускает клеточную гибель.

**ПОДАВЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ P75NTR ПРИ ПОМОЩИ CRISPRi**

## P75NTR EXPRESSION DOWNREGULATION WITH CRISPRi

Д. А. Ланшаков

*ФИЦ Институт цитологии и генетики  
Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН)  
Новосибирский государственный университет*

*D. A. Lanshakov*

*Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia  
Novosibirsk State University, Novosibirsk*

E-mail: dmitriylanshakov@gmail.com, lanshakov@bionet.nsc.ru

**Аннотация**

Нейротрофические факторы, а также их рецепторы играют ключевую роль в формировании и развитии ЦНС. Подобно резцу скульптора они высекают нейронные сети будущего организма. Рецептор нейротрофического ростового фактора, взаимодействуя с сортилином, служит рецептором проформ нейротрофических факторов и проявляет проапоптотическое действие в развивающихся нейронах, поэтому важнейшей задачей для разработки дальнейших методов генотерапии ЦНС является создание инструментариев и способов подавления экспрессии p75NTR. Для этого был выбран метод CRISPRi в нескольких вариантах: где к каталитически неактивному dCas9 пришит репрессор KRAB или вариант с усилением 10-ю пептидами GCN (dCas9-GCN) и одноцепочечными антителами к данному пептиду scfv-KRAB. В зависимости от направляющих РНК, подобранных в районе промотора p75NTR в прямом или антипараллельном направлении, комплекс с dCas9 по-разному оказывал модулирующее действие на экспрессию p75NTR.

**Abstract**

Neurotrophic factors, as well as their receptors, are key players in the formation and development of the central nervous system. Like the sculptor's incisor, they form neural networks of the future organism. The neurotrophic growth factor receptor interacting with sortilin, serves as a receptor for proform of neurotrophic factors and exhibits a proapoptotic

ic effect in developing neurons, therefore, the most important task for developing further methods of CNS gene therapy is the creation of tools and molecular methods for suppressing p75NTR expression. For this, the CRISPRi method was chosen — in several versions: where a KRAB repressor is attached to a catalytically inactive dCas9, or in a variant with enhancement by 10 GCN peptides (dCas9-GCN) and single-chain antibodies to GCN peptide — scfv-KRAB. Depending on the direction of guide RNAs chosen in the p75NTR promoter region in the forward and antiparallel directions, the complex with dCas9 differently modulated the expression of p75NTR.

Нейротрофические факторы являются основными молекулами, обеспечивающими выживание развивающихся нейронов в ЦНС. Своё антиапоптозное действие они оказывают через рецепторы с тирозинкиназным доменом TrkA-C. Однако наряду с этими высокоафинными рецепторами в развивающемся головном мозге экспрессируется и низкоафинный рецептор p75NTR, который, взаимодействуя с сортилином и sorcs2 (Glerup, Olsen et al. 2014), является рецептором проформ нейротрофинов, а, взаимодействуя с TrkA-C на мембране нейронов, является рецептором зрелых форм нейротрофинов. Имея домен смерти TNFR семейства, p75NTR как рецептор пронейротрофинов вызывает гибель нейронов. Помимо своего проапоптотического действия, p75NTR участвует в коллапсе конуса роста развивающихся нейронов, что особенно важно для моноаминэргических нейронов, имеющих обширные проекции в структуры переднего мозга: кора головного мозга, стриатум, гиппокамп. Нарушение баланса моноаминов часто связаны с психонейропатологиями, такими как депрессивное расстройство и тревожность. Таким образом, p75NTR представляет многообещающую мишень для генотерапии неонатальных нейропатологий. С целью усовершенствования молекулярного инструментария для подавления экспрессии при помощи метода Gibson Assembly был создан вектор, экспрессирующий одноцепочечное антитело к GCN пептиду (scfv), соединенное с транскрипционным репрессором KRAB. Подавление экспрессии в этом случае достигается при одновременной трансфекции либо трансдукции полученного нами вектора и вектора, экспрессирующего каталитически неактивную Cas9 с GCN пептидом, повторенным 10 раз (dCas9-10xGCN) Рис.1. Для проверки системы путем лентивирусной трансдукции и последующего субклонирования были получены трансгенные НЕК293Т клетки, экспрессирующие красный флуоресцентный белок при индукции доксициклином (2µg/ml) и направляющую РНК (гайд РНК, tregRNA) к этому промотору. Затем клетки были трансфицированы либо контрольной плазмидой, экспрессирующей dCas9, либо dCas9-Krab, либо смесью плазмид: dCas9-10xGCN и scfv-Krab. Через 24ч был оценен сигнал красной флуоресценции RFP. Использование scfv-

Krab приводило к большому уменьшению сигнала RFP и, следовательно, эффективнее подавляло транскрипцию.

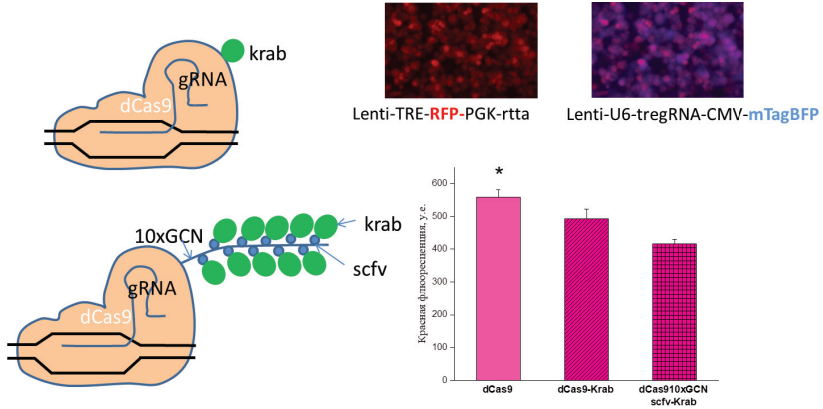


Рис. 1. Подавление экспрессии красного флуоресцентного белка, транскрибируемого с доксицилин индуцируемого промотора при помощи dCas9-Krab и системы dCas9-10xGCN/scfv-Krab

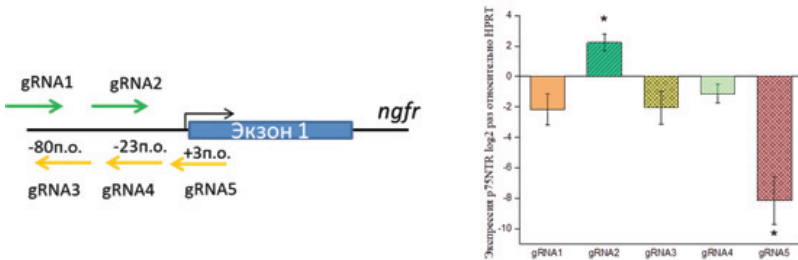


Рис. 2. Подбор направляющих РНК gRNA для подавления экспрессии p75NTR

Для подавления экспрессии p75NTR был подобран набор направляющих РНК в районе старта транскрипции (-80 до +3) как в прямой, так и в антипараллельной ориентации рис.2. Клетки феохромоцитомы крысы PC12, проявляющие норадренэргический фенотип, были трансфицированы векторами, экспрессирующими направляющую РНК, dCas9-10xGCN и scfv-Krab. Через 24 часа по сигналу зеленого репортера при помощи проточного цитометра было отсортировано по 1000 клеток для последующего выделения РНК и РТ-ПЦР. Из набора направляющих РНК, лишь gRNA5, заканчивающаяся

в районе +3, приводила к снижению экспрессии. Остальные направляющие РНК не имели такого эффекта, а gRNA2 приводила к небольшому увеличению транскрипции. Эффективность CRISPRi зависит от расположения направляющей РНК относительно нуклеосом, которые затрудняют доступ Cas9 к ДНК (Horlbeck, Witkowsky et al. 2016) и, соответственно, эффективность ингибирования транскрипции. В то же время, незначительное увеличение экспрессии p75NTR от gRNA2 возможно объяснить топологическим расположением комплекса dCas9-krab, которое приводило к снижению экспрессии антисмысловой РНК ngfr-as и увеличению экспрессии ngfr.

### Литература

Glerup, S., D. Olsen, et al. (2014). “SorCS2 regulates dopaminergic wiring and is processed into an apoptotic two-chain receptor in peripheral glia.” *Neuron* 82(5): 1074–1087.

Horlbeck, M. A., L. B. Witkowsky, et al. (2016). “Nucleosomes impede Cas9 access to DNA *in vivo* and *in vitro*.” *Elife* 5.



**ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКИЕ ЖЕЛЧНЫЕ КИСЛОТЫ:  
ВЗАИМОСВЯЗЬ «СТРУКТУРА-АКТИВНОСТЬ»  
И ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ПОТЕНЦИАЛ\***

**SEMISYNHTETIC BILE SCIDS: STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP  
STUDY AND ANTITUMOR POTENTIAL**

А. В. Марков<sup>1</sup>, В. О. Бабич<sup>1</sup>, И. И. Попадюк<sup>2</sup>, О. В. Саломатина<sup>1,2</sup>,  
Е. Б. Логашенко<sup>1</sup>, Н. Ф. Салахутдинов<sup>2</sup>, М. А. Зенкова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Институт химической биологии и  
фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*  
<sup>2</sup>*Новосибирский институт органической химии  
им. Н. Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск, Россия*

A. V. Markov<sup>1</sup>, V. O. Babich<sup>1</sup>, I. I. Popadyuk<sup>2</sup>, O. V. Salomatina<sup>1,2</sup>,  
E. B. Logashenko<sup>1</sup>, N. F. Salakhutdinov<sup>2,3</sup>, M. A. Zenkova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS,  
Novosibirsk, Russia*

<sup>2</sup>*N. N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS,  
Novosibirsk, Russia*

E-mail: andmrkv@gmail.com

**Аннотация**

Исследована цитотоксичность 8 новых производных дезоксихолевой кислоты (ДОХК), несущих в положении С3 диаминовые и аминокислотные группировки, на панели культивируемых клеток человека. На основе полученных данных проведен анализ взаимосвязи «структура-активность» новых производных и установлен ряд закономерностей, усиливающих их противоопухолевый потенциал. Установлено, что соединение **9** вызывает ROS-зависимую гибель клеток дуоденальной карциномы человека HuTu-80 путем активации митохондриального пути каспазо-зависимого апоптоза и цитодеструктивную аутофагию. С помощью молекулярного докинга установлено, что рецептор витамина D (VDR) может рассматриваться в качестве первичной мишени соединения **9**.

---

© А. В. Марков, В. О. Бабич, И. И. Попадюк, О. В. Саломатина, Е. Б. Логашенко, Н. Ф. Салахутдинов, М. А. Зенкова, 2019

\* Исследования выполнены при поддержке гранта РФФИ № 17-75-20120.

**Abstract**

The cytotoxicity of 8 novel derivatives of deoxycholic acid (DCA), bearing diamine and aminoalcohol moieties at the C3 position, was investigated on a panel of cultured human cells. Based on obtained results the structure-activity relationship analysis was performed and a range of patterns leading to increase of their antitumor potential was revealed. Compound **9** was shown to induce ROS-dependent cell death by activation of intrinsic caspase-dependent apoptosis and cytodestructive autophagy in HuTu-80 cells and vitamin D receptor can be considered as its primary target.

Желчные кислоты — стероидные молекулы, синтезируемые в печени млекопитающих — играют ключевую роль в абсорбции липидов и жирорастворимых витаминов. Данные соединения, как и другие природные метаболиты, обладают широким спектром биоактивностей и, вследствие этого, рассматриваются в качестве перспективной платформы для разработки новых фармакологических агентов. Диаминовые и аминоспиртовые заместители являются структурными компонентами многих биоактивных соединений [1]. Установлено, что введение данных групп в структуру стероидной молекулы значительно усиливает уровень ее биоактивности [2], однако к настоящему моменту противоопухолевый потенциал подобных производных не исследован.

В рамках настоящей работы было синтезировано 8 новых производных ДОХК, несущих в положении С3 линейные диаминовые и аминоспиртовые группы и их циклические аналоги (Рис. 1). Целью данного исследования являлась оценка противоопухолевого потенциала новых соединений *in vitro*. На первом этапе исследования была определена цитотоксичность новых соединений на 4 опухолевых (дуоденальная карцинома HuTu-80, гепатоцеллюлярная карцинома HepG2, рак шейки матки KB-3-1 и карцинома легких A549) и 1 нетрансформированной (фибробласты hFF3) клеточных линиях. Для этого клетки инкубировали в присутствии соединений (1–100 мкМ) в течение 24 ч, после чего определяли уровень жизнеспособности клеток с помощью МТТ теста.

Установлено, что введение аминоксодержащих заместителей в структуру ДОХК приводит к значительному усилению цитотоксичности ( $IC_{50}^{2-10} = 1.0-36.0 \mu\text{M}$  по сравнению с  $IC_{50}^{\text{ДОХК}} \geq 82,9 \mu\text{M}$ ). Более того, новые производные обладали большим уровнем антипролиферативного действия, чем эпокид-содержащее соединение **1** ( $IC_{50}^1 > 17.0 \mu\text{M}$ ), являющееся ключевым интермедиатом при синтезе производных **2-10**. В ходе анализа установлено, что именно аминоксодержащие заместители, а не желчнокислотный скаффолд определяет биоактивность — соединение **11**, несущее лишь гидроксильную группу в положении С3, обладало значительно меньшим уровнем цитотоксичности ( $IC_{50}^{11} \geq 25.7 \mu\text{M}$ ).

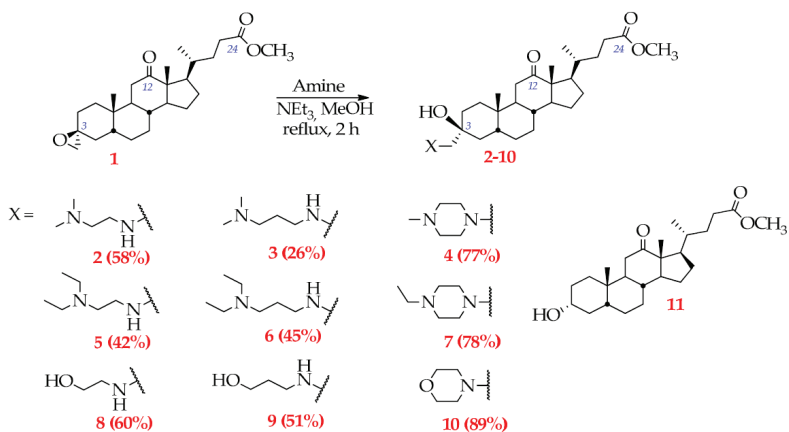


Рис. 1. Химические структуры новых производных дезоксиголевой кислоты, несущих диаминовые и аминокислотные заместители

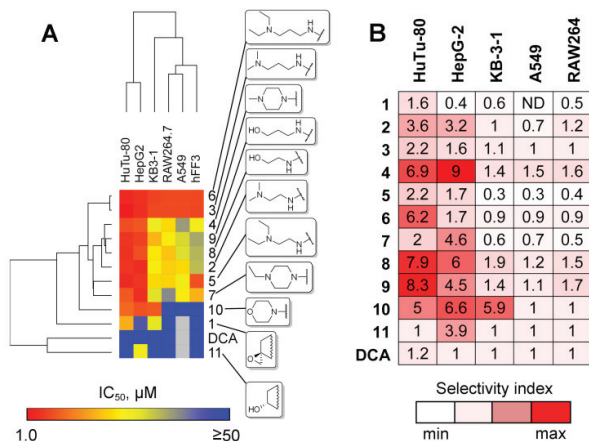
Анализ взаимосвязи «структура-активность» с использованием иерархической кластеризации полученных данных методом Евклидовых расстояний (рис. 2) выявил ряд взаимосвязей:

(а) замена терминальных третичных аминогрупп в боковом заместителе на гидроксильные группы усиливает селективность действия соединений в отношении исследуемых опухолевых клеток (сравните **8** с **2/5** и **9** с **3/6**);

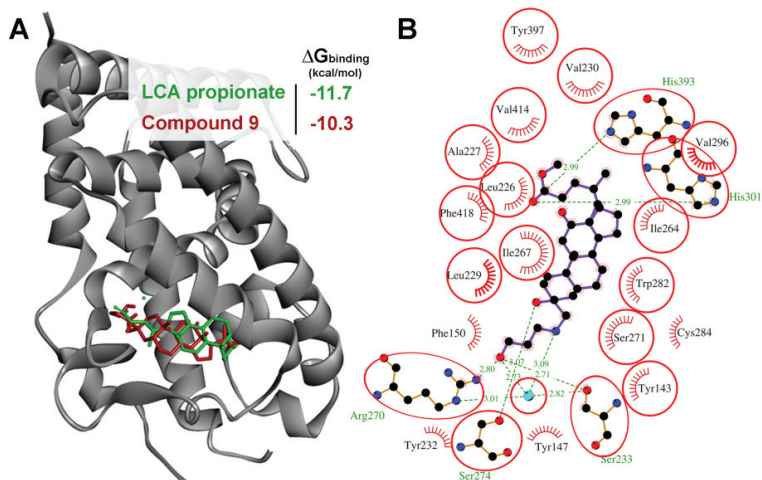
(б) удлинение линкера между амино- и гидроксильной группами не оказывает существенного влияния на цитотоксичность, в то время как в случае с диаминосодержащими производными ДОХК данная модификация значительно усиливает активность ( $IC_{50}^2 > IC_{50}^3$ ,  $IC_{50}^5 > IC_{50}^6$ ) (Рис. 2А).

Для оценки эффективности противоопухолевого действия новых производных нами был вычислен их индекс селективности ( $SI = IC_{50}^{tumor} / IC_{50}^{hFF3}$ ) (рис. 2В). Показано, что наибольшим уровнем SI характеризуется соединения **8** и **9**. Более того, установлено, что данные производные обладают наилучшими drug-likeness параметрами в исследуемом ряду соединений.

В результате более детального изучения механизмов цитотоксического действия соединения-лидера **9** выявлена его способность вызывать ROS-зависимую гибель опухолевых клеток NuTu-80 путем индукции митохондриального пути каспазозависимого апоптоза и цитодеструктивной аутофагии. Методом молекулярного докинга установлено, что VDR может рассматриваться в качестве первичной белковой мишени производного **9**, который способен связываться с данным белком в сайте связывания агониста VDR — пропионата литохолоевой кислоты (рис. 3).



*Рис. 2.* Профиль цитотоксичности новых производных ДОХК.  
**A.** Иерархическая кластеризация значений  $IC_{50}$  исследуемых соединений.  
**B.** Тепловая карта, показывающая селективность действия соединений в отношении опухолевых клеток



*Рис. 3.* Рецептор витамина D является потенциальной первичной мишенью соединения 9. (A) 3D изображение докинга соединения 9 с VDR в сайте связывания пропионата литохоловой кислоты (LCA propionate, активатор VDR). (B) 2D изображение докинг-взаимодействия 9 с VDR. Красными кругами отмечены аминокислоты, формирующие связь с лигандом, общие для 9 и пропионата LCA

**РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОВ МАЛЫХ ЯДРЫШКОВЫХ РНК  
ВЫЯВИЛО НОВЫЙ ПУТЬ РЕГУЛЯЦИИ СПЛАЙСИНГА  
ДЛИННОЙ НЕКОДИРУЮЩЕЙ РНК GAS5\***

CRISPR/CAS9 EDITING OF SMALL NUCLEOLAR RNA GENES  
REVEALED A NOVEL PATHWAY FOR MODULATION  
OF LONG NON-CODING RNA GAS5 SPLICING

А. М. Матвеева<sup>1,2</sup>, Ю. А. Филиппова<sup>1</sup>, Е. С. Журавлев<sup>1</sup>,  
Д. В. Семенов<sup>1</sup>, В. В. Власов<sup>1</sup>, Г. А. Степанов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Институт химической биологии и фундаментальной медицины,  
Сибирское отделение Российской Академии наук*  
<sup>2</sup>*Новосибирский государственный университет*

A. M. Matveeva<sup>1,2</sup>, J. A. Filippova<sup>1</sup>, E. S. Zhuravlev<sup>1</sup>,  
D. V. Semenov<sup>1</sup>, V. V. Vlassov<sup>1</sup>, G. A. Stepanov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine,  
Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences*  
<sup>2</sup>*Novosibirsk State University*

E-mail: anastasiya.maatveeva@gmail.com

**Аннотация**

На основе клеток человека 293FT с использованием системы CRISPR/Cas9 были получены клеточные линии с мутациями в генах индивидуальных C/D-боксов-мяоР-НК, закодированных в интронах гена *Gas5* (Growth Arrest Specific 5). Выявленная в гене *SNORD75* мутация привела к образованию формы альтернативного сплайсинга длинной некодирующей РНК гена-хозяина. Последующий анализ полученных данных выявил т6А-зависимый путь регуляции сплайсинга РНК *Gas5*.

**Abstract**

Using CRISPR/Cas9 system 293FT-derived single cell clones were obtained with mutations in individual box-C/D-snoRNAs, encoded in *Gas5* (Growth Arrest Specific 5)

© А. М. Матвеева, Ю. А. Филиппова, Е. С. Журавлев, Д. В. Семенов, В. В. Власов, Г. А. Степанов, 2019

\*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 18-29-07073. Разработка методов, используемых в работе, проведена при частичной поддержке базового бюджетного финансирования Минобрнауки РФ (0245-2019-0001).

gene introns. Specific *SNORD75* mutation led to the formation of long non-coding RNA Gas5 alternative splicing variant. Further analysis of collected data revealed the m6A-mediated pathway of Gas5 RNA splicing.

Технологии геномного редактирования сегодня широко используются для направленного нокаута большого числа белок-кодирующих генов и для изучения различных процессов и путей метаболизма в клетках человека, однако, работы, посвященные направленному нокауту регуляторных РНК, закодированных в интронах, немногочисленны. В качестве модели исследований в данной работе выбраны малые ядрышковые РНК (мяоРНК), а именно, семейство C/D-боксы-мяоРНК, которые за счет наличия в структуре консервативных элементов осуществляют 2'-О-метиляцию нуклеотидов рРНК. Разработка подходов к функциональному анализу представителей классов некодирующих РНК (нкРНК) может помочь как охарактеризовать уже изученные функции, так и выявить новые, ранее не описанные. Данная работа посвящена функциональному анализу C/D-боксы-мяоРНК, закодированных в гене *Gas5* с помощью редактирования соответствующих генов системой CRISPR/Cas9.

На основе клеток человека 293FT нами были получены моноклональные клеточные линии, несущие мутации в генах индивидуальных мяоРНК. В первую очередь, методом количественной ОТ-ПЦР был проанализирован уровень мутантных C/D-боксы РНК, а также оценена глубина 2'-О-метиляции целевых нуклеотидов рРНК с помощью специально разработанного протокола, основанного на терминации обратной транскрипции с последующей количественной ПЦР.

Анализ изменений в экспрессии длинной нкРНК гена-хозяина *Gas5* показал снижение общего уровня для всех описанных клеточных линий. Дальнейший анализ зрелых форм РНК *Gas5* продемонстрировал, что мутации в гене *SNORD75* в полученной моноклональной культуре привели к созреванию формы альтернативного сплайсинга *Gas5* с пропуском экзонов 3–5, что было подтверждено независимыми данными ОТ-ПЦР и полнотранскриптомного секвенирования RNA-Seq поли(A) фракции.

Анализ данных высокопроизводительных методов выявления m6A-модифицированных форм РНК и сайтов связывания регуляторных факторов с РНК послужил основанием для предположения о наличии в *SNORD75* особого структурного элемента связывания для некоторых из факторов, регулирующих созревание ядерного предшественника РНК *Gas5*. Полученные результаты позволили сделать вывод, что одним из таких факторов является METTL3, и регуляция сплайсинга *Gas5* осуществляется m6A-зависимыми путями.

**ЭФФЕКТ «ПРОСКАЛЬЗЫВАНИЯ» В РЕАКЦИИ ДОСТРАИВАНИЯ ПРАЙМЕРА ТАQ ДНК ПОЛИМЕРАЗЫ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МОДИФИЦИРОВАННОГО 2'-ДЕЗОКСИУРИДИНТРИФОСФАТА \***

SLIPPAGE EFFECT IN PRIMER EXTENSION REACTION WITH TAQ DNA POLYMERASE AND MODIFIED 2'-DEOXYURIDINE TRIPHOSPHATE

Р. А. Мифтахов<sup>1,2</sup>, В. А. Василисков<sup>1</sup>, Э. Н. Тимофеев<sup>1</sup>,  
В. Е. Кузнецова<sup>1</sup>, В. Е. Шершов<sup>1</sup>, С. А. Лапа<sup>1</sup>, А. В. Чудинов<sup>1,2</sup><sup>1</sup> *ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта  
Российской академии наук*<sup>2</sup> *ООО «ИБМХ-ЭкоБиоФарм», Москва*R. A. Miftakhov<sup>1,2</sup>, V. A. Vasiliskov<sup>1</sup>, E. N. Timofeev<sup>1</sup>,  
V. E. Kuznetsova<sup>1</sup>, V. E. Shershov<sup>1</sup>, S. A. Lapa<sup>1</sup>, A. V. Chudinov<sup>1,2</sup><sup>1</sup> *Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russia*<sup>2</sup> *IBMC-EcoBioPharm Ltd., Russia*

E-mail: chud@eimb.ru

**Аннотация**

Реакция достраивания праймера Таq ДНК полимеразой с участием модифицированного dUTP на матрицах, содержащих фрагмент A<sub>20</sub>, протекает с вовлечением терминальной активности полимеразы. Эта активность вызывает эффект «проскальзывания» при использовании в качестве нуклеотидного субстрата только модифицированного трифосфата. Добавление природных нуклеотидов в реакционную смесь подавляет нематричную достройку и образование полноразмерного продукта.

**Abstract**

The primer extension reaction with Taq DNA polymerase and modified dUTP over the template containing the A<sub>20</sub> fragment proceeds with the involvement of terminal polymerase activity. This activity causes a slippage effect when only modified triphosphate is

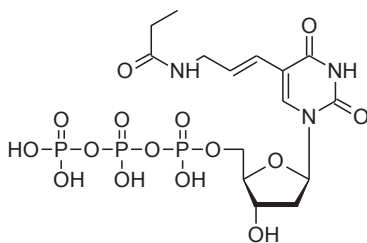
---

© Р. А. Мифтахов, В. А. Василисков, Э. Н. Тимофеев, В. Е. Кузнецова, В. Е. Шершов, С. А. Лапа, А. В. Чудинов, 2019

\* Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (соглашение № 14.576.21.0096, уникальный идентификатор проекта RFMEFI57617X0096).

used as the nucleotide substrate. The addition of natural nucleotides to the reaction mixture suppresses non-template addition and the formation of a full size product.

Модифицированные нуклеозидтрифосфаты широко используются в наиболее перспективных направлениях исследований в области химической и синтетической биологии. В частности, получение модифицированных аптамеров к белковым мишеням методом SELEX основано на использовании неприродных нуклеотидов. Субстратные свойства вновь синтезированных неприродных нуклеозидтрифосфатов оценивают, как правило, с использованием реакции достраивания праймера на природной матрице, PEX (primer extension reaction). Критерием высокой эффективности нуклеотидного субстрата в отношении выбранной полимеразы является его способность к многократному последовательному включению в цепь ДНК на гомополимерной матрице. При исследовании встраивания модифицированного 2'-дезоксинуклеотидтрифосфата (см. рисунок) Taq ДНК полимеразой на матрицах, содержащей в непраймерной части фрагмент  $dA_{20}$ , нами обнаружен выраженный эффект «проскальзывания» (slippage). На природных субстратах этот эффект можно наблюдать при репликации 2-х или 3-нуклетидных повторов, а также гомополимерных сиквенсов [1]. Вновь синтезированная цепь ДНК содержит либо вставки, либо делеции, кратные длине повтора.



Модифицированный по 5-положению dUTP

В нашем случае, эффект «проскальзывания» выражался в способности Taq полимеразы синтезировать полноразмерный продукт реакции и продукты нематричной достройки (N+1, N+2) при относительно невысокой эффективности субстрата. Полноразмерные продукты реакции и продукты, превышающие полную длину, были получены только при отсутствии в реакционной смеси природных нуклеотидов. Добавление в реакционную смесь некомплементарных матрице природных нуклеотидов, dA, dC и dG, полностью ингибировало эффект «проскальзывания». Максимальное число достроенных нуклеотидов не превышало 8 за 1 час, 10 за 2 часа, и 13 за 4 часа при 72 °С.



Известно, что Taq полимеразы характеризуется способностью к нематричной достройке одного или двух нуклеотидов по концам двуспиральной ДНК [2]. При низкой эффективности нуклеотидного субстрата Taq полимеразы диссоциирует, после чего вновь синтезированный фрагмент двуспиральной ДНК претерпевает частичную диссоциацию и повторное образование дуплекса со смещенным сиквенсом. Варианты дуплексов, содержащие пары оснований на конце, достраиваются полимеразой по механизму нематричного синтеза. Таким образом, полноразмерные продукты реакции могут формироваться за счет терминальной активности Taq полимеразы. В присутствии природных трифосфатов терминальная нематричная достройка происходит, в том числе, за счет включения природных нуклеотидов, что исключает сдвиг сиквенса при последующем повторном образовании дуплекса.

### Литература

1. Shinde D, Lai Y, Sun F, Arnheim N. Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT)<sub>n</sub> and (A/T)<sub>n</sub> microsatellites. *Nucleic Acids Res.* 2003, 31(3): 974–980;
2. Smirnov I. P., Kolganova N. A., Vasiliskov V. A., Chudinov A. V., Timofeev E. N. Mass-spectrometry analysis of modifications at DNA termini induced by DNA polymerases. *Sci Rep.* 2017, 7, 16674.

**МАСШТАБИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА  
БИОСИНТЕЗА РЕКОМБИНАНТНОГО  
ФОЛЛИКУЛОСТИМУЛИРУЮЩЕГО ГОРМОНА ЧЕЛОВЕКА  
В КЛЕТКАХ ЯИЧНИКА КИТАЙСКОГО ХОМЯЧКА**

SCALE-UP OF RECOMBINANT HUMAN FOLLICLE-STIMULATING  
HORMONE BIOSYNTHESIS IN CHO CELLS

В. С. Монахова, Н. В. Пигарева, Е. В. Демьянова, А. С. Симбирцев

*ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт  
особо чистых биопрепаратов», Санкт-Петербург, Россия*

V. S. Monakhova, N. V. Pigareva, E. V. Demyanova, A. S. Simbirtsev

*State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russia*

E-mail: v.s.monakhova@hpb.spb.ru

**Аннотация**

В работе осуществляли подбор условий культивирования клеток CHO — продуцента рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона человека в волновом биореакторе. В результате была выбрана схема ежедневного внесения питательных добавок с 3-х суток культивирования для поддержания уровня глюкозы 2 г/л. На основе анализа экзометаболитов культивируемых клеток с помощью метода газовой хроматографии-масс-спектрометрии подтверждена эффективность выбранного режима подпиток.

**Abstract**

Conditions for cultivation of CHO cells producing human recombinant follicle-stimulating hormone in a wave bioreactor were optimized. As a result, the protocol of every-day addition of feed supplements, starting day 3 of cultivation, was chosen to maintain glucose level at 2 g/l. The protocol efficiency was confirmed by data of analysis of extracellular metabolites using a method of gas-chromatography-mass-spectrometry.

Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) — это гликопротеин, который вырабатывается передней долей гипофиза и отвечает за регуляцию репродуктивной функции человека. Первоначально гормон получали из мочи менопаузальных женщин, но с развитием биотехнологической отрасли на рынке

появились препараты, полученные с помощью рекомбинантных технологий. Создание оптимальной технологии биосинтеза гликопротеина является актуальной задачей, поскольку препараты рекомбинантного ФСГ человека (рчФСГ) широко применяются в процедурах экстракорпорального оплодотворения. Целью данной работы являлось масштабирование процесса культивирования продуцента рчФСГ, полученного в клетках яичниках китайского хомячка.

Подбор условий перед культивированием в биореакторе осуществляли в колбах Эрленмейера, рабочий объем 180 мл. Суспензионные СНО клетки — продуцент рчФСГ, выращивали в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе, на шейкере со скоростью вращения 180 об/мин, в атмосфере 5 %  $\text{CO}_2$  и температуре 37 °С (стадия роста). На третьи сутки культивирования (стадия продукции) температуру снижали до 32 °С и начинали ежедневно вносить коммерческие питательные добавки А и В — 3 и 0,3 %, 4 и 0,4 %, соответственно. В качестве контрольного варианта выступали колбы, в которые не вносили добавки, но поддерживали уровень глюкозы 2 г/л. Питательная добавка А содержала глюкозу, поэтому был выбран еще один вариант эксперимента, в котором добавку А вносили в количестве, необходимом для сохранения уровня глюкозы на уровне 2 г/л, а добавку В — в 10 раз меньшем (в процентном соотношении) количестве, чем добавку А. Пробы культуральной жидкости (КЖ) отбирали ежедневно для контроля состояния клеток и определения концентрации рчФСГ с помощью иммуоферментного анализа. В волновом реакторе Wave bioreactor 20/50 ЕНТ (GE Healthcare, Швеция) клетки культивировали в оптимальном режиме подпиток, снижая температуру с 37 до 32 °С на третьи сутки, при рН 7.0 и концентрации растворенного кислорода 50 %. Образцы КЖ отбирали для контроля состояния процесса и анализа экзометаболитов с помощью газовой хроматографии-масс-спектрометрии (ГХ-МС). Предварительно образцы КЖ высушивали в токе азота, к сухому остатку в качестве внутреннего стандарта добавляли эфир тридецилметанола и тридекановой кислоты, растворенный в метаноле, стандарт углеводов С10-С40 (Sigma) и вновь высушивали. Дериватизацию проводили методом силилирования с помощью N,O-бис-(триметилсилил)трифторацетамида. ГХ-МС анализ проводили на хромато-масс-спектрометре GCMS-QP2010 Plus (Shimadzu, Япония) с использованием аналитической капиллярной колонки Agilent HP Ultra-2. Выравнивание хроматограмм проводили с использованием программы MetAlign, далее для построения матрицы данных использовали программу AOutput. Вещества идентифицировали с использованием баз данных NIST, HMDB, Golm Metabolome Database, а также на основании анализа спектральной информации.

Для всех случаев культивирование осуществляли 9–10 суток до падения жизнеспособности не ниже 85 %. При культивировании клеток в колбах Эрленмейера было отмечено увеличение продукции рчФСГ в 1,5 раза по срав-

нению с контрольной культурой при внесении добавок А и В 3/0,3 и 4/0,4 %, соответственно. Наибольшее увеличение продукции в два раза по сравнению с контролем было отмечено для культуры клеток, к которым вносили добавки А и В до поддержания уровня глюкозы 2 г/л, в этих условиях количество вносимых добавок не превышало 2,5/0,25 %. Поскольку остальные параметры культуры (количество клеток, жизнеспособность) отличались друг от друга незначительно, оптимальной для масштабирования являлась схема внесения добавок А и В в зависимости от уровня глюкозы.

При культивировании в биореакторе максимальная клеточная плотность была выше по сравнению с аналогичным экспериментом в колбах, но на поздней стадии культивирования было отмечено агрегирование клеток. Волнометрическая продукция рчФСГ при масштабировании процесса оставалась неизменной. Согласно данным, полученным с помощью ГХ-МС, концентрация некоторых, в том числе и незаменимых аминокислот, увеличилась с начала культивирования к третьим суткам более чем в 5 раз. В работе [1] был описан аналогичный эффект при культивировании клеток СНО с подпиткой и выдвинуто предположение, что клетки таким образом реагируют на изменение условий окружающей среды. Концентрация большинства аминокислот (лейцин, глицин, изолейцин, пролин, метионин, лизин) возрастала до 6–8 суток на стадии интенсивного роста, затем снижалась на 8–10 сутки (стадия снижения жизнеспособности). На 8–10 сутки культивирования увеличивалась концентрация аспарагиновой, пироглутаминовой и глутаминовой кислот. В исследовании [2] было отмечено, что аспарагиновая и глутаминовая кислоты негативно влияют на рост культуры. Концентрация молочной кислоты в биореакторе возрастала до 6 суток культивирования и снижалась практически до нуля к последним суткам. В целом, повышение концентрации молочной кислоты в период прироста биомассы и дальнейшее снижение в течение процесса культивирования является показателем оптимально подобранных условий культивирования [3].

## Литература

1. Вахитов Т. Я. Принципы метаболической регуляции и коммуникации у бактерий / Т. Я. Вахитов. URSS, 2019. 500 с.
2. Алиев Т. К., Влияние различных компонентов среды культивирования на продукцию рекомбинантных антител в СНО клетках в условиях стабильной и транзитной экспрессии / Т. К. Алиев, В. А. Топорова, В. В. Аргентова // Современные проблемы науки и образования. 2012. № 5.
3. Mulukulta B. C. On metabolic shift to lactate consumption in fed-batch culture of mammalian cells. / B. C. Mulukulta, M. Gramer, W. S. Hu // Metabolic engineering. 2012. Vol. 14 № 2.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ХРОМОСОМНЫХ ПЕРЕСТРОЕК  
НА ТРЁХМЕРНУЮ ОРГАНИЗАЦИЮ ГЕНОМА  
И ПРОФИЛЬ ГЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА \***

STUDYING AN INFLUENCE OF CHROMOSOMAL ABERRATIONS  
AT THREE-DIMENSIONAL CHROMATIN ORGANIZATION  
AND GENE EXPRESSION IN THE HUMAN GENOME

Р. В. Мунгалов<sup>1,2</sup>, В. С. Фишман<sup>1</sup>, А. А. Хабарова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *ФИЦ ИЦиГ СО РАН*

<sup>2</sup> *Новосибирский государственный университет*

R. V. Mungalov<sup>1,2</sup>, V. S. Fishman<sup>1</sup>, A. A. Khabarova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *ICG SB RAS, Russia*

<sup>2</sup> *Novosibirsk State University, Russia*

Email: mungalov.roman@yandex.ru

**Аннотация**

Данный проект посвящён изучению взаимосвязи между нарушениями трёхмерной организации генома, вызванными хромосомными перестройками, и изменением профиля генной экспрессии, а также эпигенетическими модификациями. Несмотря на существование технологий геномного редактирования, таких как CRISPR/Cas9, мы предлагаем альтернативный метод индуцированного мутагенеза, а именно систему Cre/LoxP. Это позволит нам создать большую выборку хромосомных перестроек (более одного события на клетку), в отличие от уникальных событий при использовании CRISPR/Cas9. Анализ всего нескольких субклонов, каждый из которых будет нести около 10 перестроек, даст нам исчерпывающую информацию об изменении профиля генной экспрессии в разных частях генома человека.

**Abstract**

In this research we have a goal to study an interplay between disturbances of three-dimensional human genome organization, induced by chromosomal aberrations, and gene expression and epigenetic modifications. Despite of different similar research, that use target genomic editing methods, like CRISPR/Cas9, we suggest an alternative way of the induced mutagenesis, namely Cre/LoxP system. It will allow us to create a big collection

of chromosomal aberrations (up to 10 events per cell), unlike unique events using CRISPR/Cas9. The analysis of just a few number of subclones, each of them will have about 10 aberrations, will allow us to get enough information about gene expression changes in different parts of human genome.

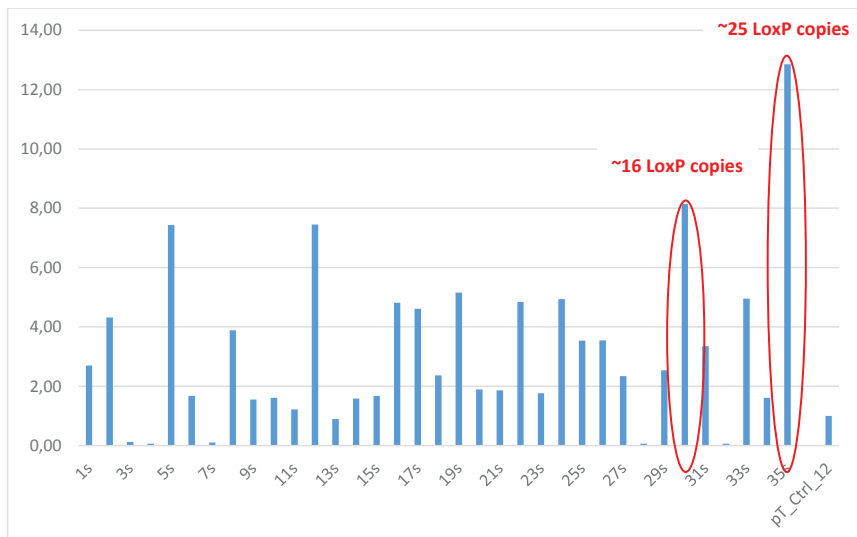
There are so many genetic interruptions, which may occur in living organizations. First of all, there are mutations in genes, which affect to the protein structure and function. Moreover, various regulatory elements can be affected, that may lead to silencing or over expression of certain genes. Other mutation causes, that can take place are repair system mistakes, viruses, genomic imprinting interruptions, etc. However one of the most interesting and unobvious factor of gene expression changes is interruption of three-dimensional genome organization [1].

In this project we develop a new approach to studying an influence of the genome architecture interruptions at gene expression changes, — creature and analysis of a big collection of chromosomal aberrations, inducing by a Cre/LoxP system [2]. The important advantage of this system is that we can achieve about 10 aberrations per one cell, unlike unique cases with CRISPR/Cas9 [3].

We have designed recombinant lentiviruses for introducing of LoxP-sites in the genome. We have also worked out a methodology of the estimation of integration number using quantitative PCR (RT-PCR). We have a near-haploid cell line HAP-1 [4]. Such a ploidy is very important for the experiment purity.

A population of the HAP-1 cells was infected by recombinant lentiviruses, carrying LoxP-sites. Furthermore, we have obtained subclones of this population and analyzed the cells for number of LoxP-site integrations. The greatest numbers of proviruses insertions, namely 16 and 25, were found in two subclones (fig. 1). These ones were chosen for the cytogenetic testing and Cre-recombinase treatment. We have also shown that ultracentrifugation of viruses can permit an increase of LoxP-site integrations at least an order of magnitude.

We have also modernized our delivery system and designed new vectors based on genetic mobile elements, also called transposons. Unlike the lentiviruses transposon vectors much smaller and that's why they have less false-positive results. Besides, they may have less toxicity effect than lentiviruses. Now we are testing different conditions and proportions of transposon-transposase tandem for the greatest efficacy of LoxP-site integrations. After that, we will repeat an obtaining of subclones with different numbers of LoxP-site integrations and proceed an experiment with Cre-recombinase treatment of the subclones, which have a greatest number of LoxP-sites in their genomes.



RT-PCR results. An absolute number of LoxP-site integrations in selected subclones. Normalized to the number of copies in the control plasmid pT\_Ctrl\_12, equal 2.

From left to right: 1s-35s — subclones  
with different numbers of lentiviral integrations, carrying LoxP-sites;  
genomic DNA for negative control (genome); control plasmid pT\_Ctrl\_12

Furthermore, we will select subclones with desired number of recombination (about 3–10 aberrations in different parts of the genome). We plan to make inverse-PCR libraries from the DNA of these subclones and to localize induced rearrangements by sequencing. The most interesting aberrations in terms of localization will select for further analysis using Hi-C, RNA-Seq and ChIP-Seq methods.

## References

1. M. J. Rowley and V. G. Corces (2018) “Organizational principles of 3D genome architecture,” *Nat. Rev. Genet.*, vol. 19, no. December, p. 1.
2. B. Sauer and N. Henderson (1988) “Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1.,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 85, no. 14, pp. 5166–5170.
3. D. G. Lupiáñez et al. (2015) “Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions,” *Cell*, vol. 161, no. 5, pp. 1012–1025.
4. T. Olbrich, C. Mayor-Ruiz, M. Vega-Sendino, and G. C. (2017) “A p53-dependent response limits the viability of mammalian haploid cells”.

**МОДЕЛИРОВАНИЕ ВНУТРИОПУХОЛЕВЫХ  
ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ *IN VITRO* С ПРИМЕНЕНИЕМ  
3 КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

MODELING OF INTRATUMORAL INTERACTIONS  
OVER 3 CELL LINES OF BREAST CANCER *IN VITRO*

Ю. А. Небова<sup>1,2</sup>, В. А. Бычков<sup>2</sup>, Н. В. Литвяков<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Национальный исследовательский  
Томский государственный университет*

<sup>2</sup>*Научно-исследовательский институт онкологии «Томский национальный  
исследовательский медицинский центр» Российской академии наук*

J. A. Nebova<sup>1,2</sup>, V. A. Bychkov<sup>2</sup>, N. V. Litviakov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia  
dical Center of the Russian Academy of Sciences*

E-mail: Julia.nebova@gmail.com

**Аннотация**

В условиях жёсткого ограничения ресурсов клоны опухолевых клеток, находящиеся в пределах одного опухолевого очага, подвержены давлению естественного отбора, в результате которого между клонами могут возникать разные типы взаимодействия, имеющие негативный (хищничество, паразитизм, аменсализм) или позитивный (синергизм, взаимность, комменсализм) характер. Понимание данных взаимоотношений между опухолевыми клонами может являться ключом к разработке новых подходов для диагностики заболевания и манипулирования этими взаимодействиями. В ходе данной работы в результате попарного культивирования установлен феномен возникновения как позитивного, так и негативного межклеточного взаимодействия (аменсализм и комменсализм).

**Abstract**

Under severe resource constraints, tumor cell clones located within the same tumor focus are subject to natural selection pressure, which can result in different types of interaction between the clones that are negative (predation, parasitism, amensalism) or positive (synergism, reciprocity, commensalism) character. Understanding these relationships between tumor clones may be key to developing new approaches for diagnosing the disease and manipulating these interactions. In the course of this work, as a result of pairwise



cultivation, he established the phenomenon of the emergence of both positive and negative intercellular interactions (amensalism and commensalism).

## Введение

На сегодняшний день метастазирование является основной причиной смертности онкобольных. В значительной степени этот процесс обусловлен наличием различных по фенотипическим и генотипическим показателям клонов внутри опухоли — гетерогенности опухоли. В ряде исследований было показано, что наличие нескольких популяций клонов непосредственно в опухолевом очаге имеет решающее значение для многих аспектов биологии опухоли, таких как рост, рецидивирование, метастазирование и развитие резистентности [Lipinski, K.A. et al., 2016].

Согласно классическим представлениям теории эволюции Nowell. P.C. 1976 года, отбор опухолевых клонов осуществляется в сторону наиболее приспособленных к микроокружению. Более того, в нескольких экспериментах было установлено, что некоторые популяции клеток в рамках первичного очага способны к кооперации, тем самым, повышая злокачественность всей опухоли. В этой связи, изучение различных типов клональных взаимодействий внутри опухоли может быть основой для создания эффективного подхода к подавлению метастазирования, рецидивирования и развития лекарственной резистентности, однако работ, направленных на изучение экологических взаимодействий между клонами практически нет. Кроме того, на сегодняшний день практически не разработаны методические подходы для идентификации различных типов взаимодействий.

Мы полагаем, что, определив типы взаимодействий между популяциями клеток, мы сможем установить дальнейшие шаги для нарушения сложившихся условий экосистемы опухоли посредством введения новых специфических внешних факторов, оказывающих давление на конкретный тип клонов (например, химиотерапия) и регуляции микроокружения с помощью механизмов иммунной системы [Gatenby R. A. et al., 2014]. Однако для начала необходимо идентифицировать молекулярно-генетические признаки каждого типа экологических взаимодействий. Мы считаем, что позитивные взаимодействия между клонами (синергизм, мутуализм, комменсализм), будут способствовать прогрессии опухоли и развитию резистентности, в то время как негативные взаимодействия (конкуренция, аменсализм, хищничество, паразитизм) будут приводить к повышению терапевтической чувствительности опухоли, обеспечивая благоприятный исход для пациента. Таким образом, выявив факторы, ассоциированные с тем или иным взаимодействием, мы на шаг приблизимся к установлению новых прогностических маркеров и мишеней для таргетной терапии.

Данная работа посвящена изучению *in vitro* различных типов экологических взаимодействий клеточных линий рака молочной железы (РМЖ) MCF-7, BT-474 и MDA-MB-231, моделирующих разные клоны опухолевых клеток в гетерогенной опухоли, при их совместном культивировании.

### Материалы и методы

Моделирование внутриопухолевой гетерогенности и изучение межклеточных взаимодействий осуществляли *in vitro* путем попарного культивирования клеточных линий MCF-7, BT-474 и MDA-MB-231 (полученных, соответственно, от пациенток с люминальным-А, люминальным-В, и трижды негативным раком молочной железы) с различной экспрессией рецепторов ER, PR, Her2/neu в стандартных условиях. Клеточные линии были отобраны с учетом наилучшего соответствия по условиям культивирования, инкубации, происхождению, морфологии и темпу роста. Межклеточные взаимодействия оценивали по изменению количества клеток двух линий РМЖ при их совместной инкубации в сравнении с двумя контролями. Идентификацию клеток в смешанной культуре осуществляли при помощи ИЦХ (ER, Her2, Dako, USA). Перенос клеток на стекла осуществлялся при помощи центрифуги Cytospin 4 (ThermoFisher Scientific, USA).

Все процедуры фиксации и окрашивания были выполнены при комнатной температуре. Клетки на покровных стеклах (или цитоспинах) фиксировали в течение 10 минут в 2 % PFA в PBS, проникали в течение 15 минут в 0,5 % Triton X-100 в PBS и фиксировали в течение 10 минут 4 % PFA в PBS, затем промывали 3 раза в PBS. Цитоспины хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Анализ роста численности клеток в режиме реального времени осуществлялся посредством клеточного анализатора iCellegence («ACEABiosciences», USA).

### Результаты

На первом этапе исследований в ходе различных комбинаций совместной культивирования клеточных линий на протяжении 2–7 суток были установлены два типа взаимодействий: негативное (аменсализм) — угнетение роста клеток линии MDA-MB-231 при совместной культивации с линией BT-474, и позитивное (комменсализм) — ускорение роста клеточной линии BT-474 при взаимодействии с MCF-7 по сравнению с контролем, в то время как скорость роста линии MCF-7 остаётся неизменной.

Следующим этапом работы являлось установление способа дистантного взаимовлияния линий посредством факторов, выделяемых в культуральную среду.

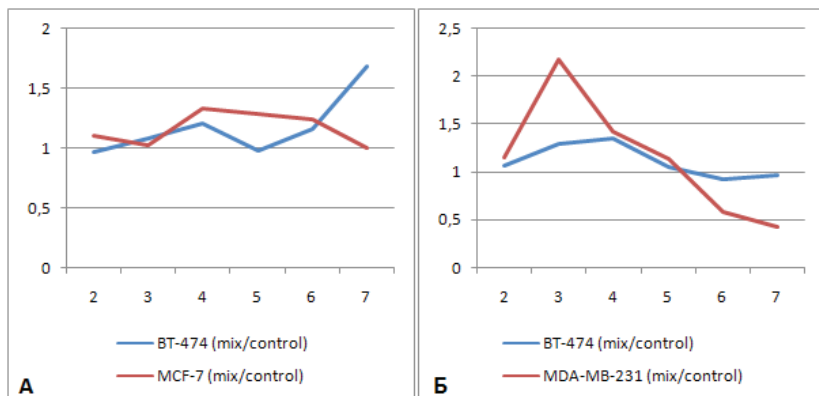


График роста клеточных культур в контроле и при совместной культивации:  
А — BT-474 / MCF-, Б — BT-474 / MDA-MB-231

При культивации линий в режиме реального времени в различных комбинациях с добавлением бесклеточной культуральной среды от трех линий после их 4х дневной инкубации полученные ранее данные были полностью подтверждены: комменсализм между BT-474 и линией MCF-7 (см. рисунок, А), аменсализм между MDA-MB-231 и линией BT-474 (рисунок 1, Б). Кроме того, установлено на уровне тенденции снижение роста клеточной линии MCF-7 в среде от BT-474 и линии BT-474 в среде от MDA-MB-231.

В итоге, на модели *in vitro* обнаружено явление негативного взаимодействия (аменсализм) при совместном культивировании клеточных линий РМЖ BT-474 и MDA-MB-231, а также позитивного взаимодействия (комменсализм) при совместном культивировании линий BT-474 и MCF-7. Установлено, что взаимодействие клеток, в том числе, осуществляется дистантным путем за счет выделения в культуральную среду биологически активных веществ. В дальнейшем идентификация этих веществ позволит оценить их роль в качестве маркеров того или иного типа взаимодействия.

## Литература

1. Lipinski K. A. Cancer evolution and the limits of predictability in precision cancer medicine // Trends in cancer. 2016. V. 2. №. 1. P. 49–63.
2. Nowell P. C. The clonal evolution of tumor cell populations // Science. 1976. V. 194. №. 4260. P. 23–28.
3. Gatenby R. A. Cunningham J. J., Brown J. S. Evolutionary triage governs fitness in driver and passenger mutations and suggests targeting never mutations // Nature communications. 2014. V. 5. P. 5499.

## РЕГУЛЯЦИЯ МЕЖДУ НЕТРИНОМ-1 И АПОЛИПОПРОТЕИНОМ А-1 НА ТРАНСКРИПЦИОННОМ УРОВНЕ

### THE REGULATION BETWEEN NETRIN-1 AND APOLIPOPROTEIN A-I ON THE TRANSCRIPTIONAL LEVEL

Е. В. Некрасова, К. В. Данько, Д. О. Кузьмина, С. В. Орлов

*ФГБНУ Институт Экспериментальной Медицины, отдел Биохимии  
Санкт-Петербургский государственный университет,  
кафедра эмбриологии*

E. V. Nekrasova, K. V. Danko, D. O. Kuzmina, S. V. Orlov

*Department of Biochemistry, Institute of Experimental Medicine,  
Russian Academy of Medical Sciences, St. Petersburg, Russia  
Department of Embryology, St. Petersburg State University,  
St. Petersburg, Russia*

E-mail: katherina.nekrasova@gmail.com

#### **Аннотация**

Атеросклероз является хроническим заболеванием, характеризующимся накоплением богатых холестерином макрофагов внутри сосудистой стенки. Воспаление развивается благодаря задержке макрофагов в интиме сосудов. Одной из причин нарушения миграции является секреция белка нетрина-1 макрофагами. Недавно было обнаружено, что Аполипопротеин А-1 (АпоА-1) играет противовоспалительную роль и предотвращает развитие атеросклеротической бляшки. Более того, экспрессия АпоА-1 в макрофагах возростала благодаря ФНО-альфа. Механизм до конца неизвестен. Здесь мы исследовали участие макрофагального АпоА-1 в регуляции миграционной способности макрофагов через взаимодействие его с нетрином-1.

#### **Abstract**

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease that is characterized by the accumulation of cholesterol-engorged macrophages inside the arterial wall. Inflammation develops by the retention of macrophages in the intima of vessels. One of the reasons of migrational disturbance is the secretion of protein netrin-1 by macrophages. Recently Apolipoprotein A-I (ApoA-I) has been found playing the anti-inflammatory role and preventing the atherosclerotic plaque development. Moreover ApoA-I expression in macro-

phages increased by TNF-alpha. The mechanism has not known yet. Here we studied the participation of macrophagal ApoA-I in the regulation of migratory ability of macrophages through the interaction its with netrin-1.

### **Aim**

The study of the regulation between netrin-1 and ApoA-I on the transcriptional level.

### **Materials & Methods**

Macrophages differentiated from THP-1 cells and from blood of healthy donors, recombinant human netrin-1, RNA interference, RealTime RT-PCR.

### **Results**

ApoA-I expression is decreased by treatment of netrin-1 in macrophages. TNF-alpha mediated increasing ApoA-I mRNA level is abolished by treatment of netrin-1. SiRNA ApoA-I knockdown results the increasing of netrin-1 expression in macrophages.

### **Conclusion**

There is the direct regulation between netrin-1 and ApoA-I expression in macrophages.

## ДЕЛЕЦИЯ И ПОТЕРЯ ГЕТЕРОЗИГОТНОСТИ В ГЕНЕ РЕПАРАЦИИ *BRCA1* КАК ПРЕДИКТИВНЫЙ МАРКЕР У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ БЕЗ ГЕРМИНАЛЬНЫХ МУТАЦИЙ \*

DELETION AND LOSS OF HETEROZYGOSITY IN THE *BRCA1* REPAIR GENE AS A PREDICTIVE MARKER IN PATIENTS WITH BREAST CANCER WITHOUT GERMINAL MUTATIONS

А. М. Певзнер<sup>1,2</sup>, К. А. Гаптулбарова<sup>1,2</sup>, М. К. Ибрагимова<sup>1</sup>, М. М. Цыганов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>НИИ онкологии Томского НИМЦ, Томск, Россия

<sup>2</sup>НИ Томский государственный университет, Томск, Россия

A. M. Pevzner<sup>1,2</sup>, K. A. Gaptulbarova<sup>1,2</sup>, M. K. Ibragimova<sup>1</sup>, M. M. Tsyganov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cancer Research Institute, Tomsk NRMC

<sup>2</sup>TSU, Tomsk

### Аннотация

Ген *BRCA1* играет важную роль в восстановлении и репарации ДНК посредством гомологичной рекомбинации, и мутация этого гена приводит к ее дефициту. Дефекты в таком пути репарации повышают чувствительность опухолей к терапевтическим средствам, особенно к цитостатической химиотерапии, которая приводит к уменьшению репарации ДНК, накоплению повреждений и, в конечном итоге, к апоптозу.

Одним из ключевых направлений в изучении исследуемого гена является такое понятие как дефицит гомологичной рекомбинации, которое включает в себя: изучение экспрессии, участков потери гетерозиготности, а так же несбалансированных хромосомных аномалий — делеций и амплификации гена *BRCA1*. Основываясь на результатах предыдущих исследований экспрессии, которые показали, что уровень *BRCA1* может быть перспективным прогностическим и предиктивным маркером при РМЖ, целью настоящей работы явилось изучение хромосомных aberrаций и участков потери гетерозиготности гена.

### Abstract

The *BRCA1* gene plays an important role in DNA repair through homologous recombination, and mutation of this gene leads to its deficiency. Defects in this repair pathway

---

© А. М. Певзнер, К. А. Гаптулбарова, М. К. Ибрагимова, М. М. Цыганов, 2019

\* Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 19-75-00027 «Исследование соматического статуса гена *BRCA1* в опухоли молочной железы для персонализированного назначения лечения».

increase the sensitivity of tumors to therapeutic agents, especially cytostatic chemotherapy, which leads to a decrease in DNA repair, the accumulation of damage and apoptosis.

One of the key areas in the study is the concept of deficiency of homologous recombination, which includes: the study of expression, loss of heterozygosity, as well as unbalanced chromosomal abnormalities — deletions and amplification of the *BRCA1* gene. Based on the results of previous expression studies, which showed that the level of *BRCA1* can be a promising prognostic and predictive marker for breast cancer, the aim of this work was to study chromosomal aberrations and areas of loss of gene heterozygosity.

### **Материалы и методы**

В исследование включены 90 больных РМЖ IIА–IIIВ стадии, с морфологически верифицированным диагнозом. Все больные получали 2–8 курсов неоадьювантной химиотерапии (НХТ) по схемам FAC (фторурацил, доксорубин, циклофосфан), CAХ (циклофосфан, доксорубин, кселода) или монотерапию таксотером. Через 3–5 недель после НХТ проводилась операция, затем больным проводили 2 курса адьювантной химиотерапии по схеме FAC, а лучевая терапия и/или гормональное лечение назначались по показаниям. В качестве исследуемого материала, были использованы биопсийные опухолевые образцы (~10 мм<sup>3</sup>), взятые до лечения под контролем УЗИ. Образцы опухоли помещали в раствор RNeasy Lysis Buffer (Qiagen, Germany) и сохраняли при температуре –80 °С (после 24-часовой инкубации при +4 °С) для дальнейшего выделения ДНК. ДНК из опухолевой ткани молочной железы выделяли при помощи набора QIAamp DNA mini Kit (Qiagen, Germany #51304) в соответствии с инструкцией производителя. Для оценки наличия хромосомных aberrаций использовали микроматричный анализ при помощи микроматриц (ДНК-чипы) высокой плотности фирмы Affymetrix (USA) CytoScan™ HD Array. Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ «STATISTICA 8.0» (StatSoft Inc., USA). Сравнение частот по качественным данным анализировали при помощи двухстороннего критерия Фишера.

### **Результаты и обсуждения**

На первом этапе работы проведенного исследования при помощи микроматричного анализа мы оценили частоту хромосомных aberrаций и участков потери гетерозиготности *BRCA1*, а также связь с основными клинико-морфологическими параметрами. Не было получено статистически значимых различий изучаемых показателей в зависимости от основных клинико-морфологических параметров. На втором этапе исследования мы показали, что частота делеций гена *BRCA1* достигает 34,4 % (при этом наибольшая частота делеций (50 %) наблюдалась при HER2+ РМЖ).

Учитывая многочисленные литературные данные, говорящие о связи наследственной мутации гена *BRCA1* с нарушениями в работе системы репарации ДНК, и, как следствие, с высокой эффективностью ДНК-повреждающих агентов, а именно препаратов платины, можно предположить, что делеция локуса гена *BRCA1* также будет ассоциирована с высокой чувствительностью новообразования к препаратам платины. Основываясь на этом, мы провели анализ связи эффекта НХТ с CNA-статусом и LOH в общей группе больных (рис. 1).

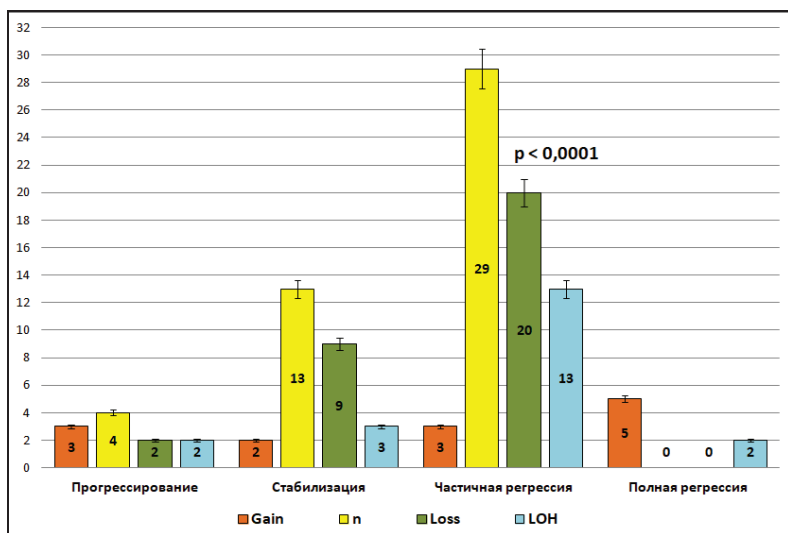


Рис. 1. Связь эффекта НХТ с CNA-статусом у больных

Из рисунка хорошо видно, что частота делеций у больных с частичной регрессией статистически значимо выше (20/52 больных, 38,5 %) по сравнению с другими группами ( $p < 0,0001$ ). Анализ локуса 21.31 длинного плеча 17 хромосомы (*BRCA1*) показал, что лишь у 20 больных (22 %) наблюдается потеря гетерозиготности в исследуемом гене. Наибольшая частота LOH представлена при трижды негативном раке молочной железы 37 % (7/19), у больных с люминальным В и HER2+ частота составляет 20 % (20/61) и 10 % (1/10), соответственно. Чаще всего LOH встречались у пациентов с частичной регрессией опухоли (25 % (14/52) по сравнению с другими группами) ( $p = 0,028$ ) (Рисунок 2). Это согласуется с данными, полученными Swisher E. M. с соавторами. Высокий уровень LOH ( $\geq 14-16$  %) сви-



детельствует о наличии в опухоли дефицита гомологичной рекомбинации и связан с положительным ответом на терапию (Swisher E. M., 2017).

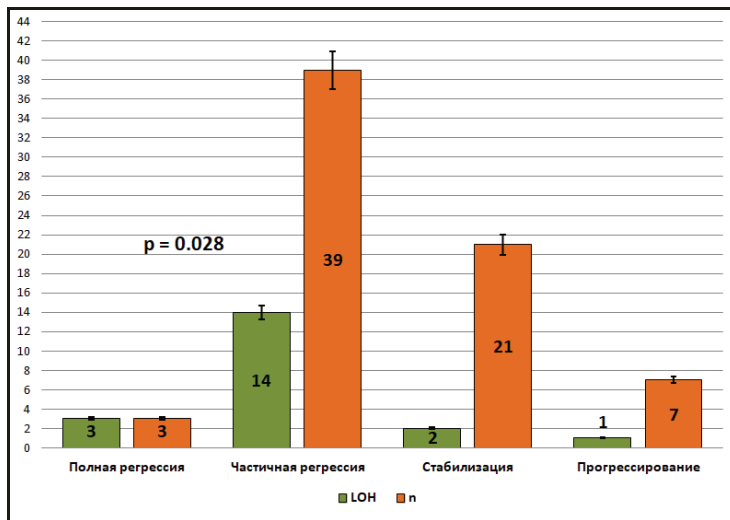


Рис. 2. Связь наличия участков потери гетерозиготности с эффектом химиотерапии

## Выводы

Таким образом, в результате проведенного исследования было показано, что наличие aberrантной составляющей в гене *BRCA1*, так же, как и наличие участков потери гетерозиготности, сопряжено с объективным ответом при проведении неoadъювантной химиотерапии. Полученные данные могут помочь в индивидуальном подборе лекарственных средств и улучшить эффективность химиотерапии у больных раком молочной железы.

## Литература

1. Swisher E. M. et al. Rucaparib in relapsed, platinum-sensitive high-grade ovarian carcinoma (ARIEL2 Part 1): an international, multicentre, open-label, phase 2 trial //The lancet oncology. 2017. V. 18. №. 1. P. 75–87.

**ПОЛУЧЕНИЕ АНТИТЕЛ КЛАССА Y, СПОСОБНЫХ  
НЕЙТРАЛИЗОВАТЬ ПСЕВДОВИРУСЫ, НЕСУЩИЕ НА СВОЕЙ  
ПОВЕРХНОСТИ GP ТРЁХ ШТАММОВ ВИРУСА МАРБУРГ \***

**OBTAINING CROSS-NEUTRALIZING IGY ANTIBODIES AGAINST  
MARBURG VIRUS VLPS**

О. А. Полежаева<sup>1,2</sup>, А. В. Зыбкина<sup>1</sup>, Д. Н. Щербаков<sup>1</sup>, Г. В. Кочнева<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *ФБУН Государственный научный центр  
вирусологии и биотехнологии «Вектор»*

<sup>2</sup> *ФГБОУ ВПО «Новосибирский национальный  
исследовательский государственный университет»*

O. A. Polezhaeva<sup>1,2</sup>, A. V. Zybkina<sup>1</sup>, D. N. Shcherbakov<sup>1</sup>, G. V. Kochneva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *SRC VB “Vector”*

<sup>2</sup> *Russia; Novosibirsk State University, Russia*

**Аннотация**

Разработана схема иммунизации кур, обеспечивающая индукцию антител, нейтрализующих псевдовirusы трех штаммов вируса Марбург (Popp, DRC, Musoke). Препарат IgY антител второй группы птиц, полученный после третьей иммунизации нейтрализовал псевдовirusы Марбург трех штаммов в диапазоне разведений от 1/256 до 1/1024.

**Abstract**

Our work is aimed at developing an effective chicken immunization schedule to obtain a variety of cross-neutralizing IgY antibodies that neutralizes the Marburg virus (Popp, DRC, Musoke). As a result, antibody preparations were obtained that neutralize virus-like particles in a range from 1/256 to 1/1024 dilution in the second group of chicken.

Согласно международной классификации, вирус Марбург (MARV) относится к семейству филовирусов порядка *Mononegavirales*. MARV способен передаваться от рукокрылым людям, с последующей передачей от человека к человеку, при этом у людей он вызывает тяжелую геморрагическую ли-

---

© О. А. Полежаева, А. В. Зыбкина, Д. Н. Щербаков, Г. В. Кочнева, 2019

\* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00512 мол\_а.

хорадку. До сих пор вопрос индукции гуморального нейтрализующего иммунного ответа в ходе натуральной инфекции и вакцинации остается нерешенным фундаментальным вопросом. На сегодняшний день неясно как или почему разные схемы иммунизаций вызывают или не вызывают выработку нейтрализующих антител. Наша работа направлена на изучение принципиальной возможности формирования кросснейтрализующих антител в ходе иммунизации, с использованием модели кур (*Gallus gallus*).

В качестве иммуногенов способных индуцировать специфичный гуморальный иммунный ответ, а также инструмента его изучения нами были выбраны псевдовирусные частицы на основе лентивирусной системы и вируса везикулярного стоматита. Для панели мы отобрали несколько штаммов — DRC1999 (Lake Victoria marburgvirus — DRC1999), Musoke, Popp. Функциональную активность псевдовирусных частиц определяли при помощи чувствительных клеток. Сигнал свечения прямо пропорционален количеству зараженных клеток и определяется в относительных люциферных единицах. Формирование псевдовирусных частиц было так же подтверждено при помощи электронной микроскопии. Физический титр псевдовирусных частиц составлял от  $1 \times 10^8$  до  $1 \times 10^{10}$ . В качестве иммуногена так же был использован рекомбинантный вирус осповакцины, содержащий ген GP MARV Musoke.

Для эксперимента, была выбрана куры (*Gallus gallus*), это модель для изучения гуморального иммунитета имеют ряд преимуществ перед другими лабораторными животными. Куры просты в содержании, а иммуноглобулины можно выделять не из крови, а из яичного желтка, что позволяет отслеживать накопление антител на больших промежутках времени. Для иммунизации было сформировано две группы кур. По литературным данным нами был выбран промежуток между иммунизациями в 3 недели. Первая иммунизация была одинаковой для обеих групп. В качестве иммуногена использовался рекомбинантный вирус осповакцины, содержащий ген GP MARV Musoke. Далее, первую группу иммунизировали очищенным при помощи центрифугирования в градиенте плотности сахарозы препаратом псевдовирусных частиц VSV-GPΔMLDpopr в концентрации  $1,4 \times 10^7$  RLU (физический титр составил  $10^9$ ). Для иммунизации второй группы использовали сходный препарат псевдовирусов с добавлением неполного адьюванта Фрейнда. Инъекции производили в четыре точки грудной мышцы птиц. Для стимуляции появления ширконейтрализующих антител, в трёх последних введениях использовали смесь VSV-GPΔMLDpopr и Lenti-GPΔMLD-DRC, для второй группы так же добавляли НАФ.

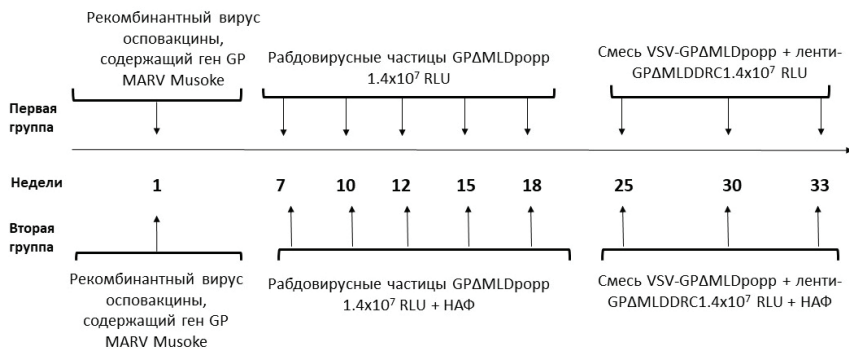


Рис. 1. Схема иммунизации кур. Всего было проведено 9 иммунизаций с промежутком в три недели. Первая группа птиц была иммунизирована очищенными ПВЧ VSV-GPΔMLDpopp в концентрации  $1,4 \times 10^7$  RLU. Вторая группа птиц получала тот же антиген в комплексе с НАФ. Последние 3 иммунизации выступали в роли буста и птицам вводили смесь VSV-GPΔMLDpopp и Lenti-GPΔMLD-DRC

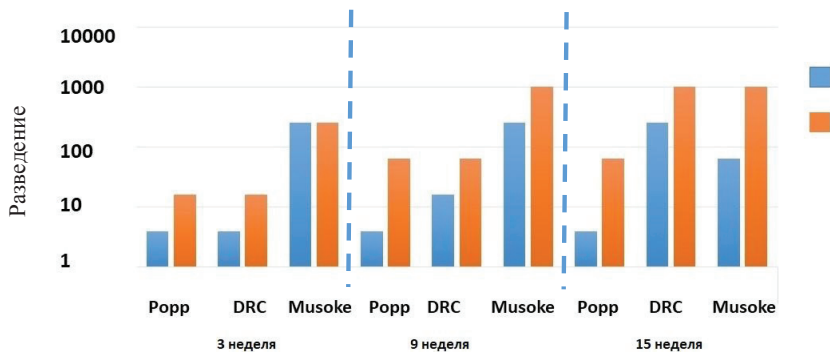


Рис. 2. Динамика накопления кросснейтрализующих антител. Синим цветом отмечена курица М7, красным — М8. Обе птицы относятся ко второй группе и во время иммунизации получали инъекции антигена в комплексе с НАФ

После сбора яиц от иммунизированных птиц проводили выделение препаратов антител. Выделение желточных антител IgY было проводили с помощью метода изоэлектрического осаждения.

Нейтрализующую активность IgY в отношении MARV проверяли методом вируснейтрализации псевдовирюсов на клетках НЕК293Т с использова-

---

нием набора Luciferase assay system (Promega). Нами была изучена способность препаратов IgY нейтрализовать штаммы MARV DRC1999 и Musoke и Popp. Для этого использовали псевдовirusы на основе рабдовирусной системы, разработанной панели. Стоит заметить, что уровень нейтрализации для первых двух штаммов достигает 1/1024.

Таким образом, было показано что наряду с антителами, нейтрализующими MARV штамм Popp, происходит накопление антител способных нейтрализовать два других использованных в работе штамма DRC1999 и Musoke.

**ЭКСКРЕТОРНО-СЕКРЕТОРНЫЙ ПРОДУКТ  
*OPISTHORCHIS FELINEUS* УВЕЛИЧИВАЕТ ПОКАЗАТЕЛИ  
ЗЛОКАЧЕСТВЕННОСТИ ХОЛАНГИОЦИТОВ H69 \***

*OPISTHORCHIS FELINEUS* EXCRETORY/SECRETORY PRODUCTS  
INCREASE MALIGNANT CHARACTERISTICS  
OF H69 CHOLANGIOCYTES

Д. В. Пономарев

Федеральный исследовательский центр  
Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

D. V. Ponomarev

The Federal Research Center of Siberian Branch of the Russian Academy  
of Sciences Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia

E-mail: mrsmokecat@gmail.com

**Аннотация**

Описторхоз — заболевание, вызываемое паразитированием плоских червей рода *Opisthorchis* в печени млекопитающих, включая человека. Этот род включает в себя вид *Opisthorchis felineus* (*O. felineus*), который охватывает территории Западной Сибири, расположенные в бассейнах рек. Обь-Иртышский бассейн самый крупный из них. [1] Среднегодовая заболеваемость описторхозом, вызванным *O. felineus*, в Новосибирске составляет от 100 до 127 на 100,000 человек в год. [1]. В настоящей работе мы исследуем ответ иммортализованной клеточной линии холангиоцитов человека H69 [2] на экскреторно/секреторный продукт *O. felineus* в системе бесконтактного сокультивирования. Результаты показали увеличение скорости миграции H69 в 6 раз после 14 дней со-культивирования.

**Abstract**

Opisthorchiasis is a disease caused by parasitization of flatworms of genus *Opisthorchis* in the liver of mammals, including humans. This genus include species *Opisthorchis felineus* (*O. felineus*), which occurs in Western Siberia, near river basins. The Ob-Irtysh basin is the largest of them. The average annual incidence of *O. felineus* in Novosibirsk was between 100 and 127 per 100,000 people per year. In this study, we investigated the

responses of an immortalized human cholangiocyte H69 to excretory/secretory product released from *O. felineus* by using a non-contact co-culture technique. The results indicated an increase rate of migration of H69 cells.

Описторхоз характеризуется длительным течением с возможным развитием холангиокарциномы — высоколетальным злокачественным новообразованием желчевыводящих путей, для которого характерна высокая частота метастазов. Пятилетняя выживаемость составляет менее 50 %. [3]

Механизм канцерогенеза, вероятно, связан с экскреторно-секреторным продуктом *O. felineus*. Этот продукт обладает генотоксичными свойствами, за счет чего может вызывать повреждения ДНК и приводить к возникновению предраковых изменений клеток.

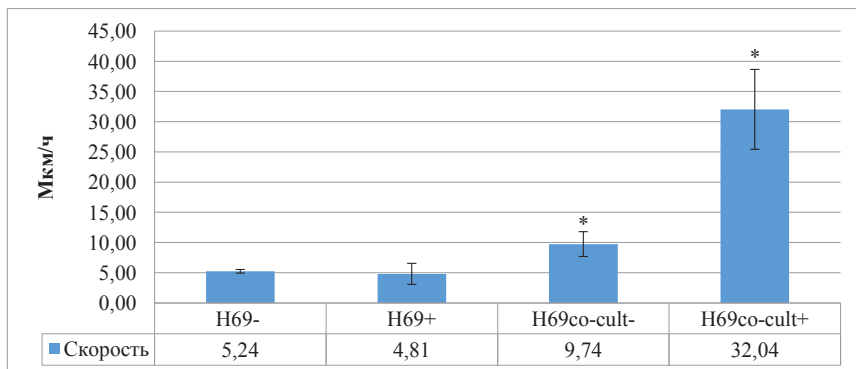
Цель исследования — изучить влияние экскреторно/секреторного продукта *O. felineus* на показатели миграции иммортализованной клеточной линии холангиоцитов человека H69.

Исследование проводили на перевиваемой культуре холангиоцитов человека H69. Клетки выращивали при 37 °C с 5 % CO<sub>2</sub> в специальных полных средах, содержащих: DMEM, 10 % FBS, антибиотик/антимикотик, аденин, эпинефрин, инсулин, гидрокортизон, Т3-трансферрин, EGF. Взрослых особей выделяли из желчных протоков печени хомячков *Mesocricetus auratus*, предварительно зараженных 100 метацеркариями *O. Felineus*, выделенными из рыб семейства карповых.

Клетки H69 культивировали без прямого контакта с 6 особями взрослой стадии *O. felineus* в течение 14 дней при помощи специальных культуральных вставок, создающих две камеры, разделенные мембраной с диаметром пор 1 и 8 микрон. Для оценки клеточной подвижности применялся тест на заживление раны. По истечении 14 дней сокультивирования клетки помещали в двухкамерные силиконовые вставки до образования монослоя. После удаления вставок создавалось пространство между клетками с фиксированным расстоянием в ~500мкм. Среду заменяли на бессывороточную и отслеживали движение клеток. Тест проводили в четырех вариантах. Было произведено 3 повтора. Достоверность различий подсчитана с помощью U-критерия Манна — Уитни в программе Statistica 10 относительно контрольной группы.

Нормальная скорость клеточной миграции холангиоцитов составила 5,24 мкм/ч (H69-). После 14 дней сокультивирования (у опытной группы H69co-cult-) скорость выросла почти в 2 раза ( $p < 0,05$ ). При добавлении *O. felineus* к опытной группе клеток (H69co-cult+) скорость клеточной миграции выросла более чем в 6 раз ( $p < 0,05$ ). Эффекта не наблюдалось при добавлении *O. felineus* к интактной группе (H69+). Были отмечены морфо-

логические изменения клеток при со-культивировании с использованием вставок с диаметром пор 8 микрон.



Скорость клеточной миграции H69 после сокультивирования с *O. felineus*.

«+» — добавление *O. felineus*. «H69» — интактные клетки.

«H69co-cult» — клетки H69 после 14 дней со-культивирования. \*  $p < 0,05$ .

Экскреторно-секреторный продукт *O. felineus* значительно увеличивает скорость клеточной миграции и меняет ее тип на индивидуальный, присущий опухоли характер движения клеток, при котором они передвигаются независимо друг от друга. Это говорит о приобретении клетками злокачественных свойств.

## Литература

1. Olga S. Fedorova, Yulia V. Kovshirina, «Opisthorchis felineus infection and cholangiocarcinoma in the Russian Federation: A review of medical statistics,» *Parasitology International*, pp. 365–371, 4 Aug 2017.
2. Grubman SA, Perrone RD, Lee DW, et al., «Regulation of intracellular pH by immortalized human intrahepatic biliary epithelial cell lines,» *Am J Physiol*, p. G1060–G1070, 1994.
3. Bridgewater, JA; Goodman, KA; Kalyan, A; Mulcahy, «Biliary Tract Cancer: Epidemiology, Radiotherapy, and Molecular Profiling,» *American Society of Clinical Oncology Educational Book; American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting*, p. e194–203, 2016.



**БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ ЭКЗОСОМ МОЛОКА \***

## PROTEINS AND PEPTIDES OF MILK EXOSOMES

Л. В. Пурвиньш, С. Е. Седых, Г. А. Невинский

*Новосибирский государственный университет  
Институт химической биологии и фундаментальной медицины  
Сибирского отделения РАН*

L. V. Purvinsh, S. E. Sedykh, G. A. Nevinsky

*Novosibirsk State University  
SB RAS ICBFM, Russia*

E-mail: ladapurvinsh13@gmail.com

**Аннотация**

В многоклеточном организме существует множество способов передачи сигнала между клетками, одним из них является везикулярный транспорт. Среди всех везикул, выделяемых клетками, последнее время наибольшее внимание уделяется экзосомам — нановезикулам с диаметром 40–100 нм. Было показано наличие в их составе различных белков, ДНК, мРНК и микроРНК, а также охарактеризована роль определенных экзосомальных белков и нуклеиновых кислот в различных клеточных процессах.

Выделение и исследование экзосом проводится из разных биологических жидкостей, однако в большинстве случаев используется культуральная жидкость или плазма крови. Экзосомы из молока животных и человека изучены в меньшей степени, так как в молоке присутствует большое количество примесных белков и белковых комплексов, что приводит к сложностям при выделении стандартным методом.

Исследования белков и пептидов экзосом молока важно для понимания их роли в физиологии молочных желез и организма в целом, а также их влияния на развитие пищеварительной и иммунной систем новорожденных. Кроме того, молочные внеклеточные везикулы — это новая область исследований, фокусирующаяся на возможности их использования в медицине в качестве диагностических и терапевтических инструментов.

**Abstract**

There are many ways to transmit signals between cells and tissues in a multicellular organism. Vesicular transport is one of them. Among the vesicles isolated from cells,

---

© Л. В. Пурвиньш, С. Е. Седых, Г. А. Невинский, 2019

\* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 18-74-10055).

special attention has recently been paid to exosomes — nanovesicles with a diameter of 40–100 nm. The presence of proteins, DNA, mRNA and miRNA in their composition has been shown and the role of proteins and nucleic acids contained in exosomes during different processes in body has been clarified.

The isolation and study of exosomes are carried out from a variety of biological fluids, although in most cases are used a culture fluid and blood plasma. Exosomes from the milk of animals and humans have been studied to a lesser extent because the isolation of exosomes from this biological fluid is complicated by the presence of a large number of impurity proteins and complexes that make it difficult to obtain pure preparations by standard methods.

Investigation of milk exosome proteins and peptides are important for understanding their role in the physiology of the mammary glands and the body as a whole, as well as their impact on the development of the newborns digestive and immune systems. Besides, milk extracellular vesicles are a new area of research focusing on the possibility of their use in medicine as diagnostic and therapeutic tools.

Нами был разработан модифицированный протокол выделения экзосом из сложных биологических жидкостей, таких как молоко. Полученные препараты анализировались электронной микроскопией, где с помощью иммуноцитохимического анализа было показано наличие экзосом. Кроме того, для дополнительной очистки препаратов использовался метод аффинной хроматографии, при котором происходил захват антителами основных маркерных трансмембранных белков экзосом CD 9, CD 63 и CD 81. Использование проточной цитометрии показало наличие данных маркеров во фракциях экзосом после хроматографии.

Электрофоретическим анализом и MALDI масс-спектрометрией было показано, что экзосомы, выделенные из молока, не содержат некоторых основных молочных белков, которые ранее были описаны в качестве экзосомальных (например, казеины и их изоформы), что свидетельствует о вероятном совыделении множества определенных белков вместе с экзосомами в процессе их выделения. С другой стороны, впервые было показано наличие мелких белков и пептидов в составе экзосом молока. Для анализа данных пептидов было проведено разрушение экзосом и разделение пептидов обращенно-фазовой хроматографией с последующим масс-спектрометрическим анализом.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что при правильной технологии выделения молоко служит перспективным источником экзосом, которые могут быть использованы для дальнейших фундаментальных и прикладных исследований.

**ИССЛЕДОВАНИЕ АФФИННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ  
ПРОИЗВОДНЫХ РЕКОМБИНАНТНОГО  
АНТИМЮЛЛЕРОВА ГОРМОНА ЧЕЛОВЕКА  
С РЕКОМБИНАНТНЫМ РЕЦЕПТОРОМ II ТИПА**

QUANTITATIVE AFFINITY INTERACTION OF HUMAN RECOMBINANT  
ANTI-MULLERIAN HORMONE DERIVATIVES WITH RECOMBINANT  
RECEPTOR TYPE II

А. Я. Рак<sup>1,2</sup>, А. В. Трофимов<sup>1</sup>, Н. П. Горбунов<sup>1,3</sup>,  
А. В. Соколов<sup>3</sup>, А. М. Ищенко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо  
чистых препаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный университет,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup>ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»,  
Санкт-Петербург, Россия

A. Ya. Rak<sup>1,2</sup>, A. V. Trofimov<sup>1</sup>, N. P. Gorbunov<sup>1,3</sup>, A. V. Sokolov<sup>3</sup>,  
A. M. Ischenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup>State Research Institute for Highly Pure Biopreparations,  
St. Petersburg, Russia

<sup>2</sup>St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

<sup>3</sup>Institute for Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia

e-mail: a.ya.rak@hpb.spb.ru

**Аннотация**

В настоящее время на основе рекомбинантного антимюллера гормона (рАМГ) человека планируется разработка таргетного противоопухолевого препарата. В значительной мере ее затрудняет отсутствие сведений о механизме взаимодействия рАМГ и его производных со специфическим рецептором II типа (MISRII). В данной работе методом поверхностного плазмонного резонанса была исследована аффинность связывания рАМГ и его производных с рекомбинантным аналогом MISRII. Было установлено, что сродство различных производных гормона к MISRII существенно различается. Максимальной аффинностью (оценивалась по величине рав-

новесной константы диссоциации  $K_D$ , константы ассоциации  $k_a$  и константы скорости диссоциации  $k_d$ ) характеризовалось связывание с рецептором С-рАМГ. В то же время сродство прогормона к рецептору оказалось в 40 раз ниже, чем С-рАМГ, однако несколько выше, чем полурасщепленная форма рАМГ. Полученные результаты свидетельствуют о наивысшей аффинности взаимодействия С-рАМГ с MISRII и, как следствие, о целесообразности разработки лекарственных препаратов на основе данного производного гормона.

### Abstract

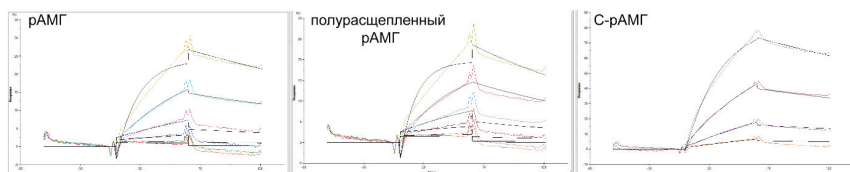
To date, human recombinant anti-mullerian hormone (rAMH) is considered to be a basis of new targeted antitumor drug. Its development is largely hampered by the lack of information about the mechanism of rAMH and its derivatives interaction with a specific type II receptor (MISRII). Here, the surface plasmon resonance method was used to study the affinity of rAMH and its derivatives binding to the recombinant MISRII analogue. The affinity of three hormone derivatives interaction with MISRII turned out to be significantly different. C-rAMH binding to the receptor was characterized by maximum affinity (was estimated by the values of the equilibrium dissociation constant  $K_D$ , the association constant  $k_a$  and the dissociation rate constant  $k_d$ ). At the same time, the prohormone affinity to the receptor was 40 times lower than that of C-rAMH, but slightly higher than that of the half-cleaved rAMH form. The results indicate the highest affinity of C-rAMH interaction with MISRII and consequently the feasibility of developing drugs based on this hormone derivative.

Рак яичников (РЯ) является наиболее смертоносным онкогинекологическим заболеванием [1], традиционное лечение которого часто оказывается неэффективным ввиду развития у пациентов резистентности к применяемым химиотерапевтическим агентам [2]. При этом для терапии РЯ до сих пор не разработаны безопасные лекарственные средства таргетного действия [3]. Основой для подобных препаратов, отдельно или в комбинации с цитостатиками, может стать рекомбинантный антимюллеров гормон (рАМГ) — гомодимерный гликопротеин массой около 140 кДа, способный индуцировать апоптоз опухолевых клеток яичника, в большинстве случаев гиперэкспрессирующих рецептор АМГ II типа (MISRII) [4, 5]. Секретированный АМГ (прогормон) претерпевает процессинг, в результате которого происходит его активация и образуется несколько молекулярных производных, в том числе гормон, расщепленный по одной полипептидной цепи (140 кДа) и С-концевой фрагмент (С-рАМГ, 25 кДа) [6].

В настоящей работе были использованы ранее полученные высокоочищенные препараты всех трех упомянутых форм рАМГ [7]. Для понимания терапевтического потенциала производных гормона первоначально было необходимо оценить аффинность их взаимодействия с MISRII, ответственным за передачу функционального сигнала внутрь клетки, что и являлось целью настоящей работы. В качестве аналога рецептора был использован

полученный ранее химерный белок MISRII+Fc, состоящий из экстраклеточного домена MISRII и Fc фрагмента иммуноглобулина IgG1 человека [8]. Аффинность взаимодействий белков оценивали методом поверхностного плазмонного резонанса с использованием анализатора BiaCore X100 и стандартных CM5 чипов (GE Healthcare, Австрия).

Сенсограммы взаимодействий производных рАМГ с MISRII+Fc представлены на рисунке. Приведенные далее значения равновесных констант диссоциации  $K_D$  были рассчитаны после 6 циклов с последовательным увеличением концентрации лигандов.



Сенсограммы взаимодействий трех производных рАМГ с CM5-чипом с Anti-Human-Fc после пропускания 20 нМ MISRII+Fc

В таблице суммированы основные параметры, характеризующие взаимодействие аналитов при иммобилизации на групповом чипе (Anti-Human-Fc) 20 нМ MISRII+Fc. Наиболее аффинным оказалось связывание с рецептором С-рАМГ (наименьшие значения  $K_D$  и константы скорости диссоциации  $k_d$ , наибольшее значение максимальной связывающей способности поверхности аналита  $R_{max}$ ). Прогормон взаимодействовал с MISRII+Fc сильнее, чем полурасщепленный рАМГ, но почти в 40 раз хуже, чем С-концевой домен. Значения U-value ниже 15 свидетельствуют о незначительной корреляции кинетических параметров и адекватности расчета их величин.

#### Параметры, характеризующие кинетику взаимодействия MISRII+Fc (иммобилизован при концентрации 20 нМ) с рАМГ и его производными

Аналит	рАМГ (прогормон)	рАМГ полурасщепленный	С-рАМГ
Концентрации, нМ	1,25–1280	1,25–1280	0,74–20
$K_D$ , нМ	88,6	111,2	1,7
$k_a$ , 10%/M*c	0,041	0,055	1,78
$k_d$ , 1/c	0,00363	0,00611	0,00297
$R_{max}$ , RU	29,7	26,0	89,4
U-value	9	7	4

Полученные результаты свидетельствуют о том, что из трех производных гормона наивысшей аффинностью взаимодействия со специфическим рецептором обладает С-рАМГ, в связи с чем именно это производное гормона наиболее перспективно для разработки лекарственных форм.

### Литература

1. Siegel R. L., Miller K. D., Jemal A. Cancer statistics, 2019 //CA: a cancer journal for clinicians. 2019. Vol. 69. № 1. P. 7–34.
2. Gill S. E. et al. Investigation of factors affecting the efficacy of 3C23K, a human monoclonal antibody targeting MISIR //Oncotarget. 2017. Vol. 8. №. 49. P. 85214–85223.
3. Estupina P. et al. The anti-tumor efficacy of 3C23K, a glyco-engineered humanized anti-MISRII antibody, in an ovarian cancer model is mainly mediated by engagement of immune effector cells //Oncotarget. 2017. Vol. 8. №. 23. P. 37061–37079.
4. Kersual N. et al. The human Müllerian inhibiting substance type II receptor as immunotherapy target for ovarian cancer: Validation using the mAb 12G4 // MAbs. 2014. Vol. 6. № 5. P. 1314–1326.
5. Pépin D. et al. AAV9 delivering a modified human Mullerian inhibiting substance as a gene therapy in patient-derived xenografts of ovarian cancer //Proceedings of the National Academy of Sciences. 2015. Vol. 112. №. 32. P. E4418-E4427.
6. Рак А. Я. и др. Антимюллеров гормон: структура, сигнальный путь и противоопухолевая активность //Цитокины и воспаление. 2016. Т. 15. № 3–4. С. 256–264.
7. Rak A. Ya. et al. Spontaneous proteolytic processing of human recombinant anti-mullerian hormone: structural and functional differences of the molecular forms // Applied Biochemistry and Microbiology. 2019. Vol. 55. № 1. P. 13–20.
8. Rak A. Ya. et al. Cytotoxic activity of the human activated recombinant anti-mullerian hormone as a basis for the new drug development //Cell and Tissue Biology. 2018. Vol. 12. № 6. P. 460–467.

**РЕАЛИЗАЦИЯ АНТИОКСИДАНТНЫХ  
И ОБМЕНОСТИМУЛИРУЮЩИХ СВОЙСТВ  
ФЕРУЛОВОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ НИВЕЛИРОВАНИЯ ГИПОКСИИ  
У ЭМБРИОНОВ КУР\***

REALIZATION OF ANTIOXIDANT AND EXCHANGE-PROPERTIING  
PROPERTIES OF FERULIC ACID FOR LEVELING HYPOXIA  
IN CHICKEN EMBRYOS

А. М. Резвых<sup>1</sup>, Т. О. Азарнова<sup>1</sup>, М. С. Найденский<sup>1</sup>,  
И. С. Луговая<sup>1</sup>, К. С. Остренко<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной  
медицины и биотехнологии — МВА им. К. И. Скрябина»*

<sup>2</sup> *Всероссийского научно-исследовательский институт физиологии,  
биохимии и питания животных — филиал ФГБНУ «Федеральный научный  
центр животноводства — ВИЖ им. акад. Л. К. Эрнста»*

A. M. Rezvykh<sup>1</sup>, T. O. Azarnova<sup>1</sup>, M. S. Naidenskiy<sup>1</sup>,  
I. S. Lygovaya<sup>1</sup>, K. S. Ostrenko<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *FSBEI of HE “MSAVMB — MBA named after K. I. Scriabin”, Russia*  
<sup>2</sup> *VNIIFBiP of animals, Russia*

E-mail: rezvyh.99@mail.ru, azarena@list.ru,  
ine98@yandex.ru, ostrenkoks@gmail.com

**Аннотация**

Антиоксидантные и обменостимулирующие свойства феруловой кислоты позволяют нивелировать негативные последствия гипоксических явлений, повысить качество и жизнеспособность молодняка суточного возраста.

**Abstract**

The antioxidant and metabolic-stimulating properties of ferulic acid make it possible to neutralize the negative effects of hypoxic phenomena, and to improve the quality and vitality of young animals of one day old.

---

© А. М. Резвых, Т. О. Азарнова, М. С. Найденский, И. С. Луговая, К. С. Остренко,  
2019

\* This work was supported by Russian Science Foundation (Grant No. 17-15-01326).

Как известно, эмбриогенез птицы неминуемо сопряжен с развитием в определенные периоды гипоксических явлений, негативные последствия которых усугубляются при нарушении функциональности тех митохондриальных цепей, в которые небольшое количество кислорода яйца всё же поступило. Как известно, промышленная инкубация до сих пор не соответствует всем требованиям интенсивно развивающегося зародыша, а вместе с тем, определяет высокую вероятность воздействия на организм факторов стресса, большинство из которых не являются слабыми, выполняя тренировочные функции. Указанное, прежде всего, сопровождается увеличением синтеза свободных радикалов, образованием продуктов липопероксидации, аферментозами, гипоэнергитическим состоянием, возрастанием доли анаэробного гликолиза и, как следствие — развитием ацидоза. Выше указанное, негативно отражается на качестве и интенсивности развития, жизнеспособности, а также продуктивности птицы.

Избежать развитие гипоксических состояний в эмбриогенезе кур невозможно, однако нивелировать их негативные последствия возможно, в том числе, благодаря использованию различных антиоксидантов.

В данном исследовании был использован относительно новый антиоксидант растительного происхождения — феруловая кислота. Данное БАВ является ароматическим соединением, входящим в состав клеточной стенки растений, и в своей химической структуре содержит углеродную цепь с двойной связью, а также фенольное кольцо, которые по данным Назаровой Л. Е. и др. обуславливают ее высокую антиоксидантную эффективность, а вместе с тем и мембраностабилизирующую активность [2].

Известно, что изучаемое БАВ замедляет процесс пероксидации липидов и легко вступает в свободно-радикальные реакции с образованием стабильного слабо реакционноспособного радикала, она также способна повышать активность таких антиоксидантных ферментов, как каталаза, супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза [1].

Всё выше изложенное указывает на способность феруловой кислоты многопланово препятствовать развитию стресса и выступать в качестве перспективного препарата для профилактики гипоксии.

В связи с выше изложенным, целью данного исследования является изучение эффективности профилактического действия феруловой кислоты для нивелирования негативных последствий гипоксии у эмбрионов кур.

Эксперимент был проведен на птицефабрике «Воловский бройлер» с использованием инкубационных яиц, полученных от бройлеров кросса Ross 308. По принципу аналогов были подобраны 3 партии яиц по 324 штуки в каждую, которые перед закладкой в инкубатор обрабатывали растворами феруловой кислоты в различных концентрациях.



Все исследования осуществляли по общепринятым методикам. В данной работе предоставлены результаты лучшей партии. Следует отметить, что в остальных группах отрицательные результаты зафиксированы не были.

Полученные данные свидетельствовали о том, что обработка инкубационных яиц растворами феруловой кислоты перед закладкой в инкубатор положительно повлияла на эмбриональную жизнеспособность фактически на всех этапах развития зародыша, причём максимальные различия между опытом и контролем были установлены по категориям отходов инкубации, обусловленных развитием гипоксии.

Так, в лучшей опытной группе было установлено снижение большинства изучаемых категорий отходов инкубации, в частности, таких, как «неоплод» в 1,3 раза, «кровяные кольца» (в опыте таковые отсутствовали), «задохликов» и «слабых» равнозначно в 1,3 раза. Указанное определило увеличение вывода цыплят на 3,4 %, выводимости яиц на 2,35 %. Как видно, разница между опытом и контролем не высока, однако учитывая высокие показатели вывода в контроле (87,65 %), превосходящие средние значения по птицефабрикам РФ, и тот факт, чем выше качество биологического материала, тем сложнее его улучшить (Найденский М. С., 2010), можно считать полученный результат высоко положительным.

Повышение эмбриональной жизнеспособности сопровождалось превосходством представителей опытной группы по интерьерным показателям, соответственно, по сравнению с контролем. Так, в экспериментальной группе установлена тенденция к увеличению живой массы цыплят суточного возраста на 6,2 %, а также снижение массы желточного мешка с остаточным желтком на 12,7 %, соответственно, по сравнению с контролем, что по данным Отрыганьева Г. К. и др. (1989) указывает на высокую вероятность лучшей реализации продуктивных качеств особи в дальнейшем. Наряду с этим, установлено увеличение массы некоторых внутренних органов таких, как: печень на 38,8 % ( $p < 0,001$ ), селезенка на 9,1 %, фабрициева сумка на 44,6 %, мышечный желудок на 2 % и железистый желудок на 7,5 %, по сравнению с контролем.

Снижение интенсивности свободно-радикальных реакций, а вместе с тем липопероксидации обусловила интенсификацию центральных обменных процессов. Так, было установлено достоверное увеличение содержания глюкозы в опытной группе относительно контроля в 1,5 раза, активности  $\alpha$ -амилазы на 9,6 % при снижении ЛДГ на 7,45 %. Всё это свидетельствует о превалирующей роли аэробного гликолиза, а, следовательно, о более эффективном обеспечении тканей организма энергией.

Следует также обратить внимание на снижение содержания триглицеридов на 27,55 % ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем, что позволяет предполо-

жить о возрастающей роли глюконеогенеза и значимости именно липидных составляющих для заявленного процесса.

В свою очередь, содержание белка и альбуминов возросло на 15,9 % и на 20 % соответственно, что, очевидно, не связано с реализацией мономеров белка для обеспечения субстратов глюконеогенеза и в дальнейшем на энергетические нужды, а учитывая увеличение живой массы и весовых значений интерьерных показателей, на становление органов и тканей, обуславливая их более высокое качество и функциональность.

Таким образом, результаты исследований свидетельствуют о том, что феруловая кислота, обладая выраженными антиоксидантными и обменостимулирующими свойствами, нивелирует негативные последствия гипоксических явлений, возникающих в эмбриогенезе кур, определяя повышение эмбриональной жизнеспособности и качества развития молодняка.

### **Литература**

1. Дьякова, И. Н. Экспериментальное исследование церебропротекторных свойств феруловой кислоты в условиях ишемии мозга: дис. ... кандидата мед. наук / И. Н. Дьякова. Пятигорск: ПятГФА, 2007. 100 с.
2. Назарова, Л. Е. Активность кислоты феруловой в условиях цитотоксического повреждения / Л. Е. Назарова, М. А. Оганова, И. Л. Абисалова. Пятигорск: Рекламно-информ. агентство на КМВ. 2010. С. 20.

**РОЛЬ ГЕНА *XIST* В ИМПРИНТИРОВАННОЙ ИНАКТИВАЦИИ  
У ПОЛЕВКИ *M. LEVIS*\***ON THE ROLE OF *XIST* DURING AN IMPRINTED INACTIVATION  
PROCESS IN PRAIRIE VOLE *M. LEVIS*Н. А. Рифель<sup>1,2</sup>, А. И. Шевченко<sup>1,2,3,4</sup><sup>1</sup>*Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия*<sup>2</sup>*Новосибирский национальный исследовательский государственный  
университет, Новосибирск, Россия*<sup>3</sup>*Институт химической биологии  
и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*<sup>4</sup>*Национальный медицинский  
исследовательский центр им. акад. Е. Н. Мешалкина*N. A. Rifel<sup>1,2</sup>, A. I. Shevchenko<sup>1,2,3,4</sup><sup>1</sup>*The Federal Research Center of Siberian Branch of the Russian Academy  
of Sciences Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia*<sup>2</sup>*Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*<sup>3</sup>*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine  
of the SB RAS, Novosibirsk, Russia*<sup>4</sup>*E. N. Meshalkin National Medical Research Centre,  
Ministry of Health Care of Russian Federation, Novosibirsk, Russia*

E-mail: n.rifel@g.nsu.ru

**Аннотация**

У полевок на ранней стадии развития инактивации подвергается преимущественно отцовская X-хромосома. Это явление называется импринтированной инактивацией, она сохраняется в тканях трофобласта. Ранее было известно, что ген *Xist* — ключевой регулятор процесса инактивации, но его функции в импринтированной инактивации не были ясны. Мы получили трофобластные стволовые клетки полевки с эктопически экспрессирующимся транскриптом *Xist* и исследовали процесс индуцированной нами инактивации X-хромосомы. Это позволило построить первую предполагаемую модель процесса импринтированной инактивации.

**Abstract**

Paternal X-chromosome undergoes transcriptional silencing at the early stages of development in voles. This phenomenon is called the imprinted inactivation, and it is stable in trophoblast tissue. It is widely known that the *Xist* gene is an important inactivation regulator. However, its precise functions in the imprinted inactivation remained a mystery. To study this process, we induced overexpression of *Xist* in the vole trophoblast stem cells. Our analysis led to a creation of the first hypothetical model of the imprinted inactivation in voles.

Инактивация X-хромосомы у самок млекопитающих — важный эпигенетический феномен раннего развития. Его исследование способствует не только пониманию фундаментальных биологических процессов, таких как плюрипотентное состояние клеток и их дифференцировка, но и разработке новых методов геной инженерии и локус-специфической регуляции уровня экспрессии генов.

Существует два типа инактивации X-хромосомы: случайная и импринтированная. У некоторых млекопитающих, например, грызунов, инактивации на стадии преимплантационного развития подвергается преимущественно отцовская X-хромосома [1]. Такой тип инактивации X-хромосомы сохраняется в трофобласте и экстраэмбриональной эндодерме, которые дают начало внезародышевым органам: плаценте и желточному мешку. В соматических клетках взрослых особей у плацентарных млекопитающих наблюдается случайная инактивация. Во время случайной инактивации шансы X-хромосом стать неактивными равны вне зависимости от их происхождения.

Ранее было показано, что основным регулятором случайной инактивации является ген *Xist*, который кодирует длинную нетранслируемую РНК [2]. Но не было детальных данных о том, как функционирует ген *Xist* и его продукт, длинная некодирующая РНК, в процессе импринтированной инактивации X-хромосомы. Кроме того, механизмы импринтированной инактивации у близкородственных видов грызунов, таких как мышь и полевка, значительно различаются. Полевки отличаются от мыши по набору модификаций хроматина и факторов сайленсинга на неактивной X-хромосоме в преимплантационном развитии [3, 4]. Такое состояние предположительно связано с эволюционно предковой формой импринтированной инактивации. Особенность ранних этапов эмбриогенеза делает полевку уникальной моделью для изучения возникновения механизмов инактивации.

Мы исследовали роль гена *Xist* в процессе импринтированной инактивации X-хромосомы у полевки. Для моделирования импринтированной инактивации выбрали культивируемые линии трофобластных стволовых (ТС) клеток полевки с *каркотипом* (53,X). В работе успешно использовали недавно разработанный способ локус-специфического запуска транскрипции

эндогенного *Xist* с помощью системы SAM-активации, что позволило вызывать эктопическую экспрессию эндогенного *Xist* на единственной активной X-хромосоме.

В ходе экспериментов мы выяснили, что укороченный транскрипт *Xist* способен участвовать в индуцированной инактивации X-хромосомы в ТС-клетках полевки. Показали, что активная экспрессия РНК *Xist* — недостаточное условие для запуска сайленсинга генов X-хромосомы в ходе индуцированной инактивации. Проанализировали изменения в структуре хроматина и статусе экспрессии генов при индуцированной инактивации. Выявленные механизмы позволили представить гипотетическую модель импринтированной инактивации у полевки.

### Литература

1. Okamoto I. Epigenetic Dynamics of Imprinted X Inactivation During Early Mouse Development // *Science* (80-). 2004. Vol. 303, № 5658. P. 644–649.
2. Clemson C. M. et al. Stabilization and localization of *Xist* RNA are controlled by separate mechanisms and are not sufficient for X inactivation // *J. Cell Biol.* Rockefeller University Press, 1998. Vol. 142, № 1. P. 13–23.
3. Vaskova E. A. et al. Dynamics of the two heterochromatin types during imprinted X chromosome inactivation in vole *Microtus levis* // *PLoS One*. 2014.
4. Demytyeva E. V. et al. Difference between random and imprinted X inactivation in common voles // *Chromosoma*. Springer-Verlag, 2010. Vol. 119, № 5. P. 541–552.

**ВЛИЯНИЕ СВЕРХЭКСПРЕССИИ ГЕНА 5-HT7 РЕЦЕПТОРОВ  
В МОЗГЕ МЫШЕЙ, СОДЕРЖАЩИХСЯ  
В УСЛОВИЯХ СОКРАЩЕННОЙ ДЛИНЫ СВЕТОВОГО ДНЯ,  
НА ПЛАСТИЧНОСТЬ СЕРТОНИНОВОЙ СИСТЕМЫ МОЗГА \***

EFFECT OF 5-HT7 GENE RECEPTOR OVER-EXPRESSION  
IN THE BRAIN OF MICE HOUSED UNDER REDUCED DAYLIGHT  
CONDITION ON PLASTICITY OF THE BRAIN SEROTONIN SYSTEM

А. Я. Родный, Е. М. Кондаурова, Т. В. Ильчибаева,  
Е. В. Антонов, В. С. Науменко

*ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр  
Институт цитологии и генетики СО РАН»  
(ФИЦ ИЦиГ СО РАН)*

A. Ya. Rodnyy, E. M. Kondaurova, T. V. Ilchibaeva,  
Y. V. Antonov, V. S. Naumenko

*Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia*

E-mail: [aleksandr1994rodny@gmail.com](mailto:aleksandr1994rodny@gmail.com)

**Аннотация**

Мышам линии C57Bl6 в ядра шва среднего мозга вводили аденоассоциированные вирусные частицы, несущие плазмиду AAV\_SynH1-2\_HTR7-EGFP, обеспечивающую сверхэкспрессию 5-HT7 рецепторов в нейронах мыши, а затем помещали их в условия сокращенного светового дня, моделирующие сезонную депрессию. Через 7 недель эксперимента были измерены уровни мРНК генов 5-HT1A, 5-HT2A, 5-HT7 рецепторов в среднем мозге, фронтальной коре, гиппокампе и гипоталамусе, а также уровни мРНК триптофангидроксилазы-2 (ТПГ2), моноаминоксидазы-A (MAO-A) и транспортера серотонина (5-НТТ) в среднем мозге. Вместе с тем были определены уровни серотонина (5-НТ) и его основного метаболита, 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-ГИУК). Сверхэкспрессия 5-HT7 вызвала снижение экспрессии мРНК гена ТПГ2 в среднем мозге, снижение уровня серотонина и его метаболитического коэффициента (5-ГИУК/5-НТ) в гипоталамусе, снижение уровня 5-ГИУК в гиппокампе. Сверхэкспрессия 5-HT7 в среднем мозге не оказала влияния на уровни мРНК генов 5-HT1A и 5-HT2A рецепторов во всех исследованных структурах мозга.

© А. Я. Родный, Е. М. Кондаурова, Т. В. Ильчибаева, Е. В. Антонов, В. С. Науменко, 2019

\* Исследования выполнены при поддержке гранта РФФ № 19-15-00025.

### **Abstract**

Adeno-associated viral particles carrying the AAV\_SynH1-2\_HTR7-EGFP plasmid, which over-expressed 5-HT7 receptors in mouse neurons, were injected into the midbrain raphe nuclei of C57Bl6 mice. Mice then were placed under reduced daylight conditions simulating seasonal depression. After 7 weeks of experiment, 5-HT1A, 5-HT2A, 5-HT7 receptor gene mRNA levels were measured in the midbrain, frontal cortex, hippocampus and hypothalamus, as well as mRNA levels of tryptophan hydroxylase-2 (TPH2), monoamine oxidase (MAO-A) and serotonin transporter (5-HTT) in the midbrain. In addition, serotonin and its primary metabolite 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) levels in brain tissue were measured. The 5-HT7 over-expression caused a decrease in TPH2 gene mRNA expression, decrease in serotonin level and its metabolic coefficient (5-HIAA/5HT) in the hypothalamus and also led to a decrease in 5-HIAA level in the hippocampus. Overexpression of 5-HT7 did not affect the 5-HT1A and 5-HT2A gene receptor mRNA levels in all investigated structures.

### **Актуальность**

Депрессия — одно из серьезнейших заболеваний человека. Во многом это связано с тем, что от этого страдает очень много людей — около 350 миллионов, по данным ВОЗ. Тем не менее, депрессия плохо диагностируется и не лечится из-за стигматизации, отсутствия эффективных методов лечения и недостаточных ресурсов психического здоровья. Эндогенная депрессия человека успешно моделируется в экспериментах на животных, что позволяет использовать новейшие молекулярно-генетические технологии для понимания концепций возникновения депрессии, механизмов резистентности к существующим препаратам, а также создание действенных методов терапевтического воздействия.

Огромное внимание уделяется изучению роли серотониновой системы, имеющей 14 различных подтипов рецепторов, в механизмах депрессии. Особый интерес привлекают рецепторы 7 типа. Это связано, в том числе с тем, что недавно была обнаружена их способность формировать гетеродимеры с 5-HT1A рецепторами, влияя на ауторегуляцию функциональной активности серотониновой системы мозга.

### **Цель работы**

Изучить влияния экспериментально повышенной экспрессии гена 5-HT7 рецепторов в ядрах шва среднего мозга с помощью аденоассоциированных вирусных частиц, несущих плазмиду AAV\_SynH1-2\_HTR7-EGFP, на функциональное состояние и пластичность 5-HT системы мозга в состоянии, моделирующем сезонную депрессию.

### **Методы**

ОТ-ПЦР в реальном времени для измерения уровня экспрессии мРНК генов, кодирующих 5-НТ1А, 5-НТ2А, 5-НТ7 рецепторы, ТПГ2, МАО-А и 5-НТТ; ВЭЖХ для количественного определения уровня 5-НТ и 5-ГИУК.

### **Результаты**

Было обнаружено влияние сверхэкспрессии 5-НТ7 рецептора на уровень экспрессии ТПГ2 в среднем мозге, который достоверно снизился, в то время как не было обнаружено влияния на уровни экспрессии генов рецепторов 5-НТ1А, 5-НТ2А подтипов, а также МАО-А и 5-НТТ в среднем мозге. В гиппокампе было зафиксировано снижение уровня 5-ГИУК, а в гипоталамусе снижение уровня серотонина и его метаболического коэффициента.



**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ  
И КОЛЕБАТЕЛЬНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ ФОСФОЛИПИДОВ****STRUCTURAL AND FUNCTIONAL FEATURES  
AND VIBRATIONAL SPECTROSCOPY OF PHOSPHOLIPIDS**

С. К. Рудных, М. Ю. Воробьева, К. З. Маматкулов, Г. М. Арзуманян

*Объединённый институт ядерных исследований*

S. K. Rudnykh, M. J. Vorobyova, K. Z. Mamatkulov, G. M. Arzumanyan

*JINR, Russia*

E-mail: rudnih@yandex.ru

**Аннотация**

Настоящая работа посвящена исследованию структурно-функциональных особенностей фосфолипидов методами колебательной — КР- и ИК-спектроскопии. Фосфолипиды являются основным структурным элементом клеточной мембраны. В работе было проанализировано влияние холестерина и мелатонина на структурно-функциональные свойства липидной матрицы. В качестве модельных фосфолипидов были выбраны SOPC и DMPC. Также в работе методом электроформирования были получены гигантские однослойные везикулы и исследовано влияние холестерина и мелатонина на их конформационное состояние.

**Abstract**

The present paper is devoted to the study of the structural and functional features of phospholipids using vibrational Raman and IR spectroscopy methods. Phospholipids are the main structural element of the cell membrane. The effect of cholesterol and melatonin on the structural and functional properties of the lipid matrix was analyzed. SOPC and DMPC were chosen as model phospholipids. In addition, using electroforming, multilamellar vesicles were obtained and the effect of cholesterol and melatonin on their conformational state was investigated.

В настоящее время существуют проблемы профилактики и лечения таких нейродегенеративных заболеваний, как болезнь Альцгеймера, склероз и другие. Болезнь Альцгеймера — нейродегенеративное заболевание, характеризующее деменцией и потерей памяти, для которой в настоящее время

нет лечения или эффективной профилактики. Ключевыми особенностями болезни являются накопление амилоидных бляшек и нейрофибриллярных клубков в тканях мозга. Считается, что решающая роль в этом процессе отдается пептид-мембранным взаимодействиям. В частности, обнаружено, что холестерин выделяется в несмешивающихся бляшках, когда они присутствуют в повышенных концентрациях. Однако, не только холестерин, но и мелатонин оказывают существенное влияние на структурно-функциональные и динамические свойства липидной матрицы.

Цель работы — исследование структурно-функциональных особенностей фосфолипидов методами колебательной — КР и ИК-спектроскопии. В качестве фосфолипидов для исследования были выбраны: полностью насыщенный фосфолипид ДМРСи фосфолипид промежуточной степени насыщенности SOPC.

В результате работы установлено, что добавление холестерина к фосфолипидам оказывает существенное влияние на их структурные особенности на границе раздела полярной головки и гидрофобной области. Зарегистрированы спектральные полосы, характеризующие сильное взаимодействие холестерина с фосфатными и холиновыми группами гидрофильной головки. Выявлен эффект упорядочения липидного бислоя в присутствии холестерина. Продемонстрировано, что добавление мелатонина в количестве 15 мол% оказывает существенное влияние на межмолекулярные цепные взаимодействия. Дальнейшее увеличение содержания мелатонина в системе практически не увеличивает межмолекулярное цепное разупорядочивание. Полученные спектральные данные подтверждены спектрами ЯМР. Также методом электроформирования были получены сферические липидные бислойные структуры — везикулы и аналогично исследованы их структурно-функциональные особенности.

**ДИЗАЙН ИММУНОГЕНОВ, ВКЛЮЧАЮЩИХ ОБЛАСТИ  
УЯЗВИМОСТИ ВИЧ-1, И ИССЛЕДОВАНИЕ  
ИХ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ  
СВОЙСТВ\***

DESIGN OF IMMUNOGENES INCLUDING VULNERABILITY REGIONS  
OF HIV-1, AND RESEARCH OF THEIR PHYSICAL-CHEMICAL  
AND IMMUNOLOGICAL PROPERTIES

А. П. Рудометов<sup>1</sup>, Н. Б. Рудометова<sup>1</sup>, Д. Н. Щербаков<sup>1</sup>,  
А. Ю. Бакулина<sup>2</sup>, А. Н. Чикаев<sup>3</sup>, А. А. Ильичев<sup>1</sup>, Л. И. Карпенко<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии  
«Вектор» Роспотребнадзора*

<sup>2</sup> *Новосибирский государственный университет*

<sup>3</sup> *Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН*

A. P. Rudometov<sup>1</sup>, N. B. Rudometova<sup>1</sup>, N. S. Shcherbakov<sup>1</sup>,  
A. Yu. Bakulina<sup>2</sup>, A. N. Chikaev<sup>3</sup>, A. A. Ilyichev<sup>1</sup>, L. I. Karpenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *SRC VB "Vector", Russia*

<sup>2</sup> *Novosibirsk State University, Russia*

<sup>3</sup> *IMCB SB RAS, Russia*

**Аннотация**

Проблема, связанная с ВИЧ-инфекцией, обусловлена весомым социально-экономическим ущербом и эпидемической значимостью этого заболевания, повсеместным распространением, тяжелыми последствиями, активным вовлечением в эпидемический процесс лиц репродуктивного и трудоспособного возраста. Разработка безопасной и эффективной вакцины против вируса иммунодефицита человека могла бы способствовать прекращению пандемии ВИЧ/СПИДа. Значительная часть исследований в области вакцинопрофилактики ВИЧ-1 направлена на разработку иммуногенов и стратегий иммунизации, способных вызывать формирование антител, обладающих нейтрализующей активностью в отношении широкого спектра

© А. П. Рудометов, Н. Б. Рудометова, Д. Н. Щербаков, А. Ю. Бакулина, А. Н. Чикаев, А. А. Ильичев, Л. И. Карпенко, 2019

\* Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ и Субъекта РФ Новосибирской области в рамках научного проекта № 18-44-543017 и при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00314.

изолятов ВИЧ-1 (bNAbs). В данной работе представлены результаты исследований по конструированию и изучению физико-химических и иммунологических свойств ВИЧ-иммуногенов, несущих непрерывные эпитопы, узнаваемые bNAbs 2F5, 4E10, 10E8 и пептид-имитатор эпитопа, узнаваемого антителом VRC01.

### **Abstract**

The problem associated with HIV infection is caused by significant socio-economic damage and the epidemic significance of this disease, the widespread occurrence, severe consequences, and the active involvement of people of reproductive and working age in the epidemic process. The development of a safe and effective vaccine against human immunodeficiency virus could help end the HIV / AIDS pandemic. A significant part of research in the field of HIV-1 vaccine prevention is aimed at developing immunogens and immunization strategies that can produce antibodies with neutralizing activity against a wide range of HIV-1 isolates (bNAbs). This paper presents the results of studies on the construction and study of the physicochemical and immunological properties of HIV immunogens bearing continuous epitopes recognized by bNAbs 2F5, 4E10, 10E8 and an epitope mimic peptide recognized by the VRC01 antibody.

Эпидемия ВИЧ-инфекции по-прежнему остается глобальной проблемой. Согласно данным ЮНЭЙДС (Объединенная программа Организации объединенных наций по ВИЧ/СПИД), широкое применение антиретровирусной терапии позволило снизить количество новых случаев заражения ВИЧ-1 в некоторых регионах мира. Однако общая ситуация распространения и последствий вызванных ВИЧ-инфекцией остается тревожной. Несмотря на то, что высокоактивная антиретровирусная терапия (ВААРТ) существенно продлевает жизнь ВИЧ-инфицированных, она не способна элиминировать вирус из организма [1]. Кроме того, среди наиболее важных проблем ВААРТ можно назвать высокую стоимость антиретровирусных препаратов, наличие ряда побочных эффектов и формирование вирусов с множественной лекарственной устойчивостью.

Наиболее очевидным решением проблемы распространения ВИЧ-инфекции является применение эффективной профилактической вакцины [1]. К сожалению, по причине высокой генетической и, как следствие, антигенной варибельности ВИЧ-1, до сих пор не удалось создать иммуноген, способный индуцировать формирование достаточного уровня протективного противовирусного иммунного ответа. В настоящее время определены ключевые направления, которые могли бы способствовать разработке вакцины против ВИЧ-1: обнаружение и характеристика антител, обладающих вируснейтрализующей активностью против широкого спектра генетических вариантов ВИЧ-1 (bNAbs, broadly neutralizing antibodies), описание структуры тримера Env, который является единственной целью bNAbs, и определение

коэволюции «вирус-антитело» у людей, у которых развивается реакция bNAbs. Эти направления способствуют разработкам новых иммуногенов и стратегий для вакцинации с целью индукции bNAbs против ВИЧ. Несмотря на то, что многие вакцины состоят из целого вируса или специфических белков, использование только минимального эпитопа патогена, который может стимулировать длительную защиту, становится тенденцией в разработке вакцин [2].

Данное исследование направлено на конструирование и изучение свойств ВИЧ-иммуногенов, содержащих отдельные эпитопы из белков ВИЧ-1, узнаваемые bNAbs или их имитаторы.

В рамках данного исследования был сконструирован и охарактеризован белок nTbI [3], полученный путем модификации искусственного белка TbI (T- and B-cell immunogen). Были заменены три B-клеточных эпитопа белка TbI эпитопами, распознаваемыми bNAbs 10E8, 2F5 и имитатором линейного эпитопа bNAbs VRC01. Антигенные свойства включенных пептидов были сохранены в молекуле nTbI, за исключением пептида, имитирующего эпитоп антитела VRC01. По сравнению с исходным TbI, nTbI продемонстрировал лучшую способность индуцировать вируснейтрализующие антитела. Конкурентный анализ показал, что иммунизация кроликов nTbI индуцировала 10E8-подобные антитела, в то время как антитела к эпитопу 2F5 и антитела, индуцированные мимотопом VRC01, не были обнаружены.

Так же получена серия химерных вариантов белка HBsAg, экспонирующих эпитопы bNAbs 10E8, 2F5 и 4E10, полноразмерную область MPER ВИЧ-1 и пептид-имитатор конформационного эпитопа, узнаваемого bNAbs VRC01. Показано, что химерные варианты HBsAg-2F5, HBsAg-4E10 и HBsAg-mimicVRC01 образует частицы сферической формы. С помощью иммуноблотинга установлено, что эпитопы, узнаваемые bNAbs 10E8, 2F5 и 4E10, сохраняют свои антигенные свойства в составе химерных HBsAg [4]. Установлено, что сыворотки животных иммунизированных вариантом HBsAg-mimicVRC01 обладают вируснейтрализующей активностью в отношении рекомбинантного ВИЧ-1 92BR025 [5].

Получен и охарактеризован химерный белок-иммуноген YkuJ-MPER. В результате проведенных экспериментов полученный рекомбинантный белок показал высокую иммуногенность [6]. С помощью спектроскопии кругового дихроизма была подтверждена смоделированная пространственная структура рекомбинантного белка YkuJ-MPER. С помощью иммуноблотинга было показано, что эпитопы bNAbs, входящие в данный регион, узнаются соответствующими моноклональными антителами. Кроме того, показано, что химерный белок YkuJ-MPER обеспечивает в организме лабораторных животных выработку специфических антител к соответствующему региону ВИЧ-1.

Таким образом, было показано, что все полученные белки способны индуцировать у иммунизированных животных ВИЧ-специфические антитела и могут быть использованы при разработке вакцины против ВИЧ-1, как на стадии создания иммуногена, так и при разработке различных схем прайм-бустерных протоколов иммунизации.

### Литература

1. Eisinger R. W., Fauci A. S. Ending the HIV/AIDS pandemic // *Emerging infectious diseases*. 2018. V. 24. № 3. P. 413.
2. Bricault C. A. et al. HIV-1 neutralizing antibody signatures and application to epitope-targeted vaccine design // *Cell host & microbe*. 2019. V. 25. № 1. P. 59–72.
3. Rudometov A. P., Chikaev A. N., Rudometova N. B., Antonets D. V., Lomzov A. A., Kaplina O. N., Pyichev A. A., Karpenko L. I. Artificial Anti-HIV-1 Immunogen Comprising Epitopes of Broadly Neutralizing Antibodies 2F5, 10E8, and a Peptide Mimic of VRC01 Discontinuous Epitope // *Vaccines*. 2019. V. 7. № 3. P. 83.
4. Рудометов А. П., Рудометова Н. Б., Зайцев Б. Н., Лебедев Л. Р., Ильичев А. А., Карпенко Л. И. Получение химерных вариантов НВсAg, экспонирующих фрагменты МРЕР ВИЧ-1 // *Сибирский научный медицинский журнал* 2019. Т. 39. № 4. С. 55–61.
5. Рудометов А. П., Чикаев А. Н., Андреева Н. Б., Щербакова Н. С., Лебедев Л. Р., Каплина О. Н., Ильичев А. А., Карпенко Л. И. Химерный белок НВсAg, несущий миметик эпитопа, узнаваемого моноклональным антителом VRC01 // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2018. Т. 21. № 4. С. 46–51.
6. Андреева Н. Б., Рудометов А. П., Бакулина А. Ю., Щербаков Д. Н. Изучение иммуногенности химерного белка, включающего эпитопы антител, нейтрализующих широкий спектр первичных изолятов ВИЧ-1 // *Международный научно-исследовательский журнал*. 2017. № 8. С. 6–10.

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПАНЕЛИ ПСЕВДОВИРУСОВ ВИЧ-1  
НА ОСНОВЕ ИЗОЛЯТОВ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ  
РФ, ДЛЯ ОЦЕНКИ КАНДИДАТНЫХ ВАКЦИН ПРОТИВ  
ВИЧ-1 И СКРИНИНГА СОЕДИНЕНИЙ, БЛОКИРУЮЩИХ  
ПРОНИКНОВЕНИЕ ВИЧ-1 \***

USE OF THE HIV-1 PSEUDOVIRUS PANEL ON THE BASIS OF  
ISOLATES CIRCULATING ON THE TERRITORY OF THE RUSSIAN  
FEDERATION, FOR THE EVALUATION OF CANDIDATE VACCINES  
AGAINST HIV-1 AND THE SCREENING OF COMPOUNDS BLOCKING  
HIV-1 ENTRY

Н. Б. Рудометова, Н. С. Щербакова,  
Д. Н. Щербаков, А. П. Рудометов, Л. И. Карпенко

*ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии  
«Вектор» Роспотребнадзора, Россия*

N. B. Rudometova, N. S. Shcherbakova, D. N. Shcherbakov,  
A. P. Rudometov, L. I. Karpenko

*SRC VB «Vector», Russia*

**Аннотация**

Использование технологии псевдовирuсов ВИЧ-1 является одним из основных методов анализа нейтрализующей активности антител и оценки антиретровирусной активности препаратов, а также для анализа гуморального иммунного ответа при первичном испытании кандидатных вакцин против ВИЧ-1. В настоящее время описаны и используются стандартные референсные псевдовирусные панели ВИЧ-1 субтипов В и С, и продолжаются усилия по созданию и расширению панелей псевдовирuсов, включающих дополнительные генетические подтипы, в том числе циркулирующие в Российской Федерации.

---

© Н. Б. Рудометова, Н. С. Щербакова, Д. Н. Щербаков, А. П. Рудометов, Л. И. Карпенко, 2019

\* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Новосибирской области в рамках научных проектов № 19-44-543013 и 19-44-540008 и при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00314.

**Abstract**

The use of HIV-1 pseudovirus technology is one of the main methods for analyzing the neutralizing activity of antibodies and evaluating antiretroviral activity of drugs, as well as for analyzing the humoral immune response in the initial test of candidate HIV vaccines. Currently, standard HIV-1 pseudovirus reference panels of subtypes B and C are described and used, and efforts are continuing to create and expand pseudovirus panels that include additional genetic subtypes, including those circulating in the Russian Federation.

Одним из основных инструментов для изучения гуморального иммунного ответа, индуцируемого кандидатными ВИЧ-вакцинами, анализа нейтрализующей активности моноклональных анти-ВИЧ антител и антиретровирусных препаратов (ингибиторов проникновения) против ВИЧ-1 является метод вируснейтрализации с использованием панели молекулярно-клонированных Env-псевдовирuсов ВИЧ-1 [1]. В настоящее время существует международная панель Env-псевдовирuсов (NIH, США), представляющая собой набор плазмид, несущих полноразмерные области env подтипов B, C, AG и др. При этом, в данных панелях не представлены псевдовирuсы, полученные на основе штаммов ВИЧ-1, распространённых в Российской Федерации. При скрининге противовирусных препаратов и при разработке вакцин необходимо учитывать молекулярно-эпидемиологическую ситуацию ВИЧ-1 в конкретном регионе, поэтому создание панели актуальной для РФ является необходимой задачей.

По сравнению с вирусами дикого типа, работа с псевдовирuсами может проводиться в лабораториях уровня биобезопасности BSL-2, что значительно удешевляет и упрощает эксперименты. Кроме того, структура поверхностного белка Env ВИЧ-1 на поверхности псевдовирuсов идентична структуре поверхностных гликопротеинов нативного вируса. Поэтому псевдовирuсы широко используются для изучения клеточного тропизма, распознавания рецепторов и механизмов ингибирования вируса, а также для разработки вакцин, получения антител и лекарственных препаратов. Однако основным достоинством этой системы является возможность получения псевдовирuсов, экспонирующих поверхностные белки множества вирусных субтипов, тем самым обеспечивая высокий уровень воспроизводимости результатов [1, 2].

Цель работы — создание и характеристика панели env-псевдовирuсов на основе изолятов ВИЧ-1, циркулирующих в Российской Федерации, и её использование для оценки кандидатных вакцин против ВИЧ-1 и скрининга соединений, блокирующих проникновение ВИЧ-1.

Для исследования были отобраны образцы РНК ВИЧ-1, выделенные из сывороток ВИЧ-инфицированных людей из Алтайского края, из Ново-



сибирской и Кемеровской областей. С помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией были амплифицированы полноразмерные участки гена *env*. Путем секвенирования были определены нуклеотидные последовательности амплифицированных фрагментов *env*. Далее ген *env* был клонирован в составе коммерческого вектора pCDNA3.1/V5-His TOPO. Целостность генетических конструкций подтверждали секвенированием. Псевдовирусы получали путем котрансфекции культуры клеток HEK293T полученными плазмидами pCDNA3.1env совместно с плазмидой pSG3Δenv (дефектной по гену *env*). После этого, определяли функциональную активность полученных псевдовирусов.

Определение субтипической принадлежности производили с помощью базы данных последовательностей ВИЧ-1 — HIV sequence database. Тропность к ко-рецептору определяли с использованием биоинформационного ресурса Geno2pheno [coreceptor] 2.5.

Кроме того, одной из важных характеристик полученных псевдовирусов и, соответственно, изолятов ВИЧ-1 является их чувствительность или устойчивость к действию известных моноклональных широконейтрализующих антител. Для этого был проведен нейтрализующий анализ с использованием известных моноклональных широконейтрализующих антител: 2F5, 4E10, 2G12, 10E8, VRC01, PG9, PG16, PGT126. Нейтрализующий анализ проводили по стандартной методике [3]. Статистическую обработку данных и определение IC50 проводили с помощью программы GraphPad Prism 6.0.

Таким образом, получено 14 *env*-псевдовирусов на основе изолятов ВИЧ-1, циркулирующих на территории Новосибирской области, Алтайского края и Кемеровской области. С помощью электронной микроскопии [4] было показано, что псевдовирусы формируют частицы характерной сферической формы. Установлено генетическое разнообразие, циркулирующих в данных регионах изолятов ВИЧ-1: *env*-псевдовирусы относятся к рекомбинантной форме CRF63\_02A1 и к субтипу A6. По результатам анализа нуклеотидных последовательностей V3-петли, можно говорить о том, что все полученные псевдовирусы, за исключением одного, являются CCR5-тропными. Более того, было показано, что большинство псевдовирусов проявляют среднюю чувствительность к нейтрализации моноклональными широконейтрализующими антителами (10 псевдовирусов), и лишь небольшая часть проявляли либо выраженную (2 псевдовируса), либо низкую чувствительность (2 псевдовируса) к нейтрализации. Полученные псевдовирусы были использованы для анализа нейтрализующей активности сывороток животных, иммунизированных кандидатными ВИЧ-иммуногенами, разрабатываемыми во ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора [5]. Помимо этого, псевдовирусы применяются для поиска антиретровирусных препаратов при

скрининге панели соединений на основе природных бициклических моно-терпеноидов и их окисленных производных, предоставленных Институтом Органической Химии (НИОХ СО РАН).

Полученная коллекция *env*-псевдовирусов ВИЧ-1 может дополнить существующие международные панели и стать основой для создания национальной панели *env*-псевдовирусов ВИЧ-1. Данная панель может быть использована для изучения иммуногенности кандидатных вакцин против ВИЧ-1 и кандидатных антиретровирусных препаратов.

### Литература

1. Li Q., Liu Q., Huang W., Li X., Wang, Y. Current status on the development of pseudoviruses for enveloped viruses // Reviews in medical virology. 2018. Vol. 28. N. 1. P. 1–10.
2. Montefiori D. C. Measuring HIV Neutralization in a Luciferase Reporter Gene Assay / Vinayaka R. Prasad, Ganjam V. Kalpana. HIV Protocols. NY: Humana Press, 2009. P. 395–405.
3. Protocol for Neutralizing Antibody Assay for IV-1 in TZM-bl Cells, Montefiori Laboratory, Duke University.
4. Зайцев Б. Н., Таранов О. С., Рудометова Н. Б., Щербакова Н. С., Ильичев А. А., Карпенко Л. И. Оптимизированный метод подсчета количества вирусных частиц с помощью электронной микроскопии // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019. Т. 23. № 3. С. 237–242.
5. Rudometov A. P., Chikaev A. N., Rudometova N. B., Antonets D. V., Lomzov A. A., Kaplina O. N., Ilyichev A. A., Karpenko L. I. Artificial Anti-HIV-1 Immunogen Comprising Epitopes of Broadly Neutralizing Antibodies 2F5, 10E8, and a Peptide Mimic of VRC01 Discontinuous Epitope // Vaccines. 2019. Vol. 7. № 3.

**ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В КЛЕТКАХ  
АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЕГКИХ A549, ИНДУЦИРОВАННЫЕ  
МЕМБРАННЫМИ ЧАСТИЦАМИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА \***

GENE EXPRESSION ALTERATIONS IN LUNG ADENOCARCINOMA  
CELLS A549 INDUCED BY MEMBRANE COVERED VESICLES  
OF HUMAN BLOOD

Ю. И. Савиновская, А. А. Нуштаева, А. В. Савельева, В. В. Морозова,  
Е. И. Рябчикова, Е. В. Кулигина, Г. А. Степанов, Д. В. Семенов

*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,  
Россия, 630090 Новосибирск, ул. ак. Лаврентьева 8*

Y. I. Savinovskaya, A. A. Nushtaeva, A. V. Savelyeva, V. V. Morozov,  
E. I. Ryabchikova, E. V. Kuligina, G. A. Stepanov, D. V. Semenov

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine,  
Siberian Branch of Russian Academy of Sciences*

**Аннотация**

Получены препараты мембранных частиц крови здоровых доноров. Исследовано изменение экспрессии генов в клетках аденокарциномы легких человека A549 под действием мембранных частиц крови методом высокоэффективного секвенирования РНК на платформе Illumina HiSeq 1500.

**Abstract**

Preparations of membrane blood particles of healthy donors were obtained. Gene expression alterations in human lung adenocarcinoma cells A549 under the influence of membrane blood particles was studied by method high-throughput RNA sequencing on the Illumina HiSeq 1500 platform.

Кровь человека кроме форменных элементов содержит мембранные частицы, такие как экзосомы, микровезикулы и апоптотические тельца. Мембранные частицы способны переносить белки, ДНК, РНК, липиды и мета-

---

© Ю. И. Савиновская, А. А. Нуштаева, А. В. Савельева, В. В. Морозова, Е. И. Рябчикова, Е. В. Кулигина, Г. А. Степанов, Д. В. Семенов, 2019

\* Исследования выполнены при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН II.1 0309-2018-0015.

болиты клеток-доноров к клеткам-реципиентам, модулируя в последних различные физиологические и патологические процессы. Высокая эффективность доставки биомолекул мембранными везикулами обусловлена тем, что везикулы захватываются и интернализуются клетками-реципиентами. Результаты исследований механизмов межклеточных коммуникаций могут быть использованы для создания новых таргетных технологий, а также для разработки новых диагностических платформ. Вместе с тем, молекулярные механизмы процессов, активируемых или подавляемых в клетках-реципиентах при взаимодействии с внеклеточными везикулами, в настоящее время исследованы лишь частично.

Целью данной работы является анализ влияния мембранных частиц крови человека на жизнеспособность, пролиферацию и экспрессию генов в клетках аденокарциномы легких линии A549.

В данной работе для получения мембранных частиц плазму крови здоровых доноров центрифугировали при 16 000g. Полученный супернатант подвергали трем последовательным ультрацентрифугированиям при 160 000g.

По данным анализа траектории частиц (NTA) установлено, что полученные препараты содержат несколько субпопуляций мембранных частиц с гидродинамическим диаметром ~85, 155, 255 и 350–400 нм. С помощью просвечивающей электронной микроскопии установлено, что во фракции частиц, осаждаемых при 16 000g, присутствуют не только мембранные частицы, но и митохондрии, а также клеточный дебрис. При этом препараты очищенных мембранных частиц крови (фракции осадка 160 000g), не содержат митохондрий, и представлены наборами частиц, размер которых варьирует в диапазоне от 50 до 150 нм.

Методом проточной цитофлуориметрии установлено, что набор мембранных частиц крови содержит частицы с маркером тромбоцитов/мегакариоцитов — CD41a (~43 %), Т-клеток — CD3 (~50 %), В-клеток — CD79a (~5 %). ~50 % очищенных частиц крови несут маркеры экзосом CD63.

По данным электрофоретического анализа РНК мембранных частиц крови представлена набором форм, длина которых, варьирует в диапазоне от 30 до 200 нуклеотидов с максимумом на ~ 100 н.

Методом массового параллельного секвенирования на платформе Illumina HiSeq 1500 установлено, что мембранные частицы крови здоровых доноров содержат до 72 % рибосомных РНК. Вклад протяженных транскриптов ядерного генома человека — мРНК и днРНК составляет ~25 %. Установлено, что мРНК мембранных частиц кодируют мажорные цитоплазматические белки форменных элементов крови человека — субъединицы гемоглобина, ферритин, тимозин-бета, бета-актин, белки рибосом и др.

Из данных анализа характеристик РНК (Egichr) можно заключить, что набор мажорных транскриптов мембранных частиц обогащен мРНК, транскрипция которых контролируется транскрипционными факторами RBMX, NFkB1, SP1, TAF7, с-Мус, NELFE и др. Кроме того, в наборе достоверно повышен вклад мРНК, кодирующих белки рибосом, белки циркулирующих внеклеточных везикул и др.

Методом МТТ–теста установлено, что препараты мембранных частиц от разных доноров оказывают различное действие на клетки А549. Видно, что часть препаратов мембранных частиц крови вызывала снижение жизнеспособности клеток на 30 и 50 %. При этом серия препаратов вызывала повышение МТТ-индекса клеток А549 до 150 %. Снижение жизнеспособности клеток сопровождалось проапоптотическими изменениями мембраны клеток А549.

Для того чтобы провести анализ действия мембранных частиц крови на клетки человека, клетки инкубировали с препаратами очищенных мембранных частиц в течение 6, 12 и 24 ч. Проводили секвенирование polyA РНК клеток на станции Illumina HiSeq 1500.

Инкубация клеток А549 с препаратами мембранных частиц в течение 6 ч приводит к изменению экспрессии генов продукты, которых участвуют в сигнальном каскаде NF-карра В, взаимодействуют и модулируют активность этого транскрипционного фактора. Продукты генов вторичного ответа, экспрессия которых активируется после 24 ч инкубации клеток А549 с мембранными частицами, участвуют в гликолизе, сборке внеклеточного матрикса, регуляции клеточной адгезии, регуляции процессов клеточной гибели и др.

Таким образом, ответ клеток аденокарциномы человека А549 на мембранные частицы крови включает, на раннем этапе активацию сигнального пути NF-карра В, который, в свою очередь, индуцирует вторичные метаболические и структурные изменения в клетках-реципиентах.

**ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ВАЗОПРЕССИНА  
И НАТРИЙУРЕТИЧЕСКОГО ГОРМОНА В ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ  
КЛЕТКАХ ТЕРМИНАЛЬНОЙ ЧАСТИ СОБИРАТЕЛЬНЫХ  
ТРУБОЧЕК НЕФРОНА ПРИ СОЛЕЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ  
ГИПЕРТОНИИ**

THE INVESTIGATION OF INTERACTIONS BETWEEN VASOPRESSIN  
AND ATRIAL NATRIURETIC PEPTIDE IN INNER MEDULLARY  
COLLECT DUCT EPITHELIAL CELLS IN SALT-SENSITIVE  
HYPERTENSION

Е. А. Сарсенова<sup>1,2</sup>, Р. Ф. Султанова<sup>1,2</sup>, Ю. А. Полина<sup>2</sup>,  
М. Домондон<sup>2</sup>, И. А. Янкелевич<sup>1</sup>, Д. В. Илатовская<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет*

<sup>2</sup> *Медицинский Университет Южной Каролины*

E. A. Sarsenova<sup>1,2</sup>, R. F. Sultanova<sup>1,2</sup>, I. A. Polina<sup>2</sup>,  
M. Domondon<sup>2</sup>, I. A. Yankelevich<sup>1</sup>, D. V. Ilatovskaya<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *St. Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University, Russia*

<sup>2</sup> *Medical University of South Carolina, USA*

E-mail: elizaveta-kurashkina@yandex.ru

**Аннотация**

Для изучения процессов взаимодействия вазопрессина и натрийуретического гормона в проекте использованы солечувствительные крысы, нокаутные по гену, кодирующему синтез натрийуретического гормона. Дано подтверждение адекватности модели для проведения подобных исследований, описано влияние изучаемых гормонов на механизм концентрирования мочи, выявлены закономерности взаимодействия вазопрессина и натрийуретического гормона.

**Abstract**

This project used Dahl Salt-Sensitive rats lacking the gene encoding for atrial natriuretic peptide for identification of its interaction with vasopressin. The research proves the utility of the transgenic model for such studies and identifies the influences of vasopressin

and atrial natriuretic peptide on kidney urea concentrating ability and basic interactions between these two hormones.

Диета с высоким потреблением соли может способствовать развитию гипертонии у людей, имеющих предрасположенность к солечувствительности [1]. Известно, что натрийуретический гормон (атриальный натрийуретический пептид, АНП) может улучшать выведение натрия и воды из организма, что ведёт к снижению давления крови.

Вазопрессин (антидиуретический гормон, АДГ) также является важным участником водно-солевого баланса организма. Вазопрессин предотвращает потерю воды в организме, стимулируя ее реабсорбцию в почечных канальцах при фильтрации мочи [2]. Принципиально важным является то, что рецептор АНП, рецептор вазопрессина, и вазопрессин-зависимый транспортёр мочевины UT-A1 обильно экспрессированы в терминальной части собирательных трубочек нефрона, расположенной в кортикальной области почки [3]. Этот сегмент — главный участок реабсорбции и накопления мочевины, играющий ключевую роль в механизме концентрирования мочи.

В данной работе мы предположили, что АНП и АДГ могут оказывать координированный эффект на транспорт солей, мочевины и воды в терминальной части собирательных трубочек нефрона в этом заболевании.

В эксперименте участвовали две группы крыс: контрольная группа солечувствительных животных и группа солечувствительных модельных животных с нокаутом гена *Nppa*, ответственного за синтез АНП. Половину каждой группы в возрасте 8 недель пересаживали на высокосолевою диету, а вторая половина группы оставалась на диете с нормальным содержанием соли.

На первом этапе эксперимента необходимо было подтвердить адекватность модели. Было установлено, что уровень натрия в плазме крови нокаутных животных возрос в сравнении с контрольной группой крыс, что говорит о нарушении работы механизма вывода солей из организма. Также, кровяное давление у модельной группы крыс было существенно выше, чем у контрольной на протяжении эксперимента. Суточный диурез у животных с нокаутом практически не увеличился, тогда как это необходимо для уменьшения концентрации солей в организме.

Отклонения трёх описанных выше параметров свидетельствует о развитии необходимой для последующей работы патологии.

На втором этапе работы проводилось изучение влияния АНП и АДГ на концентрирующую способность почек. Было выявлено, что экскреция натрия и мочевины снизилась у модельной группы животных в сравнении с контрольной. Полученные данные говорят об ухудшении концентрирующей способности почек у крыс с нокаутом гена *Nppa*.

Третья часть работы посвящена выявлению взаимодействия вазопрессина и натрийуретического гормона. Было установлено, что в тканях почек модельной группы животных экспрессия вазопрессинового рецептора снижена в сравнении с контрольной группой. Аналогичные результаты показал анализ на уровень копептина — суррогатного маркера вазопрессина.

Проведенные исследования показывают, что нарушение продукции натрийуретического гормона при высоком потреблении соли у солечувствительных крыс приводит к повышению давления крови, снижению натрийуреза, диуреза, уменьшению экспрессии вазопрессиновых рецепторов и самого вазопрессина в собирательных трубочках, и ухудшению концентрирующей способности почек. Понимание принципов возможного взаимодействия сигнальных путей вазопрессина и натрийуретического пептида в контексте водно-солевого гомеостаза организма поможет нам найти новые мишени для фармацевтических средств, целью которых является улучшение натрийуреза и концентрирующей способности почек.

### Литература

1. Fujita T. Mechanism of salt-sensitive hypertension: focus on adrenal and sympathetic nervous systems/ T. Fujita // *Journal of the American Society of Nephrology* 2014. P. 1148–1155.
2. Sodium excretion in response to vasopressin and selective vasopressin receptor antagonists. / J. Perucca, D. G. Bichet, P. Bardoux, N. Bouby et al // *J. Am. Soc. Nephrol.* 2008. № 9. P. 721–731.
3. Inoue T. 1. Physiological effects of vasopressin and atrial natriuretic peptide in the collecting duct / T. 1. Inoue, H. Nonoguchi, K. Tomita // *Cardiovas. Res.* 2001. № 15. P. 470–480.



**ЭКЗОСОМЫ МОЛОКА — СРЕДСТВА ДОСТАВКИ  
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК\*****MILK EXOSOMES — DELIVERY OF THE BIOLOGICALLY ACTIVE  
SUBSTANCES TO CELL CULTURES**

С. Е. Седых, Л. В. Пурвиньш, Г. А. Невинский

*Новосибирский государственный университет  
Институт химической биологии и фундаментальной медицины  
Сибирского отделения РАН*

S. E. Sedykh, L. V. Purvinish, G. A. Nevinsky

*Novosibirsk State University, SB RAS ICBFM, Russia*

E-mail: sedyh@niboch.nsc.ru

**Аннотация**

Молоко содержит внеклеточные везикулы различного происхождения, строения и диаметра. Экзосомы — внеклеточные везикулы диаметром 40–100 нм, активно секретируются в молоко клетками молочной железы и описаны в молоке человека, коровы, свиньи, козы, лошади. Молоко является уникальным источником экзосом, так как является биологической жидкостью, которую можно получать у доноров неинвазивным путем.

**Abstract**

Milk contains extracellular vesicles of various origin, structure and diameter. Exosomes are extracellular vesicles with a diameter of 40–100 nm and are secreted in milk by the cells of the mammary gland and were isolated from the human, bovine, swine, goat and horse milk. Milk is a unique source of exosomes, as it is a biological fluid that can be obtained from donors non-invasively.

В настоящее время в качестве перспективных для доставки в культуры клеток рассматривают следующие биологически активные молекулы: плазмиды, микроРНК, лекарственные препараты и инструменты редактирования генома. В отличие от вирусных частиц, эти молекулы не способны самостоятельно проникать через плазматическую мембрану, в связи с чем ведется активный поиск средств для их адресной доставки.

---

© С. Е. Седых, Л. В. Пурвиньш, Г. А. Невинский, 2019

\* Исследования выполнены при поддержке проекта РФФ 18-74-10055.

Литературные данные указывают на наличие сотен и тысяч молекул различных мРНК, микроРНК, а также белков в составе экзосом. Наличие такого количества природных биологически активных молекул в экзосомах ставит под сомнение пригодность возможность использования этих везикул в качестве агентов доставки в клетки.

Как и некоторым другим исследователям, нам представляется, что данные о наличии сотен и тысяч разных биологически активных молекул в экзосомах значительно преувеличены. Ранее мы модифицировали стандартный протокол выделения экзосом, добавив в него стадию гель-фильтрации. Дополнительная очистка позволяет снизить количество совыделяющихся белков и нуклеиновых кислот в препаратах экзосом. Проведен анализ содержания белков и микроРНК в экзосомах молока на разных этапах выделения, подобраны подходящие для ПЦР в реальном времени референсные гены.

Согласно полученным результатам, экзосомы молока человека и лошади содержат значительно меньшее число молекул различных белков и нуклеиновых кислот, чем опубликовано другими исследователями.

Таким образом, природные молекулы нуклеиновых кислот и белков, входящие в состав экзосом молока, не должны влиять на эффективность доставки и биологический эффект перспективных терапевтических препаратов в культуры клеток. Полученные результаты указывают на то, что экзосомы молока являются удобным инструментом доставки биологически активных молекул в культуры клеток и могут быть использованы при планировании экспериментов по доставке терапевтических нуклеиновых кислот, лекарственных препаратов и инструментов редактирования генома.

**СЕКРЕЦИЯ И УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ  
ПРОАТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИХ ЦИТОКИНОВ В КУЛЬТУРАХ  
ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ, ЭКСПОНИРОВАННЫХ МУТАГЕНОМ\***

SECRETION AND GENE EXPRESSION OF PROATHEROSCLEROTIC  
CYTOKINES IN ENDOTHELIAL CELLS EXPOSED  
TO MUTAGENIC AGENT

М. Ю. Синицкий, А. В. Цепочкина, Д. К. Шишкова, А. Г. Кутихин

*ФБНУ Научно-исследовательский институт комплексных проблем  
сердечно-сосудистых заболеваний*

M. Y. Sinitzky, A. V. Tsepokina, D. K. Shishkova, A. G. Kutikhin

*НИИ КРССЗ, Russia*

E-mail: max-sinitzky@rambler.ru

**Аннотация**

Атеросклероз является одной из ведущих причин смертности среди трудоспособного населения. Известно, что определенную роль в атерогенезе играет накопление соматических мутаций и оксидативное повреждение ДНК. В работе изучены секреция первичными эндотелиоцитами коронарной и внутренней грудной артерий человека, культивируемых в условиях генотоксической нагрузки, проатеросклеротических цитокинов IL6 и IL8, а также уровень мРНК соответствующих генов. После 6 часов культивирования клеток в присутствии мутагена, в культуральной среде наблюдается уменьшение количества IL8, а также снижение уровня экспрессии генов *IL6* и *IL8*. В дальнейшем (после элиминации мутагенного фактора) происходит резкий рост как концентрации изучаемых цитокинов, так и уровня мРНК соответствующих генов по сравнению с контролем. Таким образом, впервые получены данные о роли мутагена в формировании эндотелиальными клетками проатеросклеротического фенотипа.

**Abstract**

Atherosclerosis is one of the leading reasons of death among working population. It is known that accumulation of somatic mutations and oxidative DNA damage play the role

---

© М. Ю. Синицкий, А. В. Цепочкина, Д. К. Шишкова, А. Г. Кутихин, 2019

\* Исследования выполнены при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КРССЗ № 0546-2015-0012.

in atherogenesis. In the presented work we studied the secretion of proatherosclerotic cytokines IL6 and IL8 and mRNA level of the corresponding genes in the human coronary and internal thoracic arteries endothelial cells in conditions of genotoxic load. After 6 hours of cell cultivation with mutagen a decreasing of IL8 concentration and the expression level of *IL6* and *IL8* genes was observed. After elimination of the mutagenic factor, a sharp increase both the concentration of studied cytokines and the mRNA level of the corresponding genes compared to the control was detected. Thus, the data about role of mutagenesis in the formation of pro-atherosclerotic phenotype of endothelial cells were first obtained.

По данным Всемирной организации здравоохранения, ежегодно от сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) в мире умирает более 17 миллионов человек, при этом в России отмечается второй наибольший ежегодный показатель смертности от ССЗ. Причиной абсолютного большинства смертей от ССЗ является атеросклероз. На сегодняшний день имеются сведения о роли соматических мутаций в патогенезе атеросклероза. Общее накопление мутаций в организме человека является естественным возрастным процессом, усугубляемым действием на организм различных кластогенных агентов окружающей среды как естественной, так и техногенной природы. Таким образом, проблема оценки вклада мутагенеза в атерогенез имеет не только фундаментальное, но и прикладное значение для современной науки.

Материалом исследования послужили коммерческие культуры первичных эндотелиальных клеток коронарной (НСАЕС) и внутренней грудной (НТАЕС) артерий человека. Клетки культивировались во флаконах Т-75 в присутствии среды для роста клеток до достижения 80 % конfluence при температуре 37 °С, 5 % CO<sub>2</sub> и повышенной влажности. После четырех пассажей клетки трипсинизировали и переносили в 6-луночные планшеты для клеточных культур и культивировали еще 24 часа в стандартных условиях. На каждую клеточную линию готовили по восемь планшетов. Старую культуральную среду удаляли, в четыре планшета приливали новую культуральную среду с мутагеном митомицином С (ММС) в финальной концентрации 500 нг/мл (опыт), а в четыре других — культуральную среду с 0,9 % раствором NaCl в аналогичной концентрации (контроль) и культивировали в течение 6 часов (точка 1). Далее два контрольных и 2 опытных планшета отправляли на иммунохимический и молекулярно-генетический анализ, а из оставшихся четырех планшетов удаляли среду, клетки двукратно отмывали холодным фосфатно-солевым буфером и добавляли новую базальную культуральную среду, после чего культивировали еще в течение суток (точка 2). Оценку содержания IL6 и IL8 проводили в культуральной среде с помощью метода ИФА в точках 1 и 2. Выделение РНК осуществляли из эндотелиальных клеток с помощью набора Qiagen RNeasy Plus Universal Mini Kit в точках 1 и 2. На основе вы-

деленной РНК с помощью реакции обратной транскрипции синтезировались молекулы кДНК. Оценку генной экспрессии осуществляли с использованием TaqMan зондов с помощью метода реал-тайм ПЦР. Для нормирования результатов использовали три референсных гена *GAPDH*, *HPRT1* и *B2M*. Экспрессию рассчитывали по методу  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  и выражали как кратность изменения (fold-change) относительно контрольных образцов, экспрессия генов интереса в которых была принята за единицу.

В нашем эксперименте в качестве модельного мутагена был выбран ММС, обладающий алкилирующим механизмом действия на ДНК. Выбор данного мутагена обусловлен рядом факторов: легкой растворимостью в физиологическом растворе, стойкостью растворов, сохранением активности при температурах до 37 °С в течение нескольких часов. Более того, ММС является классическим агентом, используемым для моделирования мутагенеза в экспериментах *in vitro*. ММС вызывает двойные разрывы молекулы ДНК, аналогичные повреждениям, вызываемым различными химическими веществами, присутствующими в окружающей среде (альдегиды, спирты, кетоны, азотная кислота, пестициды и др.), а также активными формами кислорода.

На рис. 1 показана динамика изменения концентрации проатеросклеротических цитокинов в изучаемых клеточных культурах. Так, в эксперименте не было отмечено значимых различий по уровню секреции IL6, в то время как концентрация IL8 значимо отличалась в культурах, экспонированных ММС по сравнению с контролем. Интересно, что непосредственно после воздействия мутагена (точка 1) наблюдается снижение секреции данного цитокина, что может быть обусловлено компенсаторными механизмами в ответ на генотоксический стресс. В тоже время, после того, как генотоксический фактор (ММС) был удален из культуры (точка 2), происходило резкое увеличение секреции IL8 как в культуре НСАЕС, так и в культуре НТАЕС. Вероятно, за сутки культивирования клеток происходит реализация накопленных в течение 6 часов экспозиции мутагеном повреждений ДНК, что и приводит к фенотипическим изменениям изучаемых культур, что свидетельствует о наличии отложенных эффектов мутагенного воздействия на эндотелиоциты.

Данные ИФА относительно IL8 подтверждаются результатами изучения уровня мРНК (рис. 2Б). Экспрессия гена *IL6* была также снижена в точке 1 и повышена в точке 2 (рис. 2А) в образцах, экспонированных мутагеном, несмотря на то, что нам не удалось обнаружить значимых различий в концентрации данного цитокина в культуральной среде. Данные результаты позволяют предположить роль эпигенетических факторов в формировании эндотелиальными клетками ответа на действие ММС.

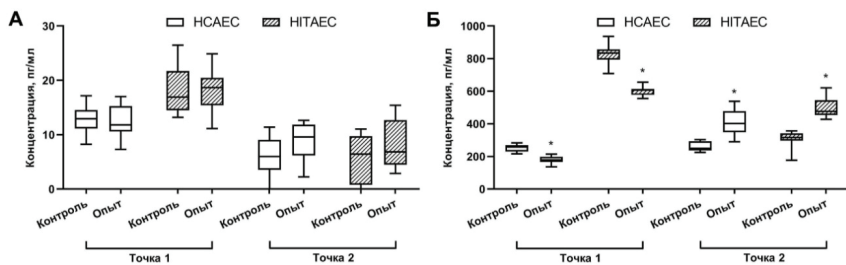


Рис. 1. Уровень секреции IL6 (А) и IL8 (Б) первичными эндотелиальными клетками (\* — значимые различия по сравнению с контролем на уровне  $P < 0,01$ )

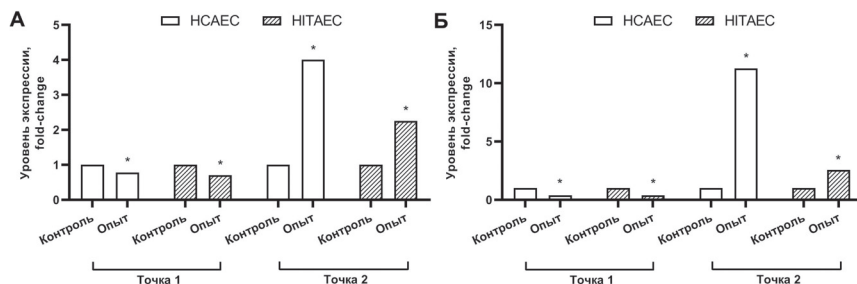


Рис. 2. Уровень экспрессии генов IL6 (А) и IL8 (Б) в первичных эндотелиальных клетках (\* — значимые различия по сравнению с контролем на уровне  $P < 0,001$ )

Таким образом, впервые в мире в эксперименте *in vitro* получены результаты о характере секреции и экспрессии генов проатеросклеротических цитокинов в культурах эндотелиальных клеток, культивируемых в условиях генотоксической нагрузки, расширяющие представления о фундаментальных механизмах формирования проатеросклеротического фенотипа эндотелиоцитов в ответ на экспозицию мутагеном алкилирующего действия.

**ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ АМПЛИФИКАЦИИ МЕТОДОМ  
ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ С ПРИМЕНЕНИЕМ  
СПЕЦИФИЧНЫХ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ  
ПАТОГЕННЫХ ШТАММОВ *LISTERIA MONOCYTOGENES*  
С ИНВАЗИВНОЙ АКТИВНОСТЬЮ**

OPTIMIZATION OF AMPLIFICATION CONDITIONS BY REAL-TIME PCR  
USING SPECIFIC PRIMERS FOR DETERMINATION OF PATHOGENIC  
*LISTERIA MONOCYTOGENES* STRAINS WITH INVASIVE ACTIVITY

Е. В. Соколова<sup>1</sup>, Е. К. Псарева<sup>1</sup>, И. Ю. Егорова<sup>2</sup>,  
Е. А. Лискова<sup>1</sup>, П. А. Журилов<sup>1</sup>, С. А. Ермолаева<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Нижегородский научно-исследовательский ветеринарный институт —  
филиал ФГБНУ “Федеральный исследовательский центр  
вирусологии и микробиологии”

<sup>2</sup> ФГБНУ “Федеральный исследовательский центр  
вирусологии и микробиологии”

<sup>3</sup> ФГБУ “Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии  
и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи” Минздрава РФ

E. V. Sokolova<sup>1</sup>, E. K. Psareva<sup>1</sup>, I. Yu. Egorova<sup>2</sup>, E. A. Liskova<sup>1</sup>,  
P. A. Zhurilov<sup>1</sup>, S. A. Ermolaeva<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Nizhny Novgorod Research Veterinary Institute — Branch of Federal Research  
Center for Virology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia

<sup>2</sup> Federal Research Center for Virology and Microbiology, Volginsky, Russia

<sup>3</sup> N. F. Gamaleya Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology,  
Moscow, Russia

E-mail: sokol.e.lena@yandex.ru

**Аннотация**

На основе гена-мишени *inlA*, кодирующего фактор патогенности интерналин А у листерий, разработана методика ПЦР в режиме реального времени (Real-time PCR) для идентификации патогенной бактерии *Listeria monocytogenes*. Проведен сравнительный анализ 15 аллелей *inlA*. Для детекции бактерий были подобраны специфич-

ческие праймеры в консервативной области *inlA*, определены оптимальная концентрация праймеров (7 пмоль/мкл) и температура отжига (58 °C).

### Abstract

Based on the *inlA* target gene encoding the pathogenicity factor of internalin A, a real-time PCR technique has been developed to identify the pathogenic bacterium *Listeria monocytogenes*. A comparative analysis of 15 *inlA* alleles was performed. For the detection of bacteria, specific primers were selected in the conserved *inlA* region, the optimal concentration of primers (7 pmol/μl) and annealing temperature (58 °C) were determined.

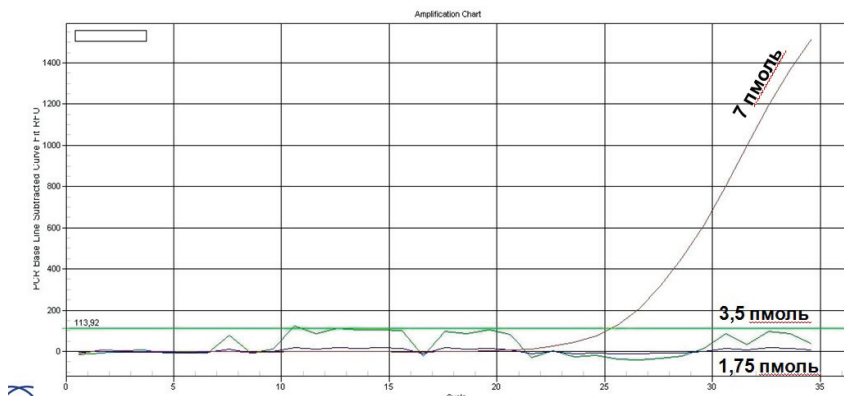
Грамположительная патогенная бактерия *L. monocytogenes* вызывает листериоз — тяжелое заболевание людей и животных, проявляющееся в форме менингитов, менингоэнцефалитов, сепсиса и мертворождения при наличии данной инфекции у беременных женщин. Основными средствами диагностики листериоза в России являются бактериологические и серологические методы, требующие значительных трудовых и временных затрат. Одним из путей преодоления указанных трудностей является разработка и использование систем на основе методов амплификации нуклеиновых кислот (МАНК) выявления генома возбудителя с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР), среди которых наиболее перспективным считается ПЦР в режиме реального времени (Real time — PCR).

Целью настоящей работы являлась разработка оптимальных условий амплификации методом Real time-PCR для идентификации штаммов *L. monocytogenes*, патогенных для человека и животных, на основе гена, кодирующего один из факторов патогенности листерий данного вида.

В настоящей работе были использованы штаммы *L. monocytogenes* из коллекции ФГБНУ ФИЦВиМ, которые выделяли от разных источников, преимущественно сельскохозяйственных животных, на территориях бывшего СССР.

В качестве мишени для идентификации изолятов *L. monocytogenes* был выбран ген *inlA*, кодирующий белок интерналин А, основной функцией которого является проникновение листерий в эукариотические клетки. При скрининге коллекции было выявлено 15 аллелей данного гена. Среди них доминирующим являлся аллель 4, который обнаружен у 55 % штаммов *L. monocytogenes*. Анализируя сиквенсы всех вариантов гена, с помощью программ BLAST и Primer select, были подобраны последовательности прямого и обратного праймеров. Анализ данного участка гена *inlA*, размером 149 пар нуклеотидов, посредством программы ClustalX2, показал, что он является консервативным у всех аллельных вариантов.





Графики амплификации участка гена *inlA* при разных концентрациях праймеров

Для подбора оптимальных условий проведения Real time-PCR использовали образцы ДНК, выделенные из лизатов штаммов *L. monocytogenes* наиболее вирулентных филогенетических линий — Lineage I, Lineage II. Штамм, относящийся к первой филогенетической линии (I) — K-23, получен от новорождённого ребёнка в г. Москва в 1988 году, относится к 252 сиквенс-типу (ST252) и к 1 клональному комплексу (CC1). Второй штамм — 3453 относится ко второй филогенетической линии (II). Он получен от свиньи в г. Москва в 1965 году, относится к 7 сиквенс-типу (ST7) и к 7 клональному комплексу (CC7). Для подбора условий амплификации лизаты использовали в нативном виде и в разведениях 1:10, 1:100 и 1:1000.

Реакционную смесь готовили с использованием реактивов из набора от компании “Евроген” (5xqPCRMix-HS SYBR+HighROX). Real-time PCR проводили в амплификаторе iQ<sup>TM</sup>5 Multicolor Real-Time PCR Detection System BioRad (см. таблицу).

### Программа амплификации для *inlA*

№ цикла	Шаг	t (°C)	Длительность (мин)	Кол-во повторов
1	1	94	2:00	1
2	1	92	00:30	45
	2	58	00:30	
	3	72	00:30	
3	1	72	02:00	1

Для достижения оптимальных условий протекания реакции, была осуществлена постановка амплификации с концентрацией праймеров 1,75 пмоль/мкл, 3,5 пмоль/мкл и 7 пмоль/мкл. В результате выяснилось, что накопление продукта амплификации происходит только в случае праймеров с концентрацией 7 пмоль/мкл, тогда как при концентрациях 1,75 пмоль/мкл и 3,5 пмоль/мкл реакция не проходит (см. рисунок). Для подбора оптимальной температуры отжига праймеров было создано две программы амплификации с отличием лишь в температуре отжига (55 °С и 58 °С). В результате установлено, что данный диапазон температур практически не влияет на протекание реакции.

Таким образом, были подобраны необходимые условия для идентификации *L. monocytogenes* в чистой культуре путем амплификации консервативного участка гена *inlA* с помощью Real-time PCR. Для этого на основании гена, кодирующего белок интерналин А, подобраны соответствующие праймеры, установлена их оптимальная концентрация (7 пмоль/мкл) и приемлемая температура отжига (58 °С). В дальнейшем планируется модернизация данной методики с целью выявления разных видов листерий, патогенных для человека и животных, с помощью мультиплексной Real-time PCR и подбор условий для применения в клинической лабораторной диагностике и пищевой промышленности.

**ОСОБЕННОСТИ УГЛЕВОДНОГО СОСТАВА ТКАНЕЙ  
MALUS BACCATA, MALUS DOMESTICA И ИХ ГИБРИДОВ,  
ВЫРАЩИВАЕМЫХ НА ТЕРРИТОРИИ ЮЖНОГО ПРИБАЙКАЛЬЯ**

FEATURES OF CARBOHYDRATE COMPOSITION OF MALUS BACCATA,  
MALUS DOMESTICA AND THEIR HYBRIDS GROWN IN THE  
SOUTHERN BAIKAL REGION

З. О. Ставицкая, Е. Г. Рудиковская, Л. В. Дударева

*ФБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН*

**Аннотация**

В данной работе приведены результаты сравнительного анализа содержания растворимых сахаров и пектинов в тканях яблони сибирской (*M. baccata* (L.) Borkh), яблони домашней (*Malus domestica*) и их гибридов. Установлено, что изученные ткани гибридных сортов характеризуются низким содержанием фруктозы в плодах. Качество пектина в яблоках зависит от филогенетической удаленности гибрида от родительской формы — *M. baccata*. В результате исследования было отобрано несколько сортов, имеющих технологически ценный, высоко-этерифицированный пектин.

**Abstract**

The article is devoted to the comparative analysis of soluble sugars and pectins composition in the tissues of Siberian Apple (*M. baccata* (L.) Borkh), domestic Apple (*Malus domestica*) and their hybrids. It was established that the studied tissues of hybrid varieties are characterized by low fructose content in fruits. The quality of pectin in apples depends on the phylogenetic distance of the hybrid from the parent form-*M. baccata*. As a result, several varieties with technologically valuable, highly esterified pectin were selected.

Яблоня — одна из немногих плодовых культур, выращиваемых в Восточной Сибири. Яблоки являются ценным источником многих биологически активных веществ. Совокупность углеводного комплекса и органических кислот является определяющим фактором в формировании специфического фруктового вкуса плодов (Borsani и др., 2009). Растворимые сахара в яблоках, выращенных в зонах более благоприятных для земледелия, в основном, представлены фруктозой (до 85 %), сахарозой и глюкозой. Все сахара могут существенно различаться по сладости (Doty, 1976). Основным полимерным углеводом яблок является пектин, качественный и количественный

состав которого также может оказывать влияние на вкус плодов. Разные виды и сорта яблок или даже одни и те же сорта, произрастающие в разных экологических условиях, закономерно отличаются по вкусу и содержанию биологически активных веществ. Известно, что в Прибайкалье способны выжить только гибридные (полукультурные) сорта яблони. Для них часто характерен особенный «сибирский» привкус. Предположительно, этот вкус определяется тем, что для гибридизации европейских и американских сортов используется аборигенный представитель рода *Malus* — сибирская (ягодная) яблоня (*Malus baccata* (L.) Borkh.).

Целью данной работы является проведение сравнительного анализа содержания углеводов (растворимых сахаров и пектинов) в тканях яблони сибирской (*M. baccata* (L.) Borkh), яблони домашней (*Malus domestica*) и их гибридов, выращиваемых в Южном Прибайкалье.

Проведенные исследования показали, что изученные ткани гибридных сортов характеризуются низким содержанием фруктозы в плодах. В сортах *M. domestica* соотношение фруктоза/сахароза увеличивается, но, тем не менее, сохраняется на уровне меньшем, чем показано для аналогичных сортов, выращенных в более благоприятных для садоводства регионах. Качество пектина в яблоках зависит от филогенетической удаленности гибрида от родительской формы — *M. baccata*. Основным углеводом в тканях листьев оказалась мальтоза. В результате проведенного исследования было выбрано несколько сортов, имеющих технологически ценный, высоко-этерифицированный пектин.

**ОЦЕНКА ИММУНОГЕННЫХ И ПРОТЕКТИВНЫХ СВОЙСТВ  
ПОЛИЭПИТОПНЫХ Т-КЛЕТОЧНЫХ ИММУНОГЕНОВ  
ПРОТИВ ВИРУСА ГРИППА А \***

**EVALUATION OF THE IMMUNOGENIC  
AND PROTECTIVE PROPERTIES OF POLYEPITOPE T-CELL  
IMMUNOGENS AGAINST INFLUENZA A VIRUS**

Е. В. Старостина, О. Н. Каплина, Л. И. Карпенко,  
С. Г. Дудко, Д. В. Антонец, С. И. Бажан

*ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии  
«Вектор» Роспотребнадзора, Россия*

E. V. Starostina, O. N. Kaplina, L. I. Karpenko,  
S. G. Dudko, D. V. Antonets, S. I. Bazhan

*SRC VB "Vector" Rospotrebnadzora, Russia*

**Аннотация**

Одним из подходов к созданию универсальной вакцины против гриппа является конструирование искусственных иммуногенов, содержащих консервативные фрагменты (эпитопы) белков различных субтипов вируса гриппа. В данной работе сконструированы ДНК-вакцинные конструкции — кандидаты универсальной вакцины против вируса гриппа, кодирующие консервативные Т-клеточные эпитопы различных белков вируса гриппа А. Было сконструировано два «человеческих» и два «мышинных» варианта полиэпитопных Т-клеточных антигенов. Иммуногенные и защитные свойства ДНК-вакцинных конструкций, кодирующих «мышинные» иммуногены, были изучены на мышах BALB/c. Оценка Т-клеточного ответа проводилась с использованием ICS. Показано, что комбинация двух искусственных Т-клеточных ДНК-вакцинных конструкций индуцировала умеренную защиту (37,5%) от вирусов H1N1 и H3N2, в то время как иммунизация живыми вакцинными штаммами (H1N1 или H3N2) не обеспечивала защиту от гетерологичных вирусов со 100% смертностью. Полученные результаты позволяют предположить, что защитный эффект спроектированных иммуногенов связан со стимуляцией специфического Т-клеточного ответа.

---

© Е. В. Старостина, О. Н. Каплина, Л. И. Карпенко, С. Г. Дудко, Д. В. Антонец, С. И. Бажан, 2019

\* Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант 15-15-00047.

**Abstract**

One of the approaches of creating a universal flu-vaccine is based on the construction of artificial immunogens containing conservative fragments (epitopes) of various subtypes of the influenza virus proteins. In this work, we constructed a DNA-vaccine constructs — candidates of the universal vaccine against the influenza virus, encoding conservative T-cell epitopes of various influenza A virus proteins. Two “human” and two “mouse” variants of polyepitope T cells antigens were constructed. The immunogenic and protective properties of DNA vaccine constructs encoding “mouse” immunogens were studied in BALB/c mice. ICS analysis was used for evaluating of the T-cell immune response. It was shown that a combination of two artificial T-cell DNA-vaccine constructs had the ability to induce moderate protection (37.5%) against H1N1 and H3N2 viruses, while immunization with live vaccine strains (H1N1 or H3N2) did not provide protection against heterologous viruses with 100% mortality. The results obtained suggest that the protective effect of the designed immunogens is associated with the stimulation of specific T-cell response.

Грипп является наиболее массовым заболеванием, который, по данным многих специалистов, занимает ведущее место в структуре инфекционных болезней. Если учитывать способность вируса гриппа вызывать частые эпидемии и даже пандемии в масштабах всего земного шара, можно утверждать, что он является проблемой мирового значения. Вакцинация считается одним из самых эффективных средств профилактики гриппа. Однако постоянная изменчивость вируса гриппа позволяет ему уходить от специфического иммунитета, сформировавшегося у человека в результате ранее перенесенной инфекции или предшествующей вакцинации предыдущими вариантами вируса. Это приводит к тому, что состав гриппозной вакцины необходимо менять каждые 2–3 года. Поэтому актуальной задачей является создание вакцин, способных индуцировать иммунный ответ против широкого спектра различных штаммов вируса гриппа человека и штаммов вируса гриппа птиц, также способных вызывать заболевания у людей.

Работы по созданию универсальной гриппозной вакцины ведутся по нескольким основным направлениям, в том числе на основе консервативных белков или консервативных участков вариабельных поверхностных гликопротеинов методами обратной генетики, а также на основе вирусоподобных частиц и рекомбинантных вирусных векторов. Таким образом, при разработке универсальной вакцины нужно стремиться к получению антигенов, способных вызвать ответы как антител, так и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, специфичные к консервативным эпитопам белков вируса гриппа.

Цель данной работы состояла в оценке иммуногенного и протективного потенциала ДНК-вакцинных конструкций, кодирующих искусственные антигены, спроектированных на основе консервативных Т-клеточных эпитопов антигенов вируса гриппа А.

Дизайн искусственных белков-антигенов был проведен с использованием как цитотоксических (CTL), так и хелперных (Th) Т-клеточных эпитопов вируса гриппа, представленных в базе данных иммунных эпитопов (<http://www.iedb.org>), которая является наиболее полным источником данных по эпитопам на сегодняшний день. Поскольку исследование иммуногенных и протективных свойств вакцинных конструкций планировалось проводить на мышах, было спроектировано два варианта полиэпитопных конструкций: «мышьяная» (muTAg) — составленная исключительно из Т-клеточных эпитопов, рестриктированных мышьяными аллелями МНС I и II класса, характерными для мышей линии BALB/c, и «универсальная» человеческая (huTAg) — составленная из Т-клеточных эпитопов, рестриктированных наиболее распространенными алломорфами HLA I и II класса.

Каждая полиэпитопная конструкция спроектирована из двух основных модулей: поли-CTL-эпитопного фрагмента, составленного из CD8+ Т-клеточных эпитопов и поли-Th-эпитопного — составленного из Т-хелперных эпитопов. Чтобы обеспечить презентацию целевых иммуногенов по пути МНС I и II класса, обе конструкции — и «человеческая», и «мышьяная» — спроектированы с использованием дополнительных N- и C-концевых сигнальных последовательностей: либо N-концевого убиквитина (Ub), либо N-концевого лидерного пептида (LP) и C-концевого фрагмента белка LAMP-1. В результате были сконструированы четыре варианта Т-клеточных антигенов: [Ub—muTAg], [LP—muTAg—LAMP], [Ub—huTAg] и [LP—huTAg—LAMP]. Гены, кодирующие спроектированные антигены были клонированы в векторной плазмиде pcDNA3.1. Полученные ДНК-вакцинные конструкции p-Ub-muTAg, p-Ub-huTAg, p-LP-muTAg-LAMP, p-LP-huTAg-LAMP использовали для изучения экспрессии целевых генов, а также для оценки их иммуногенных и протективных свойств.

Экспрессию генов оценивали в клетках 293T, трансфицированных ДНК-вакцинными конструкциями, с использованием двух методов: 1) по определению синтеза специфической мРНК с помощью ОТ-ПЦР; 2) с помощью иммунохимического окрашивания препаратов трансфицированных клеток.

Для оценки синтеза специфических мРНК из клеток, трансфицированных целевыми плазмидами выделяли суммарную РНК и использовали ее для получения кДНК в реакции обратной транскрипции. Затем проводили ПЦР со специфическими праймерами к соответствующим генам. Анализ продуктов ПЦР, проведенный с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле, показал, что размеры амплифицированных фрагментов соответствуют теоретически рассчитанным фрагментам целевых генов.

Способность разработанных ДНК-вакцинных конструкций индуцировать синтез целевых белков-иммуногенов в трансфицированных клетках оценивали с помощью окрашивания клеток с использованием FITC-меченных моноклональных антител 29F2/30A6 к Gag-эпитопу EPFRDYVDRFYKTLR, который был включен в С-конец всех полиэпитопных конструкций. Окрашивание наблюдалось только в клетках 293Т, трансфицированных экспериментальными плазмидами, и не было зарегистрировано в клетках, трансфицированных векторной плазмидой pcDNA3.1.

Таким образом, полученные результаты показали наличие в трансфицированных клетках продуктов экспрессии целевых генов на уровне синтеза как мРНК, так и белка.

Следующим этапом нашей работы была оценка иммуногенных и протективных свойств спроектированных вакцинных конструкций. Для иммунизации использовались мыши BALB/с, самки весом 16–18 г. Иммунизация проводилась внутримышечно трёхкратно с интервалом две недели (доза 100 мкг ДНК на мышь). Через две недели после третьей иммунизации у иммунизированных мышей забирали селезёнки, из которых выделяли спленоциты и стимулировали их синтетическими пептидами, соответствующими эпитопам, входящих в состав спроектированных иммуногенов. Для оценки Т-клеточного иммунного ответа использовали метод внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS) с использованием цитофлуориметра FACSCalibur. Иммуногенные и протективные свойства ДНК-вакцинных конструкций, кодирующих «мышинные» Т-клеточные иммуногены, оценивали на мышах после трехкратной иммунизации.

Для оценки протективности, иммунизированные животные были внутриназально заражены летальной дозой ( $10 LD_{50}$ ) вируса гриппа либо A/California/4/2009 (H1N1), либо A/Aichi/2/68 (H3N2). Полученные результаты показали, что комбинация двух искусственных ДНК-вакцин, состоящих из полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов, может индуцировать умеренную защиту (37,5 %) против вируса H1N1, и соответствующие механизмы могут быть связаны со стимуляцией специфических Т-клеточных ответов. Анализ выживаемости от вируса H3N2 показал тот же уровень защиты (37,5 %). Однако в данном случае защитный эффект оказался статистически незначимым. Иммунизация живыми вакцинными штаммами (H1N1 или H3N2) защищала мышей от гомологичного штамма и не обеспечивала защиту от гетерологичного вируса со 100 % смертностью.

Таким образом, наши результаты показали, что ДНК-вакцинные конструкции, кодирующие искусственные Т-клеточные антигены, могут индуцировать у иммунизированных мышей перекрестный защитный иммунитет к различным подтипам вируса гриппа в отличие от иммунизации живыми



---

вирусами гриппа, которые не обеспечивают защиту от гетерологичных вирусов. Наблюдаемый защитный эффект был очень умеренным (37,5 %), однако это не было неожиданным, так как известно, что вакцинация голый ДНК является слабо иммуногенной. Мы ожидаем, что защищенность разработанных ДНК-вакцин может быть повышена с использованием более эффективного протокола иммунизации и/или доставке ДНК, например, с помощью *in vivo* электропорация, которая, как известно, увеличивает иммуногенность ДНК-вакцин почти в 1000 раз.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ  
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ТЕСТОВ  
ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ САРКОМЫ ЮИНГА И ПРИМИТИВНЫХ  
НЕЙРОЭКТОДЕРМАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ**

THE STUDY OF THE EFFECTIVENESS OF THE USE OF MOLECULAR  
GENETIC TESTS FOR DIAGNOSIS OF EWING'S SARCOMA  
AND PRIMITIVE NEUROECTODERMAL TUMORS

К. В. Субботина

*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН  
Новосибирский государственный университет*

K. V. Subbotina

*Institute of chemical biology and fundamental medicine  
Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences  
Novosibirsk State University*

**Аннотация**

Саркома Юинга является одной из самых агрессивных злокачественных опухолей, поражающих костную ткань. Ранняя диагностика с помощью введения в практику современных методов играет важную роль в улучшении показателей излечения и выживаемости при саркомах. Нами была поставлена задача, разработать и исследовать широкодоступный молекулярно-генетический метод диагностики саркомы Юинга и примитивных нейроэктодермальных опухолей, основанный на обнаружении химерных транскриптов с помощью real-time PCR.

**Abstract**

Ewing's sarcoma is one of the most aggressive malignant tumors affecting bone tissue. Early diagnosis by introducing modern methods into practice plays an important role in improving cure rates and survival in sarcomas. We are developing and researching a widely available molecular genetic method for the diagnosis of Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumors based on the detection of chimeric transcripts using real-time PCR.

**Введение**

Саркома Юинга (СЮ) была описана доктором Джеймсом Юингом — первым профессором патологии Корнельского университета в 1921 году.

Она представляет собой остеолитическое злокачественное новообразование, которое состоит из разных вариантов соединительной ткани и имеет разные степени дифференцировки.

По данным ВОЗ, СЮ является наиболее распространенной детской опухолью костей с агрессивным поведением и быстрым распространением метастазов, которые локализуются в костном мозге, легких, плевре, внутренних органах и забрюшинном пространстве. Опухоль преимущественно возникает у детей и подростков (в основном в возрасте 10–15 лет), а также может встречаться у людей старшего возраста, но значительно реже.

СЮ относят к опухолям семейства саркомы Юинга (ОССЮ). Также к этому семейству следует отнести и высокозлокачественные примитивные нейроэктодермальные опухоли (ПНЭО), которые поражают как мягкие ткани, так и кости.

Все ОССЮ имеют схожий нейрогенный фенотип и возникают вследствие одной и той же хромосомной транслокации, чаще между 11-й и 22-й хромосомами (85%), в результате которых с перестроенных генов *EWSR1* и *FLI1* образуется химерный транскрипт. Оставшиеся 10% — 15% случаев занимают альтернативные транслокации, приводящие к слиянию гена *EWSR1* с другими факторами транскрипции ETS, такими как *ERG*, *ETV1*, *ATF1* и *CREB1* и др. Далее с них синтезируется химерный онкопротеин, который экспрессируется во всех опухолевых клетках и поддерживает их выживание. Химерный белок обладает ДНК-связывающей функцией белка *FLI*, а также функцией регуляции транскрипции белка *EWSR1*. Считается, что онкопротеин бесконтрольно включает и выключает транскрипцию различных генов. Это нарушение регуляции транскрипции приводит к неконтролируемому росту, пролиферации, аномальному созреванию и выживанию клеток, которые в дальнейшем приводят к развитию опухоли.

СЮ характеризуется патогномоничной для данного заболевания хромосомной транслокацией. Обнаружение одного из нескольких характерных слияний, чаще *всего EWSR1-FLI1*, является золотым стандартом диагностики СЮ.

В основном данное изменение генома детектируется с помощью метода FISH гибридизации. Чтобы повысить информативность метода, требуется проведение множественных гибридизаций, поэтому к одному из его недостатков относится моноплексность. Кроме того, FISH метод игнорирует некоторые виды мутаций и поломок генетического кода, что может стать важным упущением в диагностике. Чтобы не допустить ошибок в постановке диагноза, необходимо использовать более точные методы, например, молекулярно-генетические тесты.

Эти методы обладают мультиплексностью, то есть они способны проводить тестирование одновременно нескольких перестроек во время одно-

го теста. Таким образом, становится возможным выявлять сразу несколько специфических для опухолей транслокаций. Одним из таких методов является *real-time PCR* анализ. Он является эффективным инструментом диагностики опухолей с хромосомными транслокациями. Метод *real-time PCR* широко применяется в клинической практике, доступен во всех лабораториях, проводит исследования минимальной метастатической патологии и оценивает прогностическую значимость подтипов химерных транскриптов даже при отсутствии свежей опухолевой ткани.

Таким образом, целью нашей работы стала разработка метода диагностики СЮ и ПНЭО на основе выявления химерных транскриптов с помощью *real-time PCR*, адаптированного для анализа фиксированной ткани в парафиновых блоках и дальнейшее исследование его эффективности.

### **Материалы и методы**

Нами была проанализирована информация о спектре химерных транскриптов, а также о частоте их встречаемости при различных формах сарком человека в базе данных COSMIC. С помощью программы Vector NTI был проведен дизайн олигонуклеотидов и флюоресцентно меченых проб для выявления частых транскриптов, имеющих минимальный размер амплифицируемого фрагмента кДНК.

Также было проведено клонирование участков выбранных нуклеотидных последовательностей, имеющих диагностическое значение, в плазмидные вектора pBlueScript II SK(+) с возможностью синтеза РНК транскриптов для использования в качестве контрольных ДНК и РНК.

### **Результаты**

В ходе проведенного анализа были собраны данные о частоте встречаемости слияний между геном EWSR1 с другими генами на основании изученных нами статей. Была обнаружена высокая частота образования химерных транскриптов вследствие слияний гена EWSR1 с генами FLI1(62,48 %), ATF1(49,14 %), WT1(45,32 %), NR4A3(40,15 %), CREB1(32,18 %), POU5F1(13,7 %), ERG(7,44 %).

На данный момент разработка и дальнейшее исследование метода диагностики СЮ и ПНЭО на основе выявления химерных транскриптов с помощью *real-time PCR* продолжается.

Далее планируется подборка эффективных условий выявления анализируемых транскриптов с помощью *real-time PCR*, определение аналитических характеристик метода на контрольных образцах, предоставленных коллегами из ФГБУ НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова и МНИОИ им. П. А. Герцена.

## ПОИСК САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ ТОПОИЗОМЕРАЗЫ I В ГЕНОМЕ *E. COLI*\*

### TOPOISOMERASE I BINDING SITES IDENTIFICATION IN *E. COLI*

Д. А. Сутормин<sup>1</sup>, А. Х. Галивонджян<sup>2</sup>, К. В. Северинов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Сколковский Институт науки и технологии

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

D. A. Sutormin<sup>1</sup>, A. H. Galivondzhyan<sup>2</sup>, K. V. Severinov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Skoltech

<sup>2</sup>Lomonosov Moscow State University

E-mail: Dmitry.Sutormin@skoltech.ru

#### Аннотация

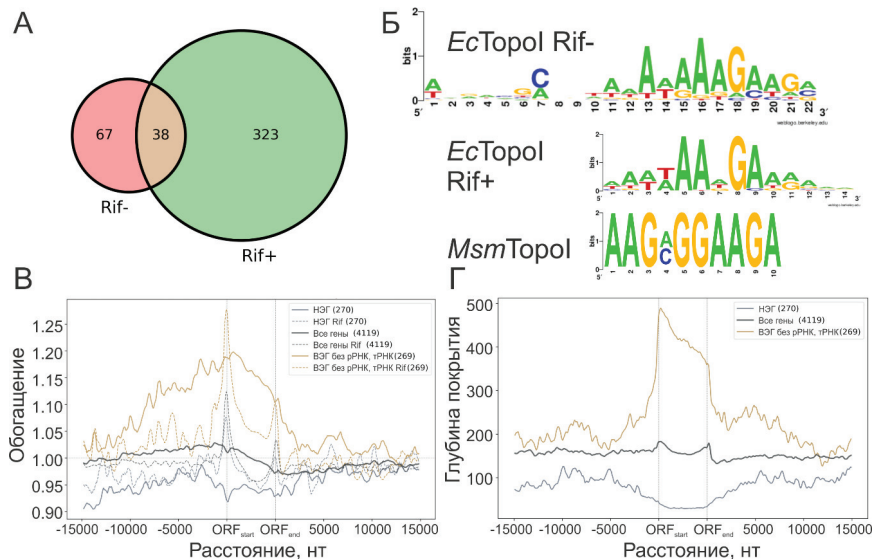
Топоизомераза I бактерий отвечает за уменьшение отрицательной суперспирализации и релаксацию молекулы ДНК в ходе различных клеточных процессов, в том числе транскрипции и репликации. Несмотря на столь важную роль, на данный момент нет однозначных данных о распределении сайтов связывания топоизомеразы I в геноме *Escherichia coli*, также неизвестен их нуклеотидный мотив. В данной работе был проведен поиск сайтов связывания топоизомеразы I в геноме *E. coli* DY330 с использованием метода ChIP-Seq. Дополнительные ChIP-Seq эксперименты были выполнены при обработке культуры *E. coli* ингибитором РНК-полимеразы рифампицином. Нами была зарегистрирована колокализация топоизомеразы I и РНК-полимеразы, что подтверждает существование комплекса между этими ферментами.

#### Abstract

Bacterial topoisomerase I removes excessive negative supercoiling and relaxes DNA molecules in several processes, including transcription and replication. Despite its essentiality, no data is available about the distribution of topoisomerase binding sites and enzyme's nucleotide motif. We performed first time identification of topoisomerase I binding sites with ChIP-Seq in *Escherichia coli* DY330 genome. Additional ChIP-Seq experiments were carried out on *E. coli* culture treated with RNAPol inhibitor rifampicin. We reveal a colocalization of topoisomerase I with RNAPol, which supports the existence of a complex between the enzymes.

© Д. А. Сутормин, А. Х. Галивонджян, К. В. Северинов, 2019

\* Исследования выполнены при поддержке стипендии Президента Российской Федерации молодым ученым и аспирантам (Конкурс СП-2019).



Результаты ChIP-Seq экспериментов с *EcTopoI*: **А** — пересечение множества пиков, обнаруженных в присутствии (Rif+) и отсутствии рифампицина (Rif-); **Б** — мотивы связывания *EcTopoI* в присутствии и отсутствии рифампицина и сравнение с мотивом связывания *MsmTopoI*; **В** — распределение *EcTopoI* вокруг различных групп открытых рамок считывания (ORF): НЭГ — низко экспрессирующихся генов, всех генов и ВЭГ — высоко экспрессирующихся генов; в скобках указано число генов в каждой группе. Представлены данные для ChIP-Seq без обработки рифампицином (непрерывные линии) и с оной (пунктирные линии); **Г** — распределение РНК-полимеразы вокруг различных групп открытых рамок считывания (ORF): группы генов как в В. Построено на основании данных ChIP-Seq эксперимента с  $\beta$ -субъединицей РНК-полимеразы *E. coli* (RpoB) [9]

Суперспирализация ДНК играет важную роль в пространственной укладке геномов многих организмов, при этом изменение топологии ДНК участвует в регуляции многих процессов в клетке, включая репликацию, транскрипцию и рекомбинацию [1]. За образование супервитков и их релаксацию в ДНК отвечают особые белки из класса изомераз — топоизомеразы [2]. Топоизомераза I *E. coli* (*EcTopoI*) ответственна за релаксацию отрицательных супервитков, регулирует инициацию репликации и участвует в сегрегации

молекул ДНК после репликации [3], [4]. Также предполагается, что для эффективной работы топоизомераз образует комплекс с РНК-полимеразой за счет своего С-терминального домена (СТД) [5], [6]. Аналогичная гипотеза была сформулирована для бактерии *Mycobacterium smegmatis*, топоизомераза I которой (MsmTopoI), однако, имеет не родственный СТД, что предполагает эволюционно независимое установление взаимодействия с РНК-полимеразой [7]. Картирование сайтов связывания и активности MsmTopoI выявило колокализацию с транскрипционными единицами и РНК-полимеразой, подтвердив высказанное предположение [8]. Целями данной работы стали определение сайтов связывания EcTopoI в геноме *E. coli* и проверка гипотезы о взаимодействии фермента с РНК-полимеразой.

Для полногеномного поиска сайтов связывания топоизомеразы I были проведены ChIP-Seq эксперименты: 40мл культуры клеток *E. coli* DY330 *topA-SPA* в экспоненциальной фазе роста фиксировали 1 % формальдегидом при достижении  $OD_{600}=0.6$ , затем клетки разрушали облучением ультразвуком и иммунопреципитацию проводили Anti-FLAG M2 антителами, связывающими SPA-таг, слитый с последовательностью гена топоизомеразы I *topA*. Секвенирование было осуществлено на Illumina Hi-Seq 4000 (Сколтех). Сырые риды были обработаны Trimmomatic и картированы на референсный геном при помощи BWA, определение пиков осуществлялось MACS2, а поиск мотивов программой ChiP-Munk. В случае экспериментов с подавлением транскрипции культура клеток была инкубирована с рифампицином (100 мкг/мл) в течение 20 минут до стадии фиксации формальдегидом. Все эксперименты были выполнены в двух биологических повторностях.

Анализ ChIP-Seq экспериментов выявил 105 достоверных сайтов связывания EcTopoI ( $p\text{-value}<0.001$ ) в условиях без рифампицина (Rif-) и 361 сайт в присутствии ингибитора РНК-полимеразы (Rif+) (рисунок, А). В последовательностях сайтов был обнаружен нуклеотидный мотив сходный между Rif- и Rif+ экспериментами. Данный мотив отличается от обнаруженного для MsmTopoI [8] (см. рисунок, Б), однако напоминает центральную часть последовательности, являющейся оптимальным оцДНК субстратом EcTopoI *in vitro* (5' AATGCGCT↓TTGGG3', последовательность показана в обратно-комплементарной форме к мотиву, центральная часть выделена жирным шрифтом, стрелкой указано место расщепления ДНК под действием EcTopoI) [10]. Анализ обогащения EcTopoI относительно аннотированных открытых рамок считывания выявил обогащение топоизомеразы в вышележащих областях генов (там, где происходит накопление отрицательных супервитков из-за активности РНК-полимеразы) и в телах генов (см. рисунок, В), в которых наблюдается наибольшая плотность РНК-полимеразы (см. рисунок, Г). Была обнаружена корреляция обогаще-

ния EsTopoI с уровнем экспрессии генов: чем выше экспрессия, тем больше топоизомеразы расположено в названных регионах (см. рисунок, В). Было продемонстрировано, что обработка рифампицином приводит к релокализации EsTopoI: наибольшее обогащение топоизомеразы локализовано в этих условиях в начале и конце генов, в области промоторов (см. рисунок, В). Выявленное перераспределение логично соотносится с механизмом действия рифампицина, который останавливает РНК-полимеразу на промоторах, вызывая abortивную транскрипцию и запрещая переход к элонгации [11].

Полученные данные свидетельствуют о существовании двух мод активности фермента: 1. Независимая от РНК-полимеразы релаксация свободных отрицательных супервитков (в вышележащих областях активных генов); 2. В комплексе с РНК полимеразой (в телах генов, а также в промоторных областях при стабилизации РНК-полимеразы в данных регионах под действием рифампицина).

### Литература

1. X. Wang, P. Montero Llopis, and D. Z. Rudner, "Organization and segregation of bacterial chromosomes," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 14, no. 3, pp. 191–203, 2013.
2. J. C. Wang, "Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 3, no. 6, pp. 430–440, Jun. 2002.
3. G. J. Pruss, S. H. Manes, N. York, and K. Drlica, "Escherichia coli DNA Topoisomerase Mutants : Increased Supercoiling Is Corrected by Mutations near Gyrase Genes," *Cell*, vol. 31, no. November, pp. 35–42, 1982.
4. V. Usongo and M. Drolet, "Roles of Type 1A Topoisomerases in Genome Maintenance in Escherichia coli," *PLoS Genet.*, vol. 10, no. 8, 2014.
5. B. Cheng, C.-X. Zhu, C. Ji, A. Ahumada, and Y.-C. Tse-Dinh, "Direct Interaction between Escherichia coli RNA Polymerase and the Zinc Ribbon Domains of DNA Topoisomerase I \*," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 33, pp. 30705–30710, 2003.
6. J. Yang, T. Annamalai, B. Cheng, S. Banda, R. Tyagi, and Y. Tse-dinh, "Antimicrobial Susceptibility and SOS-Dependent Increase in Mutation Frequency Are Impacted by Escherichia coli Topoisomerase I," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 59, no. 10, pp. 6195–6202, 2015.
7. S. Banda, N. Cao, and Y.-C. Tse-Dinha, "Distinct Mechanism Evolved for Mycobacterial RNA Polymerase and Topoisomerase I Protein-Protein Interaction," *J. Mol. Biol.*, vol. 429, no. 19, pp. 2931–2942, 2017.
8. P. Rani and V. Nagaraja, "Genome-wide mapping of Topoisomerase I activity sites reveal its role in chromosome segregation," *Nucleic Acids Res.*, vol. 47, no. 3, pp. 1416–1427, 2018.



---

9. C. Kahramanoglou et al., "Direct and indirect effects of H-NS and Fis on global gene expression control in *Escherichia coli*," *Nucleic Acids Res.*, vol. 39, no. 6, pp. 2073–2091, 2011.

10. Z. Zhang, B. Cheng, and Y.-C. Tse-Dinh, "Crystal structure of a covalent intermediate in DNA cleavage and rejoining by *Escherichia coli* DNA topoisomerase I," *PNAS*, vol. 108, no. 17, pp. 3–8, 2011.

11. K. Prasanna and D. Chatterji, "Differential inhibition of abortive transcription initiation at different promoters catalysed by *E. coli* RNA polymerase," *FEBS Lett.*, vol. 306, no. 1, pp. 46–50, 1992.

## **ВЛИЯНИЕ КАТИОНОВ ЦИНКА НА АКТИВНОСТЬ И СОСТАВ МНОЖЕСТВЕННЫХ ФОРМ ЖИВОРОДКИ РЕЧНОЙ\***

THE EFFECT OF THE CATIONS  $Zn^{2+}$  ON THE ACTIVITY AND THE COMPOSITION OF MULTIPLE FORMS OF RIVER SNAIL

Е. А. Тишина, Т. С. Дроганова, М. Анка

*ГОУ ВО МО Московский государственный областной университет*

E. A. Tishina, T. S. Droганova, M. Anka

*SE IHE MR Moscow State Regional University, Russia*

E-mail: ecolab@mgou.ru

### **Аннотация**

В остром токсикологическом эксперименте исследовано воздействие катионов  $Zn^{2+}$  на активность и состав множественных форм кислой фосфатазы живородки речной. Полученные результаты свидетельствуют об адаптационных процессах.

### **Abstract**

In an acute toxicological experiment, the effect of the  $Zn^{2+}$  cations on the activity of acid phosphatase and the composition of multiple forms of the river snail were studied. The results obtained indicate adaptation processes.

Многие токсические вещества (например, тяжелые металлы, хлорорганические пестициды и др.) могут длительное время сохраняться в воде, накапливаться в донных отложениях и гидробионтах, мигрировать по пищевой цепи. [1]. На формы нахождения тяжёлых металлов в водах оказывают влияние гидробионты, в том числе моллюски.

В числе других металлов цинк извлекается из донных отложений и накапливается гидробионтами. Основными источниками поступления цинка в природные воды являются отходы химических и металлургических производств [2; 4; 6]

---

© Е. А. Тишина, Т. С. Дроганова, М. Анка, 2019

\* Исследования выполнены при поддержке внутриуниверситетского научного гранта МГОУ.

Согласно литературным данным, цинк входит в состав более 200 металлоферментов, участвует в обмене нуклеиновых кислот и биосинтезе белков, активирует синтез металлотионеинов. При конкуренции с другими двухвалентными катионами в реакциях комплексообразования проявляет токсичность, что может сопровождаться изменением структуры биомолекул. Соединения цинка токсичны для рыб, моллюсков и ракообразных. Токсичность цинка усиливают ионы меди и никеля [2; 7].

В данной работе проанализированы изменения активности и множественных форм кислой фосфатазы живородки речной под влиянием катионов цинка.

Контрольную и экспериментальную группы моллюсков содержали в стеклянных ёмкостях, наполненных аквариумной водой. Контролем служили особи, содержащиеся в воде без токсиканта при прочих равных условиях в течение тех же временных интервалов, а также отобранные из аквариума непосредственно перед началом эксперимента. В качестве токсиканта использовали  $Zn^{2+}$  в концентрации, соответствующей величине 10 ПДК<sub>вод.</sub> (ПДК<sub>вод.</sub> составляет 1 мг/мл). Экспозиция опыта составляла 2, 4, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 и 96 ч. По истечении установленного времени отбирали группы по 5–6 животных и препарировали их для извлечения пищеварительной железы, из которой получали экстракт водорастворимых белков. Концентрацию белка в полученных экстрактах определяли по методу Лоури. Активность кислой фосфатазы определяли фотометрически ( $\lambda = 415$  нм) по скорости гидролиза модельного субстрата р-нитрофенилфосфата. За единицу активности фермента (Е) принимали такое его количество, которое катализирует образование 1 мкмоль р-нитрофенола за 1 минуту. Удельную активность ферментов рассчитывали в единицах на 1 мг белка (Е/мг белка). Множественные формы фермента выявляли при помощи энзим-электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) [3; 5; 8; 9].

В результате эксперимента было установлено, что, в целом, воздействие катионов  $Zn^{2+}$  вызывает увеличение активности кислой фосфатазы у живородки речной (рис. 1). Следует отметить скачкообразное изменение активности — после резкого всплеска показатели снижаются до контрольных значений. Максимальный прирост активности фермента (более, чем в 3,5 раза) наблюдается в точке экспозиции 24 часа. Подобные изменения активности кислой фосфатазы, вероятно, связаны с формированием срочной адаптации к воздействию токсиканта.

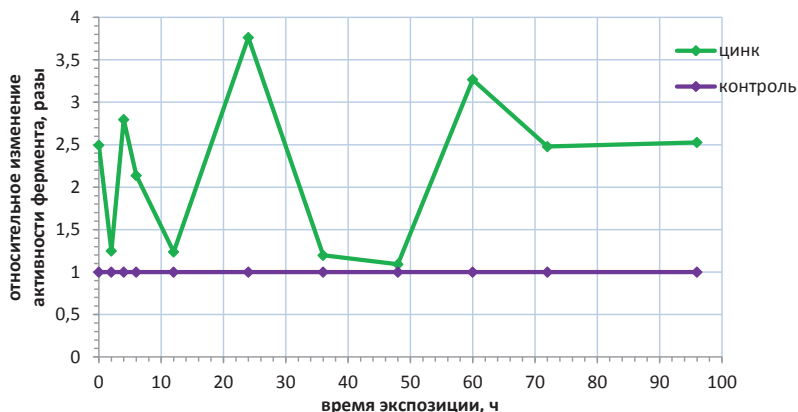


Рис. 1. Изменение удельной активности кислой фосфатазы в норме и при воздействии катионов цинка

Также было отмечено перераспределение активности кислой фосфатазы между множественными формами (рис. 2). В начале экспозиции (2 часа воздействия катионов  $Zn^{2+}$ ) обнаружено 3 множественные формы кислой фосфатазы со значениями относительной электрофоретической подвижности  $Rf_1 = 0,37$ ,  $Rf_2 = 0,28$  и  $Rf_3 = 0,14$ , тогда как в контрольной группе моллюсков фракция с  $Rf_3 = 0,14$  не была зафиксирована. Однако к концу экспозиции в опытной группе наблюдается исчезновение формы с  $Rf_2 = 0,28$ . Подобные изменения также указывают на перестройку метаболизма в связи с активаци-

ей адаптационных механизмов в ответ на воздействие катионов  $Zn^{2+}$ .

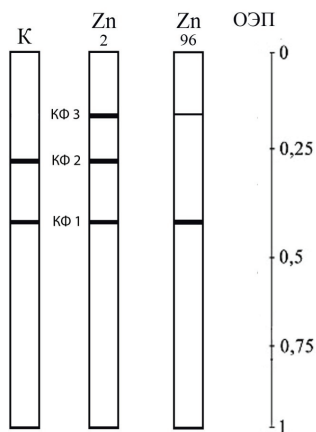


Рис. 2. Схема энзим-электрофореграммы множественных форм КФ печени живородки речной в норме и при воздействии катионов  $Zn^{2+}$ ; К — контрольная группа, 2, 96 — время экспозиции с катионов  $Zn^{2+}$ , ОЭП — относительная электрофоретическая подвижность; КФ 1, КФ 2, КФ 3 — зоны активности фермента

### Литература

1. Будников Г. К. Тяжелые металлы в экологическом мониторинге водных систем // Соросовский образовательный журнал. 1998. № 5. С. 23–29.
2. Вредные химические вещества (Неорганические соединения I-IV групп): справ. изд. / под ред. В. А. Филова и др. Л.: Химия, 1988. 592 с.].
3. Коничев А. С., Цветков И. Л., Попов А. П. и др. / Практикум по молекулярной биологии. М.: колосс, 2012. 151 с.
4. Крамаренко В. Ф. Токсикологическая химия. К.: Выща шк. Головное изд-во, 1989. 447 с.
5. Лойда З., Госспрау Р., Шиблер Т. Гистохимия ферментов. Лабораторные методы. / Пер. с англ. М.: Мир, 1982.
6. Мур Дж.В., Рамамурти С. Тяжёлые металлы в природных водах: Контроль и оценка влияния / Пер. с англ. М.: Мир, 1987. 288 с.,
7. Токсикологическая химия: учебник для вузов / под ред. Т. В. Плетневой. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005. 512 с.
8. Heinonen J. K., Lahti R. A. A new and convenient colorimetric determination to the assay of inorganic pyrophosphatase // *Anal. Biochem.* 1981. Vol. 113 (№ 2). P. 313–317.
9. Lowry O. H., Rosenbrought N. J., Farr A. L., Rangel R. L. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent // *J. Biol. Chem.* 1951. Vol. 193. № 2. P. 265–275.

**ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИЯ ТКАНИ ПУПОВИНЫ ЧЕЛОВЕКА  
КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ  
БЕСКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ  
МЕДИЦИНЫ И ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ**

HUMAN UMBILICAL CORD TISSUE DECELLULARIZATION AS  
A PERSPECTIVE METHOD FOR PRODUCING ACELLULAR MATRIX  
FOR REGENERATIVE MEDICINE AND TISSUE ENGINEERING

Д. В. Товпеко, Л. И. Калюжная, С. В. Чеботарев, Н. О. Меньшиков

*ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова»  
Министерства обороны Российской Федерации*

D. V. Tovpeko, L. I. Kalyuzhnaya, S. V. Chebotarev, N. O. Menshikov

*S. M. Kirov Military Medical Academy, Russia*

E-mail: tovpeko.dmitry@gmail.com

**Аннотация**

Методы тканевой инженерии направлены на создание тканеинженерных трансплантатов на основе бесклеточного матрикса, заселяемого клетками с регенераторными свойствами. Внеклеточный матрикс должен быть биосовместимым, иммунологически инертным, способным к продолжительному функционированию и резорбируемым в прогнозируемой перспективе. Важным методом создания такой конструкции является процесс децеллюляризации тканей и органов. Используемый в нашем исследовании щадящий способ децеллюляризации раствором додецилсульфата натрия оказался эффективным, поскольку полученный биоматериал содержит крайне мало клеток и минимальное количество ДНК. Полученные результаты являются предпосылкой для дальнейших исследований в этом направлении.

**Abstract**

The methods of tissue engineering are aimed at creating tissue-engineering transplants based on a cell-free matrix colonized by cells with regenerative features. The extracellular matrix must be biocompatible, immunologically inert, capable of long-term functioning and resorbable in the foreseeable future. An important method of creating such a construct is the process of tissues and organs decellularization. The gentle method used in our study for decellularization with sodium dodecyl sulfate solution turned out to be effective, since

the resulting biomaterial contains extremely few cells and a minimal amount of DNA. Thus, the results obtained are a prerequisite for further research in this direction.

Проблема дефицита донорских тканей и органов для трансплантации создает необходимость поиска альтернативных стратегий. Регенеративная медицина — активно развивающаяся отрасль биомедицинской индустрии, задача которой — восстановление пораженных болезнью или поврежденных тканей и органов. Основным ее инструментом считаются методы тканевой инженерии, подразумевающие различные подходы к созданию и имплантации в зону повреждения тканеинженерных конструкций на основе внеклеточного матрикса (ВКМ), заселяемого клетками с регенераторными свойствами. ВКМ представляет собой трехмерную конструкцию, включающую структурные и функциональные молекулы, такие как белки, гликопротеины, протеогликаны и полисахариды, секретируемые клетками в тканях. Материал на основе ВКМ должен быть биосовместимым, иммунологически инертным, способным к продолжительному функционированию и резорбируемым в процессе ремоделирования структуры ткани. Он обеспечивает засеянным перед трансплантацией резидентным клеткам и различным биологическим молекулам механическую поддержку и транспорт химических веществ. Материал для трансплантации должен исключать риски инфицирования, развития реакции «трансплантат против хозяина», а также поддерживать рецеллюляризацию.

Процесс децеллюляризации является одним из наиболее эффективных способов создания матрикса и заключается в удалении клеточных компонентов из соответствующих тканей и органов. Учитывая особенности эмбрионального фенотипа пуповины, можно предположить, что матрикс, полученный из нее, обеспечит индуктивное микроокружение для образования тканей в месте его трансплантации. Существующие в настоящее время методы децеллюляризации классифицируются на физические, химические и биологические (ферментативные). Идеальный метод децеллюляризации должен удалять все антигенные компоненты (нуклеиновые кислоты, клеточные мембраны, цитоплазматические структуры и липиды) из ткани без нарушения структуры и целостности ВКМ. Тем не менее, использование вышеуказанных методов в сочетании или отдельно, может потенциально привести к нарушению структурных и компонентных характеристик ткани. Поиск наиболее оптимального протокола децеллюляризации является актуальной научно-практической задачей.

Для создания децеллюляризованного матрикса использовали пуповины человека, полученные от здоровых доношенных новорожденных после самопроизвольных родов с информированным согласием доноров. Все манипуляции с материалом осуществляли в соответствии с руководящими

принципами, утвержденными локальным этическим комитетом Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова (протокол № 203). Все доноры пуповины проходили серологические исследования на наличие инфицирования вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), цитомегаловирусом, вирусом гепатита типа А и В, и сифилисом. Пуповину человека препарировали в ламинарном шкафу с соблюдением правил асептики, удаляли вену и артерии. Вартонов студень вместе с мембраной подвергали размельчению и гомогенизации, а затем децеллюляризации детергентным методом с использованием стерильного 0,05 % раствора додецилсульфата натрия (SDS) (Unger, Norway) в течение 24 ч при комнатной температуре и шейкировании при 120 об/мин. По окончании децеллюляризации образцы подвергали многократной отмывке фосфатным буферным раствором (PBS) (Биолот, Россия) (рН=7,42) с целью удаления SDS и открепившихся клеток. Децеллюляризованный матрикс хранили в растворе пенициллина-стрептомицина (100 МЕ/мл и 100 мкг/мл соответственно) (Биолот, Россия). Отсутствие ядер клеток в децеллюляризованных тканях документировали окрашиванием с помощью 2 % раствора ацетоорсеина и флуоресцентного красителя 4,6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI, 1:1000 Invitrogen) (Paisley, UK). Препараты анализировали с помощью микроскопа Axio Imager 2M (Carl Zeiss, Germany) (рис. 1, 2).

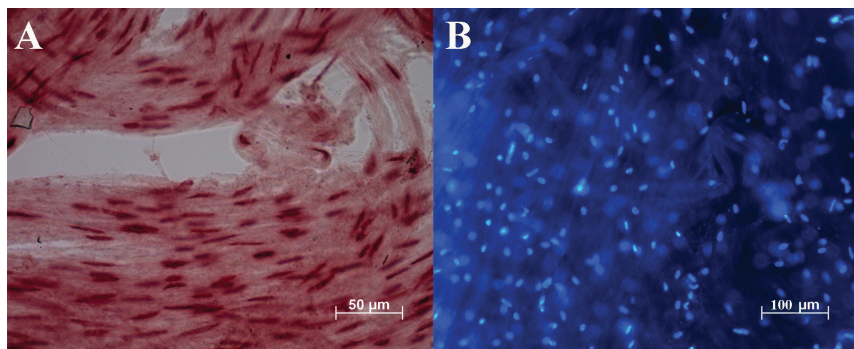


Рис. 1. Нативная пуповина. А — окраска ацетоорсеином, ок. P1 10X/23, об. EC Plan Neofluar 20X/0,5, шкала 50 мкм; В — окраска DAPI, ок. P1 10X/23, об. EC Plan Neofluar 20X/0,3, шкала 100 мкм

Гистологические исследования показали, что после децеллюляризации ядер в биоматериале почти не наблюдается. Количественную оценку содержания ДНК в нативных и децеллюляризованных тканях проводили с использованием наборов реактивов InstaGene matrix (BioRad, USA) в соответствии



с инструкциями производителя. Исследование материала осуществлялось на спектрофотометре Implen NanoPhotometer NP80 Touch (GmbH, Germany). Установлено, что среднее содержание ДНК в гомогенизированном биоматериале нативной пуповины составило 468,75 (453,65–475,15) нг/мкл, после децеллюляризации — 29,2 (27,8–30,7) нг/мкл. После децеллюляризации содержание ДНК снижено статистически значимо,  $p < 0,001$ .

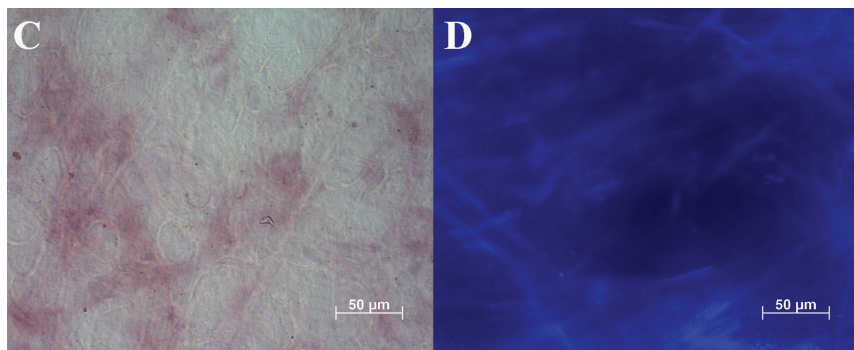


Рис. 2. Децеллюляризованная пуповина. С — окраска ацетоорсеином; D — окраска DAPI, для всех ок. P1 10X/23, об. EC Plan Neofluar 20X/0,5, шкала 50 мкм

Примененный в нашем исследовании щадящий способ удаления клеток раствором SDS является весьма эффективным, поскольку полученный биоматериал содержит крайне мало клеток и минимальное количество ДНК. Использованный способ удаления клеток из ткани пуповины, очевидно, не единственный, и помимо критерия бесклеточности, эффективность наиболее оптимального метода будет определяться и сохранностью состава ВКМ. Выявление характеристик, свидетельствующих о сохранности матрикса — предмет дальнейших исследований.

### Литература

1. Porzionato A., Stocco E., Barbon S., Grandi F., Macchi V., De Caro R. Tissue-Engineered Grafts from Human Decellularized Extracellular Matrices: A Systematic Review and Future Perspectives. *Int J Mol Sci.* 2018; 19 (12): 4117.

## СИСТЕМА АДАПТИВНОГО ИММУНИТЕТА CRISPR/CAS ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ *L. HELVETICUS* D75 И D76

CRISPR/CAS ADAPTIVE IMMUNITY SYSTEM  
OF PROBIOTIC *L. HELVETICUS* D75 AND D76

В. А. Торопов

ФГУП «Гос.НИИ особо чистых биопрепаратов»  
ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

V.A. Toropov

*State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russia*

E-mail: v.a.toropov@hpb.spb.ru

### Аннотация

*L. helveticus* D75 и D76 входят в состав пробиотического препарата Витафлор®. Штаммы обладают выраженной пробиотической активностью. С целью получения полных аннотированных последовательностей геномных ДНК *L. helveticus* D75 и D76 было проведено полногеномное секвенирование по технологии PacBio RS II. В составе геномов была выявлена система CRISPR/Cas первого класса, типа I-B. Данная система, возможно, предоставляет *L. helveticus* D75 и D76 дополнительную устойчивость к широкому кругу чужеродных генетических элементов ЖКТ за счёт наличия 33 последовательностей спейсеров CRISPR.

### Abstract

*L. helveticus* D75 and D76 are used as the probiotic supplement Vitaflor®. The strains have pronounced probiotic activity. In order to obtain complete sequences of annotated genomic DNA of *L. helveticus* D75 and D76, the whole genome sequencing was conducted by PacBio RS II technology. As part of the genomes, a first-class CRISPR/Cas system, type I-B, was identified. This system probably provides *L. helveticus* D75 and D76 with additional resistance to a wide range of foreign genetic elements of the gastrointestinal tract due to the presence of 33 CRISPR spacer sequences.

Бактерии *L. helveticus* D75 и D76 входят в состав пробиотического препарата Витафлор®. Бактерии *L. helveticus* D75 и D76 формируют устойчивую симбиотическую систему с прочными синтрофными связями и обладают выраженной пробиотической активностью.

В процессе работы было проведено полногеномное секвенирование по технологии PacBio RS II, геномная сборка в комплексе программ SMRT Portal v. 2.3.0, аннотация геномов *de novo* при помощи PGAP (Prokaryotic Genome Annotation Pipeline), программ Mauve и Artemis, баз данных Pfam и KEGG. Это позволило выявить в составе геномов *L. helveticus* D75 и D76 полноценный кластер генов системы CRISPR/Cas первого класса, типа I-B. Основная функция CRISPR-Cas типа I-B заключается в адаптивном иммунитете. Система не включена в не связанные с адаптивным иммунитетом клеточные процессы, однако может быть задействована в геномной перестройке. Мишенью для данного типа системы иммунитета выступают двуцепочечные молекулы чужеродной ДНК, а распознавание происходит через протоспейсерные последовательности, содержащие специфичные мотивы PAM. Основную роль при этом играют белки Cas3, являясь ядром мультибелкового комплекса Cascade [1, 2].

В составе геномов *L. helveticus* D75 и D76 обнаружено 3 блока массивов CRISPR. Суммарно они содержат 33 последовательности спейсеров и прямых повторяющихся последовательностей. Блок CRISPR1 содержит 3 спейсера и 4 коротких прямых повторяющихся последовательности. Блок CRISPR2 имеет 9 спейсеров, 7 коротких прямых повторяющихся последовательностей и одну неповторяющуюся последовательность. В составе массива CRISPR3 находятся 21 спейсер и 21 короткая прямая повторяющаяся последовательность. В массиве CRISPR3 — повторяющаяся последовательность, имеющая 1 нуклеотидную замену А на С в позиции 740 нуклеотида (позиция 1492878 в геноме *L. helveticus* D75 и 871612 в геноме *L. helveticus* D76). Система Cas представлена CRISPR-ассоциированными эндонуклеазами Cas-1, Cas-2, Cas-3 и CRISPR-ассоциированными белками Cas-4, Cas-5, Cas-6, Cas-7, Cas-8b1. Все гены системы Cas входят в состав единого генетического кластера. Гены, кодирующие белки Cas и массивы CRISPR представлены в таблице.

Вероятно, система CRISPR-Cas типа I-B *L. helveticus* D75 и D76 представляет целевым штаммам дополнительную устойчивость к агрессивной среде ЖКТ. Наличие 33 спейсерных участков указывает на многочисленные контакты исследуемых штаммов в процессе своего эволюционного развития с чужеродными генетическими элементами различной природы. Кроме того, развитая система CRISPR/Cas, возможно, позволяет *L. helveticus* D75 и D76 быть менее восприимчивыми к воздействию бактериофагов и является дополнительным преимуществом при их использовании в составе пробиотического препарата.

### Гены, кодирующие систему CRISPR/Cas у *L. helveticus* D75 и D76

Ген	Положение в геноме <i>L. helveticus</i> D75	Положение в геноме <i>L. helveticus</i> D76	Предполагаемый продукт транскрипции гена
CRISPR1	1360958..1361168	739692..739902	первый массив <i>CRISPR</i>
CRISPR2	1490768..1491325	869502..870059	второй массив <i>CRISPR</i>
CRISPR3	1492138..1493550	870872..872284	третий массив <i>CRISPR</i>
Cas2	1493735..1494016	872469..872750	<i>CRISPR</i> -ассоциированная эндонуклеаза <i>Cas2</i> типа I-B
Cas1	1494022..1495011	872756..873745	<i>CRISPR</i> -ассоциированная эндонуклеаза <i>Cas1</i> типа I-B
Cas4	1495021..1495512	873755..874246	<i>CRISPR</i> -ассоциированный белок <i>Cas4</i> типа I-B
Cas3	1495528..1497957	874262..876691	<i>CRISPR</i> -ассоциированная геликаза / эндонуклеаза <i>Cas3</i> типа I-B
Cas5	1498100..1498813	876834..877547	<i>CRISPR</i> -ассоциированный белок <i>Cas5</i> типа I-B
Cas7	1498800..1499702	877534..878436	<i>CRISPR</i> -ассоциированный белок <i>Cas7</i> типа I-B
Cas8b1	1499721..1501478	878455..880212	<i>CRISPR</i> -ассоциированный белок <i>Cas8b1</i> типа I-B
Cas6	1501496..1502251	880230..880985	<i>CRISPR</i> -ассоциированная эндорибонуклеаза <i>Cas6</i> типа I-B

### Литература

1. Westra ER, Buckling A, Fineran PC. CRISPR–Cas systems: beyond adaptive immunity. *Nat Rev Micro*. 2014;12(5):317–26.
2. Lander ES. The Heroes of CRISPR. *Cell*. 2016;164(1–2):18–28.

**R<sub>2</sub>R<sub>3</sub>-МУВ ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ РЕГУЛИРУЮТ  
БИОСИНТЕЗ ЛИГНИНА В РАСТЕНИЯХ СЕМЕЙСТВА  
SOLANACEAE: БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ**

R<sub>2</sub>R<sub>3</sub>-MYB TRANSCRIPTION FACTORS REGULATE LIGNIN  
BIOSYNTHESIS IN THE *SOLANACEAE* FAMILY:  
BIOINFORMATIC RESEARCH

А. С. Тугбаева, А. А. Ермошин, И. С. Киселева

*ФГАОУ ВО УрФУ им. первого Президента России Б. Н. Ельцина*

A. S. Tugbaeva, A. A. Ermoshin, I. S. Kiseleva

*Ural Federal University, Russia*

E-mail: anastasia.tugbaeva@gmail.com

**Аннотация**

В работе были проанализированы 23 последовательности R<sub>2</sub>R<sub>3</sub>-МУВ транскрипционных факторов, выявлены их структурные мотивы. На основе филогенетического анализа для 7 белков из растений семейства *Solanaceae* была предсказана роль в регуляции лигнификации и формировании устойчивости к фитопатогенам.

**Abstract**

23 sequences of R<sub>2</sub>R<sub>3</sub>-MYB transcription factors were analyzed, their structural motifs were identified. The roles of 7 proteins in the regulation of lignification and the formation of resistance to phytopathogens were predicted for the *Solanaceae* family plants.

Картофель (*Solanum tuberosum* L.), томаты (*Solanum lycopersicum* L.) табак (*Nicotiana tabacum* L.) являются одними из важных сельскохозяйственных культур семейства *Solanaceae*. Используя молекулярно-генетические подходы, можно создавать и отбирать продуктивные и устойчивые к абиотическим и биотическим стрессорам сорта растений. Известно, что ключевыми регуляторами экспрессии генов при стрессе и в онтогенезе являются транскрипционные факторы (ТФ). Семейство ТФ R<sub>2</sub>R<sub>3</sub>-МУВ участвует в формировании резистентности растений к патогенам [1].

Барьерным органом при проникновении фитопатогенов является растительная клеточная стенка. На модельном объекте *Arabidopsis thaliana* L. была показана роль ТФ *AtMYB46*, *63*, *58*, *83* и *103* в регуляции синтеза компонентов клеточной стенки, развитии метаксилемы, а также росте растений [2]. ТФ MYB могут активировать экспрессию генов, кодирующих ферменты биосинтеза лигнина — фенилаланин-аммоний-лиазу (PAL), гидроксиллазу коричной кислоты (C4H), 4-кумарат-КоА-лигазу (4CL), и др. [2]. Известно, что продукт гена *StMYB8* запускает экспрессию генов фенилпропаноидного пути при инфицировании *S. tuberosum* [3]. Для растений семейства *Solanaceae* функции многих ТФ не изучены. Целью данной работы является выявление функций ТФ семейства MYB из растений *N. tabacum*, *S. tuberosum* и *S. Lycopersicum in silico*.

Для первичного анализа была использована информация о последовательностях MYB ТФ растений *A. thaliana* (*AtMYB18*, *19*, *26*, *45*, *46*, *50*, *55*, *58*, *61*, *67*, *83*, *86*, *103*), *N. tabacum*, *S. tuberosum* и *S. lycopersicum* из базы данных факторов транскрипции растений PlantTFDB (<http://plantfdb.cbi.pku.edu.cn/>). Поиск ТФ с консервативными мотивами R<sub>2</sub>R<sub>3</sub>-MYB был проведен с использованием сервиса Constraint-based Multiple Alignment Tool NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Выравнивания аминокислотных последовательностей строили с использованием алгоритма CLUSTALW (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/>). Были выделены структурные мотивы R<sub>2</sub>R<sub>3</sub>. Филогенетическое дерево аминокислотных последовательностей строили по алгоритму присоединения соседа с использованием метода расчета р-дистанций в программе MEGA X с бутстреп-анализом 1000 повторов. Поиск информации о белок-белковых взаимодействиях и функциях проводили в базе данных STRING (<https://string-db.org>).

Для выявления гомологичных доменов было проведено множественное выравнивание аминокислотных последовательностей MYB ТФ растений *A. thaliana*, которые участвуют в регуляции биосинтеза лигнина, а также ТФ из *N. tabacum*, *S. tuberosum* и *S. lycopersicum*. Как правило, MYB ТФ содержат два функциональных домена: повторы R<sub>2</sub> [-W-(X19)-W-(X19)-W-] и R<sub>3</sub> [-F-(X18)-W-(X18)-W-] (рисунок 1А), которые включают консервативный триплет остатков триптофана (положения W26, W46 и W65 повтора R2 и F78, W97 и W106 повтора R3), разделенные 18 или 19 аминокислотными остатками. Позиции W97 и W106 повтора R3 являются высоко консервативными, в то время как аминокислота в позиции F78 заменена на остаток изолейцина. В анализируемых белках линкерная область между повторами является консервативной и образована мотивом 69-LRPD. Консервативные участки преимущественно расположены между позициями триптофана W46 и W65 повтора R2 и W97 и W106 повтора R3 (третья спираль домена

НТН в каждом повторе). Первая часть каждого повтора в домене МУВ более вариабельна.

```

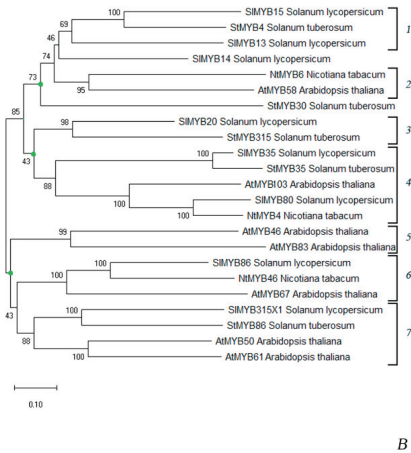
10      20      30      40      50      60
AMMYB67 MKDQFGRHRCQ-----KIVYGLMSEFSEKQELLVETIREFPRHSYFVLAQGLDCKSCRLSH
S1MYB86 ---KHH-DSK-----KIVYGLMSEFSEKQELLVETIREFPRHSYFVLAQGLDCKSCRLSH
NMYB46 ---KHH-DSK-----KIVYGLMSEFSEKQELLVETIREFPRHSYFVLAQGLDCKSCRLSH
AMMYB46 ---MKRFFVLA-----KAAATHTQVQKQKSEFSEKQELLVETIREFPRHSYFVLAQGLDCKSCRLSH
AMMYB35 --MKRFFVLA-----KAAATHTQVQKQKSEFSEKQELLVETIREFPRHSYFVLAQGLDCKSCRLSH
S1MYB35 ---MKRFFQD-----KAVYVGRFPTASDARLLATVATBETIDTIFQKAGLRDCKSCRLSH
S1MYB35 ---MKRFFQD-----KAVYVGRFPTASDARLLATVATBETIDTIFQKAGLRDCKSCRLSH
AMMYB103 ---MKRFFQD-----KAVYVGRFPTASDARLLATVATBETIDTIFQKAGLRDCKSCRLSH
S1MYB80 ---MKRFFQD-----KAVYVGRFPTASDARLLATVATBETIDTIFQKAGLRDCKSCRLSH
NMYB94 ---MKRFFQD-----KAVYVGRFPTASDARLLATVATBETIDTIFQKAGLRDCKSCRLSH
S1MYB30 ---MKRFFQD-----KAVYVGRFPTASDARLLATVATBETIDTIFQKAGLRDCKSCRLSH
AMMYB30 ---MKRFFQD-----KAVYVGRFPTASDARLLATVATBETIDTIFQKAGLRDCKSCRLSH
AMMYB61 ---MKRFFQD-----KAVYVGRFPTASDARLLATVATBETIDTIFQKAGLRDCKSCRLSH
NMYB86 ---MKRFFQD-----KAVYVGRFPTASDARLLATVATBETIDTIFQKAGLRDCKSCRLSH
AMMYB58 ---MKRFFQD-----KAVYVGRFPTASDARLLATVATBETIDTIFQKAGLRDCKSCRLSH
S1MYB35X1 ---MKRFFQD-----KAVYVGRFPTASDARLLATVATBETIDTIFQKAGLRDCKSCRLSH
S1MYB35 ---MKRFFQD-----KAVYVGRFPTASDARLLATVATBETIDTIFQKAGLRDCKSCRLSH
S1MYB20 ---MKRFFQD-----KAVYVGRFPTASDARLLATVATBETIDTIFQKAGLRDCKSCRLSH
S1MYB35 ---MKRFFQD-----KAVYVGRFPTASDARLLATVATBETIDTIFQKAGLRDCKSCRLSH
S1MYB13 ---MKRFFQD-----KAVYVGRFPTASDARLLATVATBETIDTIFQKAGLRDCKSCRLSH
S1MYB14 ---MKRFFQD-----KAVYVGRFPTASDARLLATVATBETIDTIFQKAGLRDCKSCRLSH
S1MYB15 ---MKRFFQD-----KAVYVGRFPTASDARLLATVATBETIDTIFQKAGLRDCKSCRLSH
S1MYB4 ---MKRFFQD-----KAVYVGRFPTASDARLLATVATBETIDTIFQKAGLRDCKSCRLSH

```

```

70      80      90      100     110     120     130
AMMYB67 IYVLDLQKSGSSTFQDQDITLDVFRIDMAMQKAKHGLPGRDQKQVFNHNSCKK---SLDQGLDPTKPCFPH
S1MYB86 IYVLDLQKSGSSTFQDQDITLDVFRIDMAMQKAKHGLPGRDQKQVFNHNSCKK---SLDQGLDPTKPCFPH
NMYB46 IYVLDLQKSGSSTFQDQDITLDVFRIDMAMQKAKHGLPGRDQKQVFNHNSCKK---SLDQGLDPTKPCFPH
AMMYB46 IYVLDLQKSGSSTFQDQDITLDVFRIDMAMQKAKHGLPGRDQKQVFNHNSCKK---SLDQGLDPTKPCFPH
AMMYB35 IYVLDLQKSGSSTFQDQDITLDVFRIDMAMQKAKHGLPGRDQKQVFNHNSCKK---SLDQGLDPTKPCFPH
S1MYB35 IYVLDLQKSGSSTFQDQDITLDVFRIDMAMQKAKHGLPGRDQKQVFNHNSCKK---SLDQGLDPTKPCFPH
S1MYB35 IYVLDLQKSGSSTFQDQDITLDVFRIDMAMQKAKHGLPGRDQKQVFNHNSCKK---SLDQGLDPTKPCFPH
AMMYB103 IYVLDLQKSGSSTFQDQDITLDVFRIDMAMQKAKHGLPGRDQKQVFNHNSCKK---SLDQGLDPTKPCFPH
S1MYB80 IYVLDLQKSGSSTFQDQDITLDVFRIDMAMQKAKHGLPGRDQKQVFNHNSCKK---SLDQGLDPTKPCFPH
NMYB94 IYVLDLQKSGSSTFQDQDITLDVFRIDMAMQKAKHGLPGRDQKQVFNHNSCKK---SLDQGLDPTKPCFPH
S1MYB30 IYVLDLQKSGSSTFQDQDITLDVFRIDMAMQKAKHGLPGRDQKQVFNHNSCKK---SLDQGLDPTKPCFPH
AMMYB30 IYVLDLQKSGSSTFQDQDITLDVFRIDMAMQKAKHGLPGRDQKQVFNHNSCKK---SLDQGLDPTKPCFPH
AMMYB61 IYVLDLQKSGSSTFQDQDITLDVFRIDMAMQKAKHGLPGRDQKQVFNHNSCKK---SLDQGLDPTKPCFPH
NMYB86 IYVLDLQKSGSSTFQDQDITLDVFRIDMAMQKAKHGLPGRDQKQVFNHNSCKK---SLDQGLDPTKPCFPH
AMMYB58 IYVLDLQKSGSSTFQDQDITLDVFRIDMAMQKAKHGLPGRDQKQVFNHNSCKK---SLDQGLDPTKPCFPH
S1MYB35X1 IYVLDLQKSGSSTFQDQDITLDVFRIDMAMQKAKHGLPGRDQKQVFNHNSCKK---SLDQGLDPTKPCFPH
S1MYB35 IYVLDLQKSGSSTFQDQDITLDVFRIDMAMQKAKHGLPGRDQKQVFNHNSCKK---SLDQGLDPTKPCFPH
S1MYB20 IYVLDLQKSGSSTFQDQDITLDVFRIDMAMQKAKHGLPGRDQKQVFNHNSCKK---SLDQGLDPTKPCFPH
S1MYB35 IYVLDLQKSGSSTFQDQDITLDVFRIDMAMQKAKHGLPGRDQKQVFNHNSCKK---SLDQGLDPTKPCFPH
S1MYB13 IYVLDLQKSGSSTFQDQDITLDVFRIDMAMQKAKHGLPGRDQKQVFNHNSCKK---SLDQGLDPTKPCFPH
S1MYB14 IYVLDLQKSGSSTFQDQDITLDVFRIDMAMQKAKHGLPGRDQKQVFNHNSCKK---SLDQGLDPTKPCFPH
S1MYB15 IYVLDLQKSGSSTFQDQDITLDVFRIDMAMQKAKHGLPGRDQKQVFNHNSCKK---SLDQGLDPTKPCFPH
S1MYB4 IYVLDLQKSGSSTFQDQDITLDVFRIDMAMQKAKHGLPGRDQKQVFNHNSCKK---SLDQGLDPTKPCFPH

```



Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей МУВ ТФ растений *A. thaliana*, *N. tabacum*, *S. tuberosum* и *S. lycopersicum*, участвующих в регуляции биосинтеза лигнина. *IV*. Филогенетическое дерево МУВ ТФ растений *A. thaliana*, *N. tabacum*, *S. tuberosum* и *S. lycopersicum*, построенное с помощью метода соединения соседей (Sano, Nei, 1981), бутстреп-оценка составила 1000 реплик

Для выявления филогенетической связи между анализируемыми ТФ МУВ из растений *A. thaliana* и семейства *Solanaceae* было построено филогенетическое дерево, которое представлено на рисунке В. ТФ семейства МУВ были разделены на 3 класса и 7 кластеров ( $p \geq 50$ ): 1 и 3 кластер образованы белками *S. tuberosum* и *S. lycopersicum*; 5 кластер — белками *A. thaliana*; кластеры 2, 4, 6 и 7 объединяют белки *A. thaliana* и растений семейства *Solanaceae*. Гомологичные белки, объединенные в общий кластер, как правило, имеют сходные функции. Анализ функций и взаимодействие ТФ из *A. thaliana* был проведен с использованием базы данных STRING. Согласно анализу, кластер 2 включает AtMYB58, отвечающий за регуляцию экспрессии генов целлюлозосинтазы и PAL, C4H, 4CL, HCT, таким образом, участвуя в образовании вторичной клеточной стенки. AtMYB103 (кластер 4) также участвует в регуляции этих генов и, соответственно, участвует в биогенезе

клеточной стенки. Белки кластера 6 (AtMYB67) запускают ответные реакции на биотические и абиотические стрессы и регулируют рост растений путем изменения экспрессии генов, кодирующих этилен-зависимые факторы транскрипции (ERF016, ERF017 и ERF018), гиббереллин-регулируемые белки (GASA2, GASA3) и целлюлозосинтаз. Кластер 7, который включает AtMYB50 и 61, отвечающие за развитие стрессовых реакций в ответ на действие биотических и абиотических факторов (MLP423), биосинтез лигнина и суберина, синтез антоцианов, образование сосудов метаксилемы (NAC TF — NAC012 и NAC015; KNAT7).

Таким образом, функции TF семейства MYB *N. tabacum*, *S. tuberosum* и *S. lycopersicum* были предсказаны путем сравнения с функциями MYB белков *A. thaliana*. Результаты биоинформатического анализа позволяют предположить, что 7 изученных MYB TF участвуют в регуляции лигнификации клеточной стенки, росте и развитии растений, формировании устойчивости к действию фитопатогенов.

### Литература

1. Yogendra K. N., Sarkar K., Kage U., Kushalappa A. C. Potato NAC43 and MYB8 mediated transcriptional regulation of secondary cell wall biosynthesis to contain *Phytophthora infestans* infection // Plant Molecular Biology Reporter. 2017. V. 35. P. 519–533.
2. Zhou J., Lee C., Zhong R., Ye Z.-H. MYB58 and MYB63 are transcriptional activators of the lignin biosynthetic pathway during secondary cell wall formation in *Arabidopsis* // Plant Cell. 2009. V. 21. P. 248–266.
3. Hao D., Yang J., Long W., Yi J., VanderZaag P., Li C. Multiple R genes and phenolic compounds synthesis involved in the durable resistance to *Phytophthora infestans* in potato cv. Cooperation 88. 2018. V. 8. P. 28–36.



**НАПРАВЛЕННОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ ОНКОГЕННЫХ  
МИКРОРНК В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ПОД ДЕЙСТВИЕМ  
ИСКУССТВЕННЫХ РИБОНУКЛЕАЗ\***

TARGETED INHIBITION OF ONCOGENIC MICRORNAS  
IN TUMOR CELLS BY ARTIFICIAL RIBONUCLEASES

Д. А. Чиглинцева<sup>1</sup>, О. А. Патутина<sup>1</sup>, Е. В. Биченкова<sup>2</sup>,  
Н. Л. Миронова<sup>1</sup>, В. В. Власов<sup>1</sup>, М. А. Зенкова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН*  
<sup>2</sup> *Университет Манчестера*

D. A. Chiglintseva<sup>1</sup>, O. A. Patutina<sup>1</sup>, E. V. Bichenkova<sup>2</sup>,  
N. L. Mironova<sup>1</sup>, V. V. Vlassov<sup>1</sup>, M. A. Zenkova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Institute of Chemical Biology  
and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia*  
<sup>2</sup> *University of Manchester*

E-mail: dashachiglintseva@gmail.com

**Аннотация**

В данной работе были разработаны и исследованы микроРНК-направленные конъюгаты нового дизайна — двойные олигонуклеотид-пептидные конъюгаты (DC), которые способны эффективно связываться и осуществлять сайт-направленное расщепление онкогенных микроРНК-мишеней. Было выяснено, что эффективность деградации микроРНК двойными конъюгатами значительно увеличивается в присутствии РНКазы Н. Показано, что данные конъюгаты способны снижать уровень микроРНК-мишеней в опухолевых клетках человека.

**Abstract**

In this work novel type of microRNA-targeted conjugates — dual oligonucleotide-peptide conjugates (DC), which was shown to efficiently bind and site-specific cleave of oncogenic microRNA, were developed and investigated. It was revealed that the efficiency of microRNA degradation by DC significantly increases in the presence of RNase H. It was shown that these conjugates reduce the level of microRNA targets in human tumor cells.

© Д. А. Чиглинцева, О. А. Патутина, Е. В. Биченкова, Н. Л. Миронова, В. В. Власов, М. А. Зенкова, 2019

\* Исследования выполнены при поддержке бюджета РФ грант № ААА-А-А17-117020210024-8 и Российского научного фонда грант № 19-14-00250.

В последние десятилетия интерес исследователей к препаратам на основе олигонуклеотидов и их производных, таких как олигонуклеотидные конъюгаты, значительно возрос. Олигонуклеотидные производные, в составе которых конъюгируемая группа обладает нуклеазной активностью, могут служить эффективным инструментом для специфического ингибирования ассоциированных с заболеваниями РНК, в частности, микроРНК, которые представляют собой малые некодирующие одноцепочечные молекулы РНК длиной 18–25 нуклеотидов и являются регуляторами посттранскрипционных этапов экспрессии генов. МикроРНК отвечают за регулирование основных биологических процессов, включая апоптоз, дифференцировку, пролиферацию, миграцию, инвазию, иммунный ответ. Нарушение экспрессии микроРНК наблюдается при множестве патологий, таких как неврологические расстройства, воспалительные и аутоиммунные состояния, сердечно-сосудистые и онкологические заболевания. Развитие опухоли сопровождается избытком или недостатком определенных микроРНК по сравнению с нормальными тканями. Избыточное накопление онкогенных микроРНК способствует онкогенезу путем ингибирования генов-супрессоров опухолей, тогда как глобальная потеря опухолесупрессорных микроРНК приводит к чрезмерной экспрессии онкогенов.

Новой перспективной стратегией, направленной на инактивацию избыточных онкогенных микроРНК, может стать разработка и применение сиквенс-специфических искусственных рибонуклеаз. Эти соединения представляют собой конъюгаты, состоящие из адресующего олигонуклеотида, избирательно связывающегося с микроРНК-мишенью, и ковалентно присоединенной расщепляющей группы, катализирующей деградацию РНК.

В данной работе разработаны и исследованы микроРНК-направленные конъюгаты нового поколения — двойные конъюгаты — Dual Conjugates (DC), направленные к онкогенным микроРНК микроРНК-17, микроРНК-21, микроРНК-18a и микроРНК-155. В составе данных конъюгатов расщепляющий пептид на основе чередующихся остатков аргинина, лейцина и глицина (LRLRG)<sub>2</sub> расположен между двумя короткими микроРНК-адресующими олигодезоксирибонуклеотидами. Уникальность разработанных конъюгатов заключается в том, что в последовательностях олигонуклеотидов аденины были заменены на 2-аминоаденины для повышения эффективности комплексообразования с микроРНК-мишенью. В результате экспериментов было выяснено, что разработанные DC способны связывать микроРНК-мишень с эффективностью до 96 % при эквимоларной концентрации. Исследование рибонуклеазной активности DC показало, что конъюгаты способны расщеплять микроРНК-мишень с эффективностью до 65 % за 48 ч инкубации. Установлено, что эффективность расщепления микроРНК двойными

конъюгатами зависит от последовательности мишени. Расщепление происходит по пиримидин-Х сайтам, преимущественно по С-А и U-А связям в образующемся при связывании одноцепочечном участке РНК. Показано, что в присутствии РНКазы Н в концентрации 5 ед. акт./мл эффективность расщепления микроРНК-мишеней конъюгатами возрастает на 40 %, при этом эффективность расщепления микроРНК в комплексе с DC на 15–25 % выше, чем в дуплексе с антисмысловым олигонуклеотидом. Таким образом, полученные данные показывают, что наличие пептида и введение аминокислот в составе конъюгата не препятствует активности РНКазы Н. Кроме того, очевидно, что в исследуемой системе эффективность деградации микроРНК-мишени под действием двойного конъюгата значительно возрастает в присутствии РНКазы Н, что, несомненно, может способствовать эффективной инактивации микроРНК внутри клетки. Исследование биологической активности конъюгатов выявило, что двойные конъюгаты способны снижать уровень микроРНК-мишеней в опухолевых клетках человека KB-8-5 *in vitro* до 70 % по сравнению с интактными клетками.

В заключение следует отметить, что среди разрабатываемых в настоящее время стратегий, направленных на подавление активности микроРНК, микроРНК-направленные искусственные рибонуклеазы могут занять заслуженное место в области разработки анти-микроРНК агентов в качестве самостоятельного подхода. Такие соединения могут иметь преимущество за счет способности инициировать многооборотную реакцию инактивации целевой РНК и вызывать эффективное и необратимое разрушение мишеней.

## КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ КОРОНАРНЫХ АРТЕРИЙ НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ АТЕРОГЕНЕЗА У ЧЕЛОВЕКА

### CELL COMPOSITION OF CORONARY ARTERIES IN DIFFERENT STAGES OF HUMAN ATEROGENESIS

Д. В. Шарыш<sup>1</sup>, А. В. Марков<sup>1</sup>, Е. С. Григорьева<sup>2</sup>,  
О. Е. Савельева<sup>2</sup>, М. С. Назаренко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Томский НИМЦ, НИИ медицинской генетики

<sup>2</sup>Томский НИМЦ, НИИ онкологии

D. V. Sharysh<sup>1</sup>, A. V. Markov<sup>1</sup>, E. S. Grigoryeva<sup>2</sup>,  
O. E. Savelieva<sup>2</sup>, M. S. Nazarenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Tomsk NRMC, Research Institute of Medical Genetics

<sup>2</sup>Tomsk NRMC, Cancer Research Institute

#### Аннотация

Методом проточной цитофлуориметрии установлено увеличение содержания лейкоцитов, инфильтрирующих стенки коронарных артерий человека, по мере прогрессии атеросклеротического поражения. На поздней стадии атерогенеза в стенке пораженной артерии возрастает доля макрофагов в лейкоцитарной фракции, а также количество атипичных гладкомышечных клеток с макрофагоподобным фенотипом.

#### Abstract

Flow cytometry showed an increase amount of leukocytes infiltrating the walls of the coronary arteries, as the atherosclerotic lesion progressed. At the late stage of atherogenesis, the proportion of macrophages in the leukocyte fraction in affected arteries increases, as well as the number of atypical smooth muscle cells with a macrophage-like phenotype.

#### Введение

Атеросклероз представляет собой хронический воспалительный процесс сосудов среднего и крупного диаметра, при котором резидентные клетки, составляющие стенку пораженной артерии, претерпевают количественные и качественные изменения, происходит инфильтрация стенки

иммунными клетками. Атерогенез начинается с увеличения проницаемости эндотелиальных клеток для липопротеинов (ЛП) [1]. Накопление и перекисное окисление ЛП способствуют миграции в область поражения гладкомышечных клеток (ГМК), которые, меняя фенотип на макрофаго-подобный (с экспрессией макрофагальных маркеров), поглощают их без возможности эффлюкса, а также выделяют провоспалительные хемокины, что способствует рекрутированию лимфоцитов, нейтрофилов и макрофагов. Формируется ранняя стадия атерогенеза — патологическое утолщение интимы. На более поздней стадии формируется некротическое ядро как следствие хронического воспаления, при котором иммунные клетки поглощают ЛП и выделяют активные радикалы, а также ферменты деградации межклеточного матрикса, способствующие нестабильности атеросклеротической бляшки (АБ). Осложнения атеросклероза коронарных артерий (ИБС, инфаркт миокарда) возникают вследствие окклюзии сосуда тромботическими массами при разрыве покрышки или стеноза артерии крупной АБ [1, 2]. Тем не менее, несмотря на подробность представлений о патогенезе атеросклероза, комплексного исследования клеточного состава артерий человека (включая ГМК с учетом их фенотипа) на разных стадиях атерогенеза к настоящему времени не опубликовано.

### **Цель исследования**

Изучение клеточного состава коронарных артерий на ранней и поздней стадии развития атеросклеротической бляшки методом проточной цитофлуориметрии.

### **Материалы и методы**

В результате аутопсии от 5 доноров были набраны образцы коронарных артерий, разделенные визуально по наличию или отсутствию развитой атеросклеротической бляшки в стенке артерии. Часть образца была использована для гистологического анализа по стандартной методике, с окрашиванием гематоксилин-эозином. Стадии атеросклероза были классифицированы согласно American Heart Association (типы I-VII) [3]. Другая часть образца была дезагрегирована до суспензии синглетных клеток с использованием ферментной смеси, содержащей коллагеназу, гиалуронидазу, ДНКазу в 2,5 мл 20 mM HEPES в DPBS. Иммуноокрашивание проводили на наличие поверхностных (CD45, CD31) и внутриклеточных антигенов (CD68, αSMA). Для контроля были использованы изотипические контрольные антитела и неокрашенный образец. Проточная цитофлуориметрия была проведена на приборе BD MoFlo XDP (Beckman Coulter). Были из-

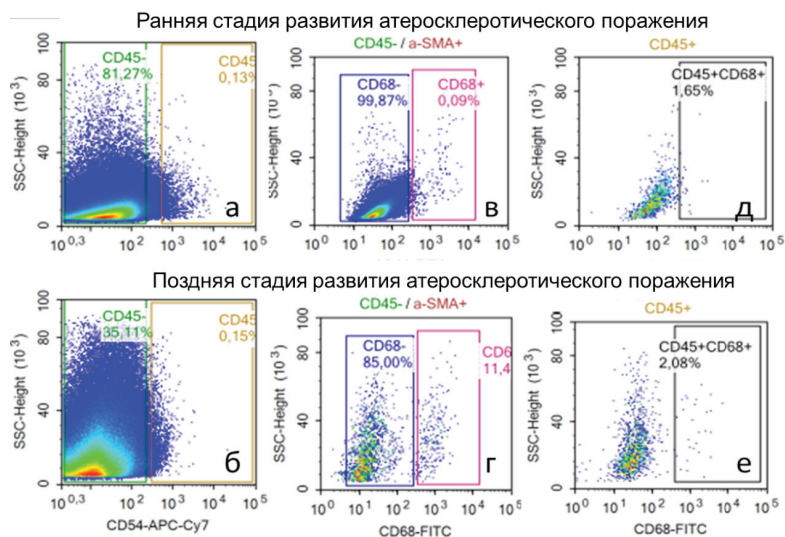
учены клетки, имеющие иммунофенотип макрофагов (CD45+CD68+), эндотелиоцитов (CD45-CD31+), ГМК с сократительным фенотипом (сГМК) (CD45-aSMA+CD68-) и с макрофаго-подобным фенотипом (мГМК) (CD45-aSMA+CD68+). Статистическая обработка данных проведена в программе PSPP (v1.2.0, Free Software Foundation). Результаты представлены в виде медианы, 1-го и 3-го квартилей (Me [Q1; Q3]). Сравнительный анализ проведен с помощью критерия Манна — Уитни, корреляционный — с помощью критерия Спирмена ( $r$ ).

### Результаты

Выявлено, что повышенное содержание CD45+ лейкоцитов относительно всех подсчитанных клеток в атеросклеротических поражениях ранней стадии развития (15,7 % [11,9; 16,1]%) статистически значимо ( $p=0,003$ ) по сравнению с развитой АБ (8,1 %, [3,9; 8,5]%). Относительное содержание макрофагов (CD45+CD68+) не различалась между стадиями развития атеросклеротического поражения и составляло в среднем 0,5 % [0,2; 0,6]%, в то время как доля макрофагов от CD45+ лейкоцитов оказалась статистически значимо ( $p=0,003$ ) выше в развитых АБ (6,7 %, [5,0; 7,8]%), чем на ранних стадиях поражения (3,0 %, [1,9; 3,6]%), что, в целом, свидетельствует об уменьшении количества CD45+CD68-клеток в развитых атеросклеротических бляшках и возрастании доли макрофагов от всех лейкоцитов при прогрессировании атеросклеротического поражения.

Среди резидентных клеток коронарных артерий содержание ГМК составило в среднем 23,5 % [10,3; 35,1]%, содержание эндотелиальных клеток составило — 0,6 % [0,4; 2,0]%. На всех стадиях атеросклеротического поражения коронарных артерий были обнаружены ГМК с измененным фенотипом — мГМК (aSMA+CD68+). Причем их относительное количество имело положительную корреляцию с гистологической стадией развития АБ ( $r=0,8$ ,  $p=0,01$ ), что подтверждает опубликованные ранее сведения о переключении фенотипа ГМК с сократительного на макрофаго-подобный при развитии АБ [2]. Отмечается статистически значимое ( $p=0,018$ ) увеличение содержания сГМК при кальцинации артерии (без кальцинации) (10,0 % [3,6; 15,7]%), при наличии кальцинации сосуда (19,6 [14,9; 26,8]%).

Также была отмечена положительная корреляция относительного количества макрофагов с относительным содержанием ГМК обоих фенотипов: сГМК ( $r=0,6$ ,  $p=0,02$ ) и мГМК ( $r=0,6$ ;  $p=0,02$ ), а также с относительным количеством эндотелиоцитов ( $r=0,6$ ;  $p=0,04$ ), что может свидетельствовать о поддержании относительной стабильности клеточного состава стенки артерии на разных этапах развития атеросклероза.



Результаты цитофлуориметрии клеток из образцов коронарных артерий одного донора. Скатерограммы отражают относительное количество клеток и логику гейтирования: а, б — содержание клеток по наличию CD45; в, г — среди CD45-аSMA+ клеток определены CD68+ и CD68-клетки; г, д — среди CD45+ клеток выделены CD68+ клетки.

## Выводы

Результаты настоящего исследования подтверждают переход от более интенсивного и остро протекающего воспаления на ранней стадии развития атеросклеротического поражения коронарных артерий к хроническому воспалению с увеличением относительного количества макрофагов на более поздней стадии формирования атеросклеротической бляшки. На поздних стадиях развития атеросклероза повышается количество гладкомышечных клеток с атипичным макрофагоподобным фенотипом, а повышение содержания типичных гладкомышечных клеток сопряжено с кальцинозом — важным фактором нестабильности атеросклеротической бляшки.

## Литература

1. Bentzon J. F. et al. Mechanisms of plaque formation and rupture // *Circulation research*. 2014. V. 114. №. 12. P. 1852–1866.
2. Albarrán-Juárez J. et al. Lineage tracing of cells involved in atherosclerosis // *Atherosclerosis*. 2016. V. 251. P. 445–453.
3. Stary H. C. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2000. V. 20. №. 5. P. 1177–1178.

**СКРИНИНГ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ  
НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕТАБОЛИТОВ КИШЕЧНОЙ  
МИКРОБИОТЫ *IN VITRO* НА МОДЕЛИ СТЕАТОЗА  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КЛЕТОК HEPG2**

SCREENING OF THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF LOW MOLECULAR  
MICROBIAL METABOLITES *IN VITRO* IN A HEPG2 CELL MODEL  
OF STEATOSIS

Е. С. Щербакова, Т. С. Салль, Т. Я. Вахитов,  
А. В. Жахов, А. М. Ищенко, Е. В. Демьянова

*Федеральное государственное унитарное предприятие  
«Государственный научно-исследовательский институт особо чистых  
биопрепаратов» Федерального медико-биологического агентства,  
Санкт-Петербург, Россия*

E. S. Shcherbakova, T. S. Sall, T. Ya. Vakhitov,  
A. V. Zhakhov, A. M. Ischenko, E. V. Demyanova

*State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russia*

E-mail: e.s.shcherbakova@hpb.spb.ru

**Аннотация**

Одним из наиболее распространенных хронических заболеваний печени является неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП). В последнее время накапливается все больше данных о том, что немаловажную роль в развитии и прогрессировании заболевания играет кишечная микробиота. Представляется интересным изучить биологическую активность низкомолекулярных метаболитов микробного происхождения в отношении НАЖБП *in vitro* с использованием линии клеток HepG2. В работе получены данные о влиянии на процессы липогенеза и воспаления короткоцепочечных жирных кислот, аминокислот с разветвленной боковой цепью, индол- и фенилкарбоновых кислот.

**Abstract**

One of the most common chronic liver diseases is non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Recently, more and more data is accumulated that the intestinal microbiota



plays an important role in the development and progression of disease. It seems interesting to study the biological activity of low molecular microbial metabolites toward NAFLD *in vitro* using HepG2 cells. The data on the effect of short chain fatty acids, branched chain amino acids, indole- and phenyl carboxylic acids on lipogenesis and inflammation are obtained.

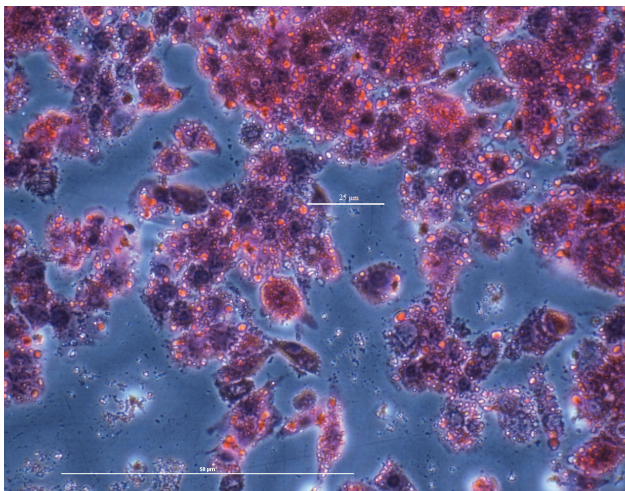
Неалкогольная жировая болезнь печени лидирует среди хронических заболеваний печени. Ее глобальная распространенность составляет 13,5–32 % [1]. НАЖБП включает в себя несколько стадий. При стеатозе происходит избыточное накопление триглицеридов (ТГ) в печени, которое при развитии воспаления прогрессирует до неалкогольного стеатогепатита. Повышенный синтез провоспалительных цитокинов способствует апоптозу гепатоцитов и фиброзу. Фиброз является клиническим показателем риска развития цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы [2].

Немаловажная роль в развитии таких патологических изменений принадлежит кишечной микробиоте. Продукты метаболизма микробиоты, всасываясь через кишечную стенку, попадают через воротную вену в печень, где они воздействуют на гепатоциты через различные рецепторы. Например, такие бактериальные метаболиты, как короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК) взаимодействуя с рецепторами, сопряженными с G-белками (GPR41), высвобождают пептид YY (PYY), который воздействует на моторную активность ЖКТ и вызывает снижение аппетита. С другой стороны, повышенное содержание КЦЖК увеличивает накопление свободных жирных кислот (ЖК) в печени через ингибирование аденозинмонофосфат-активированной протеинкиназы (АМРК) [3]. Существуют исследования, рассматривающие влияние на НАЖБП таких метаболитов, как ароматические аминокислоты, аминокислоты с разветвленной боковой цепью [4], производные индольных и фенольных карбоновых кислот [5]. В этой связи представляло интерес более подробное изучение биологической активности метаболитов микробного происхождения *in vitro*, по возможности расширение перечня метаболитов, подавляющих липогенез и воспаление при НАЖБП.

Целью данной работы является проведение скрининга биологической активности низкомолекулярных бактериальных метаболитов на модели стеатоза с использованием клеточной культуры человеческой гепатокарциномы.

Клеточную линию человеческой гепатоцеллюлярной карциномы HepG2 культивировали в среде Игла, модифицированной Дульбекком (DMEM) (Биолот, РФ), содержащей 10 % фетальную бычью сыворотку (ФБС) и L-глутамин (Биолот, РФ), при 37 °C в увлажненной атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub> в инкубаторе. Модель стеатоза получали путем воздействия на клетки HepG2 олеиновой и пальмитиновой кислот (Sigma-Aldrich, USA) (2:1)

в концентрациях 0,75 мМ, конъюгированных с 1,5 % бычьим сывороточным альбумином (БСА) (Биолот, РФ). Это приводило к избыточному накоплению ТГ за счет усиленного потока ЖК в гепатоциты (на рисунке ТГ окрашены в коричневый цвет). Для визуальной оценки накопления ТГ в гепатоцитах использовали красители Oil Red O, гематоксилин и эозин.



Клетки HepG2 с окрашенными липидными каплями. Культивирование в присутствии 0,75 мМ ЖК и 1,5 % БСА, окраска Oil Red O, гематоксилином, эозином, x20

В первый день эксперимента клетки HepG2 выращивали на 24-луночном планшете в DMEM с ФБС, плотность засева составляла  $1,5 \times 10^5$  клеток. На второй день меняли ростовую среду, клетки выращивали в среде DMEM. На третьи сутки вносили ЖК с 1,5 % БСА для создания модели стеатоза и метаболизма (КЦЖК (0,1 мМ), аминокислоты (1 мМ), индолкарбоновые кислоты (0,01 мМ), 3-фенилмолочную (0,1 мМ) и 3-фенилпропионовую (0,01 мМ) кислоты). Через 24 часа оценивали степень накопления ТГ с помощью коммерческого набора на ТГ («Randox Triglycerides», Великобритания). Количество ТГ нормировали на количество клеток путем использования косвенного показателя — содержания белка, которое определяли набором «Pierce™ BSA Protein Assay Kit» (Thermo Scientific, USA). Воспаление оценивали по количеству содержания провоспалительных цитокинов ИЛ-8, ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ФНО- $\alpha$  в культуральной среде методом ИФА (ООО «Цитокин», РФ). При обработке результатов, проводимой в программе Microsoft Excel, статисти-

ческую значимость между сравниваемыми группами оценивали по t-критерию Стьюдента для 2-х выборок; различия рассматривали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

На клеточной модели стеатоза было выявлено, что индолакриловая кислота достоверно повышает содержание ТГ в клетках на 29 % по сравнению с контролем. В то время как достоверно снижали накопление ТГ изолейцин (35 %), валин (45 %), 3-индолпропионовая (47 %) и валериановая (39 %) кислоты. Уксусная, пропионовая, масляная, изовалериановая, индолмолочная и 3-фенилпропионовая кислоты способствовали повышению количества ТГ. Добавление к клеткам лейцина, глицина, 3-фенилмолочной кислоты снижало липогенез, но результаты были недостоверными.

С помощью метода ИФА было выявлено, что клетками HepG2 продуцируется только ИЛ-8, в то время как продукция остальных цитокинов (ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ФНО- $\alpha$ ) не была обнаружена.

На клеточной модели стеатоза было обнаружено, что достоверно повышали секрецию провоспалительного цитокина ИЛ-8 по сравнению с контрольной группой валин (154 %), 3-фенилпропионовая (71 %), изовалериановая (51 %) и уксусная (28 %) кислоты. Достоверное снижение на 24 % воспаления наблюдали в клетках при добавлении 3-индолпропионовой кислоты. Тенденцию к снижению продукции ИЛ-8 наблюдали при добавлении изолейцина, лейцина, глицина, индолмолочной, валериановой и пропионовой кислот. Недостоверное повышение воспаления вызывали 3-фенилмолочная, индолакриловая и масляная кислоты.

Таким образом, был проведен скрининг биологической активности 14 низкомолекулярных метаболитов микробного происхождения *in vitro* с использованием клеток HepG2. Выявили, что такие метаболиты как глицин, лейцин, изолейцин, 3-индолпропионовая и валериановая кислоты снижают и липогенез, и воспаление, в то время как уксусная, изовалериановая, индолакриловая и 3-фенилпропионовая кислоты, наоборот, способствуют развитию воспаления и накоплению ТГ. Валин и 3-фенилмолочная кислота снижают содержание ТГ в клетках, но при этом усиливают продукцию ИЛ-8. Тогда как индолмолочная и пропионовая кислоты повышают липогенез и снижают секрецию провоспалительного цитокина ИЛ-8.

## Литература

1 Epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis: implications for liver transplantation / Younossi Z. M. [et al.] // Transplantation. 2019. Т. 103. № 1. P. 22–27.

2 Liver disease symptoms in non-alcoholic fatty liver disease and small intestinal bacterial overgrowth / Rafiei R. [et al.] // Romanian Journal of Internal Medicine. 2017. Т. 1. № 56(2). P. 85–89.

3 Кузнецов, В. Ф. Ферментированные пищевые волокна и короткоцепочечные жирные кислоты как компоненты функционального питания / В. Ф. Кузнецов, Л. М. Кулемин, В. М. Бондаренко // Вятский медицинский вестник. 2007. №. 4.

4 Branched-chain and aromatic amino acids, insulin resistance and liver specific ectopic fat storage in overweight to obese subjects / Haufe S. [et al.] // Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases. 2016. Т. 26. № 7. P. 637–642.

5 Intestinal Microbiota, Nonalcoholic Steatohepatitis and Hepatocellular Carcinoma: The Potential Role of Dysbiosis in the Hepatocarcinogenesis / Brandi G. [et al.] // Updates in Liver Cancer. 2017. P. 11.

**ПРОГРАММИРУЕМАЯ СБОРКА  
ПРОТЯЖЕННЫХ ДНК СИНТОНОВ**

## PROGRAMMED ASSEMBLY OF LONG DNA SYNTHONS

В. В. Щур, С. А. Усанов, А. В. Янцевич

*Институт биоорганической химии НАН Беларуси*

V. V. Shchur, S. A. Usanov, A. V. Yantsevich

*Institute of Bioorganic Chemistry NAN of Belarus***Аннотация**

Искусственные последовательности ДНК или синтетические гены являются мощным инструментом в молекулярной биологии и биотехнологии. Обычно последовательности ДНК длиной более 1 000 п.н. синтезируют из более мелких синтетических фрагментов ДНК (синтонов) в ходе ПЦР сборки. Способность синтезировать более длинные синтоны значительно сокращает усилия и затраты времени для синтеза ДНК. Нами разработан метод сборки ДНК-синтонов, длиной до 1550 п.н. Предлагаемый подход основан на комбинированном проектировании разбиения последовательности гена на олигонуклеотидные фрагменты, градиенте их концентраций и специализированном ПЦР цикле, пошагово направляющем стохастический процесс сборки гена.

**Abstract**

Artificial DNA sequences or synthetic genes are a powerful tool in molecular biology and biotechnology field. Usually DNA sequences with length more than 1 kb are assembled from smaller synthetic DNA fragments (synthons) by PCR assembly. The ability to synthesize longer synthons sufficiently reduces efforts and time for DNA synthesis. We developed an approach for the assembly of DNA synthons up to 1550 bp. Proposed approach is based on combined design, oligonucleotide concentration gradient, and specialized PCR cycle that directs stochastic gene assembly process in a stepwise manner.

**Введение**

Синтетическая биология — междисциплинарное направление, занимающееся проектированием и созданием биологических систем с заданными свойствами и функциями. Возможности синтетической биологии реализу-

ются в таких областях как белковая и метаболическая инженерия, редактирование и создание геномов, разработка биосенсоров, таргетная доставка лекарств. Для реализации этих направлений необходима методологическая основа: микрофлюидные технологии, способы получения искусственных генов, секвенирование ДНК, методы генетической инженерии. Синтез генов, как одна из базовых технологий, существует относительно давно, но, тем не менее, нуждается в оптимизации.

Оптимальный способ синтеза гена можно охарактеризовать тремя параметрами: максимальное количество целевого продукта, минимум побочных продуктов и возможность получения как можно более длинных синтонов. Среди многообразия способов синтеза можно отметить два подхода на основании разбиения последовательности гена на олигонуклеотидные фрагменты с помощью находящегося в свободном доступе программного обеспечения. Первый подход — термодинамически сбалансированная стандартная сборка (*thermodynamically balanced conventional assembly*, ТВС) [1]. В данном случае осуществляют синтез олигонуклеотидов, покрывающих обе цепи гена; есть пропуски в перекрытиях одной цепи; они компенсированы олигонуклеотидами другой цепи и заполняются ДНК-полимеразой в ходе ПЦР; перекрытия имеют примерно одинаковые температуры отжига. Второй подход — термодинамически сбалансированная сборка изнутри-кнаружи (*thermodynamically balanced inside-out*, ТВИО) — отличается от ТВС-метода тем, что синтез происходит поэтапно от центра гена к концам [1].

ТВИО является оптимальным способом сборки гена, но не позволяет использовать более 6 пар олигонуклеотидов. Один из вариантов решения данной проблемы — подход, предлагаемый в нашей работе. Он представляет собой комбинацию двух способов сборки в одной пробирке за один раунд ПЦР с последующей реамплификацией целевого продукта с фланкирующими праймерами за второй раунд (*one-pot* сборка).

### Материалы и методы

Олигонуклеотиды синтезировали на ДНК синтезаторе H32 (K&A) в 100 наномолярном масштабе с использованием носителя CPG с диаметром пор 1000 Å. Для депротекции и отщепления использовали 34 % водный раствор аммиака (16 часов, 55 °С), для ТФЭ — картриджи Supelco Analytical Supelclean™ ENVI™ (модифицированная методика из [2]). Спектры поглощения растворов олигонуклеотидов записывали на спектрофотометре NanoDrop 2000 UV-Vis (Thermo Scientific), масс-спектры — с помощью LCQ-Fleet ion-trap mass spectrometer (Thermo Scientific) в режиме ESI-. ВЭЖХ с МС и УФ детекцией осуществляли с помощью Agilent 1290 HPLC

system. ПЦР проводили в программируемом четырёхканальном термостате Терцик (ДНК-технология). Использовали следующие ДНК полимеразы, а также буферные растворы и раствор энхансера (для Q5), входящие в состав набора к полимеразе: DreamTaq, Q5 High-Fidelity, Flash, Tornado, ArtStart, SmArt (таблица 1). Также для всех полимераз использовали смесь дНТФ от Thermo Scientific. Результаты ПЦР визуализировали с помощью электрофореза в 2 % агарозном геле. Реамплификацию продукта ПЦР-сборки гена во всех экспериментах осуществляли с помощью DreamTaq ДНК полимеразы, используя при этом ПЦР цикл, рекомендованный производителем.

#	ДНК-полимераза	«Горячий старт»	5',3'-	3',5'-	+Sso7d	Производитель
			эксонуклеазная активность			
1	DreamTaq	–	+	–	–	Thermo Fisher Scientific (США)
2	Q5	–	–	+	+	New England BioLabs (США)
	Q5 + энхансер	–	–	+		
3	Flash	–	–	+	+	ArtBioTech (Беларусь)
4	Tornado HotStart Taq	+ (химическая модификация)	+	–	+	
5	ArtStart Taq	+ (аптамер)	+	–	–	
6	SmArt Taq	+ (антитело)	+	–		

Модельный ген — ген холестериноксидазы из *Streptomyces lavendula*, оптимизированный для экспрессии в *E. coli*. Проектирование сборки осуществляли в программе DNAWorks [3]. Центральную часть гена (1031 bp) собирали методом ТВС из 26 олигонуклеотидов с температурой плавления перекрытий 72 °С, краевые участки гена дорастили (до 1296 или 1544 п.о.) с помощью метода ТВЮ из 6 или 12 олигонуклеотидов с температурой плавления перекрытий 62 °С. Использование трех пар ТВЮ олигонуклеотидов позволяет создать простейший случай комбинации двух методов сборки и подходит для быстрой оптимизации условий перед масштабированием процесса до полной длины гена.

### Результаты и выводы

С помощью полимеразы, имеющей 5'-3'-эксонуклеазную активность (DreamTaq), нельзя реализовать комбинацию двух способов сборки в одной

пробирке, но можно осуществить её последовательно за четыре раунда ПЦР с рекомендованным производителем фермента циклом.

Возможна реализация комбинации двух способов сборки в одной пробирке только в случае двух ДНК-полимераз (Q5 без энхансера и Flash ДНК полимеразы), что подтверждается результатами эксперимента по удлинению инициального фрагмента тремя парами ТВЮ олигонуклеотидов с помощью пяти разных полимераз. Принципиальное отличие этих 2 полимераз от остальных — отсутствие 5'-3'-экзонуклеазной активности.

«One pot» синтез сложно реализовать в системе с большим количеством олигонуклеотидов. Подобный вероятностный процесс необходимо суметь направить в сторону целевого продукта с помощью специфического ПЦР цикла, который состоит из четырех этапов: инициальная денатурация, ТВС сборки, ТВЮ сборки и амплификация.

Эксперименты по оптимизации концентраций олигонуклеотидов для сборки полного гена и его фрагмента (3 пары ТВЮ олигонуклеотидов) с помощью двух полимераз позволили определить, что минимальная концентрация ТВС праймеров составляет 5 нМ, макс — 300 нМ. Различие между концентрацией ТВС и первой парой ТВЮ олигонуклеотидов должно составлять минимум 1,4 раза, оптимально — 2 раза. Схемы концентраций показавшие лучшие результаты — 10-20-40-60-80-100-300 нМ для полного гена (1544 п.о.), 5-10-14-250 нМ для его фрагмента (1296 п.о.).

Таким образом, для получения синтона, длиной более 1500 п.о. обогащенного целевым геном, с помощью предлагаемого подхода нужно обеспечить определенные условия: использовать ДНК-полимеразу без 5'-3'-экзонуклеазной активности; сложный ПЦР-цикл, направляющий процесс в сторону целевого продукта; а также оптимальный градиент концентрации олигонуклеотидов.

## Литература

1. Gao X, Yo P, Keith A, Ragan TJ, Harris TK (2003) Thermodynamically balanced inside-out (TBIO) PCR-based gene synthesis: a novel method of primer design for high-fidelity assembly of longer gene sequences. *Nucleic Acids Res* 31(22):e143.
2. Gilar M, Bouvier ESP (2000) Purification of crude DNA oligonucleotides by solid-phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 890(1):167–177.
3. Hoover D. M. and Lubkowski, J. (2002) DNAWorks: an automated method for designing oligonucleotides for PCR-based gene synthesis. *Nucleic Acids Res.*, 30, e43.



**ИССЛЕДОВАНИЕ ПОСМЕРТНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ  
В МЕТАБОЛОМНОМ СОСТАВЕ  
БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ\***

**STUDY OF POST-MORTEM CHANGES IN THE METABOLOMIC  
COMPOSITION OF BIOLOGICAL FLUIDS**

Л. В. Яньшолё, Е. А. Зеленцова, А. Д. Мельников

*ФГБУН Институт «Международный томографический центр»  
СО РАН, Новосибирск, Россия  
Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*

L. V. Yanshole, E. A. Zelentsova, A. D. Melnikov

*ITC SB RAS, NSU, Novosibirsk, Russia*

E-mail: lucy@tomo.nsc.ru

**Аннотация**

Посмертные изменения метаболомного состава исследованы для биологических жидкостей — плазмы крови, водянистой влаги и стекловидного тела. Показано, что в водянистой влаге и стекловидном теле наблюдается более медленный рост некоторых метаболитов с меньшим разбросом по сравнению с плазмой крови. Для этих жидкостей определены биомаркеры давности наступления смерти — гипоксантин, холин, креатин, бетаин, глутамат и глицин.

**Abstract**

Post-mortem changes in metabolomic composition are investigated for biological fluids — serum, aqueous and vitreous humor. It is shown that in the aqueous and vitreous humor a slower growth of some metabolites with a smaller spread compared to serum is observed. For these fluids the potential biomarkers of time of death are identified — hypoxanthine, choline, creatine, betaine, glutamate and glycine.

Метаболомные исследования в настоящее время являются перспективным направлением развития молекулярных методов в области биохимии и системной биологии. Стоит отметить, что метаболомное профилирова-

---

© Л. В. Яньшолё, Е. А. Зеленцова, А. Д. Мельников, 2019

\* Исследования выполнены при поддержке грантов РФФИ №18-34-00137, 19-34-80008.

ние биологических тканей и жидкостей человека является одной из основ развития персонализированной медицины и ранней диагностики. Биохимическое состояние организма в конкретный момент описывается определенным метаболомным профилем — совокупностью концентраций метаболитов, который претерпевает некоторые изменения в процессе нормальной жизнедеятельности. Изменение концентраций метаболитов в ткани может являться свидетельством развития патологии в организме, а также позволяет прогнозировать этапы развития патологии или эффективности производимого лечения. Ввиду развития метаболомных исследований патологий в экспериментах по сравнительному анализу патологических и здоровых тканей с целью поиска биомаркеров заболевания зачастую используют ткани от посмертных доноров в качестве контрольных, особенно в тех случаях, когда образцы здоровых тканей и жидкостей труднодоступны, к примеру, водянистая влага, стекловидное тело, хрусталик глаза. По этой причине послеоперационные образцы патологических тканей очень часто сравнивают со здоровыми тканями, полученными после смерти. Сравнение метаболомных профилей тканей от живых и мертвых доноров напрямую является некорректным, поскольку после смерти индивида происходят значительные изменения в составе низкомолекулярных соединений, в первую очередь, во всех биологических жидкостях, а потом и в тканях индивида. Таким образом, одной из задач данной работы являлось установление метаболомных профилей различных биологических жидкостей в зависимости от времени после смерти, а также построение временных зависимостей изменения концентраций различных метаболитов.

В ходе работы было проведено количественное метаболомное профилирование плазмы крови, водянистой влаги и стекловидного тела, полученных в разное время после смерти, с использованием высокочастотной ЯМР-спектроскопии на приборе AVACE III HD 700 MHz, Bruker BioSpin. Концентрации метаболитов были определены по площадям пиков и нормировались на внутренний стандарт DSS.

В результате работы были проанализированы образцы плазмы крови, стекловидного тела и водянистой влаги от 33 посмертных доноров с известными временами после смерти. Для каждой из биологических жидкостей были установлены концентрации 42 метаболитов. Было показано, что в водянистой влаге и стекловидном теле наблюдается более медленный рост концентраций некоторых метаболитов, а также разброс данных заметно меньше, чем в плазме крови. Таким образом, по полученным данным в дальнейшем можно будет делать вывод о пригодности использования некоторых посмертных биологических тканей в качестве контрольных в экспериментах по исследованию различных патологий.

**ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ПРЕСНОВОДНЫХ  
ГУБОК СЕМЕЙСТВ SPONGILLIDAE И LUBOMIRSKIIDAE,  
СОБРАННЫХ В ГЕОГРАФИЧЕСКИ УДАЛЕННЫХ РАЙОНАХ,  
С ПОМОЩЬЮ ДВУХ БАРКОДИНГ-МАРКЕРОВ\***

GENETIC DIVERSITY STUDY OF FRESHWATER SPONGES  
OF THE SPONGILLIDAE AND LUBOMIRSKIIDAE  
FAMILIES, COLLECTED IN GEOGRAPHICALLY REMOTE AREAS,  
BY USING TWO BARCODING MARKERS

А. С. Яхненко<sup>1</sup>, А. Соколова<sup>2,3</sup>,  
И. Ханаев<sup>1</sup>, В. Б. Ицкович<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ЛИН СО РАН

<sup>2</sup>Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН

<sup>3</sup>Институт Проблем Экологии и Эволюции им. А. Н. Северцова РАН

A. S. Yakhnenko<sup>1</sup>, A. Sokolova<sup>2,3</sup>,  
I. Khanaev<sup>1</sup>, V. B. Itskovich<sup>1</sup>

<sup>1</sup>LIN SB RAS

<sup>2</sup>N. K. Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Science

<sup>3</sup>A. N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Science

E-mail: yakhnenkoas@gmail.com

**Аннотация**

Пресноводные губки играют важную роль для озерных и речных экосистем. Изучение разнообразия губок базируется на классических методиках — определение размеров и формы спикул и архитектоники скелета. Современные молекулярно-генетические методы позволяют изучать внутри- и межвидовые взаимоотношения с помощью короткого участка гена COI. В данной работе мы сравниваем вариабельность двух участков гена COI, применяемых при изучении разнообразия морских губок, для пресноводных губок семейств *Spongillidae* и *Lubomirskiidae*, собранных в географически удаленных точках. По результатам работы показано, что при объе-

© А. С. Яхненко, А. Соколова, И. Ханаев, В. Б. Ицкович, 2019

\* Работа выполнена в рамках государственного задания (тема № 0345-2019-0002). Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 17-04-01598 (секвенирование ДНК) и Правительства Иркутской области в рамках научного проекта № 17-44-388103 п\_а (секвенирование ДНК).

динении двух фрагментов гена видна четкая кластеризация по видам на филогенетическом древе, что позволяет предполагать возможность использования гена COI для видовой идентификации космополитных пресноводных губок.

### Abstract

Freshwater sponges play an important role for lake and river ecosystems. Studies of the spongediversity are usually based on classical techniques — determining the size and shape of spicules and the skeleton architectonics. Modern molecular genetic methods allow to study intraspecific and interspecific relationships using a short section of the COI gene. In this paper, we compare the variability of COI gene two sections, which are used to study the diversity of marine sponges, for *Spongillidae* and *Lubomirskiidae* families of freshwater sponges collected at geographically distant points. According to the results of the work, it is shown that when two gene fragments are combined, a clear clustering by species is seen on the phylogenetic tree, which suggests the possibility of using the COI gene for species identification of cosmopolitan freshwater sponges.

Губки — фильтраторы, составляющие основную часть биомассы озерных экосистем, являются важным с экологической точки зрения, объектом исследования. Видовая идентификация губок осложнена высокой степенью их морфологической пластичности, поскольку определение основано на размерах и форме спикул и архитектонике скелета. Современные молекулярно-генетические методы позволяют определять вид и изучать генетическую структуру популяций по коротким участкам ДНК. Стандартным участком, применяющимся для этих целей, является 5' концевой фрагменты COI мтДНК. Однако низкая вариабельность митохондриального генома губок накладывает ограничение на использования данного участка генома.

Согласно данным, имеющимся по морским губкам (Erpenbeck 2006), фрагмент I3M11 гена COI показывает большую вариабельность в рангах ниже семейств, чем стандартный 5' концевой фрагмент.

В данной работе был проведен сравнительный анализ двух фрагментов гена COI для пресноводных губок, принадлежащих к 5 видам 2 семейств *Spongillidae* (*S.lacustris*, *S.arctica*, *S.alba*, *E.fluviatilis*) и *Lubomirskiidae* (*L.baicalensis*), собранных в географически удаленных точках. Каждый образец был отсековен по двум участкам гена COI для оценки вариабельности каждого фрагмента и определения пригодности гена COI для видовой идентификации пресноводных губок, а так же оценки их генетического разнообразия.

Для 5'-концевого фрагмента длина последовательностей составила 632 нуклеотида. Фрагмент находится в позициях 61–692 референсного полноразмерного гена COI из генного банка KU759841.1 *S.lacustris*.

Для фрагмента I3-M11 длина последовательностей составила 609 нуклеотидов. Фрагмент находится в позициях 707–1315 референсного гена COI.

По итогам работы выявлено четыре гаплотипа для семейства *Spongillidae*, один из которых показан впервые, что расширяет базу данных по пресноводным губкам.

Сравнение варибельности двух баркодинг фрагментов гена COI не выявило значимых отличий, что не подтверждает данные по морским губкам о более высокой варибельности участка I3M11 в сравнении со стандартным 5' концевым фрагментом.

Так же, нами выявлено четкое разделение видов семейства *Spongillidae* при использовании объединенного фрагмента гена COI. Кластеризация на филогенетическом древе и значения межвидовой варибельности, оцененные методом p-distance, позволяют говорить о возможной пригодности объединенного фрагмента гена COI для видовой идентификации *Spongillidae*. Эти данные являются значимыми, поскольку показывают возможность использования гена COI в качестве баркода для губок, ранее считавшимся непригодным для этих целей.

### Литература

1. Erpenbeck D., Hooper J. N.A., Wörheide G. CO1 phylogenies in diploblasts and the 'Barcoding of Life' are we sequencing a suboptimal partition? // Molecular Ecology Notes. 2006. № 6. P. 550–553.

**РОЛЬ БЕЛКА PCSK9 В ПАТОГЕНЕЗЕ  
АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ\***

**THE ROLE OF PCSK9 PROTEIN  
IN THE PATHOGENESIS OF HYPERTENSION**

М. П. Ячменева<sup>1</sup>, К. С. Бенимецкая<sup>1,2</sup>, Л. В. Щербакова<sup>1</sup>,  
С. В. Астраков<sup>2</sup>, Д. В. Денисова<sup>1</sup>, Ю. И. Рагино<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт терапии и профилактической  
медицины — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр  
Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской  
академии наук» (НИИТПМ — филиал ИЦиГ СО РАН), Новосибирск

<sup>2</sup> Новосибирский национальный исследовательский государственный  
Университет (НГУ), Новосибирск

M. P. Yachmeneva<sup>1</sup>, K. S. Benimetskaya<sup>1,2</sup>,  
L. V. Shcherbakova<sup>1</sup>, S. V. Astrakov<sup>2</sup>, D. V. Denisova<sup>1</sup>, Yu. I. Ragino<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Research Institute of Internal and Preventive Medicine — Branch of the  
Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of  
Science (IPM — Branch of IC&G SB RAS), Novosibirsk

<sup>2</sup> Novosibirsk State University (NSU), Novosibirsk

E-mail: astramedicina@mail.ru

**Аннотация**

Оценивали взаимосвязь наличия артериальной гипертензии с уровнем пропротеин конвертазы субтилизин/кексин 9 типа (PCSK9) в популяции молодых мужчин Новосибирска. По данным многофакторного линейного регрессионного анализа с использованием прямого пошагового метода было показано, что факт наличия артериальной гипертензии (АГ) является независимым значимым предиктором более высокого уровня белка PCSK9. При использовании обратного пошагового метода в той же модели было показано, что независимым предиктором более высокого уровня PCSK9 также является факт наличия АГ.

---

© М. П. Ячменева, К. С. Бенимецкая, Л. В. Щербакова, С. В. Астраков, Д. В. Денисова, Ю. И. Рагино, 2019

\* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00763.

**Abstract**

We estimated the relationship of hypertension with proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) level in the population group of young males in Novosibirsk.

Hypertension was an independent predictor of higher levels of PCSK9 protein according to multivariate linear regression analysis using a stepwise method. Also hypertension was an independent predictor of a higher level of PCSK9 protein according to multivariate linear regression analysis using the backward method in the same model.

В России распространенность артериальной гипертензии составляет более 40 % среди взрослого населения. Артериальная гипертензия (АГ) является одним из наиболее важных факторов риска инсультов, ишемической болезни сердца и инфарктов, сердечной недостаточности, хронической болезни почек, фибрилляции предсердий и заболеваний периферических артерий. Ее распространенность в России составляет порядка 40 %. Связанное с АГ поражение органов мишеней осуществляется посредством разнообразных патофизиологических механизмов. Эпителиальный натриевый (Na<sup>+</sup>) канал (ЭNaК) играет важную роль в абсорбции Na<sup>+</sup> через эпителиальные мембраны, контролируя обратное всасывание натрия в почечных канальцах, легких, прямой кишке, потовых железах, участвует в формировании вкусовых ощущений. Он играет ведущую роль в контроле АД, поэтому дефект регуляции самого канала приводит к изменениям артериального давления [1]. Количество ЭNaК регулируется по механизму отрицательной обратной связи в зависимости от внутриклеточной концентрации Na<sup>+</sup> посредством протеолитического расщепления с участием серина и других протеаз. Недавно был открыт ряд дополнительных протеаз, участвующих в этом процессе, включая пропротеин конвертазу субтилизин/кесин тип 9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9) PCSK9 [2].

PCSK9 является важнейшим компонентом липидного гомеостаза, поскольку непосредственно участвует в деградации рецепторов к липопротеинам низкой плотности (ЛНП), что приводит к снижению захвата ЛНП из кровотока и повышению их концентрации в крови [3]. Мутации усиления функции гена PCSK9 приводят к повышенному разрушению рецепторов к ЛНП и обуславливают третий тип аутосомно-доминантной семейной гиперхолестеринемии (СГХС). Оказалось, что участие в липидном обмене — не единственная физиологическая роль белка PCSK9: молекулы PCSK9 ингибируют ЭNaК посредством снижения экспрессии на поверхности клетки, уменьшения экзоцитоза и увеличения скорости деградации ЭNaК с помощью протеосом [4].

Снижение активности PCSK9 увеличивает почечную абсорбцию Na<sup>+</sup> и объем циркулирующей крови, повышая риск артериальной гипертен-

зии. Снижение активности PCSK9 неблагоприятно в отношении регуляции артериального давления: повышается артериальное давление и сердечно-сосудистый риск. Это обуславливает интерес к изучению взаимосвязи PCSK9 и артериального давления, особенно в свете популяционной специфичности изучаемого белка.

Целью настоящего исследования было оценить взаимосвязь наличия артериальной гипертензии с уровнем белка PCSK9 на популяционном уровне.

На базе НИИТПМ филиал ИЦиГ СО РАН в течение 2013–2017 гг. проведено одномоментное популяционное обследование случайной выборки населения в возрасте 25–45 лет одного из типичных районов г. Новосибирска. Из общего числа обследованных методом случайных чисел была сформирована выборка из 492 мужчин для проведения настоящего исследования. В программу скринингового обследования входило измерение артериального давления. Методами иммуноферментного анализа (ИФА) был определён уровень белка PCSK9, используя тест-системы «Human PCSK9 ELISA» (BioVendor, Czech Republic).

Для проведения статистического анализа использовалась программа SPSS (v.13). Проверка на нормальность распределения проводилась методом Колмогорова — Смирнова. Количественные признаки представлены как  $M \pm SD$ , где  $M$  — арифметическое среднее,  $SD$  — стандартное отклонение и как медиана ( $Me$ ) и межквартильный размах (25 %; 75 %), в силу того, что большинство изучаемых показателей имели ненормальное распределение. Сравнение в группах проводился с помощью непараметрического метода Mann — Whitney (сравнение двух независимых групп).

Средний возраст в исследуемой группе составил  $35,98 \pm 5,86$  лет (35,86 (31,17;41,08)), ИМТ  $26,65 \pm 4,95$  (26,49 (23,16;29,48)), ХС ЛНП  $3,27 \pm 0,88$  ммоль/л (3,21 (2,62;3,83)), ТГ  $1,40 \pm 0,98$  ммоль/л (1,10 (0,77;1,69)), АД  $126,13 \pm 13,4/82,91 \pm 9,93$  мм рт ст (124,50 (117,00;133,50)/82,00 (76,00;89,50)). Средний уровень белка PCSK9 составил  $325,9 \pm 141,97$  нг/мл, медиана и межквартильный размах — 300,19 (240,20; 361,80).

Сравнивали уровень PCSK9 в подгруппах, контрастных по уровню АД, различий не было выявлено ( $p = 0,110$ ).

Был проведен многофакторный линейный регрессионный анализ: в качестве зависимой переменной использовался уровень белка PCSK9 в качестве независимых переменных в модель были включены дихотомические переменные. При использовании прямого пошагового метода (Stepwise) было показано, что факт наличия артериальной гипертензии (АД >140/90 мм рт. ст.) является независимым значимым предиктором более высокого уровня белка PCSK9 ( $B$  (коэффициент регрессии) = 32,593; SE (стандартная ошибка коэффициента) = 14,624;  $p = 0,026$ ). При использовании обратного пошаго-



вого метода (Backward) в той же модели было показано, что независимым предиктором более высокого уровня PCSK9 также являются факт наличия артериальной гипертензии ( $B = 30,457$ ;  $SE = 14,649$ ;  $p = 0,038$ ).

Хотя и не было выявлено различий в уровне белка PCSK9 в паре выборок, контрастных по уровню АД, и корреляции между уровнем АД и PCSK9, в настоящем исследовании по данным множественного регрессионного анализа была убедительно показана ассоциация уровня белка PCSK9 с наличием АГ, то есть факт наличия АГ по полученным данным является независимым значимым предиктором более высокого уровня белка PCSK9.

Стоит отметить, что данные популяционных исследований в мировой литературе в отношении связи белка PCSK9 и АД противоречивы, хотя многие крупные исследования поддерживают наши результаты. Результаты настоящего исследования укрепляет роль PCSK9 в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний, причем не только атеросклеротического генеза.

### Литература

1. Bhalla V, Hallows KR. Mechanisms of ENaC regulation and clinical implications. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19(10):1845–54.
2. Sharotri V, Collier DM, Olson DR, Zhou R, Snyder PM. Regulation of epithelial sodium channel trafficking by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9). *J Biol Chem* 2012; 287(23):19266–74.
3. Park SW, Moon Y-A, Horton JD. Post-transcriptional regulation of low density lipoprotein receptor protein by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9a in mouse liver. *J Biol Chem.* 2004;279(48):50630–8.
4. Hachem A, Hariri E, Saoud P, Lteif C, Lteif L, Welty F. The Role of Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 (PCSK9) in Cardiovascular Homeostasis: A Non-Systematic Literature Review. *Curr Cardiol Rev.* 2017;13(4):274–282.

## УКАЗАТЕЛЬ АВТОРОВ

---

Абдуллин Т. И. ....	271	Байдамшина Д. Р. ....	22
Абеуов Х. Б. ....	349, 353, 364	Байков И. К. ....	319, 360
Абрамова М. Н. ....	3	Баймухаметова А. М. ....	323
Авдеев А. А. ....	415	Баканова М. Л. ....	423
Азарнова Т. О. ....	65, 591	Бакулина А. Ю. ....	603
Акимова А. С. ....	418	Бальбина Н. Ю. ....	427
Акылбаева К. К. ....	68	Баранова Д. В. ....	383
Александров А. Г. ....	314	Баранова О. А. ....	228
Аликин Ю. С. ....	70	Баранова С. В. ....	118
Ананьина Л. Н. ....	147	Барбараш О. Л. ....	466, 518
Анисимова Е. А. ....	6, 62	Барейко А. А. ....	26
Анка М. ....	642	Бармак С. М. ....	30
Антонец Д. В. ....	387, 629	Батлук У. И. ....	33
Антонов Е. В. ....	431, 598	Батурина Г. С. ....	289
Антонова Л. В. ....	166	Бауэр Т. В. ....	326
Апалёв П. В. ....	70	Башмакова Е. Е. ....	35
Апалько С. В. ....	437	Баяндин Р. Б. ....	339
Арзуманян Г. М. ....	601	Беленькая С. В. ....	38, 232
Асанжанова Н. Н. ....	374	Белокопытова И. И. ....	431
Асанов М. А. ....	423	Белокопытова П. С. ....	510
Аскретков А. Д. ....	9	Белявцев А. Н. ....	329
Астраков С. В. ....	678	Бенимецкая К. С. ....	678
Афонюшкин В. Н. ....	434	Бердыгалиев А. Б. ....	30
Ахмедова Г. Р. ....	271	Березиков Е. В. ....	448
Бабич В. О. ....	553	Бибик О. И. ....	18
Бабич П. И. ....	251	Бирулина Ю. Г. ....	255
Бабиченко Н. П. ....	14	Биченкова Е. В. ....	657
Бабкин И. В. ....	333	Блохин Д. С. ....	271
Бабушкина Н. П. ....	466	Бобикова А. С. ....	434
Бабышкина Н. Н. ....	478	Бобрикова Е. Н. ....	42
Бажан Н. М. ....	427	Богданов А. О. ....	258
Бажан С. И. ....	629	Боковая О. В. ....	319, 333
Базалий О. А. ....	18	Болдырева Д. С. ....	437

Бондарь А. А. ....	38, 232	Гильмутдинов Р. А. ....	526
Бондарь Л. Н. ....	444	Гисич А. В. ....	267
Бондина Е. В. ....	46	Гладышева А. В. ....	335, 339
Бормотов Н. И. ....	383	Глазова Н. В. ....	184
Боярских У. А. ....	437	Глебова Т. И. ....	323
Браун Л. А. ....	441, 546	Голикова П. И. ....	153
Буданова А. А. ....	50	Голубенко М. В. ....	466
Булаев А. Г. ....	54	Голунова М. В. ....	65
Бунева В. Н. ....	486	Гольтяев М. В. ....	452
Бурашев Е. Д. ....	68	Гончарик Р. Г. ....	190
Бурков Н. Н. ....	466, 518	Гончарова Н. ....	343
Быкова К. А. ....	58	Гончарова Н. С. ....	35
Бычков В. А. ....	444, 568	Гопаненко А. В. ....	530
Вавилова В. Ю. ....	448	Горбунов А. А. ....	147
Вагнер В. Д. ....	537	Горбунов Н. П. ....	587
Валеев Э. С. ....	510	Горячев А. А. ....	243
Валентович Л. Н. ....	26	Гражданцева А. А. ....	394, 498
Валетдинова К. Р. ....	128	Граскова И. А. ....	124, 132
Валиахметов Н. Р. ....	466	Григорьева Е. С. ....	660
Варламова Е. Г. ....	452	Грищенко И. В. ....	145, 464
Варпетян Э. Э. ....	441	Гудымо А. С. ....	343
Василисков В. А. ....	559	Гумерова Д. Р. ....	271
Васильева Ю. А. ....	142	Гурков А. Н. ....	121
Вахитов Т. Я. ....	664	Гусакова С. В. ....	255
Вахрушева И. В. ....	262	Гусев В. А. ....	274
Верещагина К. П. ....	121	Давыдкин В. Ю. ....	89
Власенко В. А. ....	379	Давыдкин И. Ю. ....	89
Власов В. В. ....	557, 657	Дампилова Т. Д. ....	466
Воевода М. И. ....	507, 510	Даниленко Д. М. ....	377
Войтова А. А. ....	475	Данилова А. Л. ....	153
Волкова А. С. ....	62	Данько К. В. ....	471, 572
Волкова Н. В. ....	411, 456	Дарнотук Е. С. ....	228
Волобуева А. С. ....	357	Демьянова Е. В. ....	562, 664
Воробьева М. Ю. ....	601	Денисова Д. В. ....	678
Воронина О. А. ....	264	Джекебеков К. К. ....	68
Воронкова М. С. ....	77	Дмитриева М. Д. ....	475
Вударски Я. ....	448	Дмитриенко Е. В. ....	42, 196
Высочина Г. И. ....	403, 407	Долгушин С. А. ....	46
Вязов Е. В. ....	190	Домондон М. ....	614
Вяткин Ю. В. ....	387	Дроганова Т. С. ....	642
Галивонджян А. Х. ....	637	Дрокин Р. А. ....	357
Гаптулбарова К. А. ....	460, 574	Дронова Т. А. ....	478
Гарипов М. Р. ....	150	Дубровина И. А. ....	58
Гилева И. П. ....	240	Дударева Л. В. ....	627

Дудко С. Г. ....	629	Зыбкина А. В. ....	383, 411, 578
Дурыманов А. Г. ....	343	Ибрагимова Ж. Б. ....	379
Дымова М. А. ....	475	Ибрагимова М. К. ....	345, 460, 574
Дьякова А. В. ....	124, 132	Иванов И. С. ....	86
Евтифеева М. С. ....	18	Иванова А. А. ....	507
Егорова И. Ю. ....	494	Иванова А. В. ....	411
Егорова И. Ю. ....	623	Иванощук Д. Е. ....	510
Егорова К. В. ....	481	Игитханян А. Э. ....	93, 515
Елисафенко Е. А. ....	80	Илатовская Д. В. ....	614
Ельчанинов В. В. ....	38, 232	Ильичев А. А. ....	232, 603
Емельянова Л. А. ....	360	Ильичева Т. Н. ....	343
Еремин Д. В. ....	484	Ильчибаева Т. В. ....	484, 598
Ермаков Е. А. ....	486	Иматдинов И. Р. ....	145, 173
Ермолаев В. В. ....	70	Инкарбеков Д. А. ....	374
Ермолаева С. А. ....	623	Исаева А. А. ....	411
Ермошин А. А. ....	653	Иткина Д. Л. ....	98
Еропкин М. Ю. ....	377	Ицкович В. Б. ....	675
Ерш А. В. ....	194	Ишкаева Р. А. ....	271
Ефремкина Е. П. ....	255	Ищенко А. М. ....	587, 664
Жахов А. В. ....	664	Кабанов А. С. ....	326
Железниченко Т. В. ....	77	Кабиллов М. Р. ....	530
Живень М. К. ....	80	Казанцев А. Н. ....	466, 518
Жолдыбаева Е. В. ....	30	Казаринов К. Д. ....	228
Жукова М. В. ....	526	Казачинская Е. И. ....	411
Жунушов А. Т. ....	68	Калинина Т. С. ....	481
Журавина М. А. ....	489	Қалкожаева М. Қ. ....	323
Журавлев Е. С. ....	557	Калюжная Л. И. ....	646
Журилов П. А. ....	494, 623	Камалов М. И. ....	286, 300
Завьялов Г. А. ....	546	Камешков О. Э. ....	298
Завьялов Е. Л. ....	175	Каминский В. В. ....	89
Зайковская А. В. ....	411	Каплина О. Н. ....	629
Зайнутдинов С. С. ....	498	Карапетян Д. Д. ....	93, 515
Закарья К. Д. ....	374	Карпенко Л. И. ....	603, 607, 629
Закиян С. М. ....	80, 181, 415	Карпова Г. Г. ....	530
Запарина О. Г. ....	501	Карташов М. Ю. ....	100, 418
Зарубаев В. В. ....	357	Касенов М. М. ....	68, 374
Зарубин А. А. ....	466	Каткова Л. Е. ....	289
Зарубин В. Н. ....	251	Каукарбаева М. Ж. ....	349, 353, 364
Захаренко М. А. ....	83	Кафтырева Л. А. ....	437
Захарова И. С. ....	80, 181	Каюмов А. Р. ....	22, 150
Зеленцова Е. А. ....	111, 319, 673	Кебекбаева А. Е. ....	518
Зеликман М. В. ....	283	Кедик С. А. ....	86
Зенкова М. А. ....	553, 657	Кечин А. А. ....	437
Зиновкин Д. А. ....	505	Киселева И. С. ....	653

Кищенко Д. В. ....	3	Кулигина Е. В. ....	475, 611
Кливлеева Н. Г. ....	323	Куликов Е. А. ....	190
Коваль А. Д. ....	232	Куликов Ф. В. ....	441, 546
Коваль О. А. ....	475	Куликова Е. А. ....	431
Ковель Е. С. ....	276	Куликова И. С. ....	108
Ковнер А. В. ....	501	Кумейко В. В. ....	3
Коврижкина В. ....	343	Куприянов В. В. ....	329
Кожевникова О. С. ....	522	Купцов В. Н. ....	26
Козин С. В. ....	279	Курманбекова Ж. К. ....	349, 353
Козлов Е. Н. ....	526	Курятников К. Н. ....	537
Козлова И. В. ....	360	Кутихин А. Г. ....	619
Козлова Ю. Н. ....	333	Кыдырбаев Ж. ....	374
Козырева В. С. ....	262	Ланцева К. С. ....	357
Кокорина Е. В. ....	345	Ланшаков Д. А. ....	225, 549
Колобова А. В. ....	530	Лапа С. А. ....	559
Коломиец Э. И. ....	26	Ларионова И. В. ....	444
Колосова И. В. ....	240	Лахтин В. М. ....	89
Колосова Н. П. ....	343	Лебедев Л. Р. ....	70, 175
Кондаурова Е. М. ....	431, 598	Лейб Е. А. ....	18
Кондратьева Л. Г. ....	532	Лемза А. Е. ....	33
Конев В. П. ....	537	Лискова Е. А. ....	494, 623
Коновалова Н. И. ....	377	Литвиненко А. Л. ....	293
Кононова П. А. ....	283	Литвяков Н. В. ....	568
Коптев В. Ю. ....	434	Лобанова И. Е. ....	403, 407
Королева Ю. А. ....	466	Логашенко Е. Б. ....	553
Коршунов А. В. ....	96	Локтев В. Б. ....	367
Коршунов А. С. ....	537	Ломзов А. А. ....	274
Корягина А. О. ....	98, 179	Лопатникова Ю. А. ....	105
Кочнева Г. В. ....	394, 498, 578	Лотош Н. Ю. ....	108
Кошеметов Ж. К. ....	349, 353, 364	Луговая И. С. ....	591
Кошкин С. А. ....	286	Лукманова Г. В. ....	323
Кравцов А. А. ....	279	Львова М. Н. ....	114
Красицкая В. В. ....	35	Мазурков О. Ю. ....	407
Кривкина Е. О. ....	166	Мазуркова Н. А. ....	379, 403, 407
Кривошеина Е. И. ....	100, 418, 542	Макаревич Е. В. ....	379
Крутикова Е. В. ....	390	Макарова Е. Н. ....	427
Кудрявцев И. В. ....	471	Макарова М. А. ....	437
Кудряшева Н. С. ....	276	Максимов В. Н. ....	507
Кузнецов А. И. ....	418, 542	Максимова Н. Р. ....	153
Кузнецова В. Е. ....	559	Малахова А. А. ....	415
Кузнецова М. С. ....	105	Мальгин А. А. ....	530
Кузовлева М. А. ....	289	Малютина С. К. ....	507
Кузьмина Д. О. ....	572	Маматкулов К. З. ....	601
Кукушкина Т. А. ....	407	Марков А. В. ....	466, 518, 553, 660

Марченко В. Ю. ....	187, 295, 343	Овечкина В. С. ....	128
Матвеев А. Л. ....	360	Онгарбаева Н. С. ....	323
Матвеева А. М. ....	557	Онхонова Г. С. ....	187, 295, 343
Маткеримова К. Г. ....	364	Орищенко К. Е. ....	80
Межевалова А. С. ....	367	Орлов С. В. ....	471, 572
Мелихова А. В. ....	89	Орлова Н. В. ....	9
Мельников А. Д. ....	111, 673	Осинцева Н. Д. ....	298
Менденхалл И. Х. ....	30	Осипов Г. В. ....	308
Меньшиков Н. О. ....	169, 646	Османова Ф. Р. ....	98
Микрокова Т. П. ....	100, 367, 418	Остренко К. С. ....	591
Микшис Н. И. ....	50	Павельев Р. С. ....	150
Минькова Г. А. ....	114	Павлова А. Г. ....	132
Миронова Н. Л. ....	657	Павлюк А. М. ....	300
Мифтахов Р. А. ....	559	Панкратов Ю. В. ....	258
Михайлова С. В. ....	510	Пармон В. Н. ....	158
Михеева Е. В. ....	118	Пархомчук Е. В. ....	46
Мишинов С. В. ....	475	Паталяк С. В. ....	478
Могиленко Д. А. ....	471	Патутина О. А. ....	657
Монахова В. С. ....	562	Пахарукова М. Ю. ....	114
Мордвинов В. А. ....	114	Певзнер А. М. ....	345, 460, 574
Морозов А. И. ....	371	Перельмутер В. М. ....	444
Морозова В. В. ....	319, 333, 611	Пермякова Н. В. ....	203
Москаленский А. ....	302	Перфильева А. И. ....	124, 132
Мунгалов Р. В. ....	565	Петрова П. А. ....	377
Мутин А. Д. ....	121	Петровская О. Д. ....	136
Мухина И. В. ....	308	Пигарева Н. В. ....	562
Назаренко М. С. ....	466, 518, 660	Писарев Э. ....	302
Назарова А. А. ....	121	Плотникова Е. Г. ....	236
Назимова Е. В. ....	83	Позднякова О. Г. ....	139
Найденский М. С. ....	65, 591	Полежаева О. А. ....	578
Науменко В. С. ....	431, 598	Полина Ю. А. ....	614
Небова Ю. А. ....	444, 568	Полтавченко А. Г. ....	194
Невинский Г. А. ....	486, 585, 617	Поляков Н. Э. ....	283
Некрасов В. М. ....	293	Пономарев Д. В. ....	114, 582
Некрасова Е. В. ....	471, 572	Попадюк И. И. ....	553
Немудрая А. А. ....	489	Потуремский Д. С. ....	26
Низамов И. С. ....	271	Прокудина Д. В. ....	258
Николаева Л. И. ....	329	Протопопова Е. В. ....	100, 335, 367
Новикова Н. Н. ....	247	Проценко М. А. ....	210, 379, 407
Новоселов В. П. ....	507	Псарева Е. К. ....	494, 623
Ножкина О. А. ....	124, 132	Пудова Д. С. ....	142
Норин А. М. ....	86	Пузырев В. П. ....	466, 518
Нурпейсова А. С. ....	374	Пурвиньш Л. В. ....	585, 617
Нуштаева А. А. ....	475, 489, 611	Пурвиньш Я. В. ....	145, 464

Пьянков О. В. ....	411	Сенокосова Е. А. ....	166
Пьянков С. А. ....	100, 326, 394	Сербина А. В. ....	258
Пьянкова А. А. ....	147	Сергеев А. А. ....	326
Рагино Ю. И. ....	678	Сергеева Я. Э. ....	14
Разумов И. А. ....	175	Сиволобова Г. Ф. ....	394, 498
Рак А. Я. ....	587	Сигарева Н. А. ....	434
Резвых А. М. ....	591	Сидоренко А. В. ....	26
Рифель Н. А. ....	595	Сильников В. Н. ....	166
Родный А. Я. ....	431, 598	Симанов А. Г. ....	169
Романенко С. А. ....	114	Симбирцев А. С. ....	562
Рудиковская Е. Г. ....	627	Синебрюхова А. М. ....	228
Рудных С. К. ....	601	Синицкий М. Ю. ....	619
Рудометов А. П. ....	232, 603, 607	Синицын С. А. ....	305
Рудометова Н. Б. ....	603, 607	Синявский Ю. А. ....	30, 161
Русинов В. Л. ....	357	Скрипкин С. С. ....	173
Рыжиков А. Б. ....	187, 295, 343	Слепцов А. А. ....	466, 518
Рябчикова Е. И. ....	611	Смирнова А. М. ....	80
Сабирова А. Э. ....	150	Соколов А. В. ....	587
Савватеев К. С. ....	357	Соколова А. С. ....	383, 675
Саввина М. Т. ....	153	Соколова Е. В. ....	623
Савельева А. В. ....	489, 611	Сокольников Ю. Н. ....	3
Савельева О. Е. ....	660	Соленов Е. И. ....	289
Савиновская Ю. И. ....	611	Соловьёва О. И. ....	175
Садикалиева С. О. ....	68	Соловьёва Э. Ю. ....	228
Сактаганов Н. Т. ....	323	Солодкая А. В. ....	179
Салахиева Д. В. ....	271, 286, 300	Сорокина К. Н. ....	158
Салахутдинов Н. Ф. ....	383, 553	Ставицкая З. О. ....	627
Салль Т. С. ....	664	Старостина Е. В. ....	629
Саломатина О. В. ....	553	Старчевская М. Е. ....	387
Самойлова Ю. В. ....	158	Стенкова А. М. ....	3
Санькова Н. Н. ....	46	Степанов Г. А. ....	33, 489, 557, 611
Сарсембаев Х. С. ....	161	Степанова Д. С. ....	441, 546
Сарсенова Е. А. ....	614	Степанова Е. А. ....	390
Сачкова А. С. ....	276	Строкотов Д. И. ....	267, 311
Светлякова А. В. ....	255	Стронин О. В. ....	360
Святченко В. А. ....	339	Ступникова А. С. ....	181
Святченко С. В. ....	187, 295, 343	Стучаева А. А. ....	184
Северинов К. В. ....	637	Субботина К. В. ....	634
Седых С. Е. ....	585, 617	Султанкулова К. Т. ....	68
Селищева А. А. ....	108, 228	Султанова Р. Ф. ....	614
Селютина О. Ю. ....	283	Суслопаров И. М. ....	343
Семейкина В. С. ....	46	Сутормин Д. А. ....	637
Семенов Д. В. ....	489, 557, 611	Сухарева Е. В. ....	481
Сенников С. В. ....	105	Сухов Б. Г. ....	124, 132

Сухомясова А. Л. ....	153	Фурсова А. Ж. ....	510
Тайлакова Э. Т. ....	68	Хабалова Т. С. ....	200
Таранов О. С. ....	173, 326, 367, 394, 411	Хабарова А. А. ....	565
Татаркова Д. С. ....	546, 441	Хайруллин Б. М. ....	374
Телегина Д. В. ....	522	Ханаев И. ....	675
Телегина Ю. В. ....	70	Харьковская Е. Е. ....	308
Теплякова Т. В. ....	175	Хлусевич Я. А. ....	360
Терновой В. А. ....	100, 335, 367, 418	Хозеева С. А. ....	203
Тикунова Н. В. ....	319, 333, 360	Холявка М. Г. ....	22
Тимофеев М. А. ....	121	Хохлова И. Ю. ....	206
Тимофеев Э. Н. ....	559	Хоцкин Н. В. ....	484
Титок М. А. ....	26	Царькова М. С. ....	264
Тишина Е. А. ....	642	Цепокина А. В. ....	619
Ткачёва А. В. ....	394	Цыбко А. С. ....	484
Товпеко Д. В. ....	169, 646	Цыганов М. А. ....	210
Тойменцева А. А. ....	179	Цыганов М. М. ....	345, 460, 574
Тойменцева А. А. ....	98	Чайка А. В. ....	214
Торжкова П. Ю. ....	187, 295	Чеботарев С. В. ....	646
Торопов В. А. ....	650	Чеканов А. В. ....	228
Трегубчак Т. В. ....	326, 343	Чердынцева Н. В. ....	478
Тризна Е. Ю. ....	22	Черемискина А. А. ....	218
Трофимов А. В. ....	587	Чернов И. П. ....	532
Трофимов Б. А. ....	132	Чернышев А. В. ....	311
Тугбаева А. С. ....	653	Чечушков А. В. ....	319
Тупикин А. Е. ....	530	Чиглинцева Д. А. ....	657
Тупота Н. Л. ....	418	Чикаев А. Н. ....	603
Туранова В. А. ....	190	Чопорова Ю. Ю. ....	298
Тучков И. В. ....	50	Чуб Е. В. ....	542
Уракова Е. А. ....	271	Чубик М. В. ....	206
Усанов С. А. ....	669	Чудинов А. В. ....	559
Усольцева П. С. ....	398	Шабета М. С. ....	221
Устьянцев К. В. ....	448	Шабурова Е. В. ....	225
Ушакова Т. А. ....	319	Шавва В. С. ....	471
Ушкаленко Н. Д. ....	194	Шалаев П. В. ....	46
Федин А. И. ....	228	Шарипова М. Р. ....	98, 142, 179
Фенькова О. В. ....	510	Шарыш Д. В. ....	466, 518, 660
Филатов П. В. ....	194	Шастина Н. С. ....	228, 329
Филипенко М. Л. ....	437	Шаталов Д. О. ....	86
Филиппова Е. И. ....	379, 403	Шахтштейндер Е. В. ....	510
Филиппова Е. И. ....	407	Швалов А. Н. ....	343, 367
Филиппова Ю. А. ....	489, 557	Шевченко А. И. ....	80, 181, 595
Фишман В. С. ....	510, 565	Шелепова Е. А. ....	283
Фоменко В. К. ....	196	Шерин П. С. ....	305
Фофанов М. В. ....	319	Шершов В. Е. ....	559



---

Шидловский Ю. В. ....	526	Яковлева Т. В. ....	427
Шилов А. Г. ....	114	Якубицкий С. Н. ....	240, 326
Шимановский Н. Л. ....	441, 546	Янишевская Е. С. ....	243
Шипелова А. В. ....	228	Янкелевич И. А. ....	614
Шишкина Л. Н. ....	383, 403, 407	Янцевич А. В. ....	669
Шишкова Д. К. ....	619	Янченко Т. А. ....	247
Щелконогов В. А. ....	228	Яньшолё Л. В. ....	111, 673
Щелкунов С. Н. ....	240, 326	Яровая О. И. ....	383
Щербак С. Г. ....	437	Яруллина Д. Р. ....	6, 62
Щербаков Д. Н. ....	38, 232, 383, 411, 578, 603, 607	Ястребова Е. С. ....	311, 267
Щербакова Е. С. ....	664	Ястребова О. В. ....	236
Щербакова Л. В. ....	678	Яхненко А. С. ....	675
Щербакова Н. С. ....	411, 607	Ячменева М. П. ....	678
Щур В. В. ....	669	Wong P.-F. ....	390
Юдин Д. С. ....	236		

## ОГЛАВЛЕНИЕ

---

### РАЗДЕЛ 1

#### БИОТЕХНОЛОГИЯ

- Абрамова М. Н., Кищенко Д. В., Кумейко В. В., Стенкова А. М., Сокольникова Ю. Н.** ПОИСК И ХАРАКТЕРИСТИКА МОРСКИХ БАКТЕРИЙ-ПРОДУЦЕНТОВ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ И ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ В БИОТЕХНОЛОГИИ..... 3
- Анисимова Е. А., Яруллина Д. Р.** ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ ЛАКТОБАЦИЛЛ ..... 6
- Аскретков А. Д., Орлова Н. В.** СРАВНЕНИЕ ТРЕХ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИЙ РЕКОМБИНАНТНЫХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ В КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ..... 9
- Бабиченко Н. П., Сергеева Я. Э.** ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭКСТРАКЦИИ С-ФИКОЦИАНИНА ИЗ КЛЕТОК ЦИАНОБАКТЕРИИ *ARTHROSPIRA PLATENSIS* B-12619\* ..... 14
- Базалий О. А., Евтифеева М. С., Лейб Е. А., Бибик О. И.** ОПИСТОРХОЗ — ПАРАЗИТОЗ, СПОСОБНЫЙ ВЫЗЫВАТЬ РАЗВИТИЕ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ..... 18
- Байдамшина Д. Р., Трizza Е. Ю., Холявка М. Г., Каюмов А. Р.** СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ПОТЕНЦИАЛА РАСТВОРИМЫХ И ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ ДЛЯ РАЗРУШЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БИОПЛЕНОК ..... 22

---

<b>Барейко А. А., Потуремский Д. С., Купцов В. Н., Валентович Л. Н., Сидоренко А. В., Титок М. А., Коломиец Э. И.</b> МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ГРИБНЫХ И БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ОВОЩНЫХ КУЛЬТУР .....	26
<b>Бармак С. М., Синявский Ю. А., Бердыгалиев А. Б., Менденхалл И. Х., Жолдыбаева Е. В.</b> ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЦР ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ SALMONELLA ENTERICA В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ .....	30
<b>Баглюк У. И., Лемза А. Е., Степанов Г. А.</b> СРАВНЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ НЕК 293Т И НЕК 293FT В КАЧЕСТВЕ КЛЕТОК-УПАКОВЩИКОВ ДЛЯ НАРАБОТКИ ЛЕНТИВИРУСНЫХ КОНСТРУКЦИЙ .....	33
<b>Башмакова Е. Е., Гончарова Н. С., Красицкая В. В.</b> ПОИСК АПТАМЕРОВ К РАЗНЫМ ЭПИТОПАМ ТРОПОНИНА I .....	35
<b>Беленькая С. В., Бондарь А. А., Ельчанинов В. В., Щербаков Д. Н.</b> ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ХИМОЗИНА МАРАЛА (SERVUS ELAPHUS SIBIRICUS) И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЕГО МОЛОКОСВЕРТЫВАЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ.....	38
<b>Бобрикова Е. Н., Дмитриенко Е. В.</b> ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> И ИХ КОМПОЗИТОВ КАК КОМПОНЕНТОВ СИСТЕМ ДОСТАВКИ.....	42
<b>Бондина Е. В., Шалаев П. В., Долгушин С. А., Санькова Н. Н., Семейкина В. С., Пархомчук Е.В.</b> РАЗРАБОТКА ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ МИКРОСФЕР ДЛЯ МУЛЬТИПЛЕКСНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ .....	46
<b>Буданова А. А., Микшис Н. И., Тучков И. В.</b> КОНСТРУИРОВАНИЕ И АНАЛИЗ ПРОДУЦЕНТА РАСТВОРИМОЙ ФОРМЫ КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА ЧУМНОГО МИКРОБА.....	50
<b>Булаев А. Г.</b> ЭФФЕКТ ИСТОЧНИКА УГЛЕРОДА НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОЦЕССА БИООКИСЛЕНИЯ СУЛЬФИДНОГО КОНЦЕНТРАТА.....	54

---

<b>Быкова К. А., Дубровина И. А. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ ДИГОКСИНА ПО ОТНОШЕНИЮ К ОПУХОЛЕВЫМ И НОРМАЛЬНЫМ КЛЕТКАМ.....</b>	<b>58</b>
<b>Волкова А. С., Анисимова Е. А., Яруллина Д. Р. ИДЕНТИФИКАЦИЯ НОВЫХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ШТАММОВ ЛАКТОБАЦИЛЛ .....</b>	<b>62</b>
<b>Голунова М. В., Азарнова Т. О., Найденский М. С. СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ СТИМУЛИРУЮЩЕГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ЭМБРИОГЕНЕЗ БРОЙЛЕРОВ ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ И ЕЕ АММОНИЕВОЙ СОЛИ .....</b>	<b>65</b>
<b>Джекебеков К. К., Акылбаева К. К., Тайлакова Э. Т., Садикалиева С. О., Бурашев Е. Д., Жунушов А. Т., Касенов М. М., Султанкулова К. Т. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЦР ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ГРИППА А В МОНИТОРИНГЕ ГРИППА СРЕДИ ДИКИХ ПТИЦ; СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ КОМПОЗИЦИОННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ РИБОНУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ .....</b>	<b>68</b>
<b>Ермолаев В. В., Апалёв П. В., Телегина Ю. В., Аликин Ю. С., Лебедев Л. Р. СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ КОМПОЗИЦИОННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ РИБОНУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ .....</b>	<b>70</b>
<b>Железниченко Т. В., Воронкова М. С. КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ ХВОЙНЫХ В КУЛЬТУРЕ <i>IN VITRO</i> .....</b>	<b>77</b>
<b>Живень М. К., Захарова И. С., Смирнова А. М., Орищенко К. Е., Шевченко А. И., Елисафенко Е. А., Закиян С. М. МОДУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА <i>HIF-2α</i> В ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ <i>CRISPR/CAS9</i> .....</b>	<b>80</b>
<b>Захаренко М. А., Назимова Е. В. ПОДБОР ЗАКВАСОЧНЫХ КУЛЬТУР ДЛЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО КИСЛОМОЛОЧНОГО ПРОДУКТА.....</b>	<b>83</b>
<b>Иванов И. С., Норин А. М., Шаталов Д. О., Кедик С. А. МИКРОРЕАКТОРНЫЙ СИНТЕЗ СОЛИ РАЗВЕТВЛЕННОГО ОЛИГОГЕКСАМЕТИЛЕНГУАНИДИНА И РАЗРАБОТКА ОФТАЛЬМОЛОГИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА НА ЕЕ ОСНОВЕ.....</b>	<b>86</b>

---

<b>Каминский В. В., Давыдкин В. Ю., Давыдкин И. Ю., Мелихова А. В., Лахтин В. М. ПОВЫШЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ КЛЕТОК БИФИДОБАКТЕРИЙ В БИОСУСПЕНЗИИ ПОСЛЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ.....</b>	<b>89</b>
<b>Карапетян Д. Д., Игитхянян А. Э. МИКРОСОРБЦИОННЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ НЕИНВАЗИВНОЙ ДИАГНОСТИКИ САХАРНОГО ДИАБЕТА.....</b>	<b>93</b>
<b>Коршунов А. В. МОРАЛЬНОЕ ПРИНЯТИЕ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ И АБОРТА.....</b>	<b>96</b>
<b>Корягина А. О., Османова Ф. Р., Иткина Д. Л., Тойменцева А. А., Шарипова М. Р. СОЗДАНИЕ ЭФФЕКТИВНОЙ СИСТЕМЫ ЭКСПРЕССИИ НА ОСНОВЕ ПРОМОТОРА B. SUBTILIS .....</b>	<b>98</b>
<b>Кривошеина Е. И., Карташов М. Ю., Микрюкова Т. П., Пьянков С. А., Протопопова Е. В., Терновой В. А. ПОЛУЧЕНИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА Е ВИРУСА ЖЕЛТОЙ ЛИХОРАДКИ.....</b>	<b>100</b>
<b>Кузнецова М. С., Лопатникова Ю. А., Сенников С. В. ПОЛУЧЕНИЕ ПОПУЛЯЦИЙ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ И Т-КЛЕТОК ПАМЯТИ, СПЕЦИФИЧНЫХ К ЭПИТОПАМ ОПУХОЛЬ-АССОЦИИРОВАННОГО АНТИГЕНА HER2/NEU.....</b>	<b>105</b>
<b>Куликова И. С., Лотош Н. Ю., Селищева А. А. РАЗРАБОТКА СТАБИЛЬНЫХ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ФОРМ АСТАКСАНТИНА И ЕГО ЭФИРОВ .....</b>	<b>108</b>
<b>Мельников А. Д., Яньшолле Л. В., Зеленцова Е. А. СОЗДАНИЕ МОДЕЛИ ПРЕДСКАЗАНИЯ ВРЕМЕНИ СМЕРТИ ПО МЕТАБОЛОМНОМУ СОСТАВУ КРОВИ, ВОДЯНИСТОЙ ВЛАГИ И СТЕКЛОВИДНОГО ТЕЛА .....</b>	<b>111</b>
<b>Минькова Г. А., Шилов А. Г., Пономарев Д. В., Львова М. Н., Романенко С. А., Пахарукова М. Ю., Мордвинов В. А. РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ХОЛАНГИОКАРЦИНОМЫ, АССОЦИИРОВАННОЙ С ОПИСТОРХОЗОМ .....</b>	<b>114</b>

---

<b>Михеева Е. В., Баранова С. В. КАТАЛИТИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ ГИСТОНОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА.....</b>	<b>118</b>
<b>Назарова А. А., Гурков А. Н., Мутин А. Д., Верещагина К. П., Тимофеев М. А. РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ И МЕТОДОВ ПОЛУЧЕНИЯ ПЕРВИЧНЫХ КУЛЬТУР РАЗНЫХ ТИПОВ КЛЕТОК ЭНДЕМИЧНЫХ БАЙКАЛЬСКИХ АМФИПОД <i>IN VITRO</i> .....</b>	<b>121</b>
<b>Ножкина О. А., Перфильева А. И., Дьякова А. В., Граскова И. А., Сухов Б. Г. ВЛИЯНИЕ НАНОКОМПОЗИТОВ СЕЛЕНА В ПРИРОДНЫХ МАТРИЧНЫХ ОБОЛОЧКАХ НА ВОЗБУДИТЕЛЬ КОЛЬЦЕВОЙ ГНИЛИ И ПОЧВЕННЫЕ БАКТЕРИИ .....</b>	<b>124</b>
<b>Овечкина В. С., Валетдинова К. Р. СОЗДАНИЕ ПАЦИЕНТ-СПЕЦИФИЧНЫХ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ОТ БОЛЬНЫХ СО СПИНАЛЬНОЙ МЫШЕЧНОЙ АТРОФИЕЙ III ТИПА .....</b>	<b>128</b>
<b>Перфильева А. И., Ножкина О. А., Дьякова А. В., Павлова А. Г., Граскова И. А., Сухов Б. Г., Трофимов Б. А. НАНОКОМПОЗИТ СЕЛЕНА И АРАБИНОГЛАКТАНА КАК СРЕДСТВО ОЗДОРОВЛЕНИЯ КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ .....</b>	<b>132</b>
<b>Петровская О. Д. ИЗМЕНЕНИЕ ДИНАМИЧЕСКОЙ ВЯЗКОСТИ РАСТВОРОВ ПОЛИ-3-ГИДРОКСИБУТИРАТА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ РАСТВОРОВ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ ПОЛИМЕРА .....</b>	<b>136</b>
<b>Позднякова О. Г. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРЕПАРАТА С АНТИОКСИДАНТНЫМИ СВОЙСТВАМИ НА МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ ОРГАНИЗМА .....</b>	<b>139</b>
<b>Пудова Д. С., Васильева Ю. А., Шарипова М. Р. КОНСТРУИРОВАНИЕ ГЕТЕРОЛОГИЧНОЙ СИСТЕМЫ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА ПРОТЕИНАЗЫ НА ОСНОВЕ ДРОЖЖЕЙ <i>PICNIA PASTORIS</i>.....</b>	<b>142</b>
<b>Пурвиньш Я. В., Иматдинов И. Р., Грищенко И. В. СОЗДАНИЕ ТРАНСГЕННЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ТАНДЕМНЫХ ПОВТОРОВ .....</b>	<b>145</b>

---

<b>Пьянкова А. А., Горбунов А. А., Ананьина Л. Н.</b> ИЗМЕНЕНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ПУЛА СОВМЕСТИМЫХ ВЕЩЕСТВ ШТАММА <i>CHROMOHALOBACTER SP. N1</i> В ОТВЕТ НА ОСМОТИЧЕСКИЙ И ГИПЕРТЕРМИЧЕСКИЙ СТРЕССЫ.....	147
<b>Сабилова А. Э., Павельев Р. С., Гарипов М. Р., Каюмов А. Р.</b> НОВОЕ СОЕДИНЕНИЕ НА ОСНОВЕ ПИРИДОКСИНА И ТЕРБИНАФИНА ДЛЯ ТЕРАПИИ СМЕШАННЫХ БИОПЛЕНОК <i>S. AUREUS</i> И <i>S. ALBICANS</i> .....	150
<b>Саввина М. Т., Максимова Н. Р., Сухомясова А. Л., Голикова П. И., Данилова А. Л.</b> БИОЧИП ДЛЯ БЫСТРОГО ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ МОНОГЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ В ЭТНИЧЕСКИХ ПОПУЛЯЦИЯХ .....	153
<b>Самойлова Ю. В., Сорокина К. Н., Пармон В. Н.</b> РАЗРАБОТКА ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА ТЕРМОСТАБИЛЬНОЙ ЭСТЕРАЗЫ БАКТЕРИИ <i>UREIBACILLUS THERMOSPHERAERICUS</i> ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В РЕАКЦИЯХ ЭНАНТИОСЕЛЕКТИВНОГО ГИДРОЛИЗА .....	158
<b>Сарсембаев Х. С., Синявский Ю. А.</b> ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КОБЫЛЬЕГО И ВЕРБЛЮЖЕГО МОЛОКА В СОЗДАНИИ ПРОДУКТОВ СПОРТИВНОГО ПИТАНИЯ.....	161
<b>Сенокосова Е. А., Кривкина Е. О., Антонова Л. В., Сильников В. Н.</b> ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БИОСОВМЕСТИМОСТИ БИОДЕГРАДИРУЕМОГО СОСУДИСТОГО ГРАФТА МАЛОГО ДИАМЕТРА, МОДИФИЦИРОВАННОГО RGD-ПЕПТИДАМИ.....	166
<b>Симанов А. Г., Меньшиков Н. О., Товпеко Д. В.</b> ВЛИЯНИЕ КОРОТКИХ ПЕПТИДОВ НА КЛЕТОЧНУЮ ПРОЛИФЕРАЦИЮ В КУЛЬТУРЕ ТКАНИ ПЕЧЕНИ В ПРИСУТСТВИИ ЦИКЛОФОСФАНА .....	169
<b>Скрипкин С. С., Таранов О. С., Имадинов И. Р.</b> ТРАНСГЕННАЯ КУЛЬТУРА КЛЕТОК, СТАБИЛЬНО ЭКСПРЕССИРУЮЩАЯ СТРУКТУРНЫЕ БЕЛКИ ВИРУСА ЛАССА.....	173

- 
- Соловьёва О. И., Завьялов Е. Л., Теплякова Т. В., Лебедев Л. Р., Разумов И. А.** ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ ДЕЙСТВИЕ ЭКСТРАКТА МИЦЕЛИЯ *DUDDINGTONIA FLAGRANS* НА КСЕНОГРАФТЫ ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ КАРЦИНОМЫ ШЕЙКИ МАТКИ ..... 175
- Солодкая А. В., Корягина А. О., Тойменцева А. А., Шарипова М. Р.** ПОДБОР ОПТИМАЛЬНОГО ШТАММА ПРОДУЦЕНТА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ БЕЛКОВ ..... 179
- Ступникова А. С., Захарова И. С., Шевченко А. И., Закиян С. М.** РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К КЛИНИЧЕСКОМУ ПРИМЕНЕНИЮ ВАСКУЛЯРНЫХ КЛЕТОК В РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ ..... 181
- Стучаева А. А., Глазова Н. В.** ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ПРОТЕАЗ ИЗ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ СЕВЕРНОГО ОЛЕНЯ ..... 184
- Торжкова П. Ю., Онхонова Г. С., Святченко С. В., Марченко В. Ю., Рыжиков А. Б.** БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПРОЦЕСС ОЧИСТКИ ОБРАЗЦОВ ШТАММОВ ВИРУСА ГРИППА, НАРАБОТАННЫХ НА РАЗВИВАЮЩИХСЯ КУРИНЫХ ЭМБРИОНАХ..... 187
- Туранова В. А., Куликов Е. А., Вязов Е. В., Гончарик Р. Г.** ИЗУЧЕНИЕ ОПТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ J-АГРЕГАТОВ АСТАКСАНТИНА И ЕГО ЭФИРОВ ..... 190
- Ушкаленко Н. Д., Ерш А. В., Филатов П. В., Полтавченко А. Г.** РАЗРАБОТКА БЫСТРОГО ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ТЕСТА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ОРТОПОКСВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ ..... 194
- Фоменко В. К., Дмитриенко Е. В.** ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ НАНОРАЗМЕРНОГО КАРБОНАТА КАЛЬЦИЯ ДЛЯ БИОМЕДИЦИНСКИХ ПРИМЕНЕНИЙ ..... 196
- Хабалова Т. С.** ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МИКРОВЕЗИКУЛ, ПРОДУЦИРУЕМЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТЕВЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ, НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ СПЛЕНОЦИТОВ И ПОЧЕЧНЫХ ЭПИТЕЛИОЦИТОВ *IN VITRO* .... 200
- Хозеева С. А., Пермязова Н. В.** НОКАУТ ГЕНОВ ГЛИКОЗИЛТРАНСФЕРАЗ В СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК *ARABIDOPSIS THALIANA* С ПОМОЩЬЮ RGEN ..... 203



---

<b>Хохлова И. Ю., Чубик М. В. ЭФФЕКТИВНЫЙ МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ ПИОЦИАНИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДОБАВОК ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ .....</b>	<b>206</b>
<b>Цыганов М. А., Проценко М. А. АНТИГЕЛЬМИНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЛИСАХАРИДОВ ГРИБА <i>CANTHARELLUS CIBARIUS</i> В УСЛОВИЯХ <i>IN VITRO</i> .....</b>	<b>210</b>
<b>Чайка А. В. ВЛИЯНИЕ СОЛЕЙ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ДЕСТРУКЦИИ МОДЕЛЬНОГО КСЕНОБИОТИКА <i>METHYL ORANGE</i> ШТАММОМ ГРИБА <i>TRAMETES HIRSUTA</i> TH-11 .....</b>	<b>214</b>
<b>Черемискина А. А. ПОДГОТОВКА ПОВЕРХНОСТИ НАНОПРОВОЛОЧНЫХ КРЕМНИЕВЫХ ПОЛЕВЫХ ТРАНЗИСТОРОВ КАК ЭТАП СОЗДАНИЯ БИОСЕНСОРА.....</b>	<b>218</b>
<b>Шабета М. С. ЗНАЧИМОСТЬ БРИОФИТОВ В ВОПРОСАХ БИОТЕХНОЛОГИИ .....</b>	<b>221</b>
<b>Шабурова Е. В., Ланшаков Д. А. ЭФФЕКТИВНАЯ ТРАНСДУКЦИЯ НЕЙРОНОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЛЕНТИВИРУСНЫМИ ВЕКТОРАМИ ПРИ ПОМОЩИ ОЧИСТКИ ИОНООБМЕННОЙ ХРОМОТОГРАФИЕЙ.....</b>	<b>225</b>
<b>Щелконогов В. А., Шипелова А. В., Синебрюхова А. М., Дарнотук Е. С., Шастина Н. С., Баранова О. А., Чеканов А. В., Казаринов К. Д., Селищева А. А., Соловьева Э. Ю., Федин А. И. НАНОКОНСТРУКЦИИ ЛИПОЕВОЙ КИСЛОТЫ: ПОЛУЧЕНИЕ, ХАРАКТЕРИСТИКИ И ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ НА АГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ .....</b>	<b>228</b>
<b>Щербakov Д. Н., Бондарь А. А., Рудометов А. П., Беленькая С. В., Ельчанинов В. В., Ильичев А. А., Коваль А. Д. ДИЗАЙН ГЕНА ПРОХИМОЗИНА ЛОСЯ (<i>ALCES ALCES</i>) ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЕГО РЕКОМБИНАНТНОГО АНАЛОГА В ПРОКАРИОТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ ЭКСПРЕССИИ .....</b>	<b>232</b>
<b>Юдин Д. С., Ястребова О. В., Плотникова Е. Г. ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИЙ РОДА <i>KOCURIA</i> — АКТИВНЫХ ДЕСТРУКТОРОВ ФТАЛАТОВ.....</b>	<b>236</b>

- Якубицкий С. Н., Гилева И. П., Колосова И. В., Щелкунов С. Н.**  
ИЗУЧЕНИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ  
РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА TNF- $\beta$  ВИРУСА  
НАТУРАЛЬНОЙ ОСПЫ В МОДЕЛИ СЕПТИЧЕСКОГО ШОКА ..... 240
- Янишевская Е. С., Горячев А. А.** БИОГИДРОМЕТАЛЛУРГИЧЕСКИЕ  
МЕТОДЫ ПЕРЕРАБОТКИ БЕДНЫХ СУЛЬФИДНЫХ РУД  
ОБЪЕКТОВ МУРМАНСКОЙ ОБЛАСТИ..... 243
- Янченко Т. А., Новикова Н. Н.** НОВЫЕ СХЕМЫ ПОЛУЧЕНИЯ  
БИОПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ  
БРУЦЕЛЛЕЗА ЖИВОТНЫХ..... 247

## РАЗДЕЛ 2

## БИОФИЗИКА

- Бабич П. И., Зарубин В. Н.** ПРИНЦИП ВЗАИМНОЙ  
СОПРЯЖЁННОСТИ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ  
В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ ..... 251
- Бирулина Ю. Г., Светлякова А. В., Ефремкина Е. П.,  
Гусакова С. В.** ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ  
СОКРАЩЕНИЯ СОСУДИСТЫХ ГЛАДКИХ МЫШЦ  
В МОДЕЛИ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА ..... 255
- Богданов А. О., Сербина А. В., Прокудина Д. В., Панкратов Ю. В.**  
НОРАДРЕНАЛИН АКТИВИРУЕТ НЕЙРОН-ГЛИАЛЬНЫЕ  
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ И УВЕЛИЧИВАЕТ ЭФФЕКТИВНОСТЬ  
ВОЗБУЖДАЮЩЕЙ СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЕРЕДАЧИ..... 258
- Вахрушева И. В., Козырева В. С.** БЕСКАЛИБРОВОЧНЫЙ МЕТОД  
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧИСЛА РЕЦЕПТОРОВ  
НА ПОВЕРХНОСТИ КЛЕТОК..... 262
- Воронина О. А., Царькова М. С.** ДИНАМИКА ФЕРМЕНТАТИВНОЙ  
АКТИВНОСТИ НА РАЗЛИЧНЫХ ЭТАПАХ ЛЕЧЕНИЯ  
МАСТОЦИТОМЫ У СОБАКИ ..... 264

---

<b>Гисич А. В., Ястребова Е. С., Строкотов Д. И. ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ СКАНИРУЮЩЕГО ПРОТОЧНОГО ЦИТОМЕТРА В ИЗМЕРЕНИИ ГЛИКИРОВАННОГО ГЕМОГЛОБИНА.....</b>	<b>267</b>
<b>Гумерова Д. Р., Ишкаева Р. А., Салахиева Д. В., Уракова Е. А., Блохин Д. С., Низамов И. С., Ахмедова Г. Р., Абдуллин Т. И. ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СОЛЕЙ ГЛУТАТИОНА С ДИТИОФОСФОРНЫМИ КИСЛОТАМИ.....</b>	<b>271</b>
<b>Гусев В. А., Ломзов А. А. РАЗРАБОТКА МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГРУППЫ КРОВИ С ПОМОЩЬЮ ИМПЕДАНСОМЕТРИИ.....</b>	<b>274</b>
<b>Ковель Е. С., Кудряшева Н. С., Сачкова А. С. ТОКСИЧНОСТЬ И АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ Фуллеренолов. Биолюминесцентный мониторинг.....</b>	<b>276</b>
<b>Козин С. В., Кравцов А. А. ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ НЕЙРОНОВ МОЗЖЕЧКА В СРЕДАХ С РАЗЛИЧНЫМ ИЗОТОПНЫМ 2Н/1Н СОСТАВОМ.....</b>	<b>279</b>
<b>Кононова П. А., Селютина О. Ю., Шелепова Е. А., Зеликман М. В., Поляков Н. Э. ВЛИЯНИЕ ГЛИЦИРРИЗИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА МОЛЕКУЛЯРНУЮ ПОДВИЖНОСТЬ ФОСФОЛИПИДОВ В МОДЕЛЬНЫХ МЕМБРАНАХ.....</b>	<b>283</b>
<b>Кошкин С. А., Камалов М. И., Салахиева Д. В. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ ПОЛИАСПАРАГИНОВЫХ КИСЛОТ МЕТОДОМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ.....</b>	<b>286</b>
<b>Кузовлева М. А., Каткова Л. Е., Батурина Г. С., Соленов Е. И. ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ МЕТОД ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ТРАНСПОРТА ТИОМОЧЕВИНЫ В ЖИВЫХ КЛЕТКАХ.....</b>	<b>289</b>
<b>Литвиненко А. Л., Некрасов В. М. БИОФИЗИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ ПОВЕДЕНИЯ ПОПУЛЯЦИИ ТРОМБОЦИТОВ В ПРОЦЕССЕ АКТИВАЦИИ.....</b>	<b>293</b>
<b>Онхонова Г. С., Торжкова П. Ю., Святченко С. В., Марченко В. Ю., Рыжиков А. Б. ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ РЕЦЕПТОРНОГО СВЯЗЫВАНИЯ ШТАММОВ ВИРУСА ГРИППА С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА БИОСЛОЙНОЙ ИНТЕРФЕРОМЕТРИИ.....</b>	<b>295</b>

- Осинцева Н. Д., Камешков О. Э., Чопорова Ю. Ю.** ЗАПИСЬ И ВОССТАНОВЛЕНИЕ ГОЛОГРАММ В СИСТЕМАХ НАРУШЕННОГО ПОЛНОГО ВНУТРЕННЕГО ОТРАЖЕНИЯ ТЕРАГЕРЦОВОГО ДИАПАЗОНА ..... 298
- Павлюк А. М., Камалов М. И., Салахиева Д. В.** ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПОЛИАСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТЫ И ЕЕ ИНТЕРПОЛИЕРНОГО КОМПЛЕКСА С КЛЕТКАМИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ..... 300
- Писарев Э., Москаленский А.** ИССЛЕДОВАНИЕ ФОТОАКТИВИРУЕМЫХ ДОНОРОВ ОКСИДА АЗОТА ДЛЯ ЛОКАЛЬНОЙ ВАЗОДИЛАТАЦИИ ..... 302
- Синицын С. А., Шерин П. С.** УФ-А ИНДУЦИРОВАННЫЕ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ ХРУСТАЛИКА ГЛАЗА ..... 305
- Харьковская Е. Е., Осипов Г. В., Мухина И. В.** МУЛЬТИЭЛЕКТРОДНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ИЗОЛИРОВАННОГО СЕРДЦА В УСЛОВИЯХ МЕХАНИЧЕСКОГО РАСТЯЖЕНИЯ И БЛОКИРОВАНИЯ МЕХАНОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ИОННЫХ КАНАЛОВ ..... 308
- Ястребова Е. С., Чернышев А. В., Строкотов Д. И.** ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ГАЗОТРАНСПОРТНОЙ ФУНКЦИИ ЭРИТРОЦИТОВ В ДЕСТАБИЛИЗАЦИИ АТЕРОМ МЕТОДОМ СКАНИРУЮЩЕЙ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ ..... 311

## РАЗДЕЛ 3

## ВИРУСОЛОГИЯ

- Александров А. Г.** ВЛИЯНИЕ ПИРИДОКСИНА НА ТЕЧЕНИЕ ВИРУС-ИНДУЦИРОВАННОГО ОСТРОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ЛЁГКИХ, ВЫЗВАННОГО ВИРУСАМИ ГРИППА А(Н1N1)PDM09 У МЫШЕЙ ..... 314
- Байков И. К., Зеленцова Е. А., Морозова В. В., Ушакова Т. А., Боковая О. В., Фофанов М. В., Чечушков А. В., Тикунова Н. В.** МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ СТРУКТУРНЫХ БЕЛКОВ ПОТЕНЦИАЛЬНО-ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ БАКТЕРИОФАГОВ ..... 319

---

<b>Баймухаметова А. М., Онгарбаева Н. С., Қалқожаева М. Қ., Сактаганов Н. Т., Лукманова Г. В., Глебова Т. И., Кливлеева Н. Г. ВЫЯВЛЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСТРЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В ЮЖНОМ КАЗАХСТАНЕ В 2019 г. ....</b>	<b>323</b>
<b>Бауэр Т. В., Сергеев А. А., Кабанов А. С., Якубицкий С. Н., Таранов О. С., Пьянков С. А., Трегубчак Т. В., Щелкунов С. Н. ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ МУТАНТНОГО ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ С УВЕЛИЧЕННОЙ ПРОДУКЦИЕЙ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВИРИОНОВ .....</b>	<b>326</b>
<b>Белявцев А. Н., Шастина Н. С., Николаева Л. И., Куприянов В. В. ЛИПОФИЛЬНЫЕ ПЕПТИДНЫЕ ИММУНОГЕНЫ ПРОТИВ ВГС .....</b>	<b>329</b>
<b>Боковая О. В., Морозова В. В., Бабкин И. В., Козлова Ю. Н., Тикунова Н. В. ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕПОЛИМЕРИЗУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ХВОСТОВЫХ БЕЛКОВ БАКТЕРИОФАГОВ PROTEUS MIRABILIS С ЦЕЛЬЮ СОЗДАНИЯ БАКТЕРИОФАГА С РАСШИРЕННЫМ СПЕКТРОМ ХОЗЯЕВ .....</b>	<b>333</b>
<b>Гладышева А. В., Протопопова Е. В., Терновой В. А. ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ВИРУСА ЕСНО 3 ПРИ ЕГО АДАПТАЦИИ К РАЗЛИЧНЫМ КУЛЬТУРАМ КЛЕТОК .....</b>	<b>335</b>
<b>Гладышева А. В., Баяндин Р. Б., Святченко В. А. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ ШТАММА ВИРУСА ЗИКА, ИЗОЛИРОВАННОГО НА ТЕРРИТОРИИ ГВИНЕЙСКОЙ РЕСПУБЛИКИ .....</b>	<b>339</b>
<b>Коврижкина В., Святченко С. В., Марченко В. Ю., Гончарова Н. С., Колосова Н. П., Сулопаров И. М., Дурыманов А. Г., Трегубчак Т. В., Онхонова Г. С., Швалов А. Н., Гудымо А. С., Ильичева Т. Н., Рыжиков А. Б. ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ВИРУСОВ ГРИППА А(Н5N8) К ИНГИБИТОРАМ НЕЙРАМИНИДАЗЫ .....</b>	<b>343</b>

- 
- Кокорина Е. В., Ибрагимова М. К., Цыганов М. М.,  
Певзнер А. М. ПРОГНОЗИРОВАНИЕ РИСКА  
РЕЦИДИВИРОВАНИЯ У ВПЧ16-ПОЗИТИВНЫХ  
БОЛЬНЫХ С ПЛОСКОКЛЕТОЧНЫМ  
ИНТРАЭПИТЕЛИАЛЬНЫМ ПОРАЖЕНИЕМ  
ТЯЖЕЛОЙ СТЕПЕНИ НА ОСНОВЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ  
ФИЗИЧЕСКОГО СТАТУСА ВИРУСА..... 345**
- Курманбекова Ж. К., Кошеметов Ж. К., Абеуов Х. Б.,  
Каукарбаева М. Ж. СЕРОМОНИТОРИНГ ЖИВОТНЫХ  
НА БЛУТАНГ НА ТЕРРИТОРИИ  
РЕСПУБЛИКИ ТАДЖИКИСТАН..... 349**
- Курманбекова Ж. К., Кошеметов Ж. К., Абеуов Х. Б.,  
Каукарбаева М. Ж. ПОЛУЧЕНИЕ И СРАВНИТЕЛЬНАЯ  
ОЦЕНКА СПЕЦИФИЧЕСКИХ СЫВОРОТОК  
К СЕРОТИПАМ ВИРУСА БЛУТАНГА..... 353**
- Ланцева К. С., Волобуева А. С., Зарубаев В. В., Дрокин Р. А.,  
Савватеев К. С., Русинов В. Л. АНТИВИРУСНАЯ  
АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНЫХ АЗОЛОАЗИНОВ  
ПРОТИВ ВИРУСА КОКСАКИ ВЗ *IN VITRO*..... 357**
- Матвеев А. Л., Козлова И. В., Стронин О. В., Емельянова Л. А.,  
Хлусевич Я. А., Байков И. К., Тикунова Н. В. ХИМЕРНОЕ  
АНТИТЕЛО ЗАЩИЩАЕТ МОДЕЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ ОТ  
ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО, СИБИРСКОГО И ЕВРОПЕЙСКОГО  
СУБТИПОВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА ..... 360**
- Маткеримова К. Г., Абеуов Х. Б., Кошеметов Ж. К.,  
Каукарбаева М. Ж. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ  
СЕРОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ  
ХЛАМИДИОЗНОГО АБОРТА ОВЕЦ ..... 364**
- Межевалова А. С., Терновой В. А., Микрюкова Т. П.,  
Протопопова Е. В., Швалов А. Н., Таранов О. С., Локтев В. Б.  
ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ВИРУСА ЛЕСА  
СЕМЛИКИ И ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИХ  
ИЗМЕНЕНИЙ В ОРГАНАХ МЫШЕЙ ЛИНИИ VALB/C,  
ИНФИЦИРОВАННЫХ ИМ ..... 367**

---

<b>Морозов А. И. РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ С В ГОРОДЕ СЕВАСТОПОЛЕ .....</b>	<b>371</b>
<b>Нурпейсова А. С., Кыдырбаев Ж., Касенов М. М., Асанжанова Н. Н., Инкарбеков Д. А., Хайруллин Б. М., Закарья К. Д. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОПЫТНО-ПРОМЫШЛЕННЫХ СЕРИЙ ВАКЦИН ИЗ АКТУАЛЬНЫХ ШТАММОВ ГРИППА ПТИЦ .....</b>	<b>374</b>
<b>Петрова П. А., Коновалова Н. И., Даниленко Д. М., Еропкин М. Ю. АНТИГЕННОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВИРУСОВ ГРИППА А(Н3N2), ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ В ЭПИДЕМИЧЕСКОМ СЕЗОНЕ 2018–2019 ГГ. ....</b>	<b>377</b>
<b>Проценко М. А., Филиппова Е. И., Ибрагимова Ж. Б., Власенко В. А., Макаревич Е. В., Мазуркова Н. А. РАЗРАБОТКА ПРОТИВОВИРУСНОГО СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ ЭКСТРАКТОВ ДЕРЕВОРАЗРУШАЮЩЕГО БАЗИДИОМИЦЕТА <i>VJERKANDERA ADUSTA</i> .....</b>	<b>379</b>
<b>Соколова А. С., Баранова Д. В., Яровая О. И., Зыбкина А. В., Щербаков Д. Н., Бормотов Н. И., Шишкина Л. Н., Салахутдинов Н. Ф. РАЗРАБОТКА КАТИОННЫХ АМФИФИЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ НА ОСНОВЕ МОНОТЕРПЕНОИДОВ В КАЧЕСТВЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРОТИВОВИРУСНЫХ АГЕНТОВ ШИРОКОГО СПЕКТРА ДЕЙСТВИЯ .....</b>	<b>383</b>
<b>Старчевская М. Е., Вяткин Ю. В., Антонец Д. В. МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ ВИРОМА <i>LEPTINOTARSA DESEMLINEATA</i> .....</b>	<b>387</b>
<b>Степанова Е. А., Крутикова Е. В., Wong P.-F. КОНСТРУИРОВАНИЕ ХИМЕРНОГО РЕАССОРТАНТА НА ОСНОВЕ ВИРУСОВ ГРИППА А И В С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДОВ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ .....</b>	<b>390</b>
<b>Ткачёва А. В., Сиволобова Г. Ф., Гражданцева А. А., Таранов О. С., Пьянков С. А., Кочнева Г. В. КОНСТРУИРОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА MVA ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ, ЭКСПРЕССИРУЮЩЕГО ВИРУСОПОДОБНЫЕ ЧАСТИЦЫ ВИРУСА МАРБУРГ .....</b>	<b>394</b>

- Усольцева П. С.** РОЛЬ НЕОНАТАЛЬНОГО FC РЕЦЕПТОРА  
В ДЕПРОТЕИНИЗАЦИИ ВИРУСОВ ЕСНО И КОКСАКИ А9..... 398
- Филиппова Е. И., Лобанова И. Е., Высочина Г. И., Мазуркова Н. А.,  
Шишкина Л. Н.** ОЦЕНКА ПРОТИВОВИРУСНОЙ  
АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ СУММЫ  
ФЛАВОНОИДОВ МАНЖЕТКИ ОБЫКНОВЕННОЙ  
(*ALCHEMILLA VULGARIS L.*) ПРИ ЗАРАЖЕНИИ МЫШЕЙ  
ВИРУСОМ ГРИППА А ..... 403
- Филиппова Е. И., Кукушкина Т. А., Проценко М. А.,  
Высочина Г. И., Лобанова И. Е., Мазурков О. Ю.,  
Шишкина Л. Н., Мазуркова Н. А.** ПРОТИВОВИРУСНЫЕ  
СВОЙСТВА ФЛАВОНОИДОСОДЕРЖАЩИХ ЭКТРАКТОВ  
ИЗ *ALCHEMILLA VULGARIS L.*..... 407
- Щербаков Д. Н., Исаева А. А., Зыбкина А. В., Волкова Н. В.,  
Иванова А. В., Казачинская Е. И., Пьянков О. В.,  
Зайковская А. В., Таранов О. С., Щербакова Н. С.**  
РЕКОМБИНАНТНЫЕ ПЛАЗМИДЫ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЕ  
СБОРКУ ФИЛОВИРУСНЫХ ВИРУСОПОДОБНЫХ ЧАСТИЦ ..... 411

## РАЗДЕЛ 4

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

- Авдеев А. А., Малахова А. А., Закиян С. М.** РАЗРАБОТКА  
СИСТЕМЫ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ЭКСПРЕССИИ  
ГЕНА GFAP СПЕЦИФИЧЕСКОГО МАРКЕРА АСТРОЦИТОВ ..... 415
- Акимова А. С., Тупота Н. Л., Кривошеина Е. И., Кузнецов А. И.,  
Карташов М. Ю., Микрюкова Т. П., Терновой В. А.**  
ДИНАМИКА И УРОВЕНЬ ИНФИЦИРОВАННОСТИ КЛЕЩЕЙ  
ВОЗБУДИТЕЛЯМИ ТРАНСМИССИВНЫХ ИНФЕКЦИЙ  
НА ТЕРРИТОРИИ НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ В 2018 г. .... 418
- Асанов М. А., Баканова М. Л.** РАК ЛЕГКОГО  
И ПАРАДОКС ДЛИНЫ ТЕЛОМЕР ..... 423



- Балыбина Н. Ю., Яковлева Т. В., Макарова Е. Н.,  
Бажан Н. М. ИЗУЧЕНИЕ ПОЛОВЫХ РАЗЛИЧИЙ  
В ЭФФЕКТЕ ФАКТОРА РОСТА ФИБРОБЛАСТОВ 21  
У МЫШЕЙ С ДИЕТ-ИНДУЦИРОВАННЫМ ОЖИРЕНИЕМ ..... 427**
- Белокопытова И. И., Родный А. Я., Кондаурова Е. М.,  
Антонов Е. В., Куликова Е. А., Науменко В. С. ИССЛЕДОВАНИЕ  
ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ 5-HT<sub>1A</sub> РЕЦЕПТОРА  
И ЕГО ЭКСПРЕССИИ В МОЗГЕ МЫШЕЙ  
ЛИНИИ ВТВР — МОДЕЛИ АУТИЗМА ..... 431**
- Бобикова А. С., Афонюшкин В. Н., Коптев В. Ю.,  
Сигарева Н. А. ВЛИЯНИЕ РАННЕГО НАКОПЛЕНИЯ  
ДОДЕКАНОИЛГОМОСЕРИНАКТОНА НА ДИНАМИКУ РОСТА  
КУЛЬТУРЫ PSEUDOMONAS AERUGINOSA ..... 434**
- Болдырева Д. С., Кечин А. А., Боярских У. А., Макарова М. А.,  
Кафтырева Л. А., Щербак С. Г., Апалько С. В., Филипенко М. Л.  
МОДИФИЦИРОВАННЫЙ МЕТОД ФРАГМЕНТАЦИИ  
ГЕНОМНОЙ ДНК ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ БИБЛИОТЕК NGS ..... 437**
- Браун Л. А., Степанова Д. С., Куликов Ф. В., Варпетян Э. Э.,  
Татаркова Д. С., Шимановский Н. Л.  
ПОИСК ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ НЕЙРОФИБРОМАТОЗОВ,  
ОСНОВАННОЙ НА ИЗМЕНЕНИИ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО  
ПРОФИЛЯ КЛЕТОК ОПУХОЛЕЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ  
С НЕЙРОФИБРОМАТОЗОМ 1 И 2 ТИПА ..... 441**
- Бычков В. А., Небова Ю. А., Ларионова И. В., Бондарь Л. Н.,  
Перельмутер В. М. ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРОВ  
ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОГО ПЕРЕХОДА  
В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ПРИ ПЛОСКОКЛЕТОЧНЫХ  
КАРЦИНОМАХ ОБЛАСТИ ГОЛОВЫ И ШЕИ И ИХ СВЯЗЬ  
С МЕТАСТАЗИРОВАНИЕМ ..... 444**
- Вавилова В. Ю., Вударски Я., Березиков Е. В., Устьянцев К. В.  
ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА АКТИВАЦИИ  
LTR-РЕТРОТРАНСПОЗОНОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ  
ТЕПЛООВОГО ШОКА У МОДЕЛЬНОГО  
РЕГЕНЕРИРУЮЩЕГО ПЛОСКОГО ЧЕРВЯ  
MACROSTOMUM LIGNANO ..... 448**

- Варламова Е. Г., Гольтязев М. В.** ВЛИЯНИЕ СЕЛЕНСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ РАКОВЫХ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ И ЭКСПРЕССИЮ КЛЮЧЕВЫХ УЧАСТНИКОВ СТРЕССА ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА..... 452
- Волкова Н. В.** ПОЛУЧЕНИЕ ПАНЕЛИ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИГЕНОВ — КОМПОНЕНТОВ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ЛИХОРАДКИ МАРБУРГ ... 456
- Гаптулбарова К. А., Певзнер А. М., Ибрагимова М. К., Цыганов М. М.** УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ мРНК BRCA1 КАК ПОКАЗАТЕЛЬ ХИМОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ..... 460
- Грищенко И. В., Пурвиньш Я. В.** ТРАНСКРИПЦИЯ И РЕПЛИКАЦИЯ КАК ВЕРОЯТНЫЙ ИСТОЧНИК НЕСТАБИЛЬНОСТИ ТАНДЕМНЫХ ПОВТОРОВ В КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ ЧЕЛОВЕКА ..... 464
- Дампилова Т. Д., Шарыш Д. В., Марков А. В., Королева Ю. А., Слепцов А. А., Зарубин А. А., Голубенко М. В., Бабушкина Н. П., Валиахметов Н. Р., Казанцев А. Н., Бурков Н. Н., Барбараш О. Л., Пузырев В. П., Назаренко М. С.** МЕТИЛИРОВАНИЕ ГЕНА МИКРОРНК miR127 В КЛЕТКАХ СОННЫХ АРТЕРИЙ И КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С АТЕРОСКЛЕРОЗОМ ..... 466
- Данько К. В., Некрасова Е. В., Шавва В. С., Могиленко Д. А., Кудрявцев И. В., Орлов С. В.** ВЛИЯНИЕ АНАФИЛАТОКСИНА С3А НА ПОЛЯРИЗАЦИЮ МАКРОФАГОВ ПО ФЕНОТИПАМ M1 И M2, ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ ИЗ МОНОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ..... 471
- Дмитриева М. Д., Дымова М. А., Войтова А. А., Нуштаева А. А., Коваль О. А., Мишинов С. В., Кулигина Е. В.** ПЕРВИЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ОПУХОЛЬ-АДРЕСУЮЩЕЙ ТЕРАПИИ ГЛИОМ ..... 475

---

<b>Дронова Т. А., Бабышкина Н. Н., Паталяк С. В., Чердынцева Н. В.</b> ВКЛАД ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ БЕЛКОВ Akt (p473) И ЦИКЛИНА D1 В МЕХАНИЗМЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АДЬЮВАНТНОЙ ГОРМОНОТЕРАПИИ ТАМОКСИФЕНОМ У БОЛЬНЫХ ЭСТРОГЕН-ПОЗИТИВНЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ .....	478
<b>Егорова К. В., Сухарева Е. В., Калинина Т. С.</b> ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ЭКСПРЕССИИ ЦИТОКИНОВ МОЗГА КРЫС К ВВЕДЕНИЮ ДЕКСАМЕТАЗОНА В РАННЕМ ОНТОГЕНЕЗЕ .....	481
<b>Еремин Д. В., Хоцкин Н. В., Ильчибаева Т. В., Цыбко А. С.</b> ЭФФЕКТЫ ЦЕНТРАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ДОФАМИНОВОГО НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА (CDNF) НА ПОВЕДЕНИЕ И ЭКСПРЕССИЮ КЛЮЧЕВЫХ ГЕНОВ СЕРТОНИНЕГРИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ МОЗГА МЫШЕЙ C57Bl6/J .....	484
<b>Ермаков Е. А., Бунева В. Н., Невинский Г. А.</b> КАТАЛИТИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА С НУКЛЕАЗНЫМИ АКТИВНОСТЯМИ КАК МАРКЕР НАРУШЕНИЙ В ИММУННОЙ СИСТЕМЕ БОЛЬНЫХ ШИЗОФРЕНИЕЙ.....	486
<b>Журавина М. А., Савельева А. В., Нуштаева А. А., Немудрая А. А., Филиппова Ю. А., Степанов Г. А., Семенов Д. В.</b> АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ АНАЛОГА КОЛЬЦЕВОЙ РНК SIN3A В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА .....	489
<b>Журилов П. А., Псарева Е. К., Лискова Е. А., Егорова И. Ю.</b> ИЗУЧЕНИЕ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ШТАММОВ LISTERIA MONOCYTOGENES, ПРИНАДЛЕЖАЩИХ К РАЗНЫМ КЛОНАЛЬНЫМ КОМПЛЕКСАМ И ЦИРКУЛИРОВАВШИХ НА ТЕРРИТОРИИ СССР И РФ В ПЕРИОД С 1947 ПО 2008 ГОД.....	494
<b>Зайнутдинов С. С., Сиволобова Г. Ф., Гражданцева А. А., Кочнева Г. В.</b> ИЗМЕНЕНИЕ ОНКОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ВИРУСА СЕНДАЙ ПРИ АДАПТАЦИИ К РАЗНЫМ СИСТЕМАМ РЕПЛИКАЦИИ .....	498
<b>Запарина О. Г., Ковнер А. В.</b> МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ АНТИОКСИДАНТ SKQ1 ПРЕПЯТСТВУЕТ РАЗВИТИЮ НЕОПЛАЗИИ ЖЕЛЧНЫХ ПРОТОКОВ .....	501

- Зиновкин Д. А.** СТРОМАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ  
PGRMC1 И GALECTIN-1 ЭНДОМЕТРИОИДНОЙ  
АДЕНОКАРЦИНОМОЙ ЭНДОМЕТРИЯ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ  
ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ ..... 501
- Иванова А. А., Максимов В. Н., Малютина С. К.,  
Новоселов В. П., Воевода М. И.** ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИАЦИИ  
ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ RS61999948,  
RS7172586 С ВНЕЗАПНОЙ СЕРДЕЧНОЙ СМЕРТЬЮ ..... 507
- Иванощук Д. Е., Валеев Э. С., Белокопытова П. С.,  
Фенькова О. В., Михайлова С. В., Шахтшнейдер Е. В.,  
Фишман В. С., Фурсова А. Ж., Воевода М. И.** ПОИСК ПОТЕНЦИАЛЬНО ПАТОГЕННЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ  
ВАРИАНТОВ У ПАЦИЕНТОВ С ВРОЖДЕННОЙ ГЛАУКОМОЙ:  
ПЕРВИЧНЫЕ ДАННЫЕ ИНТЕРПРЕТАЦИИ  
ДВУХ КЛИНИЧЕСКИХ СЛУЧАЕВ ..... 510
- Игитхян А. Э., Карапетян Д. Д.** ИСПОЛЬЗОВАНИЕ  
МИКРОКОНЦЕНТРАЦИОННЫХ СИСТЕМ ДЛЯ  
КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭНДОГЕННЫХ  
БИОМАРКЕРОВ В ВЫДЫХАЕМОМ ВОЗДУХЕ ..... 515
- Кебекбаева А. Е., Шарыш Д. В., Марков А. В., Слепцов А. А.,  
Казанцев А. Н., Бурков Н. Н., Барбараш О. Л., Пузырев В. П.,  
Назаренко М. С.** МЕТИЛИРОВАНИЕ РЕТРОТРАНСПОЗОНА  
LINE-1 В КЛЕТКАХ СОННЫХ АРТЕРИЙ И КРОВИ ПАЦИЕНТОВ  
С АТЕРОСКЛЕРОЗОМ 518
- Кожевникова О. С., Телегина Д. В.** ЭКСПРЕССИЯ  
ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ,  
РЕГУЛИРУЮЩИХ НЕЙРОГЕНЕЗ, В СЕТЧАТКЕ  
ПРЕЖДЕВРЕМЕННО-СТАРЕЮЩИХ КРЫС OXYS ..... 522
- Козлов Е. Н., Жукова М. В., Гильмутдинов Р. А., Шидловский Ю. В.**  
УДАЛЕНИЕ 3'UTR мРНК ORB2 ПРИВОДИТ  
К ИЗМЕНЕНИЮ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ  
И ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ  
КОДИРУЕМОГО БЕЛКА В НЕЙРОНАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА  
DROSOPHILA MELANOGASTER ..... 526

---

<b>Колобова А. В., Гопаненко А. В., Малыгин А. А., Тупикин А. Е., Кабилов М. Р., Карпова Г. Г. ИДЕНТИФИКАЦИЯ НЕКАНОНИЧЕСКИХ ФУНКЦИЙ РИБОСОМНОГО БЕЛКА eL29 ЧЕЛОВЕКА В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ.....</b>	<b>530</b>
<b>Кондратьева Л. Г., Чернов И. П. ВЛИЯНИЕ ЭКТОПИЧЕСКОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА PDX1 НА ПРОЛИФЕРАТИВНЫЙ И МИГРАЦИОННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ КЛЕТОК РАКА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ.....</b>	<b>532</b>
<b>Коршунов А. С., Конев В. П., Вагнер В. Д., Курятников К. Н. ИССЛЕДОВАНИЕ ЭМАЛЕВЫХ ПРИЗМ ПРИ ДИСПЛАЗИИ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ В РАЗЛИЧНЫЕ ПЕРИОДЫ ПОСТНАТАЛЬНОГО ОНТОГЕНЕЗА МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ .....</b>	<b>537</b>
<b>Кузнецов А. И., Чуб Е. В., Кривошеина Е. И. ВЫЯВЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНЫХ ЗАМЕН НА УЧАСТКЕ ГЕНА NS5A ВИРУСА ГЕПАТИТА С, СВЯЗАННЫХ С УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ЛЕКАРСТВЕННЫМ ПРЕПАРАТАМ ПРЯМОГО ДЕЙСТВИЯ .....</b>	<b>542</b>
<b>Куликов Ф. В., Степанова Д. С., Браун Л. А., Татаркова Д. С., Завьялов Г. А., Шимановский Н. Л. ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАПУСКА КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ АКТИВИРОВАННОЙ МАЛОЙ ГТФАЗОЙ RAS1 ПРИ ТРАНСЛОКАЦИИ ЕЁ В ЯДРО ПОД ДЕЙСТВИЕМ СТАТИНОВ И БИСФОСФОНАТОВ.....</b>	<b>546</b>
<b>Ланшаков Д. А. ПОДАВЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ p75NTR ПРИ ПОМОЩИ CRISPRi.....</b>	<b>549</b>
<b>Марков А. В., Бабич В. О., Попадюк И. И., Саломатина О. В., Логашенко Е. Б., Салахутдинов Н. Ф., Зенкова М. А. ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКИЕ ЖЕЛЧНЫЕ КИСЛОТЫ: ВЗАИМОСВЯЗЬ «СТРУКТУРА-АКТИВНОСТЬ» И ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ПОТЕНЦИАЛ.....</b>	<b>553</b>
<b>Матвеева А. М., Филиппова Ю. А., Журавлев Е. С., Семенов Д. В., Власов В. В., Степанов Г. А. РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОВ МАЛЫХ ЯДРЫШКОВЫХ РНК ВЫЯВИЛО НОВЫЙ ПУТЬ РЕГУЛЯЦИИ СПЛАЙСИНГА ДЛИННОЙ НЕКОДИРУЮЩЕЙ РНК GAS5 .....</b>	<b>557</b>

- Мифтахов Р. А., Василисков В. А., Тимофеев Э. Н.,  
Кузнецова В. Е., Шершов В. Е., Лапа С. А., Чудинов А. В.**  
ЭФФЕКТ «ПРОСКАЛЬЗЫВАНИЯ» В РЕАКЦИИ  
ДОСТРАИВАНИЯ ПРАЙМЕРА ТАQ ДНК ПОЛИМЕРАЗОЙ  
ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МОДИФИЦИРОВАННОГО  
2'-ДЕЗОКСИУРИДИНТРИФОСФАТА..... 559
- Монахова В. С., Пигарева Н. В., Демьянова Е. В., Симбирцев А. С.**  
МАСШТАБИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА БИОСИНТЕЗА  
РЕКОМБИНАНТНОГО ФОЛЛИКУЛОСТИМУЛИРУЮЩЕГО  
ГОРМОНА ЧЕЛОВЕКА В КЛЕТКАХ ЯИЧНИКА  
КИТАЙСКОГО ХОМЯЧКА ..... 562
- Мунгалов Р. В., Фишман В. С., Хабарова А. А.** ИССЛЕДОВАНИЕ  
ВЛИЯНИЯ ХРОМОСОМНЫХ ПЕРЕСТРОЕК  
НА ТРЁХМЕРНУЮ ОРГАНИЗАЦИЮ ГЕНОМА  
И ПРОФИЛЬ ГЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ..... 565
- Небова Ю. А., Бычков В. А., Литвяков Н. В.**  
МОДЕЛИРОВАНИЕ ВНУТРИОПУХОЛЕВЫХ  
ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ *IN VITRO* С ПРИМЕНЕНИЕМ  
3 КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ..... 568
- Некрасова Е. В., Данько К. В., Кузьмина Д. О., Орлов С. В.**  
РЕГУЛЯЦИЯ МЕЖДУ НЕТРИНОМ-1 И АПОЛИПОПРОТЕИНОМ  
А-1 НА ТРАНСКРИПЦИОННОМ УРОВНЕ..... 572
- Певзнер А. М., Гаптулбарова К. А., Ибрагимова М. К.,  
Цыганов М. М.** ДЕЛЕЦИЯ И ПОТЕРЯ ГЕТЕРОЗИГОТНОСТИ  
В ГЕНЕ РЕПАРАЦИИ *BRCA1* КАК ПРЕДИКТИВНЫЙ  
МАРКЕР У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ  
БЕЗ ГЕРМИНАЛЬНЫХ МУТАЦИЙ ..... 574
- Полежаева О. А., Зыбкина А. В., Щербаков Д. Н., Кочнева Г. В.**  
ПОЛУЧЕНИЕ АНТИТЕЛ КЛАССА  $\gamma$ , СПОСОБНЫХ  
НЕЙТРАЛИЗОВАТЬ ПСЕВДОВИРУСЫ, НЕСУЩИЕ НА СВОЕЙ  
ПОВЕРХНОСТИ GP ТРЁХ ШТАММОВ ВИРУСА МАРБУРГ ..... 578
- Пономарев Д. В.** ЭКСКРЕТОРНО-СЕКРЕТОРНЫЙ ПРОДУКТ  
*ORISTHORCHIS FELINEUS* УВЕЛИЧИВАЕТ ПОКАЗАТЕЛИ  
ЗЛОКАЧЕСТВЕННОСТИ ХОЛАНГИОЦИТОВ H69 ..... 582

---

<b>Пурвиньш Л. В., Седых С. Е., Невинский Г. А.</b> БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ ЭКЗОСОМ МОЛОКА .....	585
<b>Рак А. Я., Трофимов А. В., Горбунов Н. П., Соколов А. В., Ищенко А. М. ИССЛЕДОВАНИЕ АФФИННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРОИЗВОДНЫХ РЕКОМБИНАНТНОГО АНТИМЮЛЛЕРОВА ГОРМОНА ЧЕЛОВЕКА С РЕКОМБИНАНТНЫМ РЕЦЕПТОРОМ II ТИПА.....</b>	587
<b>Резвых А. М., Азарнова Т. О., Найденский М. С., Луговая И. С., Остренко К. С. РЕАЛИЗАЦИЯ АНТИОКСИДАНТНЫХ И ОБМЕНОСТИМУЛИРУЮЩИХ СВОЙСТВ ФЕРУЛОВОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ НИВЕЛИРОВАНИЯ ГИПОКСИИ У ЭМБРИОНОВ КУР .....</b>	591
<b>Рифель Н. А., Шевченко А. И. РОЛЬ ГЕНА Xist В ИМПРИНТИРОВАННОЙ ИНАКТИВАЦИИ У ПОЛЕВКИ M. LEVIS .....</b>	595
<b>Родный А. Я., Кондаурова Е. М., Ильчибаева Т. В., Антонов Е. В., Науменко В. С. ВЛИЯНИЕ СВЕРХЭКСПРЕССИИ ГЕНА 5-HT7 РЕЦЕПТОРОВ В МОЗГЕ МЫШЕЙ, СОДЕРЖАЩИХСЯ В УСЛОВИЯХ СОКРАЩЕННОЙ ДЛИНЫ СВЕТООВОГО ДНЯ, НА ПЛАСТИЧНОСТЬ СЕРОТОНИНОВОЙ СИСТЕМЫ МОЗГА .....</b>	598
<b>Рудных С. К., Воробьева М. Ю., Маматкулов К. З., Арзуманян Г. М. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ И КОЛЕБАТЕЛЬНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ ФОСФОЛИПИДОВ .....</b>	601
<b>Рудометов А. П., Рудометова Н. Б., Щербаков Д. Н., Бакулина А. Ю., Чикаев А. Н., Ильичев А. А., Карпенко Л. И. ДИЗАЙН ИММУНОГЕНОВ, ВКЛЮЧАЮЩИХ ОБЛАСТИ УЯЗВИМОСТИ ВИЧ-1, И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ.....</b>	603
<b>Рудометова Н. Б., Щербакова Н. С., Щербаков Д. Н., Рудометов А. П., Карпенко Л. И. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПАНЕЛИ ПСЕВДОВИРУСОВ ВИЧ-1 НА ОСНОВЕ ИЗОЛЯТОВ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ РФ, ДЛЯ ОЦЕНКИ КАНДИДАТНЫХ ВАКЦИН ПРОТИВ ВИЧ-1 И СКРИНИНГА СОЕДИНЕНИЙ, БЛОКИРУЮЩИХ ПРОНИКНОВЕНИЕ ВИЧ-1 .....</b>	607

- Савиновская Ю. И., Нуштаева А. А., Савельева А. В., Морозова В. В., Рябчикова Е. И., Кулигина Е. В., Степанов Г. А., Семенов Д. В. ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В КЛЕТКАХ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЕГКИХ A549, ИНДУЦИРОВАННЫЕ МЕМБРАННЫМИ ЧАСТИЦАМИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА..... 611**
- Сарсенова Е. А., Султанова Р. Ф., Полина Ю. А., Домондон М., Янкелевич И. А., Илатовская Д. В. ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ВАЗОПРЕССИНА И НАТРИЙУРЕТИЧЕСКОГО ГОРМОНА В ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ТЕРМИНАЛЬНОЙ ЧАСТИ СОБИРАТЕЛЬНЫХ ТРУБОЧЕК НЕФРОНА ПРИ СОЛЕЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ ГИПЕРТОНИИ ..... 614**
- Седых С. Е., Пурвиньш Л. В., Невинский Г. А. ЭКЗОСОМЫ МОЛОКА — СРЕДСТВА ДОСТАВКИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК..... 617**
- Синицкий М. Ю., Цепокина А. В., Шишкова Д. К., Кутихин А. Г. СЕКРЕЦИЯ И УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПРОАТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИХ ЦИТОКИНОВ В КУЛЬТУРАХ ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ, ЭКСПОНИРОВАННЫХ МУТАГЕНОМ..... 619**
- Соколова Е. В., Псарева Е. К., Егорова И. Ю., Лискова Е. А., Журилов П. А., Ермолаева С. А. ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ АМПЛИФИКАЦИИ МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ С ПРИМЕНЕНИЕМ СПЕЦИФИЧНЫХ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПАТОГЕННЫХ ШТАММОВ LISTERIA MONOCYTOGENES С ИНВАЗИВНОЙ АКТИВНОСТЬЮ ..... 623**
- Ставицкая З. О., Рудиковская Е. Г., Дударева Л. В. ОСОБЕННОСТИ УГЛЕВОДНОГО СОСТАВА ТКАНЕЙ MALUS VASSATA, MALUS DOMESTICA И ИХ ГИБРИДОВ, ВЫРАЩИВАЕМЫХ НА ТЕРРИТОРИИ ЮЖНОГО ПРИБАЙКАЛЬЯ ..... 627**
- Старостина Е. В., Каплина О. Н., Карпенко Л. И., Дудко С. Г., Антонен Д. В., Бажан С. И. ОЦЕНКА ИММУНОГЕННЫХ И ПРОТЕКТИВНЫХ СВОЙСТВ ПОЛИЭПИТОПНЫХ Т-КЛЕТОЧНЫХ ИММУНОГЕНОВ ПРОТИВ ВИРУСА ГРИППА А ..... 629**



---

<b>Субботина К. В.</b> ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ТЕСТОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ САРКОМЫ ЮИНГА И ПРИМИТИВНЫХ НЕЙРОЭКТОДЕРМАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ.....	634
<b>Сутормин Д. А., Галивонджян А. Х., Северинов К. В.</b> ПОИСК САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ ТОПОИЗОМЕРАЗЫ I В ГЕНОМЕ E. COLI.....	637
<b>Тишина Е. А., Дроганова Т. С., Анка М.</b> ВЛИЯНИЕ КАТИОНОВ ЦИНКА НА АКТИВНОСТЬ И СОСТАВ МНОЖЕСТВЕННЫХ ФОРМ ЖИВОРОДКИ РЕЧНОЙ.....	642
<b>Товпеко Д. В., Калужная Л. И., Чеботарев С. В., Меньшиков Н. О.</b> ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИЯ ТКАНИ ПУПОВИНЫ ЧЕЛОВЕКА КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ БЕСКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ И ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ.....	646
<b>Торопов В. А.</b> СИСТЕМА АДАПТИВНОГО ИММУНИТЕТА CRISPR/CAS ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ L. HELVETICUS D75 И D76.....	650
<b>Тугбаева А. С., Ермошин А. А., Киселева И. С.</b> R2R3-МУВ ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ РЕГУЛИРУЮТ БИОСИНТЕЗ ЛИГНИНА В РАСТЕНИЯХ СЕМЕЙСТВА SOLANACEAE: БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ.....	653
<b>Чиглинцева Д. А., Патутина О. А., Биченкова Е. В., Миронова Н. Л., Власов В. В., Зенкова М. А.</b> НАПРАВЛЕННОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ ОНКОГЕННЫХ МИКРОРНК В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ИСКУССТВЕННЫХ РИБОНУКЛЕАЗ.....	657
<b>Шарыш Д. В., Марков А. В., Григорьева Е. С., Савельева О. Е., Назаренко М. С.</b> КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ КОРОНАРНЫХ АРТЕРИЙ НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ АТЕРОГЕНЕЗА У ЧЕЛОВЕКА...	660
<b>Щербакова Е. С., Салль Т. С., Вахитов Т. Я., Жахов А. В., Ищенко А. М., Демьянова Е. В.</b> СКРИНИНГ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕТАБОЛИТОВ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ in vitro НА МОДЕЛИ СТЕАТОЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КЛЕТОК HepG2.....	664

---

<b>Щур В. В., Усанов С. А., Янцевич А. В.</b> ПРОГРАММИРУЕМАЯ СБОРКА ПРОТЯЖЕННЫХ ДНК СИНТОНОВ .....	669
<b>Яньшолё Л. В., Зеленцова Е. А., Мельников А. Д.</b> ИССЛЕДОВАНИЕ ПОСМЕРТНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В МЕТАБОЛОМНОМ СОСТАВЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ .....	673
<b>Яхненко А. С., Соколова А., Ханаев И., Ицкович В. Б.</b> ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ПРЕСНОВОДНЫХ ГУБОК СЕМЕЙСТВ SPONGILLIDAE И LUBOMIRSKIIDAE, СОБРАННЫХ В ГЕОГРАФИЧЕСКИ УДАЛЕННЫХ РАЙОНАХ, С ПОМОЩЬЮ ДВУХ БАРКОДИНГ-МАРКЕРОВ .....	675
<b>Ячменёва М. П., Бенимецкая К. С., Щербакова Л. В., Астраков С. В., Денисова Д. В., Рагино Ю. И.</b> РОЛЬ БЕЛКА PCK9 В ПАТОГЕНЕЗЕ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ.....	678
Указатель авторов.....	682

Научное издание

**VI МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ  
МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ:  
БИОТЕХНОЛОГОВ,  
МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ И ВИРУСОЛОГОВ**

Сборник тезисов

*Верстка А. С. Терешкиной*

Подписано в печать 11.10.2019 г.  
Формат 60 × 84 1/16. Уч.-изд. л. 44,7. Усл. печ. л. 41,6.  
Тираж 180 экз. Заказ № 238.  
Издательско-полиграфический центр НГУ  
630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2.